

PART

EXPERIMENTAL

– Materials i mètodes –

Capítol 8: Protocols de biología molecular

8 Protocols de biologia molecular

8.1 Capítol 2: Estudi de l'essencialitat de les possibles glicosiltransferases de *Mycoplasma genitalium*

8.1.1 Preparació de medi SP4

La preparació de medi SP4, medi complex que s'usa per al creixement de *Mycoplasma genitalium*, té lloc com s'explica a continuació. A la Taula 8.1 se'n presenten els components i els volums corresponents per a la preparació de 500 mL de medi líquid.

Taula 8.1. Composició i preparació del medi SP4.

Compost	Quantitat per a 500 mL
Preparació de la base	
PPLO (Difco)	1.75 g
Triptona (Difco)	5 g
Bactopeptona (Difco)	2.65 g
Glucosa (Sigma-Aldrich)	2.5 g
Aigua destil·lada	Fins a 312 mL
Preparació dels complementos	
Yestolate 2 % autoclavat (Difco)	50 mL
Roig de fenol 0.1 % pH 7 autoclavat	7 mL
Extracte de llevat fresc 25 %	17.5 mL
CMRL 10x (Invitrogen)	25 mL
Sèrum boví fetal (Invitrogen)	85 mL
Glutamina 29.2 mg/mL	1.71 mL

Inicialment es mesclen tots els components corresponents a la base del medi i s'ajusta el pH a 7.8 amb NaOH 1 M. El conjunt s'autoclava 15 min a 120 °C i es deixa refredar abans d'afegir-hi els complementos. Un cop aquests s'han addicionat, cal comprovar que el pH del medi es manté entre 7.6 i 7.8.

La preparació de l'extracte de llevat té lloc a partir de la dilució de 250 g de llevat fresc en 1 L d'aigua destil·lada. El resultat s'autoclava durant 10 min a 115 °C. La suspensió es refreda en gel i se centrifuga a 380 g i 4 °C durant 10 min. El sobrenedant s'autoclava de nou en les mateixes condicions i es conserva fins al seu ús a -20 °C, en alíquotes de 20 mL. Pel que fa al sèrum boví fetal, s'escalfa a 56 °C durant 30 min per tal d'inactivar el sistema completament.

La preparació de medi SP4 sòlid s'aconsegueix amb l'addició d'un 0.8 % d'agar noble (Difco) a la base del medi, la qual s'autoclava i es manté a 56 °C durant 1 hora. A continuació s'hi afageixen els complementos prèviament escalfats també a 56 °C i el conjunt es dispensa en plaques de Petri de 50 mm de diàmetre en volums de 5 – 6 mL, les quals es guarden a 4 °C fins al seu ús.

8.1.2 Obtenció d'ADN genòmic de *Mycoplasma genitalium*

Per tal d'iniciar el creixement del bacteri, s'inoculen 20 mL de medi SP4 estèril amb 50 µL d'un glicerinat de *Mycoplasma genitalium*. El cultiu s'incuba a 37 °C i 5 % de CO₂ durant 96 hores fins que assoleix la fase estacionària

del seu creixement i s'observa que el marcador de pH que conté el medi ha virat cap a color taronja. Les cèl·lules es renten 2 vegades amb 5 mL de PBS. Per tal de separar-les de la superfície del tub Falcon on les cèl·lules creixen adherides, s'utilitza 1 mL de solució rascadora, de composició 0.1 M Tris-HCl pH 8, 0.5 M NaCl i 10 mM EDTA i un *cell scraper*. Per extreure el conjunt del falcon s'empra 1 mL més de solució rascadora. Per tal de lisar les cèl·lules, aquestes s'incuben durant 5 min a temperatura ambient després d'addicionar 50 µL de SDS 20 %. A continuació, s'addiciona proteïnasa K a una concentració final de 50 µg/mL i la mescla (2 mL) s'incuba durant 1 hora a 55 °C amb agitació suau. Tot seguit s'addiciona un volum de fenol/cloroform i es mescla. Se centrifuga la mostra durant 10 min a 16000 g i es recull la fase superior amb una punta de pipeta retallada. Aquesta acció es repeteix dues vegades més. Finalment, l'ADN es precipita mitjançant l'addició de 2 volums d'etanol absolut i la seva centrifugació durant 5 min a 16000 g. El *pellet* d'ADN es renta amb dos volums d'etanol al 70 % i s'asseca al buit durant 30 min. Per tal de resuspendre l'ADN, s'addicionen 200 µL de tampó Tris-EDTA i la mostra es manté O/N a 4 °C. Un cop resuspensa, la mostra es guarda a -20 °C.

8.1.3 Amplificació per PCR dels braços de recombinació necessaris per a l'obtenció de *knock-outs* dels gens *mg025*, *mg060* i *mg517*

A la Taula 8.2 es presenten les condicions en les quals té lloc l'amplificació per PCR dels braços de recombinació dissenyats per a l'obtenció dels *knock-outs* dels gens *mg025*, *mg060* i *mg517*.

Taula 8.2. Condicions de reacció de la PCR d'amplificació dels braços de recombinació

Compost	Concentració stock	Concentració final
MgCl ₂	50 mM	3 mM
encebadors	5 µM	0.25 µM
ADN genòmic	21 pg/µL	200 pg
dNTPs (cadascun)	10 mM	400 µM
EcoTaq Polymerase (Ecogen)	4 U/ µL	4 U

Les mostres per a tal objectiu es preparen segons l'establert en la Taula 8.3, en un volum final de reacció de 20 µL. Ja que es tracta d'una reacció de PCR en la qual el motlle és ADN genòmic, cal iniciar el procediment amb un *hot start*. Així, es mesclen tots els components establerts en la Taula 8.3, amb l'excepció dels dNTPs i la polimerasa. Les mostres es mantenen 5 min a 96 °C. A continuació es posen en gel i s'hi addicionen els components que hi manquen. A partir d'aquí, se sotmeten als cicles que s'estableixen en la Figura 8.1, els quals tenen lloc en un termociclador MJ Research, mod. PTC-200. En finalitzar aquests, els resultats es visualitzen en un gel d'agarosa de l'1 %, el qual es tenyeix amb bromur d'etidi. Els pesos moleculars de les bandes s'estableixen per comparació amb el marcador de pesos moleculars Molecular Weight Marker III de Roche. El control positiu emprat consisteix en l'amplificació del gen *mg025* usant com a motlle l'ADN genòmic del micoplasma, les condicions per a la qual van establir-se en un treball anterior [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007].

Taula 8.3. Volums de cada component de la PCR per a l'obtenció dels braços de recombinació

	Aigua mQ	Tampó EcoTaq	MgCl ₂	ADN genòmic	dNTPs	Encebador directe	Encebador revers	EcoTaq
Mostres	3 µL	2 µL	1.2 µL	10 µL	0.8 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Control positiu	3 µL	2 µL	1.2 µL	10 µL	0.8 µL	1 µL	1 µL	1 µL

Seqüència de PCR:			
Desnaturalització inicial		5 min	94 °C
	Desnaturalització	1 min	94 °C
Cicle (x30)	Hibridació	1 min	Control + 58 °C
			mg025RA-5' 55 °C
			mg025LA-3' 57 °C
			mg060RA-5' 54 °C
			mg060LA-3' 56 °C
			mg517RA-5' 53 °C
Elongació	1 min 30 s	72 °C	
Extensió final		4 min	72 °C
Conservació		∞	4 °C

Figura 8.1. Cicles de PCR per a l'obtenció dels braços de recombinació.

Per tal de recuperar els fragments amplificats, aquests s'extreuen del gel d'agarosa amb el kit DNA QIAquick® de QIAGEN, segons les instruccions subministrades pel fabricant.

8.1.4 Digestió dels fragments necessaris per a la construcció de pΔmg025, pΔmg060 i pΔmg517

8.1.4.1 Digestió dels braços de recombinació dels gens *mg025*, *mg060* i *mg517*

A la Taula 8.4 es presenten les condicions sota les quals s'han digerit els diferents braços de recombinació per als tres gens de *Mycoplasma genitalium* en estudi.

Taula 8.4. Condicions de digestió pels braços de recombinació

Braç	Enzims	Condicions de digestió
mg025RA	<i>Sal I</i> i <i>EcoR I</i> 10 U	Tampó EcoR I (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 0.025 % triton x-100)
mg025LA	<i>BamH I</i> i <i>Hind III</i> 10 U	Seqüencial: <i>BamH I</i> amb tampó 3 de NE Biolabs (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT) i BSA 100x <i>Hind III</i> amb tampó 2 de NE Biolabs (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT)
mg060RA	<i>Sal I</i> i <i>EcoR I</i> 10 U	Tampó EcoR I (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 0.025 % triton x-100)
mg060LA	<i>BamH I</i> i <i>Hind III</i> 10 U	Seqüencial: <i>BamH I</i> amb tampó 3 de NE Biolabs (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT) i BSA 100x <i>Hind III</i> amb tampó 2 de NE Biolabs (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT)
mg517RA	<i>Sal I</i> i <i>EcoR I</i> 10 U	Tampó EcoR I (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 0.025 % triton x-100)
mg517LA	<i>BamH I</i> i <i>Nde I</i> 10 U	Tampó 3 de NE Biolabs (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT) i BSA 100x

En els casos en què s'indica, ha estat necessària una digestió seqüencial amb un pas de recuperació del fragment digerit a partir d'un gel d'agarosa i la seva purificació amb el kit DNA QIAquick® de QIAGEN, segons les instruccions subministrades pel fabricant.

Les digestions tenen lloc en un volum final de 60 µL, ja que l'esmentat kit deixa la banda estreta en un volum de 50 µL i aquest s'utilitza en la seva totalitat per a la digestió. Les reaccions es preparen segons el que s'indica a la Taula 8.5. Tots els enzims i els seus corresponents tampons de reacció han estat subministrats per New England Biolabs.

Taula 8.5. Components de les reaccions de digestió dels braços de recombinació.

Mostra	ADN	Tampó 10x	BSA 100x	Aigua mQ	Enzim 20U/ µL	Enzim 20U/ µL
mg025RA	45 µL	EcoR I - 6 µL	-	8.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
mg025LA 1ª dig.	45 µL	Tampó 3 - 6 µL	0.6 µL	7.9 µL	0.5 µL	-
mg025LA 2ª dig.	45 µL	Tampó 2 - 6 µL	-	8.5 µL	0.5 µL	-
mg060RA	45 µL	EcoR I - 6 µL	-	8.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
mg060LA 1ª dig.	45 µL	Tampó 3 - 6 µL	0.6 µL	7.9 µL	0.5 µL	-
mg060LA 2ª dig.	45 µL	Tampó 2 - 6 µL	-	8.5 µL	0.5 µL	-
mg517RA	45 µL	EcoR I - 6 µL	-	8.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
mg517LA	45 µL	Tampó 3 - 6 µL	0.6 µL	7.9 µL	0.5 µL	0.5 µL

Les digestions s'incuben a 37 °C O/N i els fragments es visualitzen en un gel d'agarosa de l'1 %, d'on s'extreuen amb el kit de purificació DNA QIAquick® de QIAGEN. Es comprova que la longitud de les bandes és l'esperada gràcies al marcador de pesos moleculars DNA Molecular Weight Marker III de Roche.

8.1.4.2 Digestió del vector pUC18

En aquest cas cal generar dues poblacions diferents de vectors pUC18, una primera digerida amb *Sal I* i *Hind III* i una segona digerida amb *Sal I* i *Nde I*. Per a la primera digestió se segueix un procediment seqüencial, ja que l'acció dels dos enzims de restricció no és compatible en un mateix medi de reacció. Per contra, la segona digestió té lloc en un únic pas, tal com s'indica a la Taula 8.6.

Taula 8.6. Condicions de digestió del vector pUC18

Enzims		Condicions de digestió
pUC18	<i>Sal I</i> i <i>Hind III</i> 10 U	Seqüencial: <i>Sal I</i> amb tampó 3 de NE Biolabs (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT) i BSA 100x <i>Hind III</i> amb tampó 2 de NE Biolabs (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT)
		Tampó 3 de NE Biolabs (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT) i BSA 100x
pUC18	<i>Sal I</i> i <i>Nde I</i> 10 U	Tampó 3 de NE Biolabs (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT) i BSA 100x

El volum total de les digestions és de 60 µL. La quantitat inicial de vector per digerir és, en el cas de la digestió seqüencial, de 4 µg i en el cas de la digestió doble, únicament de 2 µg. Cal recordar que la digestió seqüencial requereix una purificació de l'ADN digerit entre les dues reaccions de digestió, procediment en el qual tenen lloc pèrdues importants de material genètic que cal tenir en compte a l'hora d'establir la quantitat inicial d'ADN.

A la Taula 8.7 es presenten els volums de cadascun dels components de les reaccions de digestió del vector pUC18. De nou, tots els enzims i tampons han estat subministrats per New England Biolabs.

Taula 8.7. Components de les reaccions de digestió del vector pUC18.

Mostra	ADN (400 ng/ µL)	Tampó 10x	BSA 100x	Aigua mQ	Enzim 20U/ µL	Enzim 20U/ µL
pUC18 <i>Sal I</i> (1 ^a dig)	10 µL	Tampó 3 - 6 µL	0.6 µL	42.9 µL	0.5 µL	-
pUC18 <i>Hind III</i> (2 ^a dig)	45 µL	Tampó 2 - 6 µL	-	8.5 µL	0.5 µL	-
pUC18 <i>Nde I</i> i <i>Hind III</i>	5 µL	Tampó 3 - 6 µL	0.6 µL	47.4 µL	0.5 µL	0.5 µL
pUC18 blanc	2 µL	-	-	48 µL	-	-

Les mostres s'incuben O/N a 37 °C i es visualitzen mitjançant un gel d'agarosa de l'1 %, del qual s'extreuen les bandes d'interès a partir del kit DNA QIAquick® de QIAGEN.

8.1.4.3 Digestió del gen *tetM438*

Aquest gen ha estat subministrat pel laboratori de Biologia Molecular de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona en forma d'un glicerinat de cèl·lules d'*E.coli* que contenen un vector en el qual el gen es troba entre les dianes *BamH I* i *EcoR I*.

En primer lloc, s'inoculen 5 mL de medi LB estèril amb les esmentades cèl·lules d'*E.coli* i després del seu creixement O/N a 37 °C i 250 rpm, se'n recupera l'ADN plasmídic mitjançant el kit Wizard Plus Minipreps de Promega, seguint les instruccions proporcionades pel fabricant. 2 µg d'aquest ADN plasmídic s'empren com a substrat en la digestió per tal d'obtenir el fragment corresponent al gen *tetM438*. Aquesta és una digestió doble que té lloc en un volum total de 50 µL amb 10 U de cadascun dels enzims de restricció necessaris, *BamH I* i *EcoR I*, en el tampó *EcoR I* de composició 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.025 % triton x-100, tot de New England Biolabs. A la Taula 8.8 es presenten les quantitats de cadascun dels components de la reacció de digestió.

Taula 8.8. Components de les reaccions de digestió del gen *tetM438*.

Mostra	ADN (776 ng/ µL)	Tampó 10x	Aigua mQ	Enzim 20U/ µL	Enzim 20U/ µL
TcR 1	2.5 µL	Tampó <i>EcoR I</i> - 5 µL	41.5 µL	0.5 µL	0.5 µL

Aquesta es manté a 37 °C O/N i el fragment del gen es recupera d'un gel d'agarosa a l'1 % a partir del kit DNA QIAquick® de QIAGEN.

8.1.5 Lligació dels fragments necessaris per a l'obtenció de pΔmg025, pΔmg060 i pΔmg517

Per a l'obtenció de pΔmg025, pΔmg060 i pΔmg517 cal que la lligasa uneixi 4 fragments diferents en una única reacció: els dos braços de recombinació, el gen de la resistència a la tetraciclina *tetM438* i el vector pUC18 digerit. Els protocols estàndard de lligació recomanen l'existència d'una relació 3:1 entre l'insert, els braços de recombinació i el gen de resistència, i el vector, el fragment de pUC18. Per tal de poder complir amb aquesta relació, els diferents

fragments es quantifiquen mitjançant la seva intensitat en un gel d'agarosa i la comparació d'aquesta amb la de les bandes d'un marcador de pesos moleculars de concentració coneguda (Molecular Weight Marker III de Roche).

A la Taula 8.9 es presenten les concentracions aproximades de cada fragment obtingudes d'aquesta forma, juntament amb el volum emprat en la reacció de lligació per tal de complir amb l'esmentada relació 3:1.

Taula 8.9. Quantitat de cadascun dels fragments de les reaccions de lligació.

Mostra	[ADN] ng/ μ L	Volum en reacció (μ L)
p Δ mg025	mg025RA	6
	mg025LA	2
	<i>tetM438</i>	5
	pUC18	6
p Δ mg060	mg060RA	3
	mg060LA	2
	<i>tetM438</i>	5
	pUC18	6
p Δ mg517	mg517RA	5
	mg517LA	5
	<i>tetM438</i>	5
	pUC18	16

La reacció de lligació es realitza amb 2 U de la lligasa T4 DNA Ligase d'Invitrogen en el seu tampó de reacció de composició 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT i 5 % (w/v) polietilen glicol-8000 i en un volum final de 40 μ L. A la Taula 8.10 es presenten els volums dels diferents components de l'esmentada lligació.

Taula 8.10. Components de les reaccions de lligació.

Mostres	pUC18 (μ L)	Inserts (μ L)	Tampó 5x	T4 lligasa (5U/(μ L))	Aigua mQ
p Δ mg025	3.5	25.6	8	0.4	2.5
p Δ mg060	3.5	29	10	0.4	7.1
p Δ mg517	1.5	23.3	8	0.4	6.8
Blanc pUC18 <i>Hind III</i>	3.5	-	8	0.4	28.1
Blanc pUC18 <i>Nde I</i>	1.5	-	8	0.4	30.1

Un cop mesclats tots els components, la lligació s'incuba durant 8 hores a 16 °C. Després d'aquest temps, una part (4 μ L) s'utilitza per a transformar cèl·lules d'*E.coli* DH5 α competents i l'altra es congela a -20 °C. La preparació i transformació de les cèl·lules competents té lloc segons el protocol estàndard descrit per Sambrook *et al.*, 2001.

8.1.6 Anàlisi de transformants per a les construccions p Δ mg025, p Δ mg060 i p Δ mg517

A la Taula 8.11 es presenta el nombre de clons obtingut per a cada construcció, com a resultat de les transformacions amb les lligacions descrites en el punt anterior.

Taula 8.11. Colònies obtingudes després de la lligació.

Mostra	Número de colònies	Número de colònies analitzades
pΔmg025	> 100	8
pΔmg060	2	2
pΔmg517	30	8
Control de recircularització (<i>Sal I - Hind III</i>)	20	-
Control de recircularització (<i>Sal I - Nde I</i>)	11	-
Control positiu	Tota la placa plena de colònies	-

De cadascuna de les colònies a analitzar se'n purifica l'ADN plasmídic mitjançant el kit Wizard Plus Minipreps de Promega, seguint les instruccions subministrades pel fabricant. L'ADN purificat s'empra per confirmar l'obtenció de les construccions desitjades mitjançant una anàlisi de restricció amb dues parelles d'enzims diferents i una anàlisi per PCR.

8.1.6.1 Anàlisi de restricció dels clons obtinguts

El primer dels controls consisteix en una anàlisi de restricció amb dues parelles d'enzims: *EcoR I* i *Sal I* per una banda i *BamH I* i *Nde I* per l'altra. A la Taula 8.12 es recullen les condicions sota les quals tenen lloc les digestions, mentre que a la Taula 8.13 es presenten els volums de cada component de la reacció emprats.

Taula 8.12. Condicions de digestió de l'anàlisi de restricció.

Enzims	Condicions de digestió
<i>EcoR I</i> i <i>Sal I</i> 10 U	Tampó <i>EcoR I</i> de NE Biolabs (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 0.025 % triton x-100) i BSA 100x
<i>BamH I</i> i <i>Nde I</i> 10 U	Tampó 3 de NE Biolabs (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT) i BSA 100x

Taula 8.13. Components de les reaccions de digestió de l'anàlisi de restricció.

Mostra	ADN*	Tampó 10x	BSA 100x	Aigua mQ	Enzim 20U/ μL	Enzim 20U/ μL
pΔmg amb <i>EcoR I</i> i <i>Sal I</i>	6 μL	<i>EcoR I</i> - 2 μL	-	11 μL	0.5 μL	0.5 μL
pΔmg amb <i>BamH I</i> i <i>Nde I</i>	6 μL	Tampó 3 - 2 μL	0.2 μL	10.8 μL	0.5 μL	0.5 μL
blanc	3 μL	-	-	17 μL	-	-

* La concentració és variable en funció del clon. Es troba entre 180 i 480 ng/ μL.

Les digestions s'incuben a 37 °C O/N i els fragments que s'obtenen es visualitzen en un gel d'agarosa a l'1 % tenyit amb bromur d'etidi i amb el marcador de pesos moleculars DNA Molecular Weight Marker III de Roche.

8.1.6.2 Anàlisi per PCR dels clons obtinguts

Per aquells clons pels quals s'obtenen resultats positius en l'anàlisi de restricció descrit en el punt anterior, es realitzen tres reaccions de PCR amb l'objectiu de confirmar la seva naturalesa. En la primera reacció s'amplifica el fragment corresponent al braç de recombinació dret, en la segona, el corresponent al braç de recombinació esquerre i finalment, el conjunt d'ambdós braços més el gen de resistència a tetraciclina situat entremig.

A la Taula 8.14 es mostren les condicions de les reaccions de PCR, mentre que a la Taula 8.15 es recullen els volums de cada component utilitzat, en reaccions de volum final igual a 20 μL.

Taula 8.14. Condicions de reacció de la PCR de control de l'obtenció de les construccions pΔmg025, pΔmg060 i pΔmg517.

Compost	Concentració stock	Concentració final
MgCl ₂	50 mM	2 mM
encebadors	5 μM	0.25 μM
ADN	180 - 480 ng/μL	90 - 240 ng
dNTPs (cadascun)	10 mM	250 μM
EcoTaq Polymerase (Ecogen)	4 U/ μL	2 U

Taula 8.15. Volums de cada component de la PCR de control de l'obtenció de les construccions pΔmg025, pΔmg060 i pΔmg517.

	Aigua mQ	Tampó EcoTaq	MgCl ₂	ADN	dNTPs	Encebador directe	Encebador revers	EcoTaq
pΔmg - RA	13.7 μL	2 μL	0.8 μL	0.5 μL	0.5 μL	1 μL	1 μL	0.5 μL
pΔmg - LA	13.7 μL	2 μL	0.8 μL	0.5 μL	0.5 μL	1 μL	1 μL	0.5 μL
pΔmg - complet	13.7 μL	2 μL	0.8 μL	0.5 μL	0.5 μL	1 μL	1 μL	0.5 μL

Finalment, a la Figura 8.2 es presenta la seqüència de cicles de PCR realitzada amb el termociclador MJ Research, mod. PTC-200. Els resultats s'han visualitzat en un gel d'agarosa de l'1 % tenyit amb bromur d'etidi i amb el marcador de pesos moleculars Molecular Weight Marker III de Roche per tal d'establir la mida dels fragments amplificats.

Anàlisi per PCR			
Seqüència de PCR:			
Desnaturalització inicial		5 min	94 °C
Cicle (x30)	Desnaturalització	1 min	94 °C
	Hibridació	1 min	mg025RA-5' 55 °C
			mg025LA-3' 57 °C
mg025complet 54 °C			
mg060RA-5' 54 °C			
mg060LA-3' 56 °C			
mg060complet 54 °C			
Elongació	4 min 30 s	72 °C	mg517RA-5' 53 °C
			mg517LA-3' 53 °C
			mg517complet 50 °C
Extensió final		4 min	72 °C
Conservació		∞	4 °C

Figura 8.2. Cicles de PCR per al control de l'obtenció de les construccions pΔmg025, pΔmg060 i pΔmg517.

8.1.7 Obtenció dels knock-outs dels gens mg025, mg060 i mg517 de *Mycoplasma genitalium*

8.1.7.1 Obtenció d'un stock de les construccions pΔmg025, pΔmg060 i pΔmg517

Després de confirmar la seva correcta construcció, cal obtenir un stock dels plasmidis pΔmg025, pΔmg060 i pΔmg517 en el tampó que posteriorment s'empra per a la transformació de cèl·lules competents de *Mycoplasma genitalium*. Aquest es troba compost per 8 mM HEPES pH 7.2 i 272 mM sucrosa.

Amb aquest objectiu, s'empra 1 µL de l'ADN plasmídic dels clons confirmats amb els controls esmentats en el punt anterior per a transformar cèl·lules competents d'*E.coli* DH5α, preparades segons el mètode descrit per Sambrook *et al.*, 2001. Algunes de les colònies obtingudes s'utilitzen per recuperar-ne l'ADN plasmídic amb el kit Wizard Plus Minipreps de Promega, segons les instruccions del fabricant, amb l'excepció que l'elució de l'esmentat ADN de la columna de purificació té lloc amb el tampó d'electroporació i no amb l'habitual aigua mil·liQ. La concentració recuperada en cada cas es quantifica mitjançant espectrofotometria, ja que cal conèixer aquesta dada perquè la posterior transformació de cèl·lules de micoplasma requereix una elevada quantitat d'ADN per al seu èxit. Les concentracions obtingudes es presenten a la Taula 8.16.

Taula 8.16. Concentracions determinades per espectrofotometria dels plasmidis pΔmg025, pΔmg060 i pΔmg517.

Plasmidi	Concentració (ng/µL)
pΔmg025	1089
pΔmg060	905
pΔmg517	846

8.1.7.2 Transformació de cèl·lules competents de *Mycoplasma genitalium*

La preparació de cèl·lules electrocompetents de *Mycoplasma genitalium* té lloc de la següent manera. S'inoculen 20 mL de medi SP4 amb 50 µL d'un glicerinat del bacteri. El cultiu s'incuba a 37 °C i un 5 % de CO₂ durant 72 hores. A continuació, es descarten 10 mL de medi i s'utilitzen els 10 mL restants per rascar, amb l'ajuda d'un *cell scraper*, les cèl·lules que han crescut adherides al fons del tub Falcon emprat. La suspensió cel·lular recuperada es filtra per un filtre de 0.45 µm i es recultiva en 30 mL més de medi fresc SP4 durant 24 hores (37 °C i 5 % CO₂). Després d'aquest període, el medi es retira, les cèl·lules de micoplasma es renten entre 3 i 4 vegades amb tampó d'electroporació de composició 8 mM HEPES pH 7.2 i 272 mM sucrosa i finalment, es resuspenen en només 1 mL de l'esmentat tampó per tal d'aconseguir una densitat cel·lular d'aproximadament 10⁹ cfu/mL.

Per a la transformació, s'usen 20 µg de cadascun dels plasmidis obtinguts en el punt anterior. Aquesta quantitat correspon, segons les concentracions de la Taula 7.15, a 20 µL de pΔmg025, 25 µL de pΔmg060 i 30 µL de pΔmg517. El procediment de transformació comença amb la mescla de 90 µL de cèl·lules competents de micoplasma amb els volums esmentats d'ADN plasmídic. Aquesta mescla s'introdueix en una cubeta d'electroporació Plus BTX de 2 mm prèviament refredada amb gel i el conjunt es manté en gel durant 15 minuts. A continuació es procedeix a l'electroporació, emprant l'electroporador "Electro cell manipulator 600" de BTX i els paràmetres de 129 Ω de resistència i 2.5 kV de voltatge. Després del procés, la cubeta es manté 15 minuts més en gel. Tot seguit, s'introdueixen dins la cubeta 900 µL de medi SP4, els quals s'utilitzen per traspasar les cèl·lules a un tup Eppendorf. Aquestes s'incuben durant un mínim de 2 hores a 37 °C, per tal de permetre l'expressió del gen de la resistència, i a continuació se n'utilitzen 200 µL per sembrar plaques amb medi SP4 sòlid. Aquestes s'incuben a 37 °C i 5 % de CO₂ fins que s'observa l'aparició de colònies, normalment al cap de 3 setmanes.

8.1.8 Anàlisi de les colònies transformants per Southern blott

Per a cada clon a analitzar, s'aïlla el seu ADN genòmic segons el procediment descrit en el punt 8.1.1 d'aquest capítol.

A continuació, es procedeix a la seva digestió amb 10 U de l'enzim *Hind III* en el tampó 2 de NE Biolabs de composició 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT.

8.1.8.1 Transferència a una membrana de niló per capil·laritat en condicions alcalines

El resultat de la digestió es carrega en un gel d'agarosa del 0.8 %, el qual es fa corre a 30 – 45 volts durant 4 hores. El gel es tenyeix amb bromur d'etidi i es fotografia amb un regle al costat del marcador de pesos moleculars, que permetrà posteriorment conèixer la mida de les bandes visualitzades. A continuació el gel s'incuba amb agitació suau durant 1 hora en tampó de transferència alcalina (TTA) de composició 0.4 M NaOH i 1 M NaCl, per tal de desnaturalitzar l'ADN i eliminar el bromur d'etidi. Mentrestant, s'hidrata la membrana de niló (Roche) a la qual es transferirà l'ADN, primer amb aigua destil·lada i després amb TTA.

Per a la transferència, es tallen 8 trossos de paper Whatman 3MM de la mateixa mida que la membrana i se n'humitegen 4 en TTA. Es col·loquen diversos tovallons absorbents sobre una superfície plana de forma que contactin entre ells el màxim possible. A sobre, s'hi col·loquen 4 papers Whatman secs i sobre d'aquests, 2 més d'humits. En contacte amb aquests últims, es col·loca la membrana i sobre la membrana, se situa el gel. Sobre d'aquest, es col·loquen 2 papers Whatman humits més. Finalment, a la part superior de tot el muntatge, es col·loca una tira de paper Whatman més llarga i humitejada amb TTA de forma que els seus dos extrems es trobin en contacte amb dues cubetes plenes de TTA situades a una alçada superior per tal d'afavorir la capil·laritat. La transferència té lloc durant 1 hora. A continuació i abans de separar el gel de la membrana, es marquen els pous amb un punxó i es fa una marca a la membrana per tal de permetre el reconeixement de la cara que conté l'ADN transferit.

Tot seguit, la membrana es neutralitza amb tampó neutralitzant de composició 0.5 M Tris-HCl pH 7.2 i 1 M NaCl, mitjançant la seva incubació durant 2x15 minuts a temperatura ambient. Després, la membrana s'asseca amb paper Whatman.

8.1.8.2 Hibridació de la membrana amb una sonda marcada amb digoxigenina-11-dUTP

L'obtenció de la sonda es fa a través del kit Dig DNA labeling and detection de Roche, el qual permet la síntesi de sondes d'ADN marcades amb digoxigenina-11-dUTP i la seva detecció mitjançant un anti-anticòs que reconeix la marca i que es troba conjugat amb fosfatasa alcalina, fet que permet una detecció colorimètrica dels fragments sobre els quals ha hibridat la sonda. Cal recordar que per a *mg025* s'ha sintetitzat una sonda corresponent al braç de recombinació esquerre, mentre que per als dos altres gens, *mg060* i *mg517*, la sonda preparada correspon al braç de recombinació dret.

8.1.8.2.1 Síntesi de la sonda

Per a la preparació de les diferents sondes se segueix el protocol subministrat per Roche, juntament amb el kit Dig DNA labeling and detection. Es parteix d'entre 10 ng i 3 µg d'ADN motlle, en aquest cas, corresponent als braços de recombinació purificats des d'un gel d'agarosa mitjançant el kit DNA QIAquick® de QIAGEN. L'esmentat ADN s'incuba durant 10 minuts a 95 °C per tal de desnaturalitzar-lo i a continuació es manté en gel fins que s'introdueix a la mescla de marcatge, els components de la qual es detallen a la Taula 8.17.

Taula 8.17. Condicions de reacció per al marcatge de les sondes.

Compost	Concentració stock	Concentració final
ADN	6 – 7 ng/µL	100 ng
hexanucleòtids	10x	1x
dNTPs	1 mM dATP	100 µM dATP
	1 mM dGTP	100 µM dGTP
	1 mM dCTP	100 µM dCTP
	0.65 mM dTTP	65 µM dTTP
	0.35 mM DIG-11-dUTP	35 µM DIG-11-dUTP
Enzim Klenow	2 U/ µL	2 U

L'esmentada mescla s'incuba a 37 °C O/N. La reacció es para a partir de l'addició de 2 µL d'EDTA 0.2 M pH 8. Per tal de precipitar la sonda, s'addicionen 2.5 µL de NaCl 4 M i 75 µL d'EtOH absolut fred. La mescla es manté a -80 °C durant 1 hora i a continuació, se centrifuga durant 30 min a màxima velocitat. El sobrenedant s'elimina per aspiració i el *pellet* es renta amb 40 µL d'EtOH 70 % fred. Per tal d'assecar-lo, es manté durant 30 minuts al buit i després es resuspèn en 50 µL de tampó TE de composició 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA. Per tal que tingui lloc una resuspensió total, la sonda es manté O/N a 4 °C. Un cop resuspensa, es guarda a -20 °C.

8.1.8.2.2 Hibridació de la sonda amb la membrana

La membrana sobre la qual ha tingut lloc la transferència de l'ADN a analitzar s'introdueix en un tub d'hibridació. Aquesta s'incuba en 20 mL de la solució de pre-hibridació de composició 750 mM NaCl, 75 mM citrat sòdic pH 7, 50 % v/v formamida, 0.1 % w/v N-laurosilsarcosina, 0.02 % w/v SDS i 5 % w/v de *blocking reagent*. La incubació té lloc durant un mínim d'una hora a 42 °C en un forn d'hibridació (Amersham Pharmacia Biotech). Mentrestant, la sonda es desnaturalitza mantenint-la a 95 °C durant 10 min. A continuació, 15 µL de la sonda desnaturalitzada es mesclen amb 15 mL de solució de pre-hibridació i el conjunt es posa en contacte amb la membrana, la qual s'incuba a 42 °C O/N en el forn. Un cop finalitzada la hibridació, la membrana es renta amb 2x15 mL de tampó de rentat de baixa astringència de composició 300 mM NaCl, 30 mM citrat sòdic pH 7 i 0.1 % w/v SDS i amb 2x15 mL de tampó de rentat d'alta astringència de composició 15 mM NaCl, 1.5 mM citrat sòdic pH 7 i 0.1 % w/v SDS. Aquests rentats tenen lloc a temperatura ambient en el forn d'hibridació i tenen una durada de 5 minuts cadascun.

8.1.8.3 Detecció immunològica de la sonda marcada amb digoxigenina-11-dUTP

La membrana s'incuba amb 15 mL de la solució de rentat de composició 0.1 M àcid maleic pH 7.5, 0.15 M NaCl i 0.3 % v/v Tween 20. El rentat té lloc en el forn d'hibridació a temperatura ambient durant 5 minuts. A continuació i també en el mateix forn, s'incuba la membrana amb 15 mL de solució de *blocking*, de composició 0.1 M àcid maleic pH 7.5 i 0.15 M NaCl durant 30 minuts. La mateixa solució s'utilitza per a realitzar la incubació de la membrana amb

l'anticòs anti-DIG, pel qual s'empra una dilució 1: 10000. Aquesta incubació té lloc durant 30 minuts a temperatura ambient. A continuació, la membrana es renta durant 15 minuts amb 2x15 mL de solució de rentat per eliminar l'anticòs que no s'ha unit. Donat que l'anticòs es troba conjugat amb l'enzim fosfatasa alcalina, el revelat de la membrana té lloc amb els substrats colorimètrics NTB (blau de nitrotetrazoli) i BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfat). Després del rentat, la membrana s'incuba durant 2 min en 20 mL de tampó de revelat de composició 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl i 50 mM MgCl₂ i tot seguit, s'addicionen els substrats esmentats anteriorment (90 µL d'una solució de NTB de concentració 75 mg/mL en DMF al 70 % en aigua i 70 µL d'una solució de BCIP de concentració 50 mg/mL en DMF al 70 % en aigua). El conjunt s'incuba en la foscor fins que el desenvolupament del color és el desitjat.

8.2 Capítol 3: Estudi de la transcripció de les possibles glicosiltransferases de *Mycoplasma genitalium*

8.2.1 Aïllament d'ARN de *Mycoplasma genitalium*

Per tal d'obtenir l'ARN de *Mycoplasma genitalium* en dues fases diferents del seu creixement i amb l'objectiu de poder treballar amb una quantitat de biomassa que proporcioni ARN suficient, s'inoculen 8x20 mL de medi SP4 amb 50 µL de glicerinat del bacteri cadascun, utilitzant tubs Falcon de 25 cm². Quatre d'ells, aquells que representen la fase exponencial del creixement, s'incuben a 37 °C i 5 % de CO₂ durant 72 hores. La incubació dels altres quatre cultius, corresponents a la fase estacionària, s'allarga fins a 110 hores.

Per tots ells, el procediment que se segueix per tal de recuperar l'ARN és el determinat pel kit RNAqueous d'Ambion. Un cop crescuts els cultius, es retira el medi envellit i les cèl·lules de *Mycoplasma genitalium* que han crescut adherides a la superfície del tub Falcon es renten amb 3x5 mL de PBS. Per tal de rascar-les, s'utilitzen 500 µL de la *Lysis-Binding Solution*, els quals es traspassen d'un tub a l'altre amb l'objectiu de recuperar totes les cèl·lules pertanyents a la mateixa fase del creixement. En finalitzar aquest procediment, els 500 µL de suspensió cel·lular s'introdueixen en un tub Eppendorf i es vortexen per homogeneïtzar. A continuació s'addicionen 500 µL d'EtOH 64 % i es mescla. Aquesta mescla s'aplica al filtre de sílice i es facilita la unió de l'ARN mitjançant la centrifugació del conjunt durant 1 min a 16000g. A continuació tenen lloc diversos rentats, tots realitzats repetint la centrifugació descrita anteriorment. El primer d'ells amb 700 µL de *Wash Solution 1* i el segon i el tercer amb 500 µL de *Wash Solution 2/3*. L'elució de l'ARN es realitza amb 50 µL de *Elution Solution*, els quals s'han escalfat prèviament fins a 70-80 °C per tal d'augmentar el rendiment del procés.

En aquest punt es disposa d'una solució que conté l'ARN de les cèl·lules del micoplasma però la qual possiblement també inclou ADN com a contaminant. Aquest representa una font de falsos positius en una reacció de RT-PCR. Per tant cal eliminar-lo. Això es fa mitjançant l'addició d'1 µL de DNAsa I (2U/ µL) a la solució d'ARN, juntament amb 5 µL de *DNase buffer 10x*. La mescla s'incuba a 37 °C durant 16 hores. Un cop finalitzada la reacció i per tal d'eliminar la DNAsa i els cations divalents introduïts en el tampó, s'addicionen 5 µL de DNase Inactivation Reagent, es mescla el conjunt manualment per inversió del tub Eppendorf i es manté 2 min a temperatura ambient. El reactiu s'elimina de la solució mitjançant una centrifugació d'1 min a 16000g, ja que es tracta d'una resina.

8.2.2 Reacció de RT-PCR

La reacció de transcripció reversa que permet l'anàlisi de l'expressió dels gens *mg025*, *mg060* i *mg517* en *Mycoplasma genitalium* es realitza mitjançant el kit SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR d'Invitrogen, el qual permet obtenir cADN a partir de mARN.

Inicialment es preparen les reaccions, les quals tenen un volum final de 20 µL, amb els components establerts a la Taula 8.18. El conjunt s'incuba a 65 °C durant 5 minuts i a continuació es col·loca en gel durant 1 minut.

Taula 8.18. Condicions de reacció de RT-PCR (1).

Compost	Concentració stock	Concentració final	Volum (µL)
ARN	8.5 pg/µL	60 ng	7
Encebador revers	2 µM	0.2 µM	1
dNTP mix	10 mM	1 mM	1
DEPC H ₂ O	-	-	1

Tot seguit s'addiciona a les esmentades reaccions la mescla descrita en la Taula 8.19, la qual constitueix la cDNA Synthesis Mix i té un volum de 10 µL.

Taula 8.19. Condicions de reacció de RT-PCR (2).

Compost	Concentració stock	Concentració final	Volum (µL)
Tampó RT	10x	1x	2
MgCl ₂	25 mM	5 mM	4
DTT	100 mM	10 mM	2
RNAseOUT	40 U/ µL	40 U	1
SuperScript III RT	200 U/ µL	200 U	1

El conjunt s'incuba 50 min a 50 °C, 5 min a 85 °C i finalment, es manté en gel abans d'addicionar-hi 1 µL de RNAse H i incubar O/N a 37 °C. El resultat s'usa directament com a ADN motlle de la reacció de PCR que es descriu a continuació, la qual té lloc segons les condicions establertes en la Taula 8.20 i amb la mescla de components definida en la Taula 8.21. En aquesta, cal tenir en compte que s'ha addicionat menys MgCl₂ ja que l'ADN motlle ja conté una part de la salt provinent de la mescla de reacció de RT.

Taula 8.20. Condicions de reacció de PCR.

Compost	Concentració stock	Concentració final
MgCl ₂	50 mM	2 mM
encebadors	2 µM	0.25 µM
dNTPs (cadascun)	10 mM	250 µM
EcoTaq Polymerase (Ecogen)	4 U/ µL	2 U

Taula 8.21. Volums de cada component de la reacció de PCR.

	Aigua DEPC	Tampó EcoTaq	MgCl ₂	cADN	dNTPs	Encebador directe	Encebador revers	EcoTaq
MG gens	9.4 µL	2 µL	0.6 µL	2 µL	0.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	0.5 µL

A la Figura 8.3 es presenta la seqüència de cicles seguida tant per a la reacció de transcripció com per a la PCR, els resultats de la qual es visualitzen en un gel d'agarosa de l'1.7 %. La mida dels fragments amplificats s'estableix amb el marcador de pesos moleculars 100 bp DNA Ladder de NE Biolabs.

Seqüència de RT:			
Desnaturalització inicial	5 min	65 °C	
Hibridació	10 min	25 °C	
Síntesi cADN	50 min	50 °C	
Terminació	5 min	85 °C	
Eliminació ARN	O/N	37 °C	
Seqüència de PCR:			
Desnaturalització inicial		5 min	94 °C
Cicle (x30)	Desnaturalització	1 min	94 °C
	Hibridació	1 min 30 s	55 °C
	Elongació	1 min	72 °C
Extensió final		4 min	72 °C
Conservació		∞	4 °C

Figura 8.3. Cicles de RT i PCR a l'anàlisi de la transcripció dels gens *mg025*, *mg060* i *mg517*.

8.3 Capítol 6: Anàlisi funcional de l'extrem C-terminal de GT-MG517

8.3.1 Construcció del vector pET517HisN

El vector pET517HisN es construeix a partir del plasmidi p517wt, el qual conté el gen *mg517* entre les dianes *Nde I* i *BamH I*, i el vector comercial pET-15b(+). La construcció aconsegueix col·locar una cua d'His a l'extrem N-terminal del gen, ja que el situa entre les dianes *Nde I* i *BamH I* de l'esmentat vector pET-15b(+).

Amb l'objectiu d'obtenir pET517HisN es transformen cèl·lules competents d'*E.coli* DH5α, preparades segons el mètode de Sambrook *et al.*, 2001, amb el plasmidi p517wt per una banda i amb el pET-15b(+) per l'altra. Per a les colònies que s'obtenen en ambdós casos, s'aïlla l'ADN plasmídic amb el kit Wizard Plus Minipreps de Promega i aquest es digereix segons les condicions que s'estableixen en la Taula 8.22.

Taula 8.22. Condicions de digestió dels vectors p517wt i pET-15b(+).

Enzims	Condicions de digestió
<i>BamH I</i> i <i>Nde I</i> 10 U	Tampó 3 de NE Biolabs (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT) i BSA 100x

A la Taula 8.23 es presenten els volums de cadascun dels components de les esmentades reaccions de digestió, les quals tenen un volum final de 50 µL. Tots els enzims i tampón són de New England Biolabs.

Taula 8.23. Components de les reaccions de digestió dels vectors p517wt i pET-15b(+).

Mostra	ADN	Tampó 10x	BSA 100x	Aigua mQ	Enzim 20U/ µL	Enzim 20U/ µL
p517wt (184 ng/ µL)	2.5 µL	Tampó 3 - 5 µL	0.5 µL	41 µL	0.5 µL	0.5 µL
pET-15b(+) (145 ng/ µL)	10 µL	Tampó 3 - 5 µL	0.5 µL	33.5 µL	0.5 µL	0.5 µL

Les mostres s'incuben O/N a 37 °C i es visualitzen mitjançant un gel d'agarosa de l'1 %, del qual s'extreuen les bandes d'interès a partir del kit DNA QIAquick® de QIAGEN.

Per a la reacció de lligació entre els fragments generats per les digestions anteriors es treballa amb la relació estàndard de 3:1 entre la quantitat d'insert (gen *mg517*) i la quantitat de vector (fragment de pET-15b(+)). S'utilitzen 2 U de la lligasa T4 DNA Ligase de Invitrogen en el seu tampó de reacció de composició 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT i 5 % (w/v) polietilen glicol-8000 en un volum final de 20 µL. A la Taula 8.24 es presenten els volums dels diferents components de la reacció.

Taula 8.24. Components de la reacció de lligació per a l'obtenció de pET517HisN.

Mostres	pET-15b(+) (µL)	<i>mg517</i> (µL)	Tampó 5x	T4 lligasa (5U/(µL))	Aigua mQ
pET517HisN	4	4	4	0.4	7.6
Control negatiu	4	-	4	0.4	11.6

La lligació s'incuba durant 8 hores a 16 °C. Després d'aquest temps, s'utilitzen 2 µL per tal de transformar cèl·lules d'*E.coli* DH5α competents. La preparació i transformació d'aquestes té lloc segons el protocol estàndard descrit per Sambrook *et al.*, 2001.

Mentre per a la lligació de pET517HisN s'obtenen 8 colònies, únicament una creix en el control negatiu. D'aquestes 8 colònies, se'n comprova la naturalesa de 4 mitjançant una anàlisi de restricció i una reacció de PCR. Per a les colònies a analitzar, s'aïlla l'ADN plasmídic mitjançant el kit Wizard Plus Minipreps de Promega.

L'ADN que s'obté s'utilitza en una digestió de 20 µL amb els enzims de restricció *Nde I* i *BamH I*, en les condicions ja descrites a la Taula 8.22 i amb els volums de cadascun dels components resumits a la Taula 8.25.

Taula 8.25. Components de les reaccions de digestió de l'anàlisi de restricció de pET517HisN.

Mostra	ADN	Tampó 10x	BSA 100x	Aigua mQ	Enzim 20U/ µL	Enzim 20U/ µL
pET517HisN (70 - 120 ng/ µL)	5 µL	Tampó 3 - 2 µL	0.2 µL	11.8 µL	0.5 µL	0.5 µL
Blanc pET517HisN	5 µL	Tampó 3 - 2 µL	0.2 µL	12.8 µL	-	-

Després d'una incubació O/N a 37 °C, els resultats de la digestió es visualitzen en un gel d'agarosa de l'1 % tenyit amb bromur d'etidi, on és possible determinar la mida dels fragments mitjançant el marcador de pesos moleculars Molecular Weight Marker III de Roche.

D'altra banda, l'ADN plasmídic dels 4 clons s'utilitza com a motlle en una reacció de PCR amb els encebadors universals T7 promotor i T7 terminador per tal d'amplificar el gen *mg517*. Un resultat positiu indica la presència del

gen i, per tant, la correcta lligació dels fragments. Les condicions de reacció són les estàndards per a una PCR, ja descrites anteriorment a la Taula 8.14. Pel que fa als volums dels diferents components, es recullen a la Taula 8.26.

Taula 8.26. Volums de cada component de la reacció d'anàlisi per PCR dels transformants de pET517HisN.

	Aigua mQ	Tampó EcoTaq	MgCl ₂	ADN (70 - 120 ng/ µL)	dNTPs	T7 prom	T7 term	EcoTaq
pET517HisN	13.2 µL	2 µL	0.8 µL	1 µL	0.5 µL	1 µL	1 µL	0.5 µL

A la Figura 8.4 es presenta la seqüència de cicles usada per a l'amplificació del gen *mg517* en el control de PCR, el resultat de la qual s'analiza en un gel d'agarosa en les mateixes condicions descrites per al control de restricció.

Seqüència de PCR:			
Desnaturalització inicial		5 min	94 °C
Cicle (x30)	Desnaturalització	1 min	94 °C
	Hibridació	1 min 30 s	50 °C
	Elongació	1 min 30 s	72 °C
Extensió final		4 min	72 °C
Conservació		∞	4 °C

Figura 8.4. Cicles de PCR per al control de la correcta obtenció de pET517HisN.

Finalment, d'aquelles colònies que contenen la construcció pET517HisN correcta, se'n seqüència una mitjançant el kit de seqüenciació BigDye Terminator v3.1 ABI Prism de Perkin-Elmer Biosystems, segons les instruccions subministrades pel fabricant.

8.3.2 Obtenció de les formes truncades de *mg517* per PCR

Com a motlle de les reaccions de PCR s'utilitza el plasmidi pET517HisN, obtingut segons s'ha descrit en el punt anterior. Les condicions de la reacció són les habituals, però amb l'objectiu d'obtenir una fidelitat major en l'amplificació de l'ADN, es treballa amb la polimerasa Pfu Turbo d'Stratagene, la qual no necessita un aport de MgCl₂ extern perquè ja en porta el seu propi tampó de reacció. A la Taula 8.27 es recullen les citades condicions, mentre que a la Taula 8.28 es resumeixen els volums de cadascun dels components emprats.

Taula 8.27. Condicions de reacció d'obtenció de les formes truncades de *mg517*.

Compost	Concentració stock	Concentració final
encebadors	5 µM	0.25 µM
ADN	84.2 ng/µL	100 - 340 ng
dNTPs (cadascun)	10 mM	300 µM
Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene)	2.5 U/ µL	1 U

Taula 8.28. Volums de cada component de la PCR per a l'obtenció de les formes truncades de mg517.

	Aigua mQ	Tampó Pfu Turbo	ADN	dNTPs	Encebador directe	Encebador revers	Pfu Turbo
FT 2-6	11 µL	2 µL	4 µL	0.6 µL	1 µL	1 µL	0.4 µL
FT1 i FT7	13.8 µL	2 µL	1.2 µL	0.6 µL	1 µL	1 µL	0.4 µL

Finalment, a la Figura 8.5 es presenta la seqüència de cicles utilitzada per a obtenir les amplificacions desitjades, les quals es visualitzen en un gel d'agarosa de l'1.7 % tenyit amb bromur d'etidi i en el qual s'utilitza el marcador de pesos moleculars 100 bp Ladder de NE Biolabs.

Seqüència de PCR:			
Desnaturalització inicial		5 min	94 °C
Cicle (x30)	Desnaturalització	1 min	94 °C
	Hibridació	1 min 30 s	58 °C
	Elongació	1 min	72 °C
Extensió final		4 min	72 °C
Conservació		∞	4 °C

Figura 8.5. Cicles de PCR per a l'amplificació de les formes truncades de mg517.

Les formes truncades amplificades es recuperen del gel d'agarosa mitjançant la seva extracció amb el kit DNA QIAquick® de QIAGEN i es digereixen amb els enzims de restricció *Nde I* i *BamH I* (NE Biolabs) en una digestió doble. Les condicions d'aquesta reacció són: 10 U de cada enzim, Tampó 3 de NE Biolabs (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂ i 1 mM DTT) i BSA 100x. A la Taula 8.29 es presenten els volums de cada component de la digestió, la qual es manté O/N a 37 °C.

Taula 8.29. Components de les reaccions de digestió de les formes truncades de mg517.

Mostra	ADN	Tampó 10x	BSA 100x	Aigua mQ	Enzim 20U/ µL	Enzim 20U/ µL
FT1-FT7	45 µL	Tampó 3 - 6 µL	0.6 µL	7.4 µL	0.5 µL	0.5 µL

Per recuperar els fragments digerits, es realitza una nova extracció de l'ADN d'un gel d'agarosa amb el mateix kit que anteriorment.

8.3.3 Construcció dels vectors finals d'expressió per a les formes truncades

8.3.3.1 Digestió del vector pET-15b(+)

Per tal de poder expressar les formes truncades del gen *mg517*, aquestes s'insereixen en el vector pET-15b(+) entre les dianes *Nde I* i *BamH I*. Per tant, és necessari disposar del fragment de l'esmentat vector digerit per aquests punts.

Inicialment es prova una digestió doble emprant les condicions descrites a la Taula 8.22, les quals ja s'han utilitzat amb èxit per a digerir pET-15b(+). Ara bé, en aquest cas no s'aconsegueix la digestió correcta i cal passar a una

digestió seqüencial amb un pas intermedi de purificació de l'ADN. Així, les condicions finals sota les quals té lloc la digestió de pET-15b(+) són les resumides en la Taula 8.30.

Taula 8.30. Condicions de digestió del vector pET-15b(+).

Enzims	Condicions de digestió
<i>Nde I</i> i <i>BamH I</i> 10 U	Seqüencial: <i>BamH I</i> amb tampó 3 de NE Biolabs (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT) i BSA 100x <i>Nde I</i> amb tampó 4 de NE Biolabs (50 mM KAcO, 20 mM Tris-AcOH pH 7.9, 10 mM MgAcO ₂ i 1 mM DTT)

Després de la primera digestió, l'ADN es purifica d'un gel d'agarosa de l'1 % amb el kit DNA QIAquick® de QIAGEN. El resultat de l'extracció s'empra com a substrat per a la segona digestió, tal com es mostra en la Taula 8.31, on es detallen els volums dels components que formen part de cada reacció.

Taula 8.31. Components de les reaccions de digestió seqüencial de pET-15b(+).

Mostra	ADN	Tampó 10x	BSA 100x	Aigua mQ	<i>BamH I</i> 20U/ µL	<i>Nde I</i> 20U/ µL
pET-15b(+)	15 µL	Tampó 3 - 2 µL	0.2 µL	2.3 µL	0.5 µL	-
pET-15b(+)- <i>BamH I</i>	45 µL	Tampó 4 - 6 µL	-	8.5 µL	-	0.5 µL

Ambdues digestions es mantenen O/N a 37 °C. Després de la segona d'elles, el fragment del vector pET-15b(+) doblement digerit, es purifica d'un gel d'agarosa mitjançant l'extracció amb el kit DNA QIAquick® de QIAGEN.

8.3.3.2 Lligació de les formes truncades amb el fragment del vector pET-15b(+)

Les condicions estàndard de lligació segons Sambrook *et al.*, 2001 són les ja comentades anteriorment d'una relació molar 3:1 entre la quantitat d'insert i la quantitat de vector. S'utilitzen 2 U de la lligasa T4 DNA Ligase de Invitrogen en el seu tampó de reacció de composició 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT i 5 % (w/v) polietilè glicol-8000 en un volum final de 15 µL. A la Taula 8.32 es presenten els volums dels diferents components de la reacció.

Taula 8.32. Components de la reacció de lligació per a la introducció de les formes truncades de *mg517* en el vector pET-15b(+).

Mostres	pET-15b(+) digerit (µL)	FT (µL)	Tampó 5x	T4 lligasa (5U/(µL))	Aigua mQ
FT1	3	6	3	0.4	2.6
FT2-FT7	3	8.6	3	0.4	-
Control negatiu	3	-	3	0.4	8.6

La lligació s'incuba durant 5 hores a 16 °C. Després d'aquest temps, s'utilitzen 4 µL per tal de transformar cèl·lules d'*E.coli* DH5α competents. La preparació i transformació d'aquestes té lloc segons el protocol estàndard descrit per Sambrook *et al.*, 2001.

A la Taula 8.33 es resumeixen el nombre de clons obtingut per a cada lligació, pels quals s'ha aïllat l'ADN plasmídic mitjançant el kit Wizard Plus Minipreps de Promega i se n'ha estudiat la naturalesa mitjançant una anàlisi per PCR.

Taula 8.33. Colònies obtingudes després de la lligació.

Mostra	Número de colònies
FT1	5
FT2	6
FT3	12
FT4	10
FT5	8
FT6	6
FT7	13
Control de recircularització	0

8.3.3.3 Anàlisi de transformants per PCR

L'ADN plasmídic aïllat per a cada clon de la Taula 8.33 s'utilitza com a motlle en una reacció de PCR amb els cebadors universals T7, l'amplificació dels quals permet establir la correcta inserció de les formes truncades en el vector pET-15b(+).

Les condicions de l'esmentada PCR són equivalents a les exposades a la Taula 8.27 i a la Figura 8.4 respectivament, amb la diferència de la quantitat d'ADN motlle, el qual depèn de cada forma truncada. A la Taula 8.34 es recullen els volums dels components d'aquestes reaccions, el resultat de les quals es visualitza en un gel d'agarosa de l'1.7 % amb el marcador de pesos moleculars 100 bp Ladder de NE Biolabs.

Taula 8.34. Volums de cada component de la PCR control de l'obtenció de les formes truncades de mg517.

	Aigua mQ	Tampó Pfu Turbo	ADN	dNTPs	T7 Prom	T7 Term	Pfu Turbo
FT 1-7	11 µL	2 µL	4 µL	0.6 µL	1 µL	1 µL	0.4 µL

Aquells clons pels quals les reaccions de PCR donen un resultat positiu se seqüencien mitjançant el kit de seqüenciació BigDye Terminator v3.1 ABI Prism de Perkin-Elmer Biosystems, segons les instruccions subministrades pel fabricant.

Capítol 9: Protocols d'expressió i
purificació de proteïnes

9 Protocols d'expressió i purificació de proteïnes

9.1 Expressió i extracció de GT-MG517

9.1.1 Expressió i extracció de GT-MG517 a partir de la construcció pET517HisC mitjançant xoc tèrmic

Es transformen cèl·lules d'*E.coli* BL21 DE3 competents, preparades segons el mètode descrit per Sambrook *et al.*, 2001, amb la construcció pET517HisC, seguint el protocol estàndard descrit pel mateix autor. A partir d'una colònia única obtinguda de la transformació, s'incoculen 3 mL de medi LB estèril suplementat amb 50 µg/mL d'ampicil·lina i s'incuben 6-7 hores a 250 rpm i 37 °C. Passat aquest temps, el cultiu obtingut s'utilitza per inocular 50 mL de medi LB fresc suplementat amb el mateix antibiòtic. Les cèl·lules s'incuben a 250 rpm i 37 °C fins que la seva densitat òptica (OD₆₀₀) assoleix un valor de 0.3. En aquest punt el cultiu se sotmet a un xoc tèrmic, introduint-lo en un bany d'aigua a 42 °C i mantenint-lo en ell durant 30 min. Passat aquest temps, l'expressió de GT-MG517 s'indueix amb 1 mM d'IPTG i el cultiu s'incuba O/N a 250 rpm i 20 °C.

Un cop finalitzada l'expressió de GT-MG517, les cèl·lules es recuperen per centrifugació a 5000 g durant 10 min a 4 °C. El *pellet* es renta amb 5 mL de NaCl 0.9 % fred i es resuspèn en 2.5 mL del tampó 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 22 mM CHAPS i 10% glicerol. Les cèl·lules resuspeses es lisen per sonicació (5 cicles de 30 seg. amb els paràmetres *output control* 5 i *duty cycle* 30% amb el sonicador Branson Sonifier model 250) i s'incuben durant 1 hora amb agitació a 4 °C. L'extracte soluble es recupera per centrifugació a 16000 g durant 10 min a 4 °C.

9.1.2 Expressió i extracció de GT-MG517 a partir de la construcció pET517HisC mitjançant co-expressió amb xaperones en un volum de cultiu de 50 mL o menor

Es transformen cèl·lules d'*E.coli* BL21 DE3 competents, preparades segons el mètode descrit per Sambrook *et al.*, 2001, amb el vector comercial pGro7 de Takara, seguint el protocol estàndard descrit pel mateix autor. Les cèl·lules que s'obtenen es fan competents de nou i es transformen també amb la construcció pET517HisC, de forma que les cèl·lules resultants contenen ambdós plasmidis. S'incoculen 3 mL de medi LB estèril suplementat amb 50 µg/mL d'ampicil·lina i 170 µg/mL de cloramfenicol amb una colònia única d'aquestes cèl·lules cotransformades. El conjunt s'incuba entre 6-7 hores a 250 rpm i 37 °C. Passat aquest temps, el cultiu obtingut s'utilitza per inocular 50 mL de medi LB fresc suplementat amb els mateixos dos antibiòtics. Les cèl·lules s'incuben a 250 rpm i 37 °C fins que el seu OD₆₀₀ assoleix un valor de 0.4. En aquest moment, s'indueix l'expressió de les xaperones del vector pGro7 amb l'addició de 0.2 % de L-arabinosa al medi. Abans de la inducció de l'expressió de GT-MG517 amb 1 mM d'IPTG, el cultiu es manté 30 min a 37 °C i 250 rpm. Un cop addicionat l'IPTG, el conjunt s'incuba O/N a 30 °C i 250 rpm.

Un cop finalitzada l'expressió de GT-MG517, es procedeix de la mateixa forma que s'ha descrit en el punt anterior per tal d'obtenir un extracte soluble que contingui la proteïna. En funció de l'experiment, s'empra un tampó d'extracció diferent. Tots els utilitzats es recullen a la Taula 9.1.

Taula 9.1. Composició dels diferents tampons d'extracció utilitzats per volums de cultiu petits.

Experiment	Composició
Comparativa d'expressió entre xoc tèrmic i xaperones (4.2.1)	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 22 mM CHAPS i 10 % glicerol
Selecció d'un detergent adequat per a l'extracció de GT-MG517 (4.3.1)	A 20 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 5 % glicerol, 0.5 % w/v triton x-100
	B 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 22 mM CHAPS, 10 % glicerol
	C 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 20 % glicerol
	D 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl
Selecció del millor tampó de solubilització amb base Triton x-100 (4.4.1)	A 500 mM NaCl, 50 mM fosfat pH 7, 0.5 % w/v Triton, 10 % glicerol
	B 500 mM NaCl, 50 mM fosfat pH 7, 0.5 % w/v Triton
	C 500 mM NaCl, 50 mM fosfat pH 7, 1 % w/v Triton
Tria del millor tampó de solubilització amb base CHAPS (4.5.1)	1 20 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM CHAPS, 10 % glicerol
	2 20 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl, 20 mM CHAPS, 10 % glicerol
	3 20 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM CHAPS, 20 % glicerol
	4 20 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl, 20 mM CHAPS, 20 % glicerol
	5 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS, 10 % glicerol
	6 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 20 mM CHAPS, 10 % glicerol
	7 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS, 20 % glicerol
	8 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 20 mM CHAPS, 20 % glicerol
	9 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 20 mM CHAPS
	10 20 mM HEPES pH 8, 20 mM CHAPS, 20 % glicerol

Entre parèntesi al final de l'experiment s'inclou el punt de l'apartat d'Anàlisi i Discussió de Resultats en el qual es comenta.

En l'experiment per a la tria del millor tampó de solubilització amb base Triton x-100, es prepara un únic cultiu de 30 mL de medi LB i el *pellet* resultant es divideix en tres en el moment del rentat amb NaCl. Per tant, cada prova d'extracció es realitza sobre les cèl·lules corresponents a 10 mL de cultiu. En aquest mateix experiment, el volum de tampó d'extracció es redueix a 1 mL i en el procés de sonicació es realitzen 3 polsos de 10 seg. cadascun (*output control 5* i *duty cycle 30%* en el sonicador Branson Sonifier model 250).

En l'experiment per a la tria del millor tampó de solubilització amb base CHAPS, es preparen cultius de 20 mL de medi LB. Els *pellets* es resuspenen en 1.5 mL del tampó d'extracció corresponent i el seu procés de sonicació consisteix en 3 polsos de 30 seg. cadascun (*output control 5* i *duty cycle 30%* en el sonicador Branson Sonifier model 250).

9.1.3 Expressió i extracció de GT-MG517 a partir de la construcció pET517HisC mitjançant co-expressió amb xaperones en un volum de cultiu d'1 L

Una colònia única de cèl·lules d'*E.coli* BL21 DE3 cotransformades amb pET517HisC i pGro7 s'utilitza per inocular 20 mL de medi LB estèril suplementat amb 50 µg/mL d'ampicil·lina i 170 µg/mL de cloramfenicol, els quals s'incuben entre 6-7 hores a 250 rpm i 37 °C. Passat aquest temps, el cultiu obtingut s'utilitza per inocular 1 L de medi LB fresc

suplementat amb els mateixos dos antibiòtics i es procedeix de la mateixa forma descrita en el punt anterior per a la inducció de l'expressió en un volum de 50 mL de medi de cultiu.

Un cop recuperat el *pellet* cel·lular per centrifugació a 5000 g durant 10 min a 4 °C, aquest es renta amb 100 mL de NaCl 0.9 % fred. Per tal de procedir a l'extracció de GT-MG517, les cèl·lules es resuspenen en 100 mL de tampó, el qual és diferent en funció de l'experiment que es realitza, tal com s'indica en la Taula 9.2.

Taula 9.2. Composició dels diferents tampons d'extracció utilitzats per volums de cultiu d'1 L.

Experiment	Composició	
Extracció amb base al detergent Triton x-100 (4.4.2)	A	50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % w/v triton x-100
	B	50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % w/v triton x-100, 5 % glicerol i 20 mM imidazole
Extracció amb base al detergent CHAPS (4.5.2) i cinètiques (Capítol 5)	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20 % glicerol	

Entre parèntesi al final de l'experiment s'inclou el punt de l'apartat d'Anàlisi i Discussió de Resultats en el qual es comenta.

La suspensió cel·lular resultant es lisa mitjançant el seu pas per un disruptor cel·lular (Constant Cell Disruption Systems) a una pressió de 20.5 kPsi. El que es recupera del procés de lisi, se centrifuga a 16000g durant 30 min a 4 °C. El *pellet* es descarta i el sobrenedant se sonica (2 min en un sonicador Branson model 250, *output control* 5 i *duty cycle* 30%) per disminuir-ne la viscositat. Finalment se centrifuga de nou a 16000g durant 30 min més a 4 °C i l'extracte que conté GT-MG517 es filtra a través d'un filtre de 0.22 µm de Millipore, per tal que estigui apunt per a ser carregat en una columna de purificació per afinitat a metall (IMAC).

9.1.4 Expressió i extracció de GT-MG517 a partir de la construcció pET517HisN mitjançant co-expressió amb xaperones en un volum de cultiu d'1 L

Es transformen cèl·lules d'*E.coli* BL21 DE3 competents, preparades segons el mètode descrit per Sambrook *et al.*, 2001, i les quals contenen el vector pGro7, amb la construcció pET517HisN i totes les construccions derivades d'ella que contenen les set formes truncades del gen *mg517*, seguint el protocol estàndard descrit pel mateix autor.

A partir d'una colònia única, cada soca d'*E.coli* cotransformada es fa créixer en un preinòcul de 20 mL de medi estèril LB suplementat amb 50 µg/mL d'ampicil·lina i 170 µg/mL de cloramfenicol, els quals s'incuben entre 6-7 hores a 250 rpm i 37 °C. A partir d'aquests pre-inòculs, es procedeix tal com s'ha descrit en el punt anterior, amb l'excepció que un cop addicionat l'IPTG, el cultiu s'incuba O/N a 20 °C en comptes de a 30 °C. El tampó d'extracció que s'utilitza és el mateix en tots els casos, 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20 % glicerol.

9.1.5 Expressió i extracció de FT-MG517(1-197) en un volum de cultiu d'1 L

Es transformen cèl·lules d'*E.coli* BL21 DE3 competents, preparades segons el mètode descrit per Sambrook *et al.*, 2001 amb la construcció pET517HisN(1-197), seguint el protocol estàndard descrit pel mateix autor.

A partir d'una colònia única es fa créixer un preinòcul de 20 mL de medi estèril LB suplementat amb 50 µg/mL d'ampicil·lina durant unes 6-7 hores a 250 rpm i 37 °C. Passat aquest temps el pre-inòcul s'utilitza per inocular 1 L de medi LB fresc suplementat amb el mateix antibiòtic. El cultiu es manté a 250 rpm i 37 °C fins que l'OD₆₀₀ assoleix un valor de 0.4. En aquest punt, s'indueix l'expressió proteica amb 1 mM IPTG i la temperatura es disminueix fins als 20 °C. El cultiu es manté o/n i les cèl·lules es recuperen per centrifugació a 5000 g durant 10 min a 4 °C. Després de rentar-les amb 100 mL de NaCl 0.9 %, es resuspenen en 100 mL del tampó 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl i es lisen segons el procediment descrit en el punt 9.1.3.

9.2 Purificació de GT-MG517 mitjançant cromatografia d'afinitat per metall (IMAC)

El protocol de purificació de GT-MG517 mitjançant cromatografia d'afinitat per metall (IMAC) té lloc a partir de l'ús de columnes d'afinitat per Ni²⁺ HisTrap™ HP de GE Healthcare d'1 mL de capacitat en un aparell ÄKTApurifier™ FPLC també de GE Healthcare.

Taula 9.3. Resum dels processos de purificació per IMAC realitzats a partir dels extractes de GT-MG517HisC, GT-MG517HisN i les seves formes truncades. S'inclou la Figura de l'apartat d'Anàlisi i Discussió de Resultats on es mostren els resultats corresponents.

Experiment	Tampó de càrrega	Tampó rentat	Tampó elució	Mode elució (valors en mM imidazole)	Figura
Purificació amb Triton x-100 de GT-MG517HisC	50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % w/v triton	-	50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % w/v triton, 500 mM imidazole	Graons 50, 100, 250 i 500	4.10
	50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % w/v triton, 5 % glicerol, 20 mM imidazole	-	50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % w/v triton, 5 % glicerol, 500 mM imidazole	Gradient 0 – 500 (60 min a 1 mL/min)	4.11a
		50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 20 % glicerol	50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 20 % glicerol, 500 mM imidazole	50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 20 % glicerol, 500 mM imidazole	Gradient 0 – 500 (60 min a 1 mL/min)
Purificació amb CHAPS de GT-MG517HisC	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS, 20 % glicerol	-	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS, 20 % glicerol, 500 mM imidazole	Gradient 0 – 500 (60 min a 1 mL/min)	4.18
		-	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS, 20 % glicerol, 500 mM imidazole	Gradient 0 – 40 (60 min a 1 mL/min) Constant a 40 Gradient 40 – 300 (60 min a 1 mL/min)	4.19a
		-	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS, 20 % glicerol	Gradient 0 – 40 (60 min a 1 mL/min) Constant a 40 Graó 300	4.19b
		20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 20 % glicerol	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 20 % glicerol, 500 mM imidazole	Gradient 0 – 500 (60 min a 1 mL/min)	4.20
		20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 20 % glicerol	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 20 % glicerol, 500 mM imidazole	Gradient 0 – 40 (60 min a 1 mL/min) Constant a 40 Graó 300	4.21 i cinètiques Capítol 5

Taula 9.3. Resum dels processos de purificació per IMAC realitzats a partir dels extractes de GT-MG517HisC, GT-MG517HisN i les seves formes truncades (continuació). S'inclou la Figura de l'apartat d'Anàlisi i Discussió de Resultats on es mostren els resultats corresponents.

Experiment	Tampó de càrrega	Tampó rentat	Tampó elució	Mode elució (valors en mM imidazole)	Figura
Purificació amb CHAPS de GT-MG517HisN	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS, 20 % glicerol	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 20 % glicerol	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 20 % glicerol, 500 mM imidazole	Gradient 0 – 40 (60 min a 1 mL/min) Constant a 40 Graó 500	6.8
Purificació amb CHAPS de les formes truncades de GT-MG517	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS, 20 % glicerol	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 20 % glicerol	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 20 % glicerol, 500 mM imidazole	Gradient 0 – 40 (60 min a 1 mL/min) Constant a 40 Graó 500	6.14 6.15
Purificació de FT7	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl	-	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole	Gradient 0 – 40 (60 min a 1 mL/min) Constant a 40 Graó 500	6.19

Els extractes de 100 mL que contenen GT-MG517 o les seves formes truncades obtinguts segons els diversos procediments descrits en els punts 9.1.3 i 9.1.4 es carreguen a l'esmentada columna prèviament equilibrada amb 5 volums de columna (CV) del tampó usat en l'extracció de la proteïna. Aquesta càrrega té lloc a 4 °C amb l'ajut d'una bomba peristàtica i a un flux de 1 mL/min. Un cop carregat tot l'extracte, la columna es connecta a l'Äkta i es continua passant tampó d'extracció fins que es recupera el senyal d'UV de la línia de base corresponent al tampó d'extracció o tampó de càrrega. A partir d'aquest punt, se segueix un protocol diferent en funció de l'experiment, tal com es resumeix en la Taula 9.3.

En els casos en els quals s'ha utilitzat un tampó de rentat per tal d'eliminar el detergent del tampó de càrrega, el procediment seguit ha estat el següent. Un cop tot l'extracte proteic s'ha carregat a la columna d'afinitat i GT-MG517 es troba ancorada a la columna, es passen a través d'aquesta entre 90 – 100 CV del tampó de rentat, el qual no conté el detergent a eliminar. Tot el procés té lloc a 4 °C i amb l'ajut d'una bomba peristàtica i a un flux de 1 mL/min. Després del canvi de tampó, la columna es connecta a l'Äkta per procedir a l'elució amb imidazole, segons el procediment establert i inclòs en la Taula anterior.

El resultat de l'elució es recull en fraccions de 2 mL. Aquelles que segons el perfil d'UV subministrat per l'Äkta contenen proteïna s'analitzen per SDS-PAGE i es tenyeixen amb blau de Coomassie. Les fraccions per les quals es confirma que contenen GT-MG517 s'uneixen i en funció de l'experiment, se sotmeten a diàlisi contra un tampó equivalent al d'elució, però sense imidazole. Les membranes emprades en la diàlisi tenen un *cut off* de 30 kDa (Cellu Sep). El procediment habitual de diàlisi consisteix en 4 canvis de 250 mL de tampó cada 2 hores. El procés esdevé a 4 °C.

9.3 Purificació de GT-MG517 mitjançant cromatografia de gel-filtració

Moltes mostres provinents d'una purificació per IMAC se sotmeten a una segona purificació mitjançant cromatografia de gel-filtració. A la Taula 9.4 es resumeixen les condicions emprades en cadascun dels experiments realitzats, tots ells emprant l'ÄKTApurifier™ FPLC de GE Healthcare.

Taula 9.4. Resum dels processos de purificació mitjançant cromatografia de gel-filtració realitzats a partir de mostres que contenen GT-MG517HisC, GT-MG517HisN o les seves formes truncades.

Experiment	Tampó d'elució	Columna	Flux (mL/min)	V _{injecció} (mL)	Figura
Purificació de GT-MG517HisC	50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % w/v triton, 5 % glicerol	Superdex™ 200 10/300 GL de GE Healthcare	0.5	0.1	4.13
	50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 5 % glicerol, 12.5 mM OG				
	50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 5 % glicerol, 0.8 mM DM	Superdex™ 200 3.2/30 PC de GE Healthcare	0.3	0.01	4.14
	50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 5 % glicerol, 0.075 mM DDM				
	50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 5 % glicerol, 4 mM C ₈ E ₄				
Purificació de GT-MG517HisC	50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 20 % glicerol	Superdex™ 200 XK 16 de GE Healthcare	0.2 i 0.3	2	4.16, 4.23, 4.24
Purificació de FT7	20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl	Superdex™ 200 XK 16 de GE Healthcare	0.2	2	6.20

OG: octil-β-D-glucopiranòsid; DM: decil-β-D-maltopiranòsid; DDM: n-dodecil-β-D-maltòsid; C₈E₄: octiltetraoxietil-lè

En tots els casos, la columna emprada s'equilibra amb 2 CV del tampó d'elució abans de la injecció de la mostra a purificar. Al llarg de la cromatografia es prenen fraccions d'1 mL, amb l'excepció de l'experiment en el qual s'utilitza la columna Superdex™ 200 3.2/30 PC de volum 2.4 mL, en la qual es prenen fraccions de 30 μL. Aquelles per les quals el senyal d'UV indica la presència de proteïna, s'analitzen per SDS-PAGE amb tinció de blau de Coomassie o de plata, en funció de l'experiment.

9.4 Purificació de GT-MG517 mitjançant una columna d'hidroxiapatita

Una mostra de GT-MG517 purificada prèviament per IMAC es sotmet a una columna d'hidroxiapatita. L'esmentada mostra té una concentració determinada per BCA de 2.9 mg/mL i es troba en el tampó 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20 % glicerol.

La columna es prepara amb 20 mL de la resina Bio-Gel® HT de Bio Rad, segons les instruccions subministrades pel fabricant. Un cop empaquetada, la columna es connecta a l'ÄKTApurifier™ FPLC de GE Healthcare, s'equilibra amb 5 CV del tampó 20 mM HEPES pH 8, 50 mM fosfat, 500 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20 % glicerol i es carrega amb els 4 mL corresponents a la mostra de proteïna. Després de la càrrega, es passen 120 mL més del tampó anterior,

per tal de descartar les proteïnes no unides a la columna. A continuació s'inicia un gradient de fosfat amb un tampó de composició 300 mM fosfat pH 8, 200 mM NaCl, 10 mM CHAPS i 20 % glicerol, el qual té una durada de 60 min. a un flux de 1 mL/min.

Es recullen fraccions de 2 mL durant tot el procés i aquelles que, segons el perfil del senyal UV contenen proteïna, s'analitzen per SDS-PAGE i una tinció amb blau de Coomassie.

9.5 Canvi de tampó mitjançant immobilització en una resina d'afinitat per Ni²⁺

Aquesta estratègia s'empra per tal de canviar un tampó on es troba GT-MG517, el qual conté triton x-100, per altres en els quals el detergent és un de tipus alquil glucòsid. S'utilitza una resina quelant en la qual pot immobilitzar-se el metall desitjat, que en aquest cas és el Ni²⁺ (Chelating Sepharose™ Fast Flow de GE Healthcare).

Es vortexa el pot de resina intensament i es pren 1 mL d'aquesta, amb una capacitat d'unió de 5 mg de proteïna per mL de resina. La resina es tracta segons les instruccions del fabricant per tal d'unir-hi el metall Ni²⁺ i finalment s'equilibra amb 1 volum, és a dir, 1 mL, del tampó de càrrega en el qual es troba la mostra de GT-MG517, 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 0.5 % w/v triton i 5 % glicerol, la qual té una concentració al voltant de 1 mg/mL. El conjunt s'incuba amb agitació O/N a 4 °C. A continuació, la resina se sedimenta per centrifugació a 500 g durant 5 min i se n'elimina el sobrenedant, el qual constitueix el que no s'ha unit a la resina, és a dir, el *flow-trough*. La resina es resuspèn amb 5 CV del tampó de neteja 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl i 20 % glicerol i s'incuba durant 10 min amb agitació i a 4 °C. Tot seguit, la resina se sedimenta de nou a 500 g durant 5 min i el sobrenedant es guarda per al seu anàlisi. El procés es repeteix dues vegades més, per tal d'assegurar l'eliminació del triton de la proteïna unida a la resina. Per a l'elució de la proteïna la resina es resuspèn en 2 CV del tampó d'elució de composició 50 mM fosfat pH 7, 500 mM NaCl, 5 % glicerol, el detergent corresponent (Taula 9.5) i 500 mM imidazole. El conjunt s'incuba amb agitació durant 1 hora a 4 °C i a continuació se sedimenta mitjançant centrifugació a 500 g durant 5 min. El sobrenedant que s'obté conté GT-MG517 en un tampó on ja no queda triton. L'elució es repeteix dues vegades més amb 1 CV i els sobrenedants obtinguts es recuperen per al seu anàlisi per SDS-PAGE.

Taula 9.5. Composició dels diferents tampons que contenen detergents de tipus alquil glucòsid.

Tampó	Composició
OG	500 mM NaCl, 50 mM fosfat pH 7, 5 % glicerol, 12.5 mM OG
DM	500 mM NaCl, 50 mM fosfat pH 7, 5 % glicerol, 0.8 mM DM
DDM	500 mM NaCl, 50 mM fosfat pH 7, 5 % glicerol, 0.075 mM DDM
C ₈ E ₄	500 mM NaCl, 50 mM fosfat pH 7, 5 % glicerol, 4 mM C ₈ E ₄

9.6 Mètodes colorimètrics de quantificació de proteïnes

Els mètodes més habituals per a quantificar solucions proteïques són directament per espectrofotometria, en cas que prèviament s'hagi determinat de forma experimental el coeficient d'absortivitat molar (ϵ) a 280 nm de la proteïna d'interès, o mitjançant una anàlisi de Bradford, en la qual és necessària una recta patró amb una proteïna estàndard de concentració coneguda, paper que normalment té la proteïna BSA (albúmina de sèrum bovi).

Un requeriment bàsic per tal de poder aplicar el primer dels mètodes és l'absència en la solució proteica de compostos no absorbents dins de la franja corresponent a l'UV, els quals signifiquen una interferència molt important per a la quantificació. Aquest és el cas del detergent triton x-100, que per la seva estructura molecular presenta un màxim d'absorció a 280 nm.

D'altra banda, el mètode de Bradford utilitza un reactiu no compatible amb elevades concentracions ni de detergents ni de glicerol, compostos presents en els diferents tampons emprats en el present treball. Aquest fet ha propiciat que la quantificació de solucions proteïques s'hagi realitzat a partir de dos assajos diferents: el mètode de Lowry i el mètode de BCA, els quals s'expliquen a continuació.

9.6.1 Mètode de Lowry per a la quantificació de solucions proteïques

El mètode de Lowry permet quantificar solucions proteïques de concentracions entre 10 $\mu\text{g/mL}$ i 1 mg/mL de proteïna. No s'utilitza cap kit comercial per a la seva aplicació. Per tant, els reactius necessaris es preparen segons el citat en la Taula 9.6.

Taula 9.6. Reactius per a l'aplicació del mètode de Lowry.

Reactiu	Composició
A	2 % Na_2CO_3 en 0.1 N de NaOH
B	0.5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 % tartrat sòdic i potàssic
C	50 mL Reactiu A + 1 mL Reactiu B
D	Reactiu de Folin (Sigma-Aldrich) diluït en aigua mQ 1:1

Es preparen patrons de BSA (200 μL) segons el que s'estableix a la Taula 9.7, per tal d'obtenir una recta de calibració on es relacioni l'absorbància a 750 nm produïda per l'assaig i la concentració de proteïna dels patrons, en la qual es puguin interpolar els valors d'absorbància obtinguts per les mostres a quantificar.

Taula 9.7. Patrons de BSA a preparar per a l'assaig de Lowry.

Patró	Dissolució BSA	Tampó	Nom patró
20 $\mu\text{g/mL}$	40 μL BSA stock	3960 μL tampó	1
16 $\mu\text{g/mL}$	160 μL 1	40 μL tampó	2
12 $\mu\text{g/mL}$	120 μL 1	80 μL tampó	3
8 $\mu\text{g/mL}$	80 μL 1	120 μL tampó	4
4 $\mu\text{g/mL}$	40 μL 1	160 μL tampó	5
0	-	200 μL tampó	6

També es preparen dilucions de les mostres a quantificar, de forma que aquestes puguin entrar dins del rang d'aplicació de l'assaig. Es prenen 200 μL d'aquestes dilucions i s'hi addiciona 1 mL del Reactiu C. Es procedeix de la mateixa manera amb els patrons. El conjunt es manté a temperatura ambient durant 10 min. Passat aquest temps, s'addicionen 100 μL del Reactiu D i s'incuben també a temperatura ambient durant 30 min. A continuació es mesura l'absorbància tant de patrons com de mostres a 750 nm, es construeix la recta de calibració abans esmentada i s'interpolen els valors d'absorbància obtinguts per a les mostres, els quals permeten la seva quantificació.

9.6.2 Mètode de BCA per a la quantificació de solucions proteiques

L'assaig de BCA (*bicinchoninic acid assay*) es desenvolupa a partir del kit Pierce® BCA Protein Assay, compost pel Reactiu A (solució d'àcid bicinconínic i tartrat sòdic), pel Reactiu B (solució de sulfat cúpric) i per una dissolució estàndard de BSA de concentració 2 mg/mL. Es tracta d'un assaig amb un rang d'aplicació entre 20 $\mu\text{g/mL}$ i 2 mg/mL de proteïna.

Inicialment es preparen patrons de BSA (100 μL) segons l'establert en la Taula 9.8.

Taula 9.8. Patrons de BSA a preparar per a l'assaig de BCA.

Patró	Dissolució BSA	Tampó	Nom patró
1 mg/mL	100 μL BSA stock	100 μL tampó	A
0.5 mg/mL	100 μL A	100 μL tampó	B
0.25 mg/mL	100 μL B	100 μL tampó	C
0.125 mg/mL	100 μL C	100 μL tampó	D
31.25 $\mu\text{g/mL}$	50 μL D	150 μL tampó	-
0	-	100 μL tampó	-

També es preparen les mostres corresponents a la solució proteica que es pretén quantificar, amb la dilució adequada per tal que la concentració es trobi dins del rang d'aplicació de la recta de calibració amb els patrons de BSA.

S'addicionen 50 μL de cada patró i de mostra a un tub Eppendorf. Es prepara l'anomenat Reactiu de Treball, el qual conté 50 parts del Reactiu A i 1 part del Reactiu B. Cal calcular el volum necessari de Reactiu de Treball tenint en compte el nombre de mostres que es pretenen quantificar i que en cadascuna s'hi addiciona 1 mL de l'esmentat reactiu. Un cop s'addiciona aquest volum als patrons i a les mostres, s'incuben a 37 °C durant 30 min. Després d'aquest temps, es deixen refredar fins a temperatura ambient i se'n mesura l'absorbància a 562 nm. Com que el desenvolupament del color propiciat pels reactius de l'assaig, el qual es proporcional a la quantitat de proteïna, no s'atura, cal mesurar patrons i mostres dins d'un interval de temps no superior a 10 min.

Amb els valors d'absorbància obtinguts pels patrons de BSA, s'ajusta una recta que relaciona absorbància i concentració de proteïna i la qual s'usa per conèixer la concentració de les mostres.

Capítol 10: Protocols per a la determinació
de l'activitat glicosiltransferasa i
la producció de glicolípid

10 Protocols per a la determinació de l'activitat glicosiltransferasa i la producció de glicolípid

10.1 Anàlisi de la producció de glicolípid *in vivo*

Es parteix de 10 mL d'un cultiu de cèl·lules d'*E.coli*, les quals expressen GT-MG517, ja sigui amb la cua d'His a l'extrem C-terminal, N-terminal o alguna de les formes truncades dissenyades en el present treball. El *pellet* cel·lular es recupera per centrifugació a 5000 g durant 10 min i a 4 °C i es renta amb 1 mL de NaCl 0.9 % fred. Per tal de realitzar l'extracció dels lípids presents en les cèl·lules, l'esmentat *pellet* es resuspèn en 500 µL de la mescla orgànica cloroform/metanol 2:1 amb l'ajut d'un bany d'ultrasons, en el qual es manté 10 min. A continuació, el conjunt se centrifuga a 16000 g durant 5 min a 4 °C i s'observa com en resulten dues fases i un *pellet*. Únicament es recupera la fase orgànica (inferior), la qual s'evapora amb una corrent de nitrogen i posteriorment es reconstitueix amb un volum determinat de la mescla cloroform/metanol 2:1 (aquest volum pot anar entre 20 i 100 µL, en funció de la concentració de lípids que s'espera observar en la mostra).

Per tal de visualitzar el contingut en glicolípid de les cèl·lules es realitza una cromatografia de capa fina o *thin layer chromatography* (TLC). S'utilitzen les capes fines de Merk TLC Silica gel 60 F₂₅₄ aluminium sheets 20x20 cm, en les quals es punxen 20 µL de la solució anterior. L'eluent de la cromatografia és una mescla cloroform/metanol/aigua de proporcions 65:25:4. Per tal de procedir al revelat dels glicolípid presents a les mostres es pot procedir de dues formes diferents:

- Si únicament es desitja visualitzar els glicolípid, la TLC es submergeix en una dissolució 0.5 % d' α -naftol preparada amb una mescla 1:1 d'aigua i metanol. Després de deixar assecar lleugerament aquesta primera solució, es procedeix a submergir de nou la TLC, aquest cop en una dissolució d'àcid sulfúric, metanol i aigua de proporcions 45:45:10. Per al desenvolupament del color lila que aquesta tinció proporciona als glicolípid, cal esclafar la TLC en un forn entre 5-10 min.
- Si per contra es desitja veure tots els lípid presents en la mostra, la TLC se submergeix únicament en la solució d'àcid sulfúric, metanol i aigua i es crema en el forn. En aquest cas, els glicolípid apareixen de color rosa si no es deixa cremar la TLC en excés.

10.2 Anàlisi de la producció de glicolípid *ex vivo*: assaig qualitatiu.

Aquest assaig es realitza sobre extractes cel·lulars de cèl·lules d'*E.coli* que expressen GT-MG517 o sobre proteïna purificada. En el primer supòsit, els extractes es preparen segons el protocol següent.

10.2.1 Preparació d'extractes cel·lulars de cèl·lules d'*E.coli* per a l'assaig d'activitat qualitatiu

Es parteix de 10 mL d'un cultiu de cèl·lules d'*E.coli*, les quals expressen GT-MG517, ja sigui amb la cua d'His a l'extrem C-terminal o a l'extrem N-terminal. El *pellet* cel·lular es recupera per centrifugació a 5000 g durant 10 min i a 4 °C i es renta amb 1 mL de NaCl 0.9 % fred. A continuació, l'esmentat *pellet* es resuspèn en 600 µL d'una

dissolució de composició 25 % sucrosa i 1 mM EDTA i s'incuba amb agitació i a temperatura ambient durant 10 min. El resultat es centrifuga de nou a 5000 g durant 5 min a temperatura ambient i el sobrenedant es descarta. El *pellet* es resuspèn ara amb 600 µL d'aigua mQ freda i s'incuba amb agitació a 4 °C durant 10 min. El resultat d'aquesta acció és el trencament de la paret cel·lular de les cèl·lules d'*E.coli*, donant lloc a les estructures anomenades esferoplasts. Després de la incubació, aquests esferoplasts es recuperen per centrifugació a 5000 g durant 10 min a 4 °C i es resuspenen novament amb 200 µL del tampó de reacció 120 mM Tris-malat pH 8, 20 mM MgCl₂.

10.2.2 Assaig d'activitat qualitatiu

Les condicions de reacció sota les quals té lloc l'esmentat assaig que determina de forma qualitativa l'activitat de la proteïna GT-MG517, ja sigui purificada o situada en els esferoplasts descrits en el punt anterior, són les que s'estableixen en la Taula 10.1.

Taula 10.1. Condicions de reacció estàndards de l'assaig qualitatiu per l'activitat de GT-MG517

Compost	Concentració stock	Concentració en reacció
Tris-malat pH 8	1.2 M	120 mM
MgCl ₂	200 mM	20 mM
UDP-Glc (donador)	50 mM	5 mM
DOG / SDS (acceptor)	10 mM/2 mM	1 mM / 0.2 mM
T _{reacció}	-	35 °C
t _{reacció}	-	O/N

Cal dir que la dissolució stock de l'acceptor DOG s'ha preparat dissolent la quantitat requerida de DOG en una solució 2 mM del detergent SDS. Per tal que la dissolució del lípid sigui efectiva, és necessari un tractament en un bany d'ultrasons durant 10 min. L'esmentada solució stock s'aliquota i es guarda a -20 °C. En el moment de ser utilitzada, la suspensió de DOG en SDS es reconstitueix mitjançant la repetició del tractament al bany d'ultrasons.

El volum de reacció habitual és de 100 µL. Així, s'introdueixen en un tub Eppendorf 10 µL del tampó de reacció Tris-malat pH 8 1.2 M, 10 µL de MgCl₂ 200 mM i 10 µL de l'acceptor DOG/SDS després del tractament a l'ultrasons. A continuació, s'addicionen 40 µL de la font proteica, ja sigui proteïna purificada o esferoplasts. Finalment, la reacció s'inicia a partir de l'addició de 10 µL d'UDP-Glc 50 mM. La incubació del conjunt té lloc a 35 °C O/N.

Per tal d'analitzar els glicolípid produïts per la reacció enzimàtica, s'addicionen a aquesta 250 µL (2.5 volums de reacció) de la mescla cloroform/metanol 2:1, fet que propicia la parada de la reacció degut a la desnaturalització de l'enzim per part del dissolvent orgànic. El conjunt es manté 10 min en un bany d'ultrasons amb l'objectiu que l'extracció dels glicolípid sigui efectiva. A continuació la mostra se centrifuga 1 min a 16000 g per tal de separar la fase orgànica d'interès de la fase aquosa. L'esmentada fase orgànica se separa i s'evapora mitjançant una corrent de nitrogen. Finalment es reconstitueix amb 50 µL de la mescla cloroform/metanol 2:1 i es punxa a una TLC, la qual s'elueix i es revela tal com s'ha explicat en el punt 10.1 del present capítol.

10.3 Assaig d'activitat radiomètric

10.3.1 Obtenció de les rectes patró dels substrats donadors i optimització del temps de comptatge

Els substrats radioactius emprats en l'assaig radiomètric han estat subministrats per GE Healthcare i es troben marcats amb ^{14}C en els sis carbonis del sucre, ja sigui de la glucosa o de la galactosa. Les seves característiques es detallen a la Taula 10.2.

Taula 10.2. Característiques dels substrats donadors radioactius UDP-Glc i UDP-Gal.

Substrat donador	Referència GE Healthcare	Activitat específica	Concentració radioactiva
Uridine diphospho-D-[U- ^{14}C]galactose, ammonium salt	CFB129	285 mCi/mmol	25 $\mu\text{Ci/mL}$
Uridine diphospho-D-[U- ^{14}C]glucose, ammonium salt	CFB102	293 mCi/mmol	25 $\mu\text{Ci/mL}$

Per tal de poder treballar amb diferents concentracions de donador i mantenir la sensibilitat del mètode radioactiu, és necessari treballar amb dues relacions molars radioactiu/no radioactiu diferents: 1/200 i 1/50, la primera per a la majoria dels casos i la segona per a reaccions amb concentracions de donador iguals o inferiors a 50 μM . Les rectes patró del dos donadors utilitzats es calculen per a les dues relacions. Per fer-ho es preparen dissolucions stock (Taula 10.3) i a partir d'elles, s'obtenen diferents dilucions, que són les que s'analitzen en el comptador de centelleig TRI-CARB 2100 TR de Packard. En el cas de la relació 1/200 les dilucions que es preparen a partir de l'stock 10 mM són 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 i 7.81 μM . En el cas de la relació 1/50, les dilucions que es preparen a partir de l'stock 500 μM són 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 i 0.39 μM .

Taula 10.3. Preparació de les dissolucions stock de donador per a les relacions 1/50 i 1/200

Dissolució stock	Volum donador marcat comercial	Volum donador no marcat	Aigua mQ
500 μM UDP-Glc 1/50	11.7 μL	9.8 μL de 5 mM	78.5 μL
500 μM UDP-Gal 1/50	11.4 μL	9.8 μL de 5 mM	78.8 μL
10 mM UDP-Glc 1/200	58.6 μL	19.9 μL de 50 mM	21.5 μL
10 mM UDP-Gal 1/200	56.8 μL	19.9 μL de 50 mM	23.3 μL

Les mostres per a les rectes patró dels donadors es preparen a partir de la mescla de 20 μL de la dilució corresponent amb 350 μL d'AcOEt, 500 μL de MeOH i 4 mL del líquid de centelleig ACS-II scintillation liquid de GE Healthcare.

La radioactivitat emesa per cada dilució de la relació 1/50 es compta utilitzant tres temps de comptatge diferents (1 min, 2 min i 4 min), fet que permet establir el marge de linealitat del mètode radiomètric per a cadascun d'ells. Cal dir que aquest marge de linealitat es determina a partir d'un factor de resposta (f) que relaciona la concentració de donador amb el senyal obtingut. A partir de totes les concentracions analitzades es calcula un factor de resposta promig (f_{prom}) i es consideren dins del marge de linealitat aquelles concentracions que es troben dins l'interval $f_{\text{prom}} \pm 10\%$.

Per a la relació 1/200 només es treballa amb el temps de comptatge de 2 min.

10.3.2 Optimització del procés d'extracció dels glicolípid de nova síntesi

Es preparen dos còctels de reacció sense enzim, un amb 50 μM d'UDP-Glc no radioactiva i l'altre amb UDP-Glc marcada (es fa igual per l'UDP-Gal). Per tots dos s'extreu una alíquota de 20 μL i s'addiciona a un tub Eppendorf que conté 500 μL d'AcOEt. Es vortexa i s'addicionen 250 μL de NaCl 0.45 %. El conjunt se centrifuga durant 5 min a 2500 rpm i 350 μL de la fase orgànica de cada mostra s'addicionen a un vial de centelleig que conté 4 mL de líquid i 0.5 mL de MeOH.

10.3.3 Preparació d'una reacció estàndard

Les condicions sota les quals té lloc una reacció estàndard per tal de determinar l'activitat glicosiltransferasa de GT-MG517 són les descrites en la Taula 10.4.

Taula 10.4. Condicions de reacció estàndard de l'assaig radiomètric

Compost	Concentració stock	Concentració en reacció
HEPES pH 8	200 mM	20 mM
MgCl ₂	200 mM	20 mM
CHAPS	100 mM	20 mM
DOG	-	1.25 mM
DOPG	-	12.5 mM
UDP- ¹⁴ C-Glc / UDP- ¹⁴ C-Gal	10 mM	1 mM
GT-MG517 (en extracte o purificada)	-	Variable segons lot ordre: μM
T _{reacció}	-	35 °C

La preparació del còctel de reacció té lloc en dues parts diferenciades. Primer cal preparar les micel·les mixtes que contenen el substrat acceptor, el detergent i els altres lípids i a continuació, addicionar la proteïna i el donador marcat radioactivament. El volum habitual de reacció és de 110 μL .

El DOG, el DOPG i en els casos en que és necessari el DOPC es dissolen en cloroform i s'addiciona a un vial de vidre la quantitat necessària segons la concentració final en reacció. El cloroform s'evapora mitjançant un corrent de nitrogen i per tal d'assegurar que s'elimina completament, el vial es manté al buit durant 1 hora. A continuació s'addicionen 11 μL del tampó 200 mM HEPES pH 8, 200 mM MgCl₂, 22 μL de la solució 100 mM CHAPS i 27 μL d'aigua mQ. El conjunt es vortexa vigorosament i es manté en un bany d'ultrasons durant 10 min per afavorir la formació de micel·les. Un cop aquestes s'han constituït (la dissolució es fa transparent), el conjunt es traspasa a un tub Eppendorf i un cop en ell, s'addicionen 10 μL de la font proteica, ja sigui un extracte o proteïna purificada, i 29 μL més d'aigua mQ. El conjunt s'incuba un mínim de 30 min. en gel per tal de permetre la incorporació de la proteïna a les micel·les. La reacció s'inicia amb l'addició de 10 μL d'una dissolució stock de donador marcat de la concentració desitjada.

A la Taula 10.5 es mostra un exemple dels volums i quantitats de lípids requerits per a la preparació d'una reacció estàndard.

Taula 10.5. Preparació d'una reacció estàndard de l'assaig radiomètric

Volum total de reacció = 110 µL		
Reacció	R1 - estàndard	
Lípids	DOG (Sigma-Aldrich)	85.4 µg
	DOPG (Sigma-Aldrich)	1.1 mg
Extracte lipídic (60 µL)	Tampó HEPES 200 mM, MgCl ₂ 200 mM	11 µL
	CHAPS 100 mM	22 µL
	Aigua mQ	27 µL
	GT-MG517 (12.4 µM)	10 µL
	Aigua mQ	29 µL
	UDP-Glc 10 mM 1/200	11 µL

10.3.4 Obtenció d'una corba de progrés de la reacció

L'addició del donador marcat es considera el punt inicial de la reacció de glicosilació. Per a les reaccions en les quals es treballa amb UDP-Glc s'extreuen alíquotes de 20 µL cada 4 minuts durant 20 minuts. Així és tenen les mostres de 4, 8, 12, 16 i 20 min. Per contra, en les reaccions en les quals el donador és UDP-Gal s'extreuen alíquotes de 20 µL cada 2 minuts durant 10 minuts, obtenint-se mostres de 2, 4, 6, 8 i 10 min.

Cadascuna d'aquestes alíquotes es tracta de la forma següent. Els 20 µL s'addicionen sobre 500 µL d'AcOEt i el conjunt es vortexa lleugerament per assegurar que té lloc la mescla i la reacció es para. Tot seguit, es procedeix al rentat de la fase orgànica amb 250 µL de NaCl 0.45 %. Per tal de separar les fases correctament, la mostra se centrifuga durant 5 min a 2500 rpm. Posteriorment, 350 µL de la fase orgànica s'extreuen mitjançant una xeringa Hamilton de 500 µL de volum i s'addicionen sobre el conjunt format per 500 µL de MeOH i 4 mL de líquid de centelleig. La solució resultant es mescla i s'introdueix al comptador de centelleig, on la radioactivitat emesa es compta durant 2 min.

Cal dir que el punt zero de les reaccions s'obté a partir d'una mescla de reacció en la qual no s'addiciona enzim, però sí donador marcat. L'extracció d'una alíquota de 20 µL d'aquesta mescla i el seu tractament segons el que s'ha exposat en el paràgraf anterior proporciona el valor de radioactivitat corresponent al moment inicial de les reaccions.

10.4 Producció i purificació de MGlcDG per al seu ús com a substrat acceptor en l'estudi cinètic de GT-MG517 com a DGlcDG sintasa

10.4.1 Obtenció de l'extracte proteic de GT-MG517

A partir d'una colònia única de cèl·lules d'*E. coli* cotransformades amb els plasmidis pET517HisC i pGro7, s'inoculen 9 mL de medi LB estèril suplementat amb 50 µg/mL d'ampicil·lina i 170 µg/mL de cloramfenicol, els quals s'incuben entre 6-7 hores a 250 rpm i 37 °C. Passat aquest temps, el cultiu obtingut s'utilitza per inocular 250 mL de medi LB

fresc suplementat amb els mateixos dos antibiòtics. Les cèl·lules s'incuben a 250 rpm i 37 °C fins que el seu OD₆₀₀ assoleix un valor de 0.4. En aquest moment, s'indueix l'expressió de les xaperones del vector pGro7 amb l'addició de 0.2 % de L-arabina al medi. Abans de la inducció de l'expressió de GT-MG517 amb 1 mM d'IPTG, el cultiu es manté 30 min a 37 °C i 250 rpm. Un cop addicionat l'IPTG, el conjunt s'incuba O/N a 30 °C i 250 rpm.

El *pellet* cel·lular es recupera per centrifugació a 5000 g durant 10 min. a 4 °C i es renta amb 25 mL d'una solució de NaCl 0.9 %. Les cèl·lules resultants es resuspenen en 8 mL del tampó 20 mM HEPES pH 8, 500 mM NaCl, 22 mM CHAPS i 10 % glicerol (en fred) i es lisen per sonicació realitzant 4 cicles de 30 seg. amb descansos de 5 min. entremig per evitar l'escalfament de la mostra (Sonicador Branson Sonifier model 250, paràmetres *output control* 5 i *duty cycle* 30%). Després de la lisi es realitza una incubació amb agitació a 4 °C de 2 hores per tal d'afavorir l'extracció de GT-MG517 per part del tampó. Finalment, el lisat se centrifuga a 16000 g i 4 °C durant 30 min. L'extracte soluble es quantifica mitjançant el mètode de BCA descrit en el punt 9.6.2.

10.4.2 Producció de glicolípid *ex vivo*

Una part de l'extracte generat segons el punt anterior s'empra com a font proteica en la reacció per a l'obtenció de MGlcDG. A la Taula 10.6 es presenten els components d'aquesta reacció, realitzada segons el descrit en el punt 10.2.2.

Taula 10.6. Condicions de reacció per a la producció de MGlcDG

Compost	Concentració stock	Concentració en reacció	Volums emprats
Tris-malat pH 8	1.2 M	120 mM	600 µL
MgCl ₂	200 mM	20 mM	600 µL
UDP-Glc (donador)	50 mM	5 mM	600 µL
DOG / SDS (acceptor)	10 mM/2 mM	1 mM / 0.2 mM	600 µL
Extracte proteic	10 mg/mL	12 mg prot tot	1200 µL
Aigua mQ	-	-	2400 µL
T _{reacció}	-	35 °C	-
t _{reacció}	-	O/N	-

Un cop finalitzat el temps d'incubació a 35 °C, els 6 mL de reacció es traspassen a un embut d'extracció i s'hi addicionen 2.5 volums de la mescla cloroform/metanol 2:1, és a dir, 15 mL. Amb aquest volum es realitza una primera extracció de la reacció, la fase orgànica de la qual es recull en un baló prèviament tarat. A continuació té lloc una segona extracció de la reacció amb 15 mL més de la mescla cloroform/metanol 2:1 i la nova fase orgànica s'uneix a la recuperada anteriorment. Per tal d'eliminar tot el precipitat corresponent a les proteïnes presents en la reacció, les quals es troben precipitades per l'acció del dissolvent orgànic, la fase orgànica es filtra. Finalment, i amb l'objectiu d'eliminar tota l'aigua present, s'addiciona MgSO₄ a la fase orgànica, s'agita i es filtra de nou. Per tal de recuperar tots els lípids extrets en el procés, l'esmentada fase orgànica es rotavapora fins a eliminar completament el dissolvent. El pas final consisteix a pesar el baló per tal de determinar el pes total de lípids, el qual condiona la quantitat de sílice que s'empra en la columna que constitueix el pas següent del protocol.

10.4.3 Separació del MGlcDG mitjançant una columna de sílice

Per tal d'aconseguir la separació dels diferents lípids de la mostra i principalment del MGlcDG, es prepara una columna de sílice en la qual es treballa amb una relació de 500 mg de fase estacionària per cada 10 mg de mescla inicial a separar. La sílice que s'empra és per a columnes *flash*, Sílica 60 AC.C 35-70 μm (Carlo Erba - SDS), ja que la columna que es realitza és d'aquest tipus.

Un cop muntada la columna i activada la sílice amb trietilamina, es procedeix a la càrrega de la mostra, és a dir, els lípids recuperats segons l'apartat anterior, els quals es dissolen en el menor volum possible de cloroform per a la seva càrrega. La seqüència d'eluent utilitzats en l'elució de la columna és la següent: cloroform, acetona i metanol. Ja que el cloroform s'empra per a la neteja de la sílice, només se'n passen uns 25 mL. És a partir del moment en el qual s'inicia el pas d'acetona que es comencen a recollir fraccions a la sortida de la columna, ja que és aquest dissolvent el que permet la separació dels glicolípid d'interès MGlcDG, DGlcDG i TGlcDG. El metanol s'empra al final amb l'objectiu d'eluir tots els components que no han sortit encara degut a la seva elevada polaritat.

Cadascuna de les fraccions recollides s'analitza per TLC, segon el procediment descrit en l'apartat 9.1 del present capítol. Aquelles fraccions que contenen MGlcDG sense impureses de DGlcDG s'uneixen en un vial prèviament tarat i se n'evapora el dissolvent. Mitjançant el pes del vial final s'estableix la quantitat aïllada de MGlcDG.

10.5 Determinació dels productes sintetitzats per GT-MG517 mitjançant HPLC-MS

Es preparen reaccions de condicions equivalents a les reaccions per a l'assaig radiomètric descrites en la Taula 10.4, amb la única diferència que s'utilitza un volum superior, 220 μL , i que els donadors emprats, UDP-Glc i UDP-Gal, no són radioactius.

Per a la determinació dels glicolípid presents inicialment a la mostra, s'extreu una alíquota de 10 μL de la mescla de reacció, just després de l'addició de la font proteica i abans de la introducció del donador. Aquest volum s'addiciona directament sobre 100 μL de metanol i la dissolució resultant s'injecta directament a l'equip d'HPLC. Per a les mostres corresponents als diversos temps de reacció, s'extreuen alíquotes de 20 μL , les quals s'addicionen a 200 μL de metanol i també s'injecten directament.

El cromatògraf emprat en l'anàlisi de les mostres és un Acquity™ UPLC de Waters, el qual té com a detector un espectròmetre de masses Micromass ZMD LC/MS, també de Waters. A la Taula 10.7 es descriuen les condicions sota les quals té lloc l'esmentada anàlisi.

Taula 10.7. Condicions del mètode cromatogràfic d'HPLC-MS per a la detecció de glicolípids.

Característiques	
Pre-columna	C18
Columna	Nova-Pack C18 (4 µm, 3.9 x 150 mm)
Fase mòbil	mescla 98:1 MeOH/aigua
Flux	1 ml/min
Volum d'injecció	10 µL
temps	30 min
Detector	Espectròmetre de masses: ESP+ / Mode SIR / Con 20 volts
m/z avaluades	[M+Na] ⁺ DOG = 644 [M+Na] ⁺ MGlcDG = 806 [M+Na] ⁺ DGlcDG = 968 [M+Na] ⁺ TGlcDG = 1130

BIBLIOGRAFIA

11 Bibliografia

Ahn, T., Yun, C.H. (2004). High-level expression of human cytochrome P450 3A4 by co-expression with human molecular chaperone HDJ-1 (Hsp40), *Arch. Pharm. Res.*, 27, 319-323.

Andersson, A.S., Rilfors, L., Bergqvist, M., Persson, S., Lindblom, G. (1996). New aspects on membrane lipid regulation in *Acholeplasma laidlawii* A and phase equilibria of monoacyldiglucoxydiacylglycerol, *Biochemistry*, 35, 11119-11130.

Barroso, J.F., Elholm, M., Flatmark, T. (2003). Tight binding of deoxyribonucleotide triphosphates to human thymidine kinase 2 expressed in *Escherichia coli*. Purification and partial characterization of its dimeric and tetrameric forms, *Biochemistry*, 42, 15158-15169.

Baseman J., Lange M., Criscimagna N., Giron J. and Thomas C. (1995). Interplay between mycoplasmas and host target cells, *Microb. Pathog.*, 19, 105-116.

Baseman, J. B. and Tully, J. G. (1997). Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety, *Emerg. Infect. Dis.*, 3, 21-32.

Bauer, M.W., Bylina, E.J., Swanson, R.V., Kelly, R.M. (1996). Comparison of a beta-glucosidase and a beta-mannosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Purification, characterization, gene cloning, and sequence analysis, *J. Biol. Chem.*, 271, 23749-23755.

Benders, G.A., Powell, B.C. and Hutchison III, C.A. (2005). Transcriptional analysis of the conserved *ftsZ* gene cluster in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*, *J. Bacteriol.*, 187, 4542-4551.

Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 77, 1496-1500.

Botté, C., Jeanneau, C., Snajdrova, L., Bastien, O., Imberty, A., Breton, C., Maréchal, E. (2005). Molecular modeling and site-directed mutagenesis of plant chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase reveal critical residues for activity, *J. Biol. Chem.*, 280, 34691-34701.

Bradshaw, C.S., Jensen, J.S., Tabrizi, S.N., Read, T.R., Garland, S.M., Hopkins, C.A., Moss, L.M., Fairley C.K. (2006). Azithromycin failure in *Mycoplasma genitalium* urethritis, *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 1149-1152.

Brockhausen, I., Hu, B., Liu, B., Lau, K., Szarek, W.A., Wang, L. and Feng, L. (2008). Characterization of two β -1,3-glucosyltransferases from *Escherichia coli* serotypes O56 and O152, *J. Bacteriol.*, 190, 4922-4932.

Burgos, R., Pich, O.Q., Ferrer-Navarro, M., Baseman, J.B., Querol, E. and Piñol, J (2006). *Mycoplasma genitalium* P140 and P110 cytoadhesins are reciprocally stabilized and required for cell adhesion and terminal-organelle development, *J. Bacteriol.*, 188, 8627-8637.

- Burgos, R., Pich, O.Q., Querol, E. and Piñol, J** (2007). Functional analysis of the *Mycoplasma genitalium* MG312 protein reveals a specific requirement of the MG312 N-terminal domain for gliding motility, *J. Bacteriol.*, 189, 7014-7023.
- Burgos, R., Pich, O.Q., Querol, E. and Piñol, J** (2008). Deletion of the *Mycoplasma genitalium* MG_217 gene modifies cell gliding behaviour by altering terminal organelle curvature, *Mol. Microbiol.*, 69, 1029-1040.
- Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V., and Henrissat, B.** (1997). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities, *Biochem. J.* 326 (Pt 3), 929-939.
- Cao, J., Kapke, P.A., and Minion, F.C.** (1994). Transformation of *Mycoplasma gallisepticum* with Tn916, Tn4001, and integrative plasmid vectors, *J. Bacteriol.*, 176, 4459-4462.
- Charnock, S. J. and Davies, G. J.** (1999). Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms, *Biochemistry*, 38, 6380-6385.
- Chiu, C. P. C., Watts, G. A., Lairson, L.L., Gilbert, M., Lim, D., Wakarchuk, W. W., Withers, S. G. and Strynadka, N. C. J.** (2004). Structural analysis of the sialyltransferase CstII from *Campylobacter jejuni* in complex with a substrate analog, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 163-170.
- Costa, J., Grabenhorst, E., Nimtz, M., Conradt, H.S.** (1997). Stable expression of the Golgi form and secretory variants of human fucosyltransferase III from BHK-21 cells. Purification and characterization of an engineered truncated form from the culture medium, *J. Biol. Chem.*, 272, 11613-11621.
- Covés, J., Blocka, M.A., Joyarda, J. and Douce, R.** (1986). Solubilization and partial purification of UDP-galactose:diacylglycerol galactosyltransferase activity from spinach chloroplast envelope, *FEBS Lett.*, 208, 401-406.
- Covés, J., Joyard, J., Douce, R.** (1988). Lipid requirement and kinetic studies of solubilized UDP-galactose:diacylglycerol galactosyltransferase activity from spinach chloroplast envelope membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 85, 4966-4970.
- Dahlqvist, A., Andersson, S., Wieslander, A.** (1992). The enzymatic synthesis of membrane glucolipids in *Acholeplasma laidlawii*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1105, 131-140.
- Dahlqvist, A., Nordstroem, S., Karlsson, O. P., Mannock, D. A., McElhaney, R. N., Wieslander, A.** (1995). Efficient modulation of glucolipid enzyme activities in membranes of *Acholeplasma laidlawii* by the type of lipids in the bilayer matrix, *Biochemistry*, 34, 13381-13389.
- Davies, J.G.** (2001). Sweet secrets of synthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 8, 98-100.
- Deguchi, T. and Maeda, S. I.** (2002). *Mycoplasma genitalium*: another important pathogen of nongonococcal urethritis, *Journal of Urology*, 167, 1210-1217.
- Dörmann, P. and Benning C.** (2002). Galactolipids rule in seed plants, *Trends Plant Sci.*, 7, 112-118.

Dörmann, P., Balbo, I., Benning, C. (1999). Arabidopsis galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1, *Science*, 284, 2181-2184.

Dörmann, P. and Hölzl, G. (2009). The role of glycolipids in photosynthesis, *H. Wada and N. Murata (eds), Lipids in photosynthesis: Essential and regulatory Functions*, 265-282.

Dutta-Roy, A.K., Sinha, A.K. (1987). Purification and properties of prostaglandin E1/prostacyclin receptor of human blood platelets, *J. Biol. Chem.*, 262, 12685-12691.

Eriksson, H.M., Persson, K., Zhang, S., Wieslander, K. (2009). High-yield expression and purification of a monotopic membrane glycosyltransferase, *Protein Expr. Purif.*, 66, 143-148.

Fadiel, A., Eichenbaum, K.D., El Sema, N., Epperson, B. (2007). Mycoplasma genomics: tailoring the genome for minimal life requirements through reductive evolution, *Front. Biosci.*, 12, 2020-2028.

Farkas, T., Deng, X., Ruiz-Palacios, G., Morrow, A. and Jiang, X. (2006). Development of an enzyme immunoassay for detection of sapovirus-specific antibodies and its application in a study of seroprevalence in children, *J. Clin. Microbiol.*, 44, 3674-3679.

Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd, *Science* 269, 496-512.

Franke, A.E., Clewell, D.B. (1981). Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid, *J. Bacteriol.*, 145, 494-502.

Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O., Adams, M. D., Clayton, R. A., Fleischmann, R. D., Bult, C. J., Kerlavage, A. R., Sutton, G., Kelley, J. M., Fritchman, R. D., Weidman, J. F., Small, K. V., Sandusky, M., Fuhrmann, J., Nguyen, D., Utterback, T. R., Saudek, D. M., Phillips, C. A., Merrick, J. M., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Bott, K. F., Hu, P. C., Lucier, T. S., Peterson, S. N., Smith, H. O., Hutchison, C. A., III, and Venter, J. C. (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*, *Science* 270, 397-403.

Forsyth, R.A., Haselbeck, R.J., Ohlsen, K.L., Yamamoto, R.T., Xu, H., Trawick, J.D., Wall, D., Wang, L., Brown-Driver, V., Froelich, J.M., Kedar G.C., King, P., McCarthy, M., Malone, C., Misiner, B., Robbins, D., Tan, Z., Zhu, Z., Carr, G., Mosca, D.A., Zamudio, C., Foulkes, J.G., Zyskind, J.W. (2002). A genome-wide strategy for the identification of essential genes in *Staphylococcus aureus*, *Mol. Microbiol.*, 43, 1387-1400.

Fujita-Yamaguchi, Y., Harmon, J.T. (1988). A monomer-dimer model explains the results of radiation inactivation: binding characteristics of insulin receptor purified from human placenta, *Biochemistry*, 27, 3252-3260.

Fukunaga, R., Ishizaka-Ikeda, E., Nagata, S. (1990). Purification and characterization of the receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor, *J. Biol. Chem.*, 265, 14008-14015.

- Gallet, P.F., Vaujour, H., Petit, J.M., Maftah, A., Oulmouden, A., Oriol, R., Le Narvor, C., Guilloton, M., Julien, R.** (1998). Heterologous expression of an engineered truncated form of human Lewis fucosyltransferase (Fuc-TIII) by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Glycobiology*, 8, 919-925.
- Garavito, R.M., Ferguson-Miller, S.** (2001). Detergents as tools in membrane biochemistry, *J. Biol. Chem.*, 276, 32403-32406.
- Garinot-Schneider, C., Lellouch, A. C. and Geremia, R.A.** (2000). Identification of essential amino acid residues in the *Sinorhizobium meliloti* glucosyltransferase ExoM, *J. Biol. Chem.*, 275, 31407-31413.
- Glass, J.I., Assad-Garcia, N., Alperovich, N., Yooseph, S., Lewis, M.R., Maruf, M., Hutchison III, C.A., Smith, H.O., and Venter, J.C.** (2006). Essential genes of a minimal bacterium, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 425-430.
- Gastinel, L.N., Bignon, C., Misra, A.K., Hindsgaul, O., Shaper, J.H. and Joziase D.H.** (2001). Bovine α -1,3-galactosyltransferase catalytic domain structure and its relationship with ABO histo-blood group and glycosphingolipid glycosyltransferases, *EMBO J.*, 20, 638-649.
- Goedl, C., Griessler, R., Schwarz, A. and Nidetzky, B.** (2006). Structure-function relationships for *Schizophyllum commune* trehalose phosphorylase and their implications for the catalytic mechanism of family GT-4 glycosyltransferases, *Biochem. J.*, 397, 491-500.
- Grabenhorst, E., Conradt, H.S.** (1999). The cytoplasmic, transmembrane, and stem regions of glycosyltransferases specify their *in vivo* functional sublocalization and stability in the Golgi, *J. Biol. Chem.*, 274, 36107-36116.
- He, H.T., Johnson, K., Thermos, K., Reisine, T.** (1989). Purification of a putative brain somatostatin receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 86, 1480-1484.
- Hedreyda, C.T., Lee, K.K. and Krause, D.C.** (1993). Transformation of *Mycoplasma pneumoniae* with Tn4001 by electroporation, *Plasmid*, 30, 170-175.
- Heemskerk, J.W.M., Storz, T., Schmidt, R.R. and Heinz, E.** (1990). Biosynthesis of digalactosyldiacylglycerol in plastids from 16:3 and 18:3 plants, *Plant. Physiol.*, 93, 1286-1294.
- Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkl, E., Li, B. C., and Herrmann, R.** (1996). Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*, *Nucleic Acids Res.* 24, 4420-4449.
- Hutchison III, C. A., Peterson, S. N., Gill, S. R., Cline, R. T., White, O., Fraser, C. M., Smith, H. O., and Venter, J. C.** (1999). Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome, *Science* 286, 2165-2169.
- Higuchi, M. L., Martins Reis, M., Vieira Sambiase, N., Pinheiro Palomino, S. A., Bianchi Castelli, J., Sampaio Gutierrez, P., Demarchi Aiello, V., Franchini Ramires, J. A.** (2003). Coinfection with *Mycoplasma Pneumoniae* and *Chlamydia Pneumoniae* in ruptured plaques associated with acute myocardial infarction, *Arq. Bras. Cardiol.*, 81, 12-22.

- Hölzl, G., Dörmann, P.** (2007). Structure and function of glycoacylglycerolipids in plants and bacteria, *Prog. Lipid Res.*, 46, 225-243.
- Hölzl, G., Leipelt, M., Ott, C., Zähringer, U., Lindner, B., Warnecke, D., Heinz, E.** (2005b). Processive lipid galactosyl/glucosyltransferases from *Agrobacterium tumefaciens* and *Mesorhizobium loti* display multiple specificities, *Glycobiology*, 15, 874-886.
- Hölzl, G., Witt, S., Gaude, N., Melzer, M., Schöttler, M.A., Dörmann, P.** (2009). The role of diglycosyl lipids in photosynthesis and membrane lipid homeostasis in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 150, 1147-1159.
- Hölzl, G., Zähringer, U., Warnecke, D., Heinz, E.** (2005a). Glycoengineering of cyanobacterial thylakoid membranes for future studies on the role of glycolipids in photosynthesis, *Plant Cell Physiol.*, 46, 1766-1778.
- Hryb, D.J., Khan, M.S., Romas, N.A., Rosner, W.** (1989). Solubilization and partial characterization of the sex hormone-binding globulin receptor from human prostate, *J. Biol. Chem.*, 264, 5378-5383.
- Igura, M., Maita, N., Kamishikiryo, J., Yamada, M., Obita, T., Maenaka, K. and Kohda, D.** (2008). Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase, *The EMBO Journal*, 27, 234-243.
- Jones, M.R.** (2007). Lipids in photosynthetic reaction centres: structural roles and functional holes, *Prog. Lipid Res.*, 46, 56-87.
- Jorasch, P., Wolter, F.P., Zähringer, U. and Heinz, E.** (1998). A UDP glucosyltransferase from *Bacillus subtilis* successively transfers up to four glucose residues to 1,2-diacylglycerol: expression of *ypfPypfP* in *Escherichia coli* and structural analysis of its reaction products. *Mol. Microbiol.*, 29, 419-430.
- Jorasch, P., Warnecke, D.C., Lindner, B., Zähringer, U., Heinz, E.** (2000). Novel processive and nonprocessive glycosyltransferases from *Staphylococcus aureus* and *Arabidopsis thaliana* synthesize glycoacylglycerolipids, glycoacylphospholipids, glycosphingolipids and glycosylsterols, *Eur. J. Biochem.*, 267, 3770-3783.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W., Krauss N.** (2001). Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature*, 411, 909-17.
- Kadmas, J.L., Raetz, C.R.** (1998). Enzymatic synthesis of lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. Purification and properties of heptosyltransferase I, *J. Biol. Chem.*, 273, 2799-2807.
- Kanipes, M.I., Ribeiro, A.A., Lin, S., Cotter, R.J. and Raetz, C.R.H.** (2003). A mannosyl transferase required for lipopolysaccharide inner core assembly in *Rhizobium leguminosarum*. Purification, substrate specificity, and expression in *Salmonella waaC* mutants, *J. Biol. Chem.*, 278, 16356-16364.
- Karlsson, O.P., Dahlqvist, A., Wieslander, A.** (1994). Activation of the membrane glucolipid synthesis in *Acholeplasma laidlawii* by phosphatidylglycerol and other anionic lipids, *J. Biol. Chem.*, 269, 23484-23490.

Karlsson, O.P., Dahlqvist, A., Vikström, S., Wieslander, A. (1997). Lipid dependence and basic kinetics of the purified 1,2-diacylglycerol 3-glucosyltransferase from membranes of *Acholeplasma laidlawii*, *J. Biol. Chem.*, 272, 929-936.

Keane, F. E. A., Thomas, B. J., Gilroy, C. B., Renton, A. and Taylor-Robinson D. (2000). The association of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* with non-gonococcal urethritis: observations on heterosexual men and their female partners, *Int. J. STD. AIDS.*, 11, 435 - 439.

Kelly, A.A., Dörmann, P. (2002). DGD2, an arabidopsis gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions, *J. Biol. Chem.*, 277, 1166-1173.

Kiriukhin, M.Y., Debabov, D.V., Shinabarger, D.L., Neuhaus, F.C. (2001). Biosynthesis of the glycolipid anchor in lipoteichoic acid of *Staphylococcus aureus* RN4220: role of Ypfp, the diglucosyldiacylglycerol synthase, *J. Bacteriol.*, 183, 3506-3514.

Kitamoto, D., Isoda, H. and Nakahara, T. (2002). Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants — from energy-saving materials to gene delivery carriers, *J. Biosci. Bioeng.*, 94, 187-201.

Kobayashi, K., Ehrlich, S.D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K.K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., Boland, F., Brignell, S.C., Bron, S., Bunai, K., Chapuis, J., Christiansen, L.C., Danchin, A., Débarbouillé, M., Dervyn, E., Deuerling, E., Devine, K., Devine, S.K., Dreesen, O., Errington, J., Fillinger, S., Foster, S.J., Fujita, Y., Galizzi, A., Gardan, R., Eschevins, C., Fukushima, T., Haga, K., Harwood, C.R., Hecker, M., Hosoya, D., Hullo, M.F., Kakeshita, H., Karamata, D., Kasahara, Y., Kawamura, F., Koga, K., Koski, P., Kuwana, R., Imamura, D., Ishimaru, M., Ishikawa, S., Ishio, I., Le Coq, D., Masson, A., Mauël, C., Meima, R., Mellado, R.P., Moir, A., Moriya, S., Nagakawa, E., Nanamiya, H., Nakai, S., Nygaard, P., Ogura, M., Ohanan, T., O'Reilly, M., O'Rourke, M., Pragai, Z., Pooley, H.M., Rapoport, G., Rawlins, J.P., Rivas, L.A., Rivolta, C., Sadaie, A., Sadaie, Y., Sarvas, M., Sato, T., Saxild, H.H., Scanlan, E., Schumann, W., Seegers, J.F.M.L., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Séror, S.J., Simon, M., Stragier, P., Studer, R., Takamatsu, H., Tanaka, T., Takeuchi, M., Thomaidis, H.B., Vagner, V., van Dijl, J.M., Watabe, K., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., Yamane, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H., Zuber, U. and Ogasawara, N. (2003). Essential *Bacillus subtilis* genes, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 4678-4683.

Kyratsous, C.A., Silverstein, S.J., DeLong, C.R., Panagiotidis, C.A. (2009). Chaperone-fusion expression plasmid vectors for improved solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*, *Gene*, 440, 9-15.

Lairson, L.L., Henrissat, B., Davies, G.J., Withers, S.G. (2008). Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms, *Annu. Rev. Biochem.*, 77, 521-555.

Lang, S., Katsiwela, E. and Wagner, F. (1989). Antimicrobial effects of biosurfactants, *Fact. Sci. Technol.*, 91, 363-368.

Latowski, D., Akerlund, H.E., Strzałka, K. (2004). Violaxanthin de-epoxidase, the xanthophyll cycle enzyme, requires lipid inverted hexagonal structures for its activity, *Biochemistry*, 43, 4417-4420.

Lee, H.Y., Chung, H.S., Hang, C., Khosla, C., Walsh, C.T., Kahne, D., Walker, S. (2004). Reconstitution and characterization of a new desosaminyl transferase, EryCIII, from the erythromycin biosynthetic pathway, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 9924-9925.

Lind, J., Rämö, T., Klement, M.L., Bárány-Wallje, E., Epand, R.M., Epand, R.F., Mäler, L., Wieslander, A. (2007). High cationic charge and bilayer interface-binding helices in a regulatory lipid glycosyltransferase, *Biochemistry*, 46, 5664-5677.

Lindblom, G., Brentel, I., Sjölund, M., Wikander, G., Wieslander, A. (1986). Phase equilibria of membrane lipids from *Acholeplasma laidlawii*: importance of a single lipid forming nonlamellar phases, *Biochemistry*, 25, 7502-7510.

Liu, J. and Mushegian, A. (2003). Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases, *Protein Sci.*, 12, 1418-1431.

Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., Chang, W. (2004). Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution, *Nature*, 428, 287-292.

Lluch-Senar, M., Vallmitjana, M., Querol, E., Piñol, J. (2007). A new promoterless reporter vector reveals antisense transcription in *Mycoplasma genitalium*, *Microbiology*, 153, 2743-2752.

Lo, S. C., Hayes, M. M., Tully, J. G., Wang, R. Y. H., Hitoshi, K., Pierce, P. F., Rose, D. L., Shih, J. W. K. (1992). *Mycoplasma penetrans* sp. nov., from the urogenital tract of patients with AIDS, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42, 357-364.

Lyon, B.R., May J.W. and Skurray R.A. (1984). Tn4001: A gentamicin and kanamycin resistance transposon in *Staphylococcus aureus*, *Mol. Gen. Genet.*, 193, 554-556.

Maréchal, E., Block, M.A., Joyard, J., Douce, R. (1994). Kinetic properties of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes, *J. Biol. Chem.*, 269, 5788-5798.

Mazella, J., Chabry, J., Zsurger, N., Vincent, J.P. (1989). Purification of the neurotensin receptor from mouse brain by affinity chromatography, *J. Biol. Chem.*, 264, 5559-5563.

Meech, R., Mackenzie, P.I. (1997). UDP-glucuronosyltransferase, the role of the amino terminus in dimerization, *J. Biol. Chem.*, 272, 26913-26917.

Miles, R. J. (1992). Catabolism in *Mollicutes*, *J. Gen. Microbiol.*, 138, 1773-1783.

Monegal, A., Pinyol, R., Planas, A. (2005). Capillary electrophoresis method for the enzymatic assay of galactosyltransferases with postreaction derivatization, *Anal. Biochem.*, 346, 115-123.

- Moya, I., Silvestri, M., Vallon, O., Cinque, G., Bassi, R.** (2001). Time-resolved fluorescence analysis of the photosystem II antenna proteins in detergent micelles and liposomes, *Biochemistry*, 40, 12552-12561.
- Munshi, R., Linden, J.** (1989). Co-purification of A1 adenosine receptors and guanine nucleotide-binding proteins from bovine brain, *J. Biol. Chem.*, 264, 14853-14859.
- Murray, B. W., Wittmann, V., Burkart, M. D., Hung, S. C., and Wong, C. H.** (1997). Mechanism of human alpha-1,3-fucosyltransferase V: glycosidic cleavage occurs prior to nucleophilic attack, *Biochemistry*, 36, 823-831.
- Mushegian, A. R. and Koonin, E. V.** (1996). A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 10268-10273.
- Neuhaus, F.C., Baddiley, J.** (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67, 686-723.
- Neyrolles, O., Ferris, S., Behbahani, N., Montagnier, L. and Blanchard, A.** (1996). Organization of *Ureaplasma urealyticum* urease gene cluster and expression in a suppressor strain of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 178, 647-655.
- Nidetzky, B., Eis, C., and Albert, M.** (2000). Role of non-covalent enzyme-substrate interactions in the reaction catalysed by cellobiose phosphorylase from *Cellulomonas uda*, *Biochem. J.*, 351, 649-659.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H., Yura, T.** (1998). Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1694-1699.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Yanagi, H. and Yura, T.** (2000). Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 884-889.
- Okamura, H., Raguette, S., Bell, A., Gagnon, J., Kelly, P.A.** (1989). Purification and protein sequence analysis of rat liver prolactin receptor, *J. Biol. Chem.*, 264, 5904-5911.
- Pak, J.E., Arnoux, P., Zhou, S., Sivarajah, P., Satkunarajah, M., Xing, X. and Rini, J.M.** (2006). X-ray crystal structure of leukocyte type core 2 β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase. Evidence for a convergence of metal ion-independent glycosyltransferase mechanism, *J. Biol. Chem.*, 281, 26693-26701.
- Paul, S., and Chaudhuri, T.K.** (2007). Chaperone mediated solubilization of 69-kDa recombinant maltodextrin glucosidase in *Escherichia coli*, *J. Appl. Microbiol.*, 104, 35-41.
- Persson, K., Ly, H.D., Dieckelmann, M., Wakarchuk, W.W., Withers, S.G. and Strynadka, N.C.J.** (2001). Crystal structure of the retaining galactosyltransferase LgtC from *Neisseria meningitidis* in complex with donor and acceptor sugar analogs, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 8, 166-175.

- Pich, O.Q., Burgos, R., Planell, R., Querol, E. and Piñol, J.** (2006a). Comparative analysis of antibiotic resistance gene markers in *Mycoplasma genitalium*: application to studies of the minimal gene complement, *Microbiology*, 152, 519-527.
- Pich, O.Q., Burgos, R., Ferrer-Navarro, M., Querol, E. and Piñol, J.** (2006b). *Mycoplasma genitalium* mg200 and mg386 genes are involved in gliding motility but not in cytodherence, *Mol. Microbiol.*, 60, 1509-1519.
- Pich, O.Q., Burgos, R., Ferrer-Navarro, M., Querol, E., and Piñol, J.** (2008). Role of *Mycoplasma genitalium* MG218 and MG317 cytoskeletal proteins in terminal organelle organization, gliding motility and cytodherence, *Microbiology*, 154, 3188-3198.
- Pingel, S., Rheinweiler, U., Kolb, V. and Duszenko, M.** (1999). Purification and characterization of an alpha-galactosyltransferase from *Trypanosoma brucei*, *Biochem. J.*, 338, 545-551.
- Pour-Ei, I., Adams C. and Minion F.C.** (2002). Construction of Mini-Tn4001tet and its use in *Mycoplasma gallisepticum*, *Plasmid*, 47, 129-137.
- Privé, G.G.** (2007). Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins, *Methods*, 41, 388-397.
- Rahman, K.S.M. and Gakpe, E.** (2008). Production, characterisation and applications of biosurfactants. Review, *Biotechnology*, 7, 360-370.
- Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Banat, I.M., Lord, R. and Street, G.** (2006). Bioremediation of petroleum sludge using bacterial consortium with biosurfactant, In: *Environmental Bioremediation Technologies*, Singh, S.N. and Tripathi, R.D. (Eds.). Springer Publication, 391-408.
- Razin, S.** (1978). The mycoplasmas, *Microbiological Reviews*, 42, 414-470.
- Razin, S. and Hayflick, L.** (2010). Highlights of mycoplasma research—An historical perspective, *Biologicals*, 38, 183-190.
- Razin, S. and Jacobs, E.** (1992). Mycoplasma adhesion, *J. Gen. Microbiol.*, 138, 407-422.
- Razin, S., Yogeve, D., and Naot, Y.** (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1094-1156.
- Reddy, S.P., Rasmussen, W.G., Baseman, J.B.** (1996). Correlations between *Mycoplasma pneumoniae* sensitivity to cyclosporin A and cyclophilin-mediated regulation of mycoplasma cytodherence, *Microb. Pathog.*, 20, 155-169.
- Reich, K. A., Chovan, L., Hessler, P.** (1999). Genome scanning in *Haemophilus influenzae* for identification of essential genes. *J. Bacteriol.*, 181, 4961-4968.
- Rilfors, L., Wieslander, A., and Lindblom, G.** (1993). Regulation and physicochemical properties of the polar lipids in *Acholeplasma laidlawii*, *Subcell. Biochem.* 20, 109-166.

- Rohman, M., Harrison-Lavoie, K.J.** (2000). Separation of copurifying GroEL from glutathione-S-transferase fusion proteins, *Protein. Expr. Purif.*, 20, 45-47.
- Rosén Klement, M.L., Öjemyr, L., Tagscherer, K.E., Widmalm, G. and Wieslander, A.** (2007). A processive lipid glycosyltransferase in the small human pathogen *Mycoplasma pneumoniae*: involvement in host immune response, *Mol. Microbiol.*, 65, 1444-1457.
- Rosenow, M.A., Magee, C.L., Williams, J.C., Allen, J.P.** (2002). The influence of detergents on the solubility of membrane proteins, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 58, 2076-2081.
- Salama, N.R., Shepherd, B., Falkow, S.** (2004). Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*, *J. Bacteriol.*, 186, 7926-7935.
- Sassetti, C.M., Boyd, D.H. and Rubin, E.J.** (2001). Comprehensive identification of conditionally essential genes in mycobacteria, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 12712-12717.
- Sato, T.N., Neale, J.H.** (1989). Immunological identification of multiple 1-like subunits of the γ -aminobutyric acidA receptor complex purified from neonatal rat cortex, *J. Neurochem.*, 53, 1089-1095.
- Saurin, W. and Dassa, E.** (1996). In the search of *Mycoplasma genitalium* lost substrate-binding proteins: sequence divergence could be the result of a broader substrate specificity, *Mol. Microbiol.* 22, 389-390.
- Saxena, I.M., Brown, R.M. Jr., Fevre, M., Geremia, R.A., and Henrissat, B.** (1995) Multidomain architecture of beta-glycosyl transferases: implications for mechanism of action, *J. Bacteriol.* 177, 1419-1424.
- Seko, A., Sumiya, J. and Yamashita K.** (2005). Porcine, mouse and human galactose 3-O-sulphotransferase-2 enzymes have different substrate specificities; the porcine enzyme requires basic compounds for its catalytic activity, *Biochem. J.*, 391, 77-85.
- Sheridan, G.E.C., Masters, C.I., Shallcross, J.A. and Mackey, B.M.** (1998). Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1313-1318.
- Shimajima, M., Ohta, H., Iwamatsu, A., Masuda, T., Shioi, Y. and Takamiya, K.** (1997). Cloning of the gene for monogalactosyldiacylglycerol synthase and its evolutionary origin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 94, 333-337.
- Soya, N., Fang, Y., Palcic, M.M. and Klassen, J.S.** (2010). Trapping and characterization of covalent intermediates of mutant retaining glycosyltransferases, *Glycobiology*, ahead of print.
- Standfuss, J., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Lamborghini, M., Kühlbrandt, W.** (2005). Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution, *The EMBO Journal.*, 24, 919-928.
- Taylor-Robinson, D.** (2002). *Mycoplasma genitalium* – an up-date, *Int. J. STD. AIDS.*, 13, 145 - 151.

- Teo, C.F., Hwang, T.S., Chen, P.H., Hung, C.H., Gao, H.S., Chang, L.S., Lin, C.H.** (2005). Synthesis of sialyl T_N glycopeptides - enzymatic sialylation by α -2,6-Sialyltransferase from *Photobacterium damsela*, *Adv. Synth. Catal.*, 347, 967 – 972.
- Tully, J.G., Cole, R.M., Taylor-Robinson, D. and Rose, D.L.** (1981). A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract, *The Lancet*, 317, 1288-1291.
- Turkewitz, A.P., Amatruda, J.F., Borhani, D., Harrison, S.C., Schwartz, A.L.** (1988). A high yield purification of the human transferrin receptor and properties of its major extracellular fragment, *J. Biol. Chem.*, 263, 8318-8325.
- Ueno, P.M., Timenetsky, J., Centonze, V.E., Wewer, J.J., Cagle, M., Stein, M.A., Krishnan, M., Baseman, J.B.** (2008). Interaction of *Mycoplasma genitalium* with host cells: evidence for nuclear localization, *Microbiology*, 154, 3033-3041.
- Ungar, D., Oka, T., Brittle, E.E., Vasile, E., Lupashin, V.V., Chatterton, J.E., Heuser, J.E., Krieger, M. and Waters, M.G.** (2002). Characterization of a mammalian Golgi-localized protein complex, COG, that is required for normal Golgi morphology and function, *J. Cell. Biol.*, 157, 405–415.
- Ünlügil, U. M. and Rini, J. M.** (2000). Glycosyltransferase structure and mechanism, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 510-517.
- Uozumi, N., Yanagidani, S., Miyoshi, E., Ihara, Y., Sakuma, T., Gao, C.X., Teshima, T., Fujii, S., Shiba, T., Taniguchi, N.** (1996). Purification and cDNA cloning of porcine brain GDP-L-Fuc:N-acetyl-beta-D-glucosaminide alpha-1→6-fucosyltransferase, *J. Biol. Chem.*, 271, 27810-27817.
- Venkatesh, B., Arifuzzaman, M., Mori, H., Taguchi, T., Ohmiya, Y.** (2004). GroEL chaperone binding to beetle luciferases and the implications for refolding when co-expressed, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 2096-103.
- Vikström, S., Li, L., Karlsson, O.P., Wieslander, A.** (1999). Key role of the diglucoalydiacylglycerol synthase for the nonbilayer-bilayer lipid balance of *Acholeplasma laidlawii* membranes, *Biochemistry*, 38, 5511-5520.
- Wang, J., Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Miyatake, A., Ueda, N.** (2006). Functional analysis of the purified anandamide-generating phospholipase D as a member of the metallo-beta-lactamase family, *J. Biol. Chem.*, 281, 12325-12335.
- Weiner III, J., Herrmann, R. and Browning, G.F.** (2000). Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*, *Nucleic Acids Res.*, 28, 4488-4496.
- Wiener, M.C.** (2004). A pedestrian guide to membrane protein crystallization, *Methods*, 34, 364-372.
- Xu, C., Fan, J., Riekhof, W., Froehlich, J.E., Benning, C.** (2003). A permease-like protein involved in ER to thylakoid lipid transfer in *Arabidopsis*, *EMBO J.*, 22, 2370-2379.

Xu, Z., Vo, L., Macher, B.A. (1996). Structure-function analysis of human α -1,3-fucosyltransferase. Amino acids involved in acceptor substrate specificity, *J. Biol. Chem.*, 271, 8818-8823.

Yavlovich, A., Tarshis, M., Rottem, S. (2004). Internalization and intracellular survival of *Mycoplasma pneumoniae* by non-phagocytic cells, *FEMS Microbiol. Lett.*, 233, 241-246.

Yoon, S.O., Hirata, R.D.C., da Silva, A.C.R., Nguyen, N.Y. and Hirata, M.H. (2002). Cloning and expression of soluble recombinant protein comprising the extracellular domain of the human type I interferon receptor 2c subunit (IFNAR-2c) in *E. coli*, *Biotechnol. Lett.*, 24, 1443-1448.

Zechel, D.L. and Withers S.G. (2000). Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst, *Acc. Chem. Res.*, 33, 11-18.

Zhang, Y., Malinovskii, V. A., Fiedler, T. J., and Brew, K. (1999). Role of a conserved acidic cluster in bovine beta-1,4-galactosyltransferase-1 probed by mutagenesis of a bacterially expressed recombinant enzyme, *Glycobiology*, 9, 815-822.

ANNEXOS

Annex 1: Dades cinètiques de l'activitat
enzimàtica de GT-MG517

12 Annex 1: Dades cinètiques de l'activitat enzimàtica de GT-MG517

12.1 Obtenció de les rectes patró dels substrats donadors

Taula 12.1. Dades per a l'establiment de la recta patró d'UDP-Gal amb la relació 1/200 i t=2 min.

[UDP-Gal] / μM	dpm	dpm corr	f ([conc]/dpm)	f*1000	f + 10%	f - 10%
1000	61995.7	61982.43	0.01613015	16.13	17.50	14.32
1000	61903.1	61889.83	0.01615428	16.15	17.50	14.32
500	30506	30492.73	0.01639022	16.39	17.50	14.32
500	30719.1	30705.83	0.01627652	16.28	17.50	14.32
250	15595	15581.73	0.01603078	16.03	17.50	14.32
250	15631.1	15617.83	0.01599376	15.99	17.50	14.32
125	7891.11	7877.84	0.01584061	15.84	17.50	14.32
125	7712.03	7698.76	0.01620844	16.21	17.50	14.32
62.5	3968.91	3955.64	0.0157474	15.75	17.50	14.32
62.5	3872.29	3859.02	0.01614032	16.14	17.50	14.32
31.25	1927.56	1914.29	0.01621221	16.21	17.50	14.32
31.25	1944.92	1931.65	0.0160675	16.07	17.50	14.32
15.63	1021.18	1007.91	0.01530582	15.31	17.50	14.32
15.63	1009.87	996.6	0.01547724	15.48	17.50	14.32
7.81	524.17	510.9	0.01489975	14.90	17.50	14.32
7.81	499.65	486.38	0.01563094	15.63	17.50	14.32
0	15.39	2.12	-	-	-	-
0	13.27	0	-	-	-	-

Taula 12.2. Dades per a l'establiment de la recta patró d'UDP-Glc amb la relació 1/200 i t=2 min.

[UDP-Glc] / μM	dpm	dpm corr	f ([conc]/dpm)	f*1000	f + 10%	f - 10%
1000	61040.7	61030.09	0.01638251	16.38	17.93	14.67
1000	60775	60764.39	0.01645413	16.45	17.93	14.67
500	30434.8	30424.19	0.01642856	16.43	17.93	14.67
500	30017.3	30006.69	0.01665706	16.66	17.93	14.67
250	15233.7	15223.09	0.01641098	16.41	17.93	14.67
250	15316.2	15305.59	0.01632259	16.32	17.93	14.67
125	7591.39	7580.78	0.01646602	16.47	17.93	14.67
125	7575.85	7565.24	0.0164998	16.50	17.93	14.67
62.5	3857.85	3847.24	0.01620073	16.20	17.93	14.67
62.5	3743.43	3732.82	0.01669592	16.70	17.93	14.67
31.25	1979.15	1968.54	0.01578961	15.79	17.93	14.67
31.25	1917.04	1906.43	0.01630117	16.30	17.93	14.67
15.63	990.06	979.45	0.01578692	15.79	17.93	14.67
15.63	1012.87	1002.26	0.0154314	15.43	17.93	14.67
7.81	473.34	462.73	0.01649977	16.50	17.93	14.67
7.81	498.68	488.07	0.01566135	15.66	17.93	14.67
0	10.61	0	0	-	-	-
0	16.45	5.84	0	-	-	-

Taula 12.3. Dades per a l'establiment de la recta patró d'UDP-Gal amb la relació 1/50 i t=2 min.

[UDP-Gal] / μM	dpm	dpm corr	f ([conc]/dpm)	f*1000	f + 10%	f - 10%
50	12292.9	12282.83	0.00406739	4.07	4.64	3.80
50	12108.5	12098.43	0.00412933	4.13	4.64	3.80
25	6043.44	6033.37	0.00413672	4.14	4.64	3.80
25	6059.1	6049.03	0.00412603	4.13	4.64	3.80
12.5	2980.07	2970	0.00419453	4.19	4.64	3.80
12.5	2935.92	2925.85	0.00425761	4.26	4.64	3.80
6.25	1441.72	1431.65	0.0043351	4.34	4.64	3.80
6.25	1431.54	1421.47	0.00436593	4.37	4.64	3.80
3.13	702	691.93	0.00445869	4.46	4.64	3.80
3.13	696.42	686.35	0.00449441	4.49	4.64	3.80
1.65	393.43	383.36	0.00419388	4.19	4.64	3.80
0.78	187.01	176.94	0.0041709	4.17	4.64	3.80
0.78	178.91	168.84	0.00435973	4.36	4.64	3.80
0.39	100.8	90.73	0.00386905	3.87	4.64	3.80
0.39	93.96	83.89	0.0041507	4.15	4.64	3.80
0	14.33	4.26	0	-	-	-
0	10.07	0	0	-	-	-

Taula 12.4. Dades per a l'establiment de la recta patró d'UDP-Glc amb la relació 1/50 i t=2 min.

[UDP-Glc] / μM	dpm	dpm corr	f ([conc]/dpm)	f*1000	f + 10%	f - 10%
50	11627.8	11613.48	0.00430534	4.31	4.72	3.87
50	11583	11568.68	0.00432201	4.32	4.72	3.87
25	5976	5961.68	0.00419345	4.19	4.72	3.87
25	5816.05	5801.73	0.00430906	4.31	4.72	3.87
12.5	2931.39	2917.07	0.00428512	4.29	4.72	3.87
12.5	2972.34	2958.02	0.0042258	4.23	4.72	3.87
6.25	1477.46	1463.14	0.00427163	4.27	4.72	3.87
6.25	1434.93	1420.61	0.00439952	4.40	4.72	3.87
3.13	759.73	745.41	0.00419903	4.20	4.72	3.87
3.13	764.61	750.29	0.00417172	4.17	4.72	3.87
1.65	368.04	353.72	0.00466471	4.66	4.72	3.87
1.65	385.92	371.6	0.00444026	4.44	4.72	3.87
0.78	200.06	185.74	0.00419942	4.20	4.72	3.87
0.78	203.75	189.43	0.00411762	4.12	4.72	3.87
0.39	105.1	90.78	0.0042961	4.30	4.72	3.87
0.39	104.54	90.22	0.00432277	4.32	4.72	3.87
0	14.32	0	0	-	-	-
0	16.43	2.11	0	-	-	-

12.2 Determinació dels glicolípid formats en l'assaig radiomètric per HPLC-MS

Taula 12.5. Anàlisi per HPLC-MS dels productes sintetitzats per GT-MG517.

temps / min	Àrea MGlcDG	Àrea MGalDG	Àrea DGalDG
0	0	0	0
2	11754	59432	0
4	27826	121132	12019
6	37973	158454	14960
8	53083	196598	21899
10	62326	261978	29371
20	128637	415251	51584
30	201889	580251	74705
40	257972	797455	106570
50	325708	910215	143058
60	406613	1229856	188940

12.3 Caracterització de GT-MG517 en extracte proteic

12.3.1 Activitat específica de GT-MG517 en extracte

Taula 12.6. Rectes d'activitat vs proteïna total per UDP-Glc i UDP-Gal

Donador UDP-Glc		Donador UDP-Gal	
prot tot (μg)	Vo ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	prot tot (μg)	Vo ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
17.0	5.083E-04	3.4	3.524E-04
13.6	4.750E-04	3.1	3.032E-04
11.3	3.544E-04	2.5	2.563E-04
7.6	1.813E-04	2	1.812E-04
5.2	1.265E-04	1.5	1.248E-04

12.3.2 Paràmetres cinètics aparents del substrat donador per GT-MG517 en extracte

Taula 12.7. Corbes de Michaelis-Menten per UDP-Glc i UDP-Gal

Donador UDP-Glc		Donador UDP-Gal	
[UDP-Glc] (μM)	Vo ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{prot tot}$)	[UDP-Gal] (μM)	Vo ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{prot tot}$)
10	0.184	75	0.617
10	0.183	75	0.722
25	0.140	150	0.949
25	0.231	150	1.005
50	0.176	250	1.266
50	0.263	250	1.460
75	0.217	500	1.948
75	0.306	500	2.083
150	0.416	750	2.433
150	0.455	750	2.233
150	0.341	1000	2.382
200	0.441	1500	2.639
200	0.399	2000	2.774

Taula 12.7. Corbes de Michaelis-Menten per UDP-Glc i UDP-Gal (continuació)

Donador UDP-Glc		Donador UDP-Gal	
[UDP-Glc] (μM)	V_o ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{prot tot}$)	[UDP-Gal] (μM)	V_o ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{prot tot}$)
250	0.417	-	-
250	0.443	-	-
250	0.436	-	-
500	0.442	-	-
500	0.432	-	-
1000	0.495	-	-
1000	0.452	-	-

12.4 Caracterització cinètica de GT-MG517 purificada

12.4.1 Rectes patró enzimàtiques

Taula 12.8. Rectes patró enzimàtiques per UDP-Glc i UDP-Gal

	Donador UDP-Glc	Donador UDP-Gal
[GT-MG617] (μM)	V_o ($\mu\text{M}/\text{min}$)	V_o ($\mu\text{M}/\text{min}$)
0	0.000	0.000
0.23	2.431	8.968
0.45	6.304	19.291
1.13	15.459	59.480

12.4.2 Paràmetres cinètics de GT-MG517 com a monoglicosildiacilglicerol sintasa

12.4.2.1 Paràmetres cinètics aparents del substrat donador

Taula 12.9. Corbes de Michaelis-Menten per UDP-Glc i UDP-Gal

Donador UDP-Glc		Donador UDP-Gal	
[UDP-Glc] (μM)	V_o/E (s^{-1})	[UDP-Gal] (mM)	V_o/E (s^{-1})
10	0.036	0.025	0.082
25	0.056	0.05	0.160
50	0.110	0.075	0.264
75	0.095	0.15	0.340
100	0.149	0.2	0.549
250	0.204	0.25	0.496
500	0.240	0.3	0.718
1000	0.231	0.4	0.774
-	-	0.5	0.715
-	-	0.5	0.832
-	-	0.75	0.749
-	-	1	0.807
-	-	1	0.970
-	-	1.5	1.020
-	-	1.5	1.032
-	-	2	0.861

12.4.2.2 Paràmetres cinètics aparents del substrat acceptor

Taula 12.10. Corba de Michaelis-Menten per DOG

Donador UDP-Gal		
[DOG] (mM)	mol % DOG	Vo/E (s ⁻¹)
0.05	0.154	0.046
0.1	0.307	0.226
0.2	0.612	0.515
0.4	1.216	0.785
0.5	1.515	0.830
0.8	2.402	0.796
1	2.985	0.870
1.25	3.704	0.885

12.4.2.3 Influència dels lípids aniònics sobre l'activitat de GT-MG517

Taula 12.11. Corba de Michaelis-Menten per UDP-Glc a diferents concentracions de DOPG.

[DOPG] = 12.5 mM o 37 mol %		[DOPG] = 9.2 mM o 27.5 mol %		[DOPG] = 3.1 mM o 9.2 mol %	
[UDP-Glc] (μM)	Vo/E (s ⁻¹)	[UDP-Glc] (μM)	Vo/E (s ⁻¹)	[UDP-Glc] (μM)	Vo/E (s ⁻¹)
10	0.036	10	0.016	10	0.014
25	0.056	25	0.024	25	0.021
50	0.110	50	0.073	50	0.037
75	0.095	75	0.058	75	0.031
100	0.149	100	0.066	100	0.036
250	0.204	250	0.143	-	-
500	0.240	500	0.184	500	0.040
1000	0.231	1000	0.169	1000	0.042

Taula 12.12. Efecte activador de DOPG sobre kcat.

Donador UDP-Glc		Donador UDP-Glc	
[lípidis totals] = 12.5 mM		[lípidis totals] = 8 mM	
[DOPG] (mol %)	Vo/E (s ⁻¹)	[DOPG] (mol %)	Vo/E (s ⁻¹)
0	0.005	0	0.004
9.2	0.042	0	0.003
27.5	0.169	6.8	0.014
37.0	0.231	6.8	0.010
-	-	20.5	0.122
-	-	20.5	0.098
-	-	27.3	0.178
-	-	27.3	0.163

Taula 12.13. Influència de la concentració de DOPG en la naturalesa dels glicolípids sintetitzats per GT-MG517 determinats per HPLC-MS.

[DOPG] = 12.5 mM				[DOPG] = 6 mM			
Temps (min)	[MGlcDG] (μM)	[DGlcDG] (μM)	Ratio DGlcDG:MGlcDG (%)	Temps (min)	[MGlcDG] (μM)	[DGlcDG] (μM)	Ratio DGlcDG:MGlcDG (%)
0	0.000	0	0	0	0.00	0.000	-
2	1.804	0	0	2	13.73	0.000	0.0
4	4.396	0	0	4	25.73	0.708	2.8
6	5.911	0	0	6	36.97	0.829	2.2
8	8.724	0	0	8	51.00	1.155	2.3
10	9.963	0	0	10	58.79	1.384	2.4
20	20.980	0	0	20	108.46	3.099	2.9
30	32.542	0	0	30	147.05	4.664	3.2
40	41.644	0	0	40	181.96	6.313	3.5
50	51.833	0	0	50	209.76	7.568	3.6
60	61.983	0	0	60	233.87	8.709	3.7

12.4.3 Paràmetres cinètics de GT-MG517 com a diglicosildiacilglicerol sintasa**12.4.3.1 Paràmetres cinètics aparents del substrat donador****Taula 12.14. Corbes de Michaelis-Menten per UDP-Glc i UDP-Gal**

Donador UDP-Glc		Donador UDP-Gal	
[UDP-Glc] (μM)	Vo/E (s^{-1})	[UDP-Gal] (mM)	Vo/E (s^{-1})
10	0.0037	10	0.0020
25	0.0036	25	0.0026
50	0.0036	50	0.0047
100	0.0038	100	0.0046
250	0.0036	250	0.0102
500	0.0045	500	0.0153
1000	0.0051	1000	0.0202

12.4.3.2 Paràmetres cinètics aparents del substrat acceptor**Taula 12.15. Corba de Michaelis-Menten per MGlcDG**

Donador UDP-Gal		
[MGlcDG] (mM)	[MGlcDG] (mol %)	Vo/E (s^{-1})
0.5	1.52	0.0191
1	2.99	0.0194
1.3	3.70	0.0194
1.5	4.41	0.0194
2	5.80	0.0188
3	8.45	0.0179
3.5	9.72	0.0170

Annex 2: Alíneaments de seqüències

13 Annex 2: Alineaments de seqüències

13.1 Seqüència de pET517HisN

A continuació es presenta l'alineament entre la seqüència teòrica del pET517HisN situada entre el promotor T7 i el terminador T7 i l'obtinguda en la reacció de seqüenciació emprant els encebadors universals T7 promotor i T7 terminador i el kit de seqüenciació BigDye Terminator v3.1 ABI Prism de Perkin-Elmer Biosystems.

Encebador: T7 promotor

```

teòric      10      20      30      40      50      60
           CCCGCGAAATTAATACGACTCACTA TAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTA
mostra      ----AATT-----CCCTCT-
           10

teòric      70      80      90      100     110     120
           GAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATCGGCAGCAGCCATCATCATCA
mostra      GAA--TATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATCGGCAGCAGCCCCCTTAAGG
           20      30      40      50      60

teòric      130     140     150     160     170
           -TCATCAGAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGATAAACTTGTTAGTATAT
mostra      GNCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCNTATGGATAAACTTGTTAGTATAT
           70      80      90      100     110     120

teòric      180     190     200     210     220     230
           TAGTTCCTTGTTACAAATCAAAACCTTTTTTAAAACGTTTTTTTAAATTCACCTTTTAAAGC
mostra      TAGTTCCTTGTTACAAATCAAAACCTTTTTTAAAACGTTTTTTTAAATTCACCTTTTAAAGC
           130     140     150     160     170     180

teòric      240     250     260     270     280     290
           AAGATCTTAATCAAGCTAAAATTATTTTTTCAATGACAATGTTGCTGATGAAACCTATG
mostra      AAGATCTTAATCAAGCTAAAATTATTTTTTCAATGACAATGTTGCTGATGAAACCTATG
           190     200     210     220     230     240

teòric      300     310     320     330     340     350
           AAGTTTTGCAAAAATTCAAAAAGAACAATAACTTAGCAATTGAAGTCTATTGTGACA
mostra      AAGTTTTGCAAAAATTCAAAAAGAACAATAACTTAGCAATTGAAGTCTATTGTGACA
           250     260     270     280     290     300

teòric      360     370     380     390     400     410
           AACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCGTGATAAGCTAGTGAATCTAGTAACAACACCT
mostra      AACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCGTGATAAGCTAGTGAATCTAGTAACAACACCT
           310     320     330     340     350     360

teòric      420     430     440     450     460     470
           ATTTTTATTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAACAAAAATGTCATAAAAGAGATTG
mostra      ATTTTTATTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAACAAAAATGTCATAAAAGAGATTG
           370     380     390     400     410     420
    
```

Annex 2: Alineaments de seqüències

```

      480      490      500      510      520      530
teòric TTGAATCAATTAAAAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTATTAAAAAGTATGGTCTATTTAT
      .....
mostra TTGAATCAATTAAAAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTATTAAAAAGTATGGTCTATTTAT
      430      440      450      460      470      480

      540      550      560      570      580      590
teòric GCTTCTTAAAACATGATTTTCATTATTAAATTTTTGCCTTTAAAAGGTATTTTTCAAGGCA
      .....
mostra GCTTCTTAAAACATGATTTTCATTATTAAATTTTTGCCTTTAAAAGGTATTTTTCAAGGCA
      490      500      510      520      530      540

      600      610      620      630      640      650
teòric GAGTAAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAAATTAATTTACATCAAAAATAATGATC
      .....
mostra GAGTAAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAAATTAATTTACATCAAAAATAATGATC
      550      560      570      580      590      600

      660      670      680      690      700      710
teòric AATATATTTGGAATATTTGTTATAAACACAGATTTTTTTTAGGAAGCTAAATTTAACTTTTG
      .....
mostra AATATATTTGGAATATTTGTTATAAACACAGATTTTTTTTAGGAAGCTAAATTTAACTTTTG
      610      620      630      640      650      660

      720      730      740      750      760      770
teòric AATCAAGGTTATTTGAAGATATACCAATCTGGTATCCGATGTTTTTTTCATCACAAAAAA
      .....
mostra AATCAAGGTTATTTGAAGATATACCAATCTGGTATCCGATGTTTTTTTCATCACAAAAAA
      670      680      690      700      710      720

      780      790      800      810      820      830
teòric TTGTTTTTATTGATGTGATAGGAACAAATTATTTTATTCGTAATGATAGTTTATCAACTA
      .....
mostra TTGTTTTTATTGATGTGATAGGAACAAATTATTTTATTCGTAATGATAGTTTATCAACTA
      730      740      750      760      770      780

      840      850      860      870      880      890
teòric CTATTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCCAATGTTATGAAAAGCTATATGTAATC
      .....
mostra CTATTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCCAATGTTATGAAAAGCTATATGTAATC
      790      800      810      820      830      840

      900      910      920      930      940      950
teòric TCAGCCAAAATGGTCTCTTGCAAGTTTTATTGATCCAAATCATAAGATTGAAGCTAGGT
      .....
mostra TCAGCCAAAATGGTCTCTTGCAAGTTTTATTGATCCAAATCATAAGATTGAAGCTAGGT
      850      860      870      880      890      900

      960      970      980      990      1000      1010
teòric TTTGG-AGAAGGCAAATG-TTTGTTTGGTTTG-CACTTTTTCAGCTTTGAATACTTTAAGA
      .....
mostra TTTGGGAGAAGGCAAATGGTTTGTNGTTTGGCACTTTTTCAGCTTTGAATACTTTAAGA
      910      920      930      940      950      960

      1020      1030      1040      1050      1060      1070
teòric AAAA-TTTTTCTGAATCAAAAAAAAAA-TTCTTG--AAAAACTATTTGTTTTTTT--GGAAA
      .....
mostra AAAANTTTTTCTGAATCAAAAAAAAAAATCTTGAAAAAAATTTATTTGTTTTTTTTTGGNAAA
      970      980      990      1000      1010      1020

      1080      1090      1100      1110      1120

```


Annex 2: Alineaments de seqüències

```

teòric TTTTTCATCACAAAAAATTGTTTTTATTGATGTGATAGGAACAAATTATTTTATTCGTAA
      :
mostra TTTTTCATCACAAAAAATTGTTTTTATTGATGTGATAGGAACAAATTATTTTATTCGTAA
      850      860      870      880      890      900

      830      840      850      860      870      880
teòric TGATAGTTTATCAACTACTATTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCCAATGTTATGA
      :
mostra TGATAGTTTATCAACTACTATTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCCAATGTTATGA
      910      920      930      940      950      960

      890      900      910      920      930      940
teòric AAAGCTATATGTAAATCTCAGCCAAAATGGTTCTCTTGCAAGTTTTATTGATCCAAATCA
      :
mostra AAAGCTATATGTAAATCTCAGCCAAAATGGTTCTCTTGCAAGTTTTATTGATCCAAATCA
      970      980      990      1000      1010      1020

      950      960      970      980      990      1000
teòric TAAGATTGAAGCTAGGTTTTGGAGAAGGCAAATGTTTGTGGTTTGCACTTTTCAGCTT
      :
mostra TAAGATTGAAGCTAGGTTTTGGAGAAGGCAAATGTTTGTGGTTTGCACTTTTCAGCTT
      1030      1040      1050      1060      1070      1080

      1010      1020      1030      1040      1050      1060
teòric TGAATACTTTAAGAAAAATTTTTCTGAATCAAAAAAATCTTGAAAACTATTTGTTTT
      :
mostra TGAATACTTTAAGAAAAATTTTTCTGAATCAAAAAAATCTTGAAAACTATTTGTTTT
      1090      1100      1110      1120      1130      1140

      1070      1080      1090      1100      1110      1120
teòric TTTGGAAAAAATGGAGTTTATGAACGTGTTTTTCAAACAAAAAATCAAGGTATTTACTA
      :
mostra TTTGGAAAAAATGGAGTTTATGAACGTGTTTTTCAAACAAAAAATCAAGGTATTTACTA
      1150      1160      1170      1180      1190      1200

      1130      1140      1150      1160      1170      1180
teòric TATTTGGGTACAGCGACTAAA-ATATTTTAAACATGTTTTGGAATCTAAATCAGATAACT
      :
mostra TATTTGGGTACAGCGACTCCCCATAGGGGGAACATGTTTTGGAATCTAAATCAGATAACT
      1210      1220      1230      1240      1250      1260

      1190      1200      1210      1220      1230      1240
teòric AAGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAG
      :
mostra AAGGATCCGGCTGCNA-CCAAGCCCGAAG--AGCGGG-----
      1270      1280      1290

      1250
teòric CAATAACTAGCA
mostra -----

```

La seqüenciació amb l'encebador T7 Terminador permet confirmar la zona final del gen, més enllà de la base 960 de la seqüenciació anterior. De totes maneres, just abans del codó de parada (marcat en lila) existeix una zona amb algunes bases no alineades. La distància entre l'encebador i l'inici del gen no possibilita la visualització del codó d'inici ni de la cua d'His. Així doncs, es fa necessària una segona seqüenciació amb un parell d'encebadors interns al gen que permeti observar tant l'esmentada cua com la zona del final del gen.

Encebador: mg335-w197β [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007]

```

                10          20          30          40          50
teòric  -----CCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTC
          ::: :
mostra  TCTCGATCCCNCGAAATTAATACGACTCNCCTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTC
          610      620      630      640      650      660

                60          70          80          90          100         110
teòric  CCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACCATCGGCAGCAGCCATC
          ::: :
mostra  CCCNCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACCATCGGCAGCAGCCATC
          670      680      690      700      710      720

                120         130         140         150         160         170
teòric  ATCATCATCATCAGCAGCGGCCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGATAAACTTGTTA
          ::: :
mostra  ATCATCATCATCAGCAGCGGCCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGATAAACTTGTTA
          730      740      750      760      770      780
    
```

Aquesta seqüenciació permet observar perfectament l'inici del gen i la zona de les sis His.

Encebador: mg335-w197 α [Andrés, E., Tesi Doctoral, 2007]

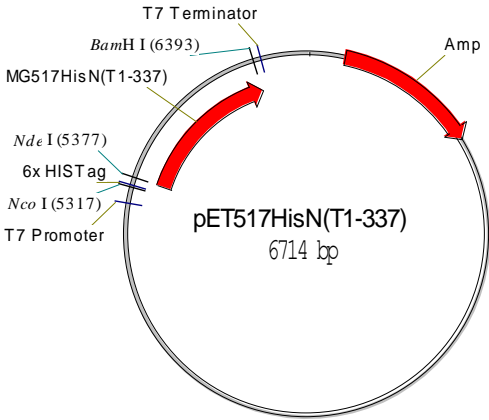
```

                360         370         380         390         400         410
teòric  TATGAACGTGTTTTTCAAACAAAAAATCAAGGTATTTACTATATTTGGGTACAGCGACTA
          ::: :
mostra  TATGAACGTGTTTTTCAAACAAAAAATCAAGGTATTTACTATATTTGGGTACAGCGACTA
          310      320      330      340      350      360

                420         430         440         450         460         470
teòric  AAATATTTTAAACATGTTTTGGAATCTAAATCAGATAACTAAGGATCCGGCTGCTAACAA
          ::: :
mostra  AAATATTTTAAACATGTTTTGGAATCTANTTCAGATAACTAAGGATCCGGCTGCTAACAA
          370      380      390      400      410      420
    
```

Amb l'encebador emprat en aquest cas la seqüència final del gen queda perfectament definida. Així doncs, es confirma l'obtanció del vector pET517HisN.

13.2 Seqüenciació de pET517HisN(T1-337)

<p>PLÀSMID</p>	
<p>CONSTRUCCIÓ</p>	<p>Amplificació del gen MG517HisN(T1-337) per PCR amb Pfu DNA polimerasa; anàlisi de restricció del gen i del vector pET517HisN amb els enzims NdeI i BamHI, i lligació d'ambdós (vector: 5700 bp, insert: 1014 bp)</p>
<p>SEQÜENCIACIÓ</p>	<p>Kit BigDye Terminator v3.1 ABI Prism de Perkin-Elmer Biosystems Purificació del plàsmid: Kit Wizard Plus Minipreps de Promega Encebadors: T7 promotor i T7 terminador Seqüenciació: gen MG517HisN(T1-337) Indicacions: en negre, seqüència de referència de MG517HisN(T1-337) en vermell, seqüència obtinguda amb T7 promotor en verd, seqüència obtinguda amb T7 terminador sombrejats en verd, els codons d'inici i de parada sombrejades en groc, les bases en què l'alineament no és satisfactori</p>
<p>COMENTARIS</p>	<p>Amb T7 promotor és possible llegir de la base 5287 a la 6144 Amb T7 terminador és possible llegir de la base 5529 a la 6404 Totes les bases dubtoses es poden resoldre amb la seqüència complementària o a partir de l'electroferograma.</p>

```

1      -----CCNGCGACA-----TT--
5221  -----CCCGCGAAA-----TTAA
1      GGGGGCCCAGNGGGGCCCCAGNCCCNGCCGGGGCCCCCNNTCCC CGAAAAAGGTT CAG

12     -----
5234  TACGA-----CTCACTATAGGGGAATTG-----
60     GC CGANGGGGNCCGTTTCCCN CGGGGTTGGGGAAAGGGCCNCCCCCCCCCCNCGG

12     -----
5257  -----TGAGCGGATAAC-----AATT--
119   CCCNGGNTCCCCGCCCCNATGCCCGGGGANNGATCGNATNCCGCCCCCGNAATTAA

12     -----CCCTCT---GAN-----TATTTGTTTAACTT
5273  -----CCCCTCTAGAAAT-----AATTTGTTTAACTT
178   TCCNCCCCCTNAGGGGAN TNGNGGNGNACCATTCCCCCAGGAAAATTTGGTTACCT-

36    TAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCNTCATCACAGCAGCGGCCTG
5301  TAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTG
236   -AANGAGGGNTAN-CCCCGGGCGGCAGCC-TCTTC-TCTTCNTCCAGCAGCGGCCNG

95    GTGCCGCGCGGCAGCCATATGGATAAACTTGTTAGTATATTAGTTCCTTGTTACAAATC
5360  GTGCCGCGCGGCAGCCATATGGATAAACTTGTTAGTATATTAGTTCCTTGTTACAAATC
291   G-GCC-CGCGGCACCCA-AGGGA-AAACCTGTANGTATATTAGTTCCTGTGTACCAATC
    
```

154 AAAACCTTTTTTAAAACGTTTTTTAATTCACCTTTTAAAGCAAGATCTTAATCAAGCTA
5419 AAAACCTTTTTTAAAACGTTTTTTAATTCACCTTTTAAAGCAAGATCTTAATCAAGCTA
346 CAAACCTTTTTTAAAACGNTTTTTTAATTCACCTTTAAAAGCAGGATCTTA-TCCAGCTA

213 AAATTATTTTTTTCAATGACAATGTTGCTGATGAAACCTATGAAGTTTGC-AAAAATT
5478 AAATTATTTTTTTCAATGACAATGTTGCTGATGAAACCTATGAAGTTTGC-AAAAATT
404 AAAATTAATTTTTTTCAATGACNATGTTGCTGATGAAACCTATGAAGTTTGC CAAAAATT

271 CAAAAAGAACACAATAACTTAGCAATTGAAGTCTATTGTGACAAACAGAATGAAGGTA
5536 CAAAAAGAACACAATAACTTAGCAATTGAAGTCTATTGTGACAAACAGAATGAAGGTA
463 CAAAAAGAACACAATAACTTAGCAATTGAAGTCTATTGTGACAAACAGAATGAAGGTA

330 TTGAAAAGTGCGTGATAAGCTAGTGAATCTAGTAACAACACCTTATTTTTATTTTTATC
5595 TTGAAAAGTGCGTGATAAGCTAGTGAATCTAGTAACAACACCTTATTTTTATTTTTATC
522 TTGAAAAGTGCGTGATAAGCTAGTGAATCTAGTAACAACACCTTATTTTTATTTTTATC

389 GATCCTGATGATTGTTTTAACAACAAAAATGTCATAAAAAGAGATTGTTGAATCAATTAA
5654 GATCCTGATGATTGTTTTAACAACAAAAATGTCATAAAAAGAGATTGTTGAATCAATTAA
581 GATCCTGATGATTGTTTTAACAACAAAAATGTCATAAAAAGAGATTGTTGAATCAATTAA

448 AAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTATTA AAAAGTATGGTCTATTTATGCTTCTTAAAAAC
5713 AAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTATTA AAAAGTATGGTCTATTTATGCTTCTTAAAAAC
640 AAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTATTA AAAAGTATGGTCTATTTATGCTTCTTAAAAAC

507 ATGATTTTCATTATTA AATTTTTGCCTTTAAAAGGTATTTTTCAAGGCAGAGTAAAATTA
5772 ATGATTTTCATTATTA AATTTTTGCCTTTAAAAGGTATTTTTCAAGGCAGAGTAAAATTA
699 ATGATTTTCATTATTA AATTTTTGCCTTTAAAAGGTATTTTTCAAGGCAGAGTAAAATTA

566 ATTAATAATAACAATGTTAATAAATTAAATTACATCAAAAATAATGATCAATATATTTG
5831 ATTAATAATAACAATGTTAATAAATTAAATTACATCAAAAATAATGATCAATATATTTG
758 ATTAATAATAACAATGTTAATAAATTAAATTACATCAAAAATAATGATCAATATATTTG

625 GAATATTGTTATAAACACAGATTTTTTTTAGGAAGCTAAATTTAACTTTTGAATCAAGGT
5890 GAATATTGTTATAAACACAGATTTTTTTTAGGAAGCTAAATTTAACTTTTGAATCAAGGT
817 GAATATTGTTATAAACACAGATTTTTTTTAGGAAGCTAAATTTAACTTTTGAATCAAGGT

684 TATTTGAAGATATACCAATCTGGTATCCGATGTTTTTTTCATCACAAAAAATTGTTTTT
5949 TATTTGAAGATATACCAATCTGGTATCCGATGTTTTTTTCATCACAAAAAATTGTTTTT
876 TATTTGAAGATATACCAATCTGGTATCCGATGTTTTTTTCATCACAAAAAATTGTTTTT

743 ATTGATGTGATAGGAACAAATTATTTTATTCGTAATGATAGTTTATCAACTACTATTAG
6008 ATTGATGTGATAGGAACAAATTATTTTATTCGTAATGATAGTTTATCAACTACTATTAG
935 ATTGATGTGATAGGAACAAATTATTTTATTCGTAATGATAGTTTATCAACTACTATTAG

802 TGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCCAATGTTATGAAAAGCTATATGTAAATCTCAGCC
6067 TGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCCAATGTTATGAAAAGCTATATGTAAATCTCAGCC
994 TGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCCAATGTTATGAAAAGCTATATGTAAATCTCAGCC

861 AAAATGGTTCTCTTGCAAGGTTTTATTGATCC CAAATCATAAGATTGAAGCTAGGTTTT
6126 AAAATGGTTCTCTTGCAAG-TTTTATTGATCC-AAATCATAAGATTGAAGCTAGGTTTT
1053 AAAATGGTTCTCTTGCAAG-TTTTATTGATCC-AAATCATAAGATTGAAGCTAGGTTTT

920 GGAGAAGGCAAATGTTTGTTNGGNTTGCACTTTTTCNGCTTTGAATACTTTAAGAAAAA
6183 GGAGAAGGCAAATGTTTG-TTTGGTTTGCACTTTTTCAGCTTTGAATACTTTAAGAAAAA
1110 GGAGAAGGCAAATGTTTG-TTTGGTTTGCACTTTTTCAGCTTTGAATACTTTAAGAAAAA


```

979  TTTTTTTCTGAAATCAAAAAAAAAATTTCCTGGGAAAACCTATTTGGTTTTTTTGTGGAAA
6241  TTTTT--CTGAA-TCAAAAAAAAAATT-CTTG--AAAAACTATTTGTTTTTTTT--GGAAA
1168  TTTTT--CTGAA-TCAAAAAAAAAATT-CTTG--AAAAACTATTTGTTTTTTTT--GGAAA

1038  AAAATGGNAGNTTATGGANCNGNNTTTTNC CAACCAAAAAATCAAGGGTATTTACNNT
6291  AAAATGG-AGTTTATGAA--CGTGTTTTT--CAAACAAAAATCAAGG-TATTTACTAT
1218  AAAATGG-AGTTTATGAA--CGTGTTTTT--CAAACAAAAATCAAGG-TATTTACTAT

1097  TTTNGGGGTNCCGCGCCNTAAAAAATTTTAAANCCTGNTTTGGGAANNCTTAGGNANCNG
6344  ATTTGGG-TACAGCGAC-TAAAATATTTTAAACATGTTTTGG--AATCTTAAGGATCCG
1271  ATTTGGG-TACAGCGAC-TAAAATATTTTAAACATGTTTTGG--AATCTTAAGGATCCG

1156  NCNGCCTAACAAAGCCCN AAGGGAANCTGAN TTGGCNGGCCGCCCCCCNNGAACAAA
6399  GCTGC-TAACAAAGCCCGAAAGG-AAGCTGAGTTGGCTG-CTGCCACCGCT-GAGCAA-
1326  GCTGC--AACCCCGCCGANG-----

1215  ACCAGCANACCCCNTGGGGGCCNTAACGGGGCCTTGGGGGTTTTTTCGNNAAAGGGG
6453  -----
1345  -----

1274  AACTTTTCCGGGATTCCCCNANGNNNGGGGNCCGGGTAACCAN CTTGCNCNNNC
6453  -----TAAGTAGC-----
1345  -----AGC-----

1333  NNCCGGGGNGGGGNCCANNAACAAAGNCCTTTTN
6461  -----A
1348  -----G

```

13.3 Seqüenciació de pET517HisN(T1-331)

<p>PLÀSMID</p>	
<p>CONSTRUCCIÓ</p>	<p>Amplificació del gen MG517HisN(T1-331) per PCR amb Pfu DNA polimerasa; anàlisi de restricció del gen i del vector pET15b(+) amb els enzims NdeI i BamHI, i lligació d'ambdós (vector: 5700 bp, insert: 996 bp)</p>
<p>SEQÜENCIACIÓ</p>	<p>Kit BigDye Terminator v3.1 ABI Prism de Perkin-Elmer Biosystems Purificació del plàsmid: Kit Wizard Plus Minipreps de Promega Encebadors: T7 promotor i T7 terminador Seqüenciació: gen MG517HisN(T1-331) Indicacions: en negre, seqüència de referència de MG517HisN(T1-331) en vermell, seqüència obtinguda amb T7 promotor en verd, seqüència obtinguda amb T7 terminador sombrejats en verd, els codons d'inici i de parada sombrejades en groc, les bases en què l'alineament no és satisfactori</p>
<p>COMENTARIS</p>	<p>Amb T7 promotor és possible llegir de la base 5300 a la 6102 Amb T7 terminador és possible llegir de la base 5556 a la 6397 Totes les bases dubtoses es poden resoldre amb la seqüència complementària o a partir de l'electroferograma.</p>

```

-----
5221 CCCG-----
1   CCAAGAGCCCCCNGGNGGGGCCGGNCCCCCCCCNANNNGCCCCGGGGGGCCNAANTN
-----
5225 -----
60   CCNGGCCGGGGCGCCCCAATCCCNCGGAAANAGGGTNANNNCCGANGGGGNCCNTTT
-----
5225 -----
119  NCCCCNNGGGT'TNNGNGANANGNCCCCCCCCCCCCGGGGCCCCGNATCCCGCCCC
-----
5225 -----
178  CANNGTNCCCGGAAGNGNNTCGNATTCTCNTNCCCCGGAATTTATTTCNGCCCCNNNN
1   -----GGANA-----TNCCTCN--GAATAATTTGTTTA-CTTTAAGAA
5248 GGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAA
237  GGGGATTGGGGNGGNTACCCTTCCCCNCANGAA-AATTTGTTTAACCTTAGGAG
38   GG-AGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCC
5307 GG-AGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCC
295  GGNANTNCCNGGGCNGCCGCCNTCNTCATCTTCCNGCNGNGGCNNGGNGCC

```

96 GCGCGGCAGCC-ATATGGATAAACTTGTTAGTATATTAGTTCC-TTGN TACAAATCAA
 5365 GCGCGGCAGCC-ATATGGATAAACTTGTTAGTATATTAGTTCC-TTGT TACAAATCAA
 354 NCCCGGCAGCCCATNNGGANAACTNGTTAGGNNNTTAGGTCCTN GTTACAAATCAA

 153 ACC-TTTTTTAAAACG-TTTTTTAAATTCACTTTTAAAGCAAGATCTTAATCAAGCTAA
 5422 ACC-TTTTTTAAAACG-TTTTTTAAATTCACTTTTAAAGCAAGATCTTAATCAAGCTAA
 413 ACCCTTTTTTAAAACGGTTTTTTNAATTCACTTTTAAAGCAAGATCTTATCCAAGCTAA

 210 AA-TTATTTTTTTT-CAATGAC-AATGTTGCTGATGAAACCTATGAAGTTTTGCAAAAAAT
 5479 AA-TTATTTTTTTT-CAATGAC-AATGTTGCTGATGAAACCTATGAAGTTTTGCAAAAAAT
 472 AAATTATTTTTTTTCAATGACCAANGTTGCTGATGAAACCTATGAAGTTTTGCAAAAAAT

 266 TCAAAAAA--GAACACAATAACTTAGCAATTGAAGTCTATTGTGACAAACAGAATGAAG
 5535 TCAAAAAA--GAACACAATAACTTAGCAATTGAAGTCTATTGTGACAAACAGAATGAAG
 531 TCAAAAAAAGGAACACAATANCTTAGCAATTGAAGTCTATTGTGACAAACAGAATGAAG

 323 GTATTGGAAAAGTGCGTGATAAGCTAGTGAATCTAGTAACAACACCTTATTTTTATTTT
 5592 GTATTGGAAAAGTGCGTGATAAGCTAGTGAATCTAGTAACAACACCTTATTTTTATTTT
 590 GTATTGGAAAAGTGCGTGATAAGCTAGTGAATCTAGTAACAACACCTTATTTTTATTTT

 382 ATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAACAAAAATGTCATAAAAGAGATTGTTGAATCAAT
 5651 ATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAACAAAAATGTCATAAAAGAGATTGTTGAATCAAT
 649 ATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAACAAAAATGTCATAAAAGAGATTGTTGAATCAAT

 441 TAAAAAAGAAGATTTTGATCTTGGGTGTATTAAAAAGTATGGTCTATTTATGCTTCTTA
 5710 TAAAAAAGAAGATTTTGATCTTGG-TGTATTAAAAAGTATGGTCTATTTATGCTTCTTA
 708 TAAAAAAGAAGATTTTGATCTTGG-TGTATTAAAAAGTATGGTCTATTTATGCTTCTTA

 500 AAACATGATTTTCATTATTAATTTTTGCCTTTAAAAGGTATTTTTTCAAGGCAGAGTAAA
 5768 AAACATGATTTTCATTATTAATTTTTGCCTTTAAAAGGTATTTTTTCAAGGCAGAGTAAA
 766 AAACATGATTTTCATTATTAATTTTTGCCTTTAAAAGGTATTTTTTCAAGGCAGAGTAAA

 559 ATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAATTAATTTACATCAAAAATAATGATCAATATA
 5827 ATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAATTAATTTACATCAAAAATAATGATCAATATA
 825 ATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAATTAATTTACATCAAAAATAATGATCAATATA

 618 TTTGGAATATTGTTATAAACACAGATTTTTTTTAGGAAGCTAAATTTAACTTTTGAATCA
 5886 TTTGGAATATTGTTATAAACACAGATTTTTTTTAGGAAGCTAAATTTAACTTTTGAATCA
 884 TTTGGAATATTGTTATAAACACAGATTTTTTTTAGGAAGCTAAATTTAACTTTTGAACCA

 677 AGGTTATTTGAAGATATACCAATCTGGTATCCGATGTTTTTTTTCATCACAAAAAATTGT
 5945 AGGTTATTTGAAGATATACCAATCTGGTATCCGATGTTTTTTTTCATCACAAAAAATTGT
 943 AGGTTATTTGAAGATATACCAATCTGGTATCCGATGTTTTTTTTCATCACAAAAAATTGT

 736 TTTTATTGATGTGATAGGAACAAATTATTTTATTCGTAATGATAGTTTATCAACTACTA
 6004 TTTTATTGATGTGATAGGAACAAATTATTTTATTCGTAATGATAGTTTATCAACTACTA
 1002 TTTTATTGATGTGATAGGAACAAATTATTTTATTCGTAATGATAGTTTATCAACTACTA

 795 TTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCCAATGTTATGNAAGCTATATGTAAATCTC
 6063 TTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCCAATGTTATGAAAAGCTATATGTAAATCTC
 1061 TTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCCAATGTTATGAAAAGCTATATGTAAATCTC

 854 AGCCAAAAATGGTTCCTCTTGCAAGTTTTTATTGATCCNAATCATAAGATTGAAGCTAGGT
 6122 AGCCAAAA-TGGTTCCTCTTGCAAGTTTTTATTGATCCAAATCATAAGATTGAAGCTAGGT
 1120 AGCCAAAA-TGGTTCCTCTTGCAAGTTTTTATTGATCCAAATCATAAGATTGAAGCTAGGT

913 TTTGGCAGAAGGCAAANGGTTTGTTTGGTTTGCACCTTTCCGCTTTGAATACTTTAAG
 6180 TTTGG-AGAAGGCAAATG-TTTGTTTGG-TTGCACCTTTCCAGCTTTGAATACTTTAAG
 1178 TTTGG-AGAAGGCAAATG-TTTGTTTGG-TTGCACCTTTCCAGCTTTGAATACTTTAAG

 972 AAAAATTTTTTCGGGAATCNAAAAAAATTCNAAAAACCTATTTGTTTTTTTGAAAA
 6236 AAAAATTTTTCTG-AATC-AAAAAAATTCCTGAAAAAC-TATTTGTTTTTTTGAAAA
 1234 AAAAATTTTTCTG-AATC-AAAAAAATTCCTGAAAAAC-TATTTGTTTTTTTGAAAA

 1031 AAAGGNAGTTTATGAACGGGTTTTTCAACNAAAAATCNANGGATTNNCNTNTTTGGG
 6292 AAATGGAGTTTATGAACGTG-TTTTTCAAACAAAAATCAAGGTATTTACTATATTTGG
 1290 AAATGGAGTTTATGAACGTG-TTTTTCAAACAAAAATCAAGGTATTTACTATATTTGG

 1090 GNNCNGNNGNAAAATATTTTTAAGNCCGNCNGCCNCNAAAGCCCCAAAGGGNAAC
 6350 GTACAGCGACTAAAATATTTTTTAAGGATCC-GGCTGCTAACAAAGCCCCGAAAGG--AAG
 1348 GTACAGCGACTAAAATATTTTTAAGGATCC-GGCTGCTAACAAAGCCCCGAAG-----AG

 1149 CTGAATTGGCGGNCCCCCGCGGAACANNACCTANNNAACCCCTGGGGGCCNTAAA
 6406 CTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTA-----
 1401 CGGG-----

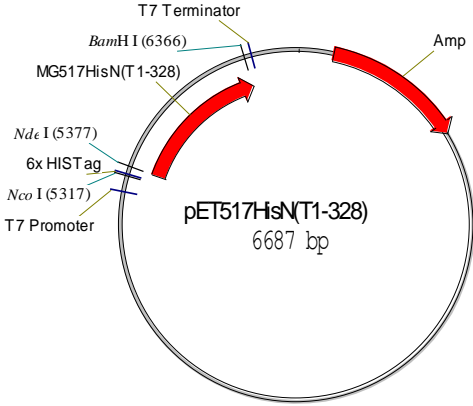
 1208 NGGGGCTGGGGGTTTTGCGGNAAGGGGGANTNNTCCGGGNTCCCCNNANAGGCCNGGG
 6441 -----

 1267 GACCCGNAACNAACCTNCCNCNTCNCNGGGGCGGGCCNNNGAAANATNAACCTTT
 6441 -----

 1326 TATNTNCNCCGGGCNNGGGGNGNATTCGGGGGAACCCCNNTAGNTTCCGGAGAGGCCA
 6441 -----

 1385 AGAAATGGAAGNGNCCGNCNTTTGGNGGNGNNAGGGCG
 6441 -----GCA

13.4 Seqüenciació de pET517HisN(T1-328)

<p>PLÀSMID</p>	
<p>CONSTRUCCIÓ</p>	<p>Amplificació del gen MG517HisN(T1-328) per PCR amb Pfu DNA polimerasa; anàlisi de restricció del gen i del vector pET15b(+) amb els enzims NdeI i BamHI, i lligació d'ambdós (vector: 5700 bp, insert: 987 bp)</p>
<p>SEQÜENCIACIÓ</p>	<p>Kit BigDye Terminator v3.1 ABI Prism de Perkin-Elmer Biosystems Purificació del plàsmid: Kit Wizard Plus Minipreps de Promega Encebadors: T7 promotor i T7 terminador Seqüenciació: gen MG517HisN(T1-328) Indicacions: en negre, seqüència de referència de MG517HisN(T1-328) en vermell, seqüència obtinguda amb T7 promotor en verd, seqüència obtinguda amb T7 terminador sombrejats en verd, els codons d'inici i de parada sombrejades en groc, les bases en què l'alineament no és satisfactori</p>
<p>COMENTARIS</p>	<p>Amb T7 promotor és possible llegir de la base 5281 a la 6092 Amb T7 terminador és possible llegir de la base 5554 a la 6371 Totes les bases dubtoses es poden resoldre amb la seqüència complementària o a partir de l'electroferograma.</p>

```

1      -----GGGAC-----ATTC
5221  C-----CCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTC
1      NGGNNTCNCCNGGNAATNNT-CNCCNCCNNNGGGGATNGGGGNNNGGATACCCANTT-C

10     CCCCCT-GAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCAN
5274  CCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCAT
58     CCCCCCNNGGAATANNTTTGGTT--ACCTTAAGNANGAGGAAATACCCNGGGC-GCNGCC-T

68     CTTTNNGTNTCATCACAGCAGCGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCNTATGGATAAACTTG
5333  CA-TCATCATCATCACAGCAGCGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATGGATAAACTTG
113   TA-TCTTCNTCTTCCGCGGGNGGCN-GGNGCCNCNCCGGCANCCCANATGGNAAAACCTG

127   -TTAGTATATTAGTTCCTTGTTTACAAATCAAACCTTTTTTAAACGTTTTTTTAATTC
5391  -TTAGTATATTAGTTCCTTGTTTACAAATCAAACCTTTTTTAAACGTTTTTTTAATTC
170   GTTTAGTANAT-AGTCCCTGGT-ACCCAATCAAACCNTTTTTTAAACGTTTTTTTAATTC

185   ACTTTTAAAGCAAGATCTTAATCAAGCTAAAATTATTTTTTTT-CAATGACAATGTTGCT
5449  ACTTTTAAAGCAAGATCTTAATCAAGCTAAAATTATTTTTTTT-CAATGACAATGTTGCT
227   CCCTTTAAAGCCAGATCTTNANCCAAGCTAAAATTATTTTTTTTTCAATGACAATGTTGCT

243   GATGAAACCTATG-AAGTTTTGC-AAAAATTC-AAAAAAGAACACAATAA-CTTAGCAA
5507  GATGAAACCTATG-AAGTTTTGC-AAAAATTC-AAAAAAGAACACAATAA-CTTAGCAA
286   GATGAAACCTATGGAAGGTTTGCCAAAAATTCCAAAAAAGAACACAATAAACTTAGCAA

```

298 TTGAAGTCTATTGTGACAAACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCGTGATAAGCTAGTG
5562 TTGAAGTCTATTGTGACAAACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCGTGATAAGCTAGTG
345 TTGAAGTCTATTGTGACAAACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCGTGATAAGCTAGTG

357 AATCTAGTAACAACACCTTATTTTTATTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAACAA
5621 AATCTAGTAACAACACCTTATTTTTATTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAACAA
404 AATCTAGTAACAACACCTTATTTTTATTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAACAA

416 AAATGTCATAAAAAGAGATTGTTGAATCAATTAAAAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTAT
5680 AAATGTCATAAAAAGAGATTGTTGAATCAATTAAAAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTAT
463 AAATGTCATAAAAAGAGATTGTTGAATCAATTAAAAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTAT

475 TAAAAAGTATGGTCTATTTATGCTTCTTAAAACATGATTTTCATTATTAAATTTTTGCCT
5739 TAAAAAGTATGGTCTATTTATGCTTCTTAAAACATGATTTTCATTATTAAATTTTTGCCT
522 TAAAAAGTATGGTCTATTTATGCTTCTTAAAACATGATTTTCATTATTAAATTTTTGCCT

534 TTAAAAGGTATTTTTCAAGGCAGAGTAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAAT
5798 TTAAAAGGTATTTTTCAAGGCAGAGTAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAAT
581 TTAAAAGGTATTTTTCAAGGCAGAGTAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAAT

593 AAATTACATCAAAAATAATGATCAATATATTTGGAATATTGTTATAAACACAGATTTTT
5857 AAATTACATCAAAAATAATGATCAATATATTTGGAATATTGTTATAAACACAGATTTTT
640 AAATTACATCAAAAATAATGATCAATATATTTGGAATATTGTTATAAACACAGATTTTT

652 TTAGGAAGCTAAATTTAACTTTTGAATCAAGGTTATTTGAAGATATAACCAATCTGGTAT
5916 TTAGGAAGCTAAATTTAACTTTTGAATCAAGGTTATTTGAAGATATAACCAATCTGGTAT
699 TTAGGAAGCTAAATTTAACTTTTGAATCAAGGTTATTTGAAGATATAACCAATCTGGTAT

711 CCGATGTTTTTTTCATCACAAAAAATTGTTTTTATTGATGTGATAGGAACAAATTATTT
5975 CCGATGTTTTTTTCATCACAAAAAATTGTTTTTATTGATGTGATAGGAACAAATTATTT
758 CCGATGTTTTTTTCATCACAAAAAATTGTTTTTATTGATGTGATAGGAACAAATTATTT

770 TATTCGTAATGATAGTTTATCAACTACTATTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCC
6034 TATTCGTAATGATAGTTTATCAACTACTATTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCC
817 TATTCGTAATGATAGTTTATCAACTACTATTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCC

829 CAATGTTATGAAAAGCTATATGTAAATCTCNGCCAAAATGGTTCCTCTTGCAAGTTTTAT
6093 -AATGTTATGAAAAGCTATATGTAAATCTCAGCCAAAATGGTTCCTCTTGCAAGTTTTAT
876 -AATGTTATGAAAAGCTATATGTAAATCTCAGCCAAAATGGTTCCTCTTGCAAGTTTTAT

888 TGATCCAAATCATANGATTGAAGCTAGGTTTTGGAGAAGGCAAATGTTTGNITGGGTTG
6151 TGATCCAAATCATAGATTGAAGCTAGGTTTTGGAGAAGGCAAATGTTTGTGTTGGTTG
934 TGATCCAAATCATAGATTGAAGCTAGGTTTTGGAGAAGGCAAATGTTTGTGTTGGTTG

947 CNCTTTTCAGCTTTGAATCCTTNAAGAAAAATTTTTCTGAATCCAAAAAAATTCCTGG
6210 CACTTTTCAGCTTTGAATACTTTAAGAAAAATTTTTCTGAATC-AAAAAAATTCCTG-
993 CACTTTTCAGCTTTGAATACTTTAAGAAAAATTTTTCTGAATC-AAAAAAATTCCTG-

1006 AAAA ACTATTGTTTTTTGGAAAAA-TGGAGTTATGANCNGGNTTTTCCAACAAAA
6267 AAAA ACTATTTGTTTTTTGGAAAAAATGGAGTTTATGAACGTGTTTTCCAACAAAA
1050 AAAA ACTATTTGTTTTTTGGAAAAAATGGAGTTTATGAACGTGTTTTCCAACAAAA

1064 ANCCAGG--GNNTTTANCTANTTTGGGGNCCNGNGNCTAAAGGAC-CCGCCNCCACC
6326 AATCAAG--GTATTTA-CTATATTTGGGTACAGCGACTATAAGGAT-CCGGCTGCTAAC
1109 AATACAGNGGTATTTA-CTATATTTGGGTACAGCGACTATAAGGATCCGGCTGCNAN

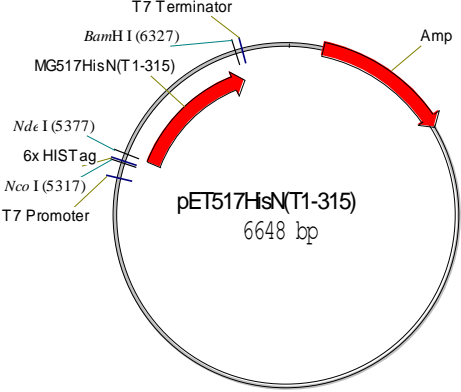
Annex 2: Alineaments de seqüències

```
1120 AA-GCCCNAAAGGGAAACTGAA TTGGCGGNC G C C C C C C C G A N A N A A A A C N N C C T A A C C C C
6381 AAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCC-----ACCGC
1167 AA-GCCCGAAGG--AGC-----GTGC G N C N-----NNNNN

1178 TNGGGCCCTAACGGCCTNGGGGGTTTTNCNAAANNGNACCTTCCNGNATTCCCNNNGG
6419 TGAG--CAATAAC-----
1194 N G G N--C N C-----

1237 NCCGGGGNCNGGNTANNNGCN
6430 -----TAGCA
-----
```

13.5 Seqüenciació de pET517HisN(T1-315)

<p>PLÀSMID</p>	
<p>CONSTRUCCIÓ</p>	<p>Amplificació del gen MG517HisN(T1-315) per PCR amb Pfu DNA polimerasa; anàlisi de restricció del gen i del vector pET15b(+) amb els enzims NdeI i BamHI, i lligació d'ambdós (vector: 5700 bp, insert: 948 bp)</p>
<p>SEQÜENCIACIÓ</p>	<p>Kit BigDye Terminator v3.1 ABI Prism de Perkin-Elmer Biosystems Purificació del plàsmid: Kit Wizard Plus Minipreps de Promega Encebadors: T7 promotor i T7 terminador Seqüenciació: gen MG517HisN(T1-315) Indicacions: en negre, seqüència de referència de MG517HisN(T1-315) en vermell, seqüència obtinguda amb T7 promotor en verd, seqüència obtinguda amb T7 terminador sombrejats en verd, els codons d'inici i de parada sombrejades en groc, les bases en què l'alineament no és satisfactori</p>
<p>COMENTARIS</p>	<p>Amb T7 promotor és possible llegir de la base 5298 a la 6182 Amb T7 terminador és possible llegir de la base 5516 a la 6339 Totes les bases dubtoses es poden resoldre amb la seqüència complementària o a partir de l'electroferograma.</p>

```

1      --TGNGANATT-----CCC
5221  CCGCGAAATTAATACGACTCAC--TATAGGGGAATTGTGAG-CGGATAACAATTCCCC
261   CCCNNNAAATTANTCCGGCCCCCENNNGGGNATTGGGGGCGGANAACCATTCCCC

13    TCT--GAAT--ATTTGTTTA-C-TTAAAGAAGGAGATATACC-ATGGGCAGCAGCCA
5277  TCTA--GAAATAATTTGTTTAAC-TTAAAGAAGGAGATATACC-ATGGGCAGCAGCCA
320   CCCAGGAAANAANTTTGGTTNACNNTTANGAGGGNGNTNCCCCAGGGGCNGCAGCCN

64    TCAT-CATC-ATCATCACAG-CAGCGG-CCTGGTGCC-GCGCGGCAGCCATATGGATAA
5332  TCAT-CATC-ATCATCACAG-CAGCGG-CCTGGTGCC-GCGCGGCAGCCATATGGATAA
379   TCNTTCATCCNATCATCCNNGGCGAGCNGNCCNGGNGCCGCGCGGCAGCCATATGGATNA

118   AC-TTGTTAGTATATTAGTTCCTTG-TTACAAATC-AAAACCTTTTTTAAACGTTTTT
5386  AC-TTGTTAGTATATTAGTTCCTTG-TTACAAATC-AAAACCTTTTTTAAACGTTTTT
438   ACCNNGTTAGTATATTAGTTCCTTG-TTACAAATC-AAAACCTTTTTTAAACGTTTTT

174   TTAATTCAC-TTTTAAAGCAAGATCTTAATCAAGCTAAAATTATTTTTTCAATGACAA
5442  TTAATTCAC-TTTTAAAGCAAGATCTTAATCAAGCTAAAATTATTTTTTCAATGACAA
497   TTAATTCACCTTTTAAAGCAAGATCTTAATCAGCTAAAATTATTTTTTCAATGACAA

232   TGTT-GCTGATGAAACC-TATGAAGTTTTGCAAAAATTCAAAAAGAACACAATAACTT
5500  TGTT-GCTGATGAAACC-TATGAAGTTTTGCAAAAATTCAAAAAGAACACAATAACTT
556   TGTTNGCTGATGAAACCCTATGAAGTTTTGCAAAAATTCAAAAAGAACACAATAACTT
    
```


289 AGCAATTGAAGTCTATTGTGACAAACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCCTGATAAGC
5557 AGCAATTGAAGTCTATTGTGACAAACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCCTGATAAGC
615 AGCAATTGAAGTCTATTGTGACAAACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCCTGATAAGC

348 TAGTGAATCTAGTAACAACACCTTATTTTTATTTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAAC
5616 TAGTGAATCTAGTAACAACACCTTATTTTTATTTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAAC
674 TAGTGAATCTAGTAACAACACCTTATTTTTATTTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAAC

407 AACAAAAATGTCATAAAAGAGATTGTTGAATCAATTAATAAAGAAGATTTTGATCTTGG
5675 AACAAAAATGTCATAAAAGAGATTGTTGAATCAATTAATAAAGAAGATTTTGATCTTGG
733 AACAAAAATGTCATAAAAGAGATTGTTGAATCAATTAATAAAGAAGATTTTGATCTTGG

466 TGTATTAATAAGTATGGTCTATTTATGCTTCTTAAACATGATTTTCATTATTAATTTTT
5734 TGTATTAATAAGTATGGTCTATTTATGCTTCTTAAACATGATTTTCATTATTAATTTTT
792 TGTATTAATAAGTATGGTCTATTTATGCTTCTTAAACATGATTTTCATTATTAATTTTT

525 TGCCTTTAAAGGTATTTTTCAAGGCAGAGTAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAAT
5793 TGCCTTTAAAGGTATTTTTCAAGGCAGAGTAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAAT
851 TGCCTTTAAAGGTATTTTTCAAGGCAGAGTAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAAT

584 AAATTAATACATCAAAAAAATGATCAATATATTTGGAATATTGTTATAAACACAGA
5852 AAATTAATACATCAAAAAAATGATCAATATATTTGGAATATTGTTATAAACACAGA
910 AAATTAATACATCAAAAAAATGATCAATATATTTGGAATATTGTTATAAACACAGA

643 TTTTTTTAGGAAGCTAAATTTAACTTTTGAATCAAGGTTATTTGAAGATATACCAATCT
5911 TTTTTTTAGGAAGCTAAATTTAACTTTTGAATCAAGGTTATTTGAAGATATACCAATCT
969 TTTTTTTAGGAAGCTAAATTTAACTTTTGAATCAAGGTTATTTGAAGATATACCAATCT

702 GGTATCCGATGTTTTTTTCATCACAAAAAATGTTTTTATTGATGTGATAGGAACAAAT
5970 GGTATCCGATGTTTTTTTCATCACAAAAAATGTTTTTATTGATGTGATAGGAACAAAT
1028 GGTATCCGATGTTTTTTTCATCACAAAAAATGTTTTTATTGATGTGATAGGAACAAAT

761 TATTTTATTCGTAATGATAGTTTATCAACTACTATTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTT
6029 TATTTTATTCGTAATGATAGTTTATCAACTACTATTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTT
1087 TATTTTATTCGTAATGATAGTTTATCAACTACTATTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTT

820 AATCCAATGTTATGAAAAGCTATATGTAAATCTCAGCCAAAATGGTTCTCTTGCAAGTT
6088 AATCCAATGTTATGAAAAGCTATATGTAAATCTCAGCCAAAATGGTTCTCTTGCAAGTT
1146 AATCCAATGTTATGAAAAGCTATATGTAAATCTCAGCCAAAATGGTTCTCTTGCAAGTT

879 TTATTGATCCAAATCATAAGATTGAAGCTAGGTTTTGGAGAAGGCAA-TGNTTGTNTN
6147 TTATTGATCCAAATCATAAGATTGAAGCTAGGTTTT-GGAGAAGGCAAATGTTTGTNTN-
1205 TTATTGATCCAAATCATAAGATTGAAGCTAGGTTTT-GGAGAAGGCAAATGTTTGTNTN-

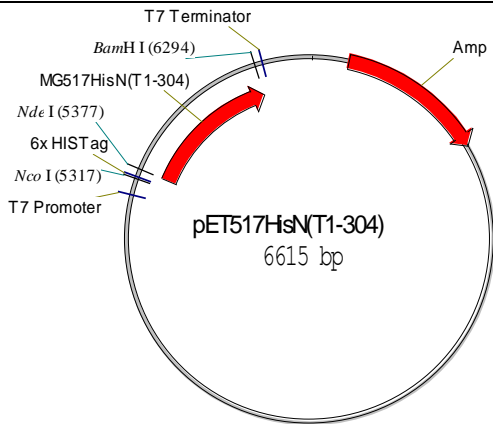
937 GGNNTGCACTTTTCAGCTTTGAATACTTTAAGAAAAATTTTCTGAATCAAAAAAATNT-
6204 GGTTTGCACCTTTTCAGCTTTGAATACTTTAAGAAAAATTTTCTGAATCAAAAAAATNT-
1262 GGTTTGCACCTTTTCAGCTTTGAATACTTTAAGAAAAATTTTCTGAATCAAAAAAATNT

995 CTTGAAAACTATTTGNTTTTTGGAAAAAN-GGAGTTTATGNACCGTGTTTTTCCAA
6263 CTTGAAAACTATTTGNTTTTTGGAAAAAATGGAGTTTATGAAC-GTGTTTTTCCAA
1321 CTTGAAAACTATTTGNTTTTTGGAAAAAATGGAGTTTATGAAC-GTGTTTTTCCAA

1053 CCAAGGANCCGGCGGCTA-CNAAGCCCAAAGGAAGCTGANNTGGCTGCTGCC-CCNC
6321 CATAAGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGC
1379 CATAAGGATCCGGCTGCTA--CAAGCCCGAAAG-----

```
1110  TGANCAANA-CTAGNA  
6380  TGAGCAATAACTAGCA  
1410  -----AGCG
```

13.6 Seqüenciació de pET517HisN(T1-304)

<p>PLÀSMID</p>	
<p>CONSTRUCCIÓ</p>	<p>Amplificació del gen MG517HisN(T1-304) per PCR amb Pfu DNA polimerasa; anàlisi de restricció del gen i del vector pET15b(+) amb els enzims NdeI i BamHI, i lligació d'amdós (vector: 5700 bp, insert: 915 bp)</p>
<p>SEQÜENCIACIÓ</p>	<p>Kit BigDye Terminator v3.1 ABI Prism de Perkin-Elmer Biosystems Purificació del plàsmid: Kit Wizard Plus Minipreps de Promega Encebadors: T7 promotor i T7 terminador Seqüenciació: gen MG517HisN(T1-304) Indicacions: en negre, seqüència de referència de MG517HisN(T1-304) en vermell, seqüència obtinguda amb T7 promotor en verd, seqüència obtinguda amb T7 terminador sombrejats en verd, els codons d'inici i de parada sombrejades en groc, les bases en què l'alineament no és satisfactori</p>
<p>COMENTARIS</p>	<p>Amb T7 promotor és possible llegir de la base 5298 a la 6193 Amb T7 terminador és possible llegir de la base 5491 a la 6304 Totes les bases dubtoses es poden resoldre amb la seqüència complementària o a partir de l'electroferograma.</p>

```

1      --TGNGANATT-----CCC-TC
5221  CCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCC-TC
298   CCCNNGAATTTAATNCGCCTCCCTATNNGGGANTNG-GAGCGGATANCCATTCCCCCTC

15    TG--AATAATTTTGTTTA-CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCA
5279  TAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCA
356   NAGGAATAATTTTGTTNACCTTNAGGAGGGNGATNTCCNNGGGCGGCAGCCATCATCA

71    TCATCATC-ACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGCC-ATATGGATAAACTTGTTAG
5338  TCATCATC-ACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGCC-ATATGGATAAACTTGTTAG
415   TCATCATCCACAGCAGCGCCNNGGGCCGCGGGCAGCCCATATGGATAAACTTGTTAG

128   TATATTAGTTCCTTG-TTACAAATCAAACC-TTTTTTAAAACGTTTTTTTAATTCACT
5395  TATATTAGTTCCTTG-TTACAAATCAAACC-TTTTTTAAAACGTTTTTTTAATTCACT
474   TATATTAGTCCNTGCTTACAAATCAAACCCTTTTTTAAAACGTTTTTTTAATTCACT

185   TTTAAAGCAAGATCTTAATCAAGCTAAAATTATTTTTTTCAATGACAATGTTGCTGATG
5452  TTTAAAGCAAGATCTTAATCAAGCTAAAATTATTTTTTTCAATGACAATGTTGCTGATG
533   TTTAAAGCAAGATCTTAATCAAGCTAAAATTATTTTTTT-CAATGACAATGTTGCTGATG

244   AAACCTATGAAGTTTTGCAAAAATTCAAAAAGAACAATAAAGTTAGCAATTGAAGTC
5511  AAACCTATGAAGTTTTGCAAAAATTCAAAAAGAACAATAAAGTTAGCAATTGAAGTC
591   AAACCTATGAAGTTTTGCAAAAATTCAAAAAGAACAATAAAGTTAGCAATTGAAGTC
    
```

303 TATTGTGACAAACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCCTGATAAGCTAGTGAATCTAGT
 5570 TATTGTGACAAACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCCTGATAAGCTAGTGAATCTAGT
 650 TATTGTGACAAACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCCTGATAAGCTAGTGAATCTAGT

 362 AACAAACACCTTATTTTTATTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAAACAAAAATGTCA
 5629 AACAAACACCTTATTTTTATTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAAACAAAAATGTCA
 709 AACAAACACCTTATTTTTATTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAAACAAAAATGTCA

 421 TAAAAGAGATTGTTGAATCAATTAAAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTATTAAAAAGT
 5688 TAAAAGAGATTGTTGAATCAATTAAAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTATTAAAAAGT
 768 TAAAAGAGATTGTTGAATCAATTAAAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTATTAAAAAGT

 480 ATGGTCTATTTATGCTTCTTAAAACATGATTTTCATTATTAATTTTTGCCTTTAAAAGG
 5747 ATGGTCTATTTATGCTTCTTAAAACATGATTTTCATTATTAATTTTTGCCTTTAAAAGG
 827 ATGGTCTATTTATGCTTCTTAAAACATGATTTTCATTATTAATTTTTGCCTTTAAAAGG

 539 TATTTTTCAAGGCAGAGTAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAATTAATTTACA
 5806 TATTTTTCAAGGCAGAGTAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAATTAATTTACA
 886 TATTTTTCAAGGCAGAGTAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAATTAATTTACA

 598 TCAAAAATAATGATCAATATATTTGGAATATTGTTATAAACACAGATTTTTTTAGGAAG
 5865 TCAAAAATAATGATCAATATATTTGGAATATTGTTATAAACACAGATTTTTTTAGGAAG
 945 TCAAAAATAATGATCAATATATTTGGAATATTGTTATAAACACAGATTTTTTTAGGAAG

 657 CTAAATTTAACTTTTGAATCAAGGTTATTTGAAGATATACCAATCTGGTATCCGATGTT
 5924 CTAAATTTAACTTTTGAATCAAGGTTATTTGAAGATATACCAATCTGGTATCCGATGTT
 1004 CTAAATTTAACTTTTGAATCAAGGTTATTTGAAGATATACCAATCTGGTATCCGATGTT

 716 TTTTTCATCACAAAAAATTGTTTTTATTGATGTGATAGGAACAAATTATTTTATTTCGTA
 5983 TTTTTCATCACAAAAAATTGTTTTTATTGATGTGATAGGAACAAATTATTTTATTTCGTA
 1063 TTTTTCATCACAAAAAATTGTTTTTATTGATGTGATAGGAACAAATTATTTTATTTCGTA

 775 ATGATAGTTTATCAACTACTATTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCCAATGTTAT
 6042 ATGATAGTTTATCAACTACTATTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCCAATGTTAT
 1122 ATGATAGTTTATCAACTACTATTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCCAATGTTAT

 834 GAAAAGCTATATGTAAATCTCAGCCAAAATGGTTCTCTTGCAAGTTTTATTGATCCAAA
 6101 GAAAAGCTATATGTAAATCTCAGCCAAAATGGTTCTCTTGCAAGTTTTATTGATCCAAA
 1181 GAAAAGCTATATGTAAATCTCAGCCAAAATGGTTCTCTTGCAAGTTTTATTGATCCAAA

 893 TCATAAGATTGAAGCTAGGTTTTGGAGAAGGCAA-TGTTTGTGGT-TTGCACCTT-CC
 6160 TCATAAGATTGAAGCTAGGTTTTGGAGAAGGCAAATGTTTGTGGT-TTGCACCTTTC
 1240 TCATAAGATTGAAGCTAGGTTTTGGAGAAGGCAAATGTTTGTGGT-TTGCACCTTTC

 950 GCTTTGAATACTTTAAGAAAA--TTTTCTGAATCAAAAAA-TTCTGAAAAACTATTT
 6219 GCTTTGAATACTTTAAGAAAAATTTTTCTGAATCAAAAAAATCTTGAAAAACTATTT
 1299 GCTTTGAATACTTTAAGAAAAATTTTTCTGAATCAAAAAAATCTTGAAAAACTATTT

 1006 GTTTTT--GGAATAAGGAN-C-GGCTGCTA--CAAGCCNNA--GGANCTGAGTNGNCTG
 6278 GTTTTTTTGGAA-TAAGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTG
 1358 GTTTTTTTGGAAATAAGGATCCGGCTGC-AACAAAGCCCCGAAAG--AGC-----

 1058 CGCCNCTGANCACTGCATACCCTGGGCCCCNAACGGNCTGNGGGTTTTGCGAAGGG
 6337 CTGCC-----ACCGCTGAGCAATAAC-----
 1403 -----

1117 GACTTNC CGNTTCCNCAGNGCCGGGGTCCGGNTACCA
6358 -----TAGCA
1403 -----GTG

13.7 Seqüenciació de pET517HisN(T1-297)

<p>PLÀSMID</p>	
<p>CONSTRUCCIÓ</p>	<p>Amplificació del gen MG517HisN(T1-297) per PCR amb Pfu DNA polimerasa; anàlisi de restricció del gen i del vector pET15b(+) amb els enzims NdeI i BamHI, i lligació d'ambdós (vector: 5700 bp, insert: 894 bp)</p>
<p>SEQÜENCIACIÓ</p>	<p><i>Kit BigDye Terminator v3.1 ABI Prism de Perkin-Elmer Biosystems</i> Purificació del plàsmid: Kit Wizard Plus Minipreps de Promega Encebadors: T7 promotor i T7 terminador Seqüenciació: gen MG517HisN(T1-297) Indicacions: en negre, seqüència de referència de MG517HisN(T1-297) en vermell, seqüència obtinguda amb T7 promotor en verd, seqüència obtinguda amb T7 terminador sombrejats en verd, els codons d'inici i de parada sombrejades en groc, les bases en què l'alineament no és satisfactori</p>
<p>COMENTARIS</p>	<p>Amb T7 promotor és possible llegir de la base 5298 a la 6158 Amb T7 terminador és possible llegir de la base 5409 a la 6285 Totes les bases dubtoses es poden resoldre amb la seqüència complementària o a partir de l'electroferograma.</p>

```

1      --TGNGANAT-----
5221  CCCGCGAAAT-----
111   CCCCGGAANGGCCCGGGGGGCCCCANGTCCCCGGCCCGGGNCGCCCNACCCCN
9
5231  -----
170   GGAACAGGGGCCNCGGNCNGAGGGGGGCCGTTTCCCTCGGGGNGNGNGGAANNNG
9
5231  -----
229   GCCCAGCACCNCCCCNGGGCCCCGGGATCCGGCCCCAAGNTNCGGNGNGNGATCGGGAT
9
5231  -----T-----CCC
288   -----TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCC
      NCGNTCCCGGAATTATNCGNCCCNATNGGGGA-TTGGAGNNGGANA-CCATTCCCN
13    TCT--GAATA-TTTTGTTTA-CTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCAT
5277  TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCAT
345   --NAGGAATAATTTNGTTNA-CTTTAGGAGGGAGATATNCCA-GGGCNGCAGCC-TCAT
68    CATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGATAAACTTGTTAG
5336  CATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGATAAACTTGTTAG
399   CATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATANGGATAAACTGGT-AG
    
```

127 TATATTAGTTCCTTGTTACAAATCAAACCTTTTTTAAAACGTTTTTTTAATTCACTTT
5395 TATATTAGTTCCTTGTTACAAATCAAACCTTTTTTAAAACGTTTTTTTAATTCACTTT
457 TATATTAGTTCCTGTTTACAAATCAAACCTTTTTTAAAACGTTTTTTTAATTCACTTT

186 TAAAGCAAGATCTTAATCAAGCTAAAATTATTTTTTTCAATGACAATGTTGCTGATGAA
5454 TAAAGCAAGATCTTAATCAAGCTAAAATTATTTTTTTCAATGACAATGTTGCTGATGAA
516 TAAAGCAAGATCTTAATCAAGCTAAAATTATTTTTTTCAATGACAATGTTGCTGATGAA

245 ACCTATGAAGTTTTGCAAAAATTCAAAAAGAACAATAACTTAGCAATTGAAGTCTA
5513 ACCTATGAAGTTTTGCAAAAATTCAAAAAGAACAATAACTTAGCAATTGAAGTCTA
575 ACCTATGAAGTTTTGCAAAAATTCAAAAAGAACAATAACTTAGCAATTGAAGTCTA

304 TTGTGACAAACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCCTGATAAGCTAGTGAATCTAGTAA
5572 TTGTGACAAACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCCTGATAAGCTAGTGAATCTAGTAA
634 TTGTGACAAACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCCTGATAAGCTAGTGAATCTAGTAA

363 CAACACCTTATTTTTATTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAACAAAAATGTCATA
5631 CAACACCTTATTTTTATTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAACAAAAATGTCATA
693 CAACACCTTATTTTTATTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAACAAAAATGTCATA

422 AAAGAGATTGTTGAATCAATTA AAAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTATTA AAAAGTAT
5690 AAAGAGATTGTTGAATCAATTA AAAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTATTA AAAAGTAT
752 AAAGAGATTGTTGAATCAATTA AAAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTATTA AAAAGTAT

481 GGTCTATTTATGCTTCTTAAACATGATTTTCATTATTAATTTTTGCCTTTAAAAGGTA
5749 GGTCTATTTATGCTTCTTAAACATGATTTTCATTATTAATTTTTGCCTTTAAAAGGTA
811 GGTCTATTTATGCTTCTTAAACATGATTTTCATTATTAATTTTTGCCTTTAAAAGGTA

540 TTTTTCAAGGCAGAGTAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAATTA AATTACATC
5808 TTTTTCAAGGCAGAGTAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAATTA AATTACATC
870 TTTTTCAAGGCAGAGTAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAATTA AATTACATC

599 AAAAATAATGATCAATATATTTGGAATATTGTTATAAACACAGATTTTTTTTAGGAAGCT
5867 AAAAATAATGATCAATATATTTGGAATATTGTTATAAACACAGATTTTTTTTAGGAAGCT
929 AAAAATAATGATCAATATATTTGGAATATTGTTATAAACACAGATTTTTTTTAGGAAGCT

658 AAATTTAACTTTTGAATCAAGGTTATTTGAAGATATAACCAATCTGGTATCCGATGTTTT
5926 AAATTTAACTTTTGAATCAAGGTTATTTGAAGATATAACCAATCTGGTATCCGATGTTTT
988 AAATTTAACTTTTGAATCAAGGTTATTTGAAGATATAACCAATCTGGTATCCGATGTTTT

717 TTTCATCACAAAAAATTGTTTTTATTGATGTGATAGGAACAAATTATTTTATTCGTAAT
5985 TTTCATCACAAAAAATTGTTTTTATTGATGTGATAGGAACAAATTATTTTATTCGTAAT
1047 TTTCATCACAAAAAATTGTTTTTATTGATGTGATAGGAACAAATTATTTTATTCGTAAT

776 GATAGTTTATCAACTACTATTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCCAATGTTATGA
6044 GATAGTTTATCAACTACTATTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCCAATGTTATGA
1106 GATAGTTTATCAACTACTATTAGTGCTCCACGCTACTTAAATTTAATCCAATGTTATGA

835 AAAGCTATATGTAATCTCAGCCAAAATGGTTCTCTTGCAAGTTTTATTGATCCAA TC
6103 AAAGCTATATGTAATCTCAGCCAAAATGGTTCTCTTGCAAGTTTTATTGATCCAAATC
1165 AAAGCTATATGTAATCTCAGCCAAAATGGTTCTCTTGCAAGTTTTATTGATCCAAATC

893 ATAAGATTGAAGCTAGGN TTTGGAGAAGGCAAATGTTTGTGTTGGN TTGCACTTT CAGC
6162 ATAAGATTGAAGCTAGGTTTTGGAGAAGGCAAATGTTTGTGTTGGTTTGCACTTTT CAGC
1224 ATAAGATTGAAGCTAGGTTTTGGAGAAGGCAAATGTTTGTGTTGGTTTGCACTTTT CAGC

```
951   TTTGAATACTTTAAGAAAAATTTT-CTGAATCAAAAAAATTCTTGAATANGGATCCGG
6221  TTTGAATACTTTAAGAAAAATTTTTCTGAATCAAAAAAATTCTTGAATAAGGATCCGG
1283  TTTGAATACTTTAAGAAAAATTTTTCTGAATCAAAAAAATTCTTGAATAAGGATCCGG

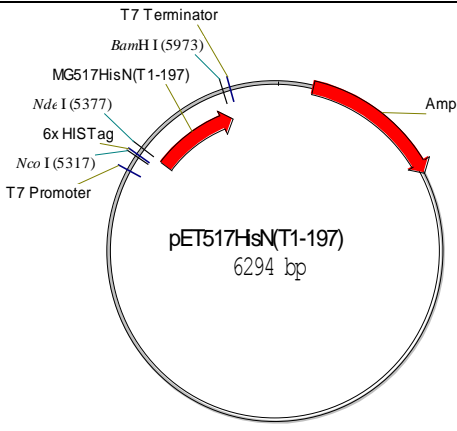
1009  CTGCTAACAA-GCCCGAANG-AAGCTGAGT-GGCTGCGCCNCGACAAAACAGCATAc
6280  CTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCC-----AC
1342  CTGCTA-CANAGCCCGAAAG--AGC-----

1065  CCCTGGGGCNCTACGGGCTGGGGGTTTTGCGAAGNNGACNTTCGGATCCGAGAGCCGNG
6323  CGCTG-----
1364  -----

1124  GTCGGNTACCANCNGCCCCNNCGGGNCGGCCAGANNAAGANCTTGTNATCCNCGGCCG
6328  -----AGCAATAACTAG-----
1364  -----G-----

1183  CGNGTGCA
6340  -----CA
1365  -----TG
```


13.8 Seqüenciació de pET517HisN(T1-197)

<p>PLÀSMID</p>	 <p style="text-align: center;">pET517HisN(T1-197) 6294 bp</p>
<p>CONSTRUCCIÓ</p>	<p>Amplificació del gen MG517HisN(T1-197) per PCR amb Pfu DNA polimerasa; anàlisi de restricció del gen i del vector pET15b(+) amb els enzims NdeI i BamHI, i lligació d'ambdós (vector: 5700 bp, insert: 594 bp)</p>
<p>SEQÜENCIACIÓ</p>	<p><i>Kit BigDye Terminator v3.1 ABI Prism de Perkin-Elmer Biosystems</i> <i>Purificació del plàsmid: Kit Wizard Plus Minipreps de Promega</i> Encebadors: T7 promotor i T7 terminador Seqüenciació: gen MG517HisN(T1-197) Indicacions: en negre, seqüència de referència de MG517HisN(T1-197) en vermell, seqüència obtinguda amb T7 promotor en verd, seqüència obtinguda amb T7 terminador sombrejats en verd, els codons d'inici i de parada sombrejades en groc, les bases en què l'alineament no és satisfactori</p>
<p>COMENTARIS</p>	<p>Amb T7 promotor és possible llegir de la base 5298 a la 6041 (final) Amb T7 terminador és possible llegir de la base 5221 (inici) a la 5976 Totes les bases dubtoses es poden resoldre amb la seqüència complementària o a partir de l'electroferograma.</p>

```

1      --NCGGAA-----TCCCTCT
5221  CCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCTCT
505   CCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCTCT

15    GAA--ATTTGTTTACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCAT
5280  AGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCAT
564   AGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCAT

70    CATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGATAAACTTGTTAGTAT
5339  CATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGATAAACTTGTTAGTAT
623   CATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGATAAACTTGTTAGTAT

129   ATTAGTTCCTTGTTACAAATCAAACCTTTTTTAAAACGTTTTTTTAAATTCACTTTTAA
5398  ATTAGTTCCTTGTTACAAATCAAACCTTTTTTAAAACGTTTTTTTAAATTCACTTTTAA
682   ATTAGTTCCTTGTTACAAATCAAACCTTTTTTAAAACGTTTTTTTAAATTCACTTTTAA

188   AGCAAGATCTTAATCAAGCTAAAATTATTTTTTTCAATGACAATGTTGCTGATGAAACC
5457  AGCAAGATCTTAATCAAGCTAAAATTATTTTTTTCAATGACAATGTTGCTGATGAAACC
741   AGCAAGATCTTAATCAAGCTAAAATTATTTTTTTCAATGACAATGTTGCTGATGAAACC

247   TATGAAGTTTTGCAAAAATTCAAAAAGAACACAATAACTTAGCAATTGAAGTCTATTG
5516  TATGAAGTTTTGCAAAAATTCAAAAAGAACACAATAACTTAGCAATTGAAGTCTATTG
800   TATGAAGTTTTGCAAAAATTCAAAAAGAACACAATAACTTAGCAATTGAAGTCTATTG
    
```

306 TGACAAACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCGTGATAAGCTAGTGAATCTAGTAACAA
5575 TGACAAACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCGTGATAAGCTAGTGAATCTAGTAACAA
859 TGACAAACAGAATGAAGGTATTGGAAAAGTGCGTGATAAGCTAGTGAATCTAGTAACAA

365 CACCTTATTTTTATTTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAACAAAAATGTCATAAAA
5634 CACCTTATTTTTATTTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAACAAAAATGTCATAAAA
918 CACCTTATTTTTATTTTTATCGATCCTGATGATTGTTTTAACAACAAAAATGTCATAAAA

424 GAGATTGTTGAATCAATTAATAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTATTAATAAAGTATGGT
5693 GAGATTGTTGAATCAATTAATAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTATTAATAAAGTATGGT
977 GAGATTGTTGAATCAATTAATAAAGAAGATTTTGATCTTGGTGTATTAATAAAGTATGGT

483 CTATTTATGCTTCTTAAAACATGATTTTCATTATTAATTTTTGCCTTTAAAAGGTATTT
5752 CTATTTATGCTTCTTAAAACATGATTTTCATTATTAATTTTTGCCTTTAAAAGGTATTT
1036 CTATTTATGCTTCTTAAAACATGATTTTCATTATTAATTTTTGCCTTTAAAAGGTATTT

542 TTCAAGGCAGAGTAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAATTAATTTACATCAAA
5811 TTCAAGGCAGAGTAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAATTAATTTACATCAAA
1095 TTCAAGGCAGAGTAAAATTAATTAATAATAACAATGTTAATAAATTAATTTACATCAAA

601 AATAATGATCAATATATTTTGAATATTGTTATAAACACAGATTTTTTTTAGGAAGCTAAA
5870 AATAATGATCAATATATTTTGAATATTGTTATAAACACAGATTTTTTTTAGGAAGCTAAA
1154 AATAATGATCAATATATTTTGAATATTGTTATAAACACAGATTTTTTTTAGGAAGCTAAA

660 TTTAACTTTTGAATCAAGGTTATTTGAAGATATACCAATCTAAGGATCC-GGCTGCTAA
5929 TTTAACTTTTGAATCAAGGTTATTTGAAGATATACCAATCTAAGGATCC-TAAGGATCC-GGCTGCTAA
1213 TTTAACTTTTGAATCAAGGTTATTTGAAGATATACCAATCTAAGGATCC-CGGCTGCNA-

718 CAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCA
5987 CAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCA
1271 -CAAGCCCGAAAGG-----AGCGGCGN-----