



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Farmàcia

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

**Estudi estructural i genètic del nucli del lipopolisacàrid de
Serratia marcescens N28b**

Núria Coderch Marco
2008

3. MATERIALS I MÈTODES

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 SOQUES BACTERIANES UTILITZADES

En la següent taula es llisten les soques utilitzades en aquest treball juntament amb les seves característiques principals i la seva procedència.

Taula 3.1. Soques bacterianes utilitzades en aquest treball

Soca	Característiques Principals	Procedència
<i>Serratia marcescens</i>		
N28b	<i>Serratia marcescens</i> N28b, serovar O4	Gargallo-Viola, 1989
N28b4	Mutant antigen O' de N28b en els gens <i>wzm</i> i <i>wzt</i> per doble recombinació	Saigí <i>et al.</i> , 1999
N28bΔorf4	Mutant de N28b en el gen <i>orf4</i> per doble recombinació amb pKO3KmΔorf4	Present treball
N28bΔorf7	Mutant de N28b en el gen <i>orf7</i> per doble recombinació amb pKO3KmΔorf7	Present treball
N28bΔwaaQ	Mutant de N28b en el gen putatiu <i>waaQ</i> (<i>orf8</i>) per doble recombinació amb pKO3KmΔwaaQ	Present treball
N28bΔorf9- orf10	Mutant doble de N28b en els gens <i>orf9</i> – <i>orf10</i> per doble recombinació amb pKO3KmΔorf9-10	Present treball
N28bΔwaaE	Mutant de N28b en el gen putatiu <i>waaE</i> (<i>orf13</i>) per doble recombinació amb pKO3KmΔwaaE	Present treball
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
52145	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , serovar O1:K2	Nassif <i>et al.</i> , 1989
NC16	Mutant no-polar derivat de 52145 en el gen <i>waaE</i>	Regué <i>et al.</i> , 2001
NC19	Mutant no-polar derivat de 52145 en el gen <i>waaQ</i>	Regué <i>et al.</i> , 2001
<i>Escherichia coli</i>		
NM554	<i>recA13 araD139 Δ(ara-leu)7696 Δ(lac)X74 galE15 galK16 hsdR2 rpsL mcrA mcrB</i>	Raleigh <i>et al.</i> , 1988
DH5α	F ⁻ <i>endA hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁻) <i>supE44 thi-1 recA1 gyr-A96 φ80lacZM15 Δ(argF lacZYA)U169</i>	Hanahan, 1983
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> (F' <i>proAB lacI</i> ^φ ZΔM15 Tn10)	Stratagene

3.2 VECTORS UTILITZATS

En la següent taula, es detallen els diferents plasmidis que han estat utilitzats en aquest treball, alguns dels quals provenen de fonts comercials, d'altres de treballs anteriors i altres han estat generats en el nostre laboratori arrel del present treball.

Taula 3.2. Plasmidis utilitzats en aquest treball

Vector	Característiques Principals	Procedència
Cos FGR16	Supercos 1 recombinant que conté els gens <i>waaC</i> , <i>orf4</i> , <i>waaL</i> , <i>orf6</i> , <i>orf7</i> , <i>waaQ</i> , <i>orf9</i> , <i>orf10</i> , <i>orf11</i> , <i>waaA</i> , <i>waaE</i> i <i>coaD</i> de <i>S.marcescens</i> N28b	Abitiu, 2000
pSKF41	Plasmidi pBluescript SK (Ap ^r , lacI) que conté un fragment de 5.5kb amb els gens <i>waaA</i> , <i>waaE</i> i <i>coaD</i> de <i>S.marcescens</i> N28b	Guasch <i>et al.</i> , 1996
Cos R11	Supercos 1 recombinant que conté els gens <i>orf7</i> (parcial), <i>orf8</i> , <i>orf9</i> , <i>orf10</i> , <i>orf11</i> , <i>waaA</i> , <i>waaE</i> i <i>coaD</i> de <i>S.marcescens</i> N28b	Piqué, 2000
pKO3	Plasmidi Cm ^r , <i>sacB</i> . Conté un origen de replicació termosensible [<i>repA(ts)</i>]	Link <i>et al.</i> , 1997
pKO3Km	Plasmidi Km ^r , Cm ^r , <i>sacB</i> . Plasmidi derivat del pKO3 per inserció del gen de resistència a la kanamicina	Present treball
pKO3KmΔorf4	pKO3Km que conté una construcció d'una deleció del gen <i>orf4</i> de <i>S. marcescens</i> N28b	Present treball
pKO3KmΔorf7	pKO3Km que conté una construcció d'una deleció del gen <i>orf7</i> de <i>S. marcescens</i> N28b	Present treball
pKO3KmΔwaaQ	pKO3Km que conté una construcció d'una deleció del gen putatiu <i>waaQ</i> de <i>S. marcescens</i> N28b	Present treball
pKO3KmΔorf9-10	pKO3Km que conté una construcció d'una doble deleció dels gens <i>orf9</i> i <i>orf10</i> de <i>S. marcescens</i> N28b	Present treball
pKO3KmΔwaaE	pKO3Km que conté una construcció d'una deleció del gen putatiu <i>waaE</i> de <i>S. marcescens</i> N28b	Present treball
pGEM-T easy	Vector linealitzat per a la clonació de fragments obtinguts per PCR, ja que conté a l'extrem 3' timidines addicionals. Conté el gen <i>lacZ</i> . Amp ^r	Promega
pGEMT- WaaQ _{Sm}	pGEM-T easy amb el gen <i>orf8</i> (<i>waaQ</i>) de <i>S. marcescens</i> N28b	Present treball
pGEMT- WaaE _{Sm}	pGEM-T easy amb el gen <i>waaE</i> de <i>S. marcescens</i> N28b	Present treball
pGEMT- WaaE _{Kp}	pGEM-T easy amb el gen <i>waaE</i> de <i>K. pneumoniae</i>	Regué <i>et al.</i> , 2001
pGEMT-Orf9 _{Sm}	pGEM-T easy amb el gen <i>orf9</i> de <i>S. marcescens</i> N28b	Present treball
pGEMT-Orf10 _{Sm}	pGEM-T easy amb el gen <i>orf10</i> de <i>S. marcescens</i> N28b	Present treball
pGEMT-Orf9-10 _{Sm}	pGEM-T easy amb el gen <i>orf9</i> i <i>orf10</i> de <i>S. marcescens</i> N28b	Present treball

Taula 3.2 (cont.). Plasmidis utilitzats en aquest treball

Vector	Característiques Principals	Procedència
pGEMT-Orf8-9 _{Kp}	pGEM-T easy amb el gen <i>orf8</i> i <i>orf9</i> de <i>K. pneumoniae</i>	Izquierdo, 2003
pGLU	Vector pLS88 (Km ^r , Sm ^r , Sul ^r) amb el gen <i>lgtF</i> de <i>Haemophilus ducreyi</i>	Filiatrault <i>et al.</i> , 2000
pUC4K	Plasmidi de 4kb, Amp ^R , Km ^R . Utilitzat per extraure el casset de kanamicina	GE Healthcare (anteriorment Amersham Pharmacia)

3.3 MEDIS DE CULTIU, ANTIBIÒTICS I ALTRES ADDITIUS

3.3.1 MEDIS LÍQUIDS

TSB (*Trypticase Soy Broth*): medi nutritivament ric utilitzat habitualment per al creixement bacterià. La seva composició és:

- peptona de caseïna 17,0 g/l
- peptona de soja 3,0 g/l
- clorur sòdic 5,0 g/l
- fosfat dipotàssic 2,5 g/l
- glucosa 2,5 g/l

pH aproximat un cop rehidratat = 7,3

Alternativament, s'utilitzà també com a medi nutritiu el medi **LB-Miller** (Miller, 1972) que té la composició següent:

- peptona de caseïna 10,0 g/l
- extracte de llevat 5,0 g/l
- clorur sòdic 10,0 g/l

LB-Lúria (Luria–Bertani): Medi nutritivament ric utilitzat per la preparació de cèl·lules competents prèvies a l'electroporació, ja que presenta un baix contingut en sals minerals. La seva composició és:

- peptona de caseïna 10,0 g/l
- extracte de llevat 5,0 g/l

pH aproximat un cop rehidratat = 7,2

LB-Mutagènesi (LB-mut): Medi nutritivament ric derivat del LB-Miller utilitzat per a dur a terme els experiments de mutagènesi amb els plasmidis pKO3 o pKO3Km.

- bactotriptonna 10,0 g/l
- extracte de llevat 5,0 g/l
- clorur sòdic 5,0 g/l

3.3.2 MEDIS SÒLIDS

TSA (*Trypticase Soy Agar*): Medi nutritivament ric utilitzat per a la preparació de plaques de cultiu per al manteniment rutinari de totes les soques. La seva composició és:

- peptona de caseïna 15,0 g/l
- peptona de soja 5,0 g/l
- clorur sòdic 5,0 g/l
- agar-agar 15 g/l

pH aproximat un cop rehidratat = 7,3

Alternativament, també s'utilitzà el medi **agar LB-Miller**, la composició del qual és la mateixa que el LB-Miller però suplementat amb 15 g/l d'agar.

LB mutagènesi (LB-mut) agar: medi LB-mutagènesi suplementat amb 15 g/l d'agar. Utilitzat en els experiments de mutagènesi amb els plasmidis pKO3 o pKO3Km.

3.3.3 ANTIBIÒTICS I ALTRES ADDITIUS

Quan fou necessari, els medis de cultiu es van suplementar amb antibiòtics a les concentracions de treball que s'indiquen a la taula següent. En els casos en els que es feia créixer bacteris que tenien plasmidis que contenien el gen *lac* com a sistema de selecció de transformants que havien lligat un insert (colònies blanques), s'hi afegia al medi de cultiu X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosid) i IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosid) a les concentracions que s'indiquen a la Taula 3.3. En el protocol de mutagènesi per doble recombinació amb el plasmidi pKO3Km, es va suplementar el medi de cultiu (LB- mut) amb sacarosa 10% per a forçar la doble recombinació (veure secció 3.4.12 *Tècniques de mutagènesi*).

Taula 3.3. Antibiòtics i altres additius utilitzats en aquest treball

	Concentració de treball	Concentració estoc	Solvent
Antibiòtics			
Ampicil·lina (Amp)	100 μ g/ml	100 mg/ml	Aigua MilliQ
Cloramfenicol (Cm)	30 μ g/ml	50 mg/ml	Etanol absolut
Kanamicina (Km)	50 μ g/ml	50 mg/ml	Aigua MilliQ
Tetraciclina (Tc)	10 μ g/ml	10 mg/ml	Etanol 50%
Altres additius			
X-Gal	80 μ g/ml	50 mg/ml	N,N'-dimetil-formamida (DMF)
IPTG	0.5mM	100mM	Aigua MilliQ
Sacarosa (Sac)	10% (p/v)	50% (p/v)	Aigua MilliQ

3.4 TÈCNIQUES DE GENÈTICA MOLECULAR

La majoria de les tècniques de manipulació de l'ADN utilitzades en aquest treball són protocols més o menys adaptats dels que es troben descrits en els manuals de biologia molecular de Sambrook *et al.*, 1989 i Ausubel *et al.*, 1989. A més, en molts casos es van utilitzar kits comercials seguint les instruccions del fabricant.

3.4.1 OBTENCIÓ DE L'ADN PLASMÍDIC

Per a extraure l'ADN plasmídic se segueixen dues metodologies bàsiques en funció de la quantitat i del grau de puresa de l'ADN que es vol obtenir de cara a posteriors manipulacions: extraccions a petita escala o “minipreps” i extraccions a escala mitjana o “midipreps”.

En el cas d'extraccions d'ADN plasmídic a petita escala en què no es requeria un ADN d'elevada puresa (per a mostreig) o bé en el cas de plasmidis de baix número de còpies es va utilitzar el mètode de la lisi alcalina de Birnboim i Doly, 1979, descrit per Maniatis *et al.*, 1982 i modificat per Martínez i De la Cruz, 1988. Per a extraccions en què es requeria major puresa, especialment pels plasmidis d'alt número de còpies, es van utilitzar les columnes de purificació d'ADN plasmídic incloses en els kits comercials *GFXTM Micro Plasmid Prep Kit* (GE Healthcare, abans Amersham Biosciences) o *Qiagen plasmid mini-prep* (QIAGEN). Per a l'obtenció d'ADN plasmídic de major puresa i en quantitat més elevada es va utilitzar el kit *Qiagen plasmid midi-prep preparations* de QIAGEN, el qual permet dur a terme extraccions a partir de cultius bacterians de 100 ml. En tots els casos, es van seguir els protocols recomanats pels fabricants dels kits. De manera resumida, aquests sistemes es basen en provocar en primer lloc una lisi alcalina. El sobrenedant obtingut per centrifugació de les restes de la lisi cel·lular s'aplica a una columna que uneix selectivament els àcids nucleics. A través de rentats i d'una elució final amb concentracions adequades de clorur sòdic es produeix l'elució selectiva de l'ADN plasmídic així com també l'eliminació de la resta d'àcids nucleics, restes de proteïnes i contaminants de baix pes molecular.

3.4.2 OBTENCIÓ DE L'ADN CROMOSÒMIC

Per a l'obtenció d'ADN cromosòmic de gran puresa es va utilitzar el kit d'aïllament d'ADN genòmic total *Easy chromosomal DNA extraction kit* (Invitrogen™), seguint el procediment indicat pel fabricant. Com a eina de cribatge per als experiments de mutagènesi, es va posar a punt un mètode d'extracció ràpida d'ADN cromosòmic a partir del creixement en placa.

3.4.2.1 Extracció ràpida d'ADN cromosòmic per a reaccions de PCR

En els experiments de mutagènesi amb el plasmidi pKO3Km, el cribatge dels possibles mutants es va fer per la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Donat el volum elevat de mostres que calia processar es va fer necessari buscar un sistema d'obtenció d'ADN cromosòmic alternatiu al del kit descrit anteriorment que fos més ràpid i menys costós tant en termes econòmics com de manipulació i que alhora fos apropiat per l'amplificació per PCR.

Inicialment, es va provar d'obtenir l'ADN motlle per un mètode molt senzill que Liu i col·laboradors (Liu *et al.*, 1994) havien utilitzat prèviament en *Serratia marcescens* i que consistia en realitzar la reacció de PCR directament en els sobrenedants obtinguts per centrifugació d'una suspensió bacteriana preparada a partir de colònies d'un cultiu fresc després d'haver-la bullit durant 15 minuts. En el cas de *S. marcescens* N28b, els intents de realitzar les PCRs amb l'ADN extret directament del creixement en placa van fracassar per la presència d'ADNases que són produïdes per la pròpia *S. marcescens* i que autodegraden l'ADN cromosòmic durant el procés d'extracció. Aquesta dificultat d'obtenir ADN cromosòmic de *S. marcescens* per l'amplificació posterior per PCR ha estat també reportada per altres autors (Polyzou *et al.*, 2000; Hezaji *et al.*, 1997). Per aquesta raó, es va posar a punt un mètode ràpid d'extracció que permet obtenir ADN cromosòmic que pot ser utilitzat en posteriors reaccions d'amplificació per PCR i que elimina les ADNases entre d'altres proteïnes.

El protocol és el següent:

- Resuspendre 20 colònies (màxim 48 hores) en 200 µl d'aigua desionitzada estèril i mantenir en fred.
- Afegir 100 µl de solució de fenol equilibrat i 100 µl de solució de cloroform:isoamílic i agitar per inversió 6 o 7 cops.
- Incubar a T^a ambient durant 5 minuts.
- Centrifugar a 16.000 r.p.m. durant 5 minuts.
- Recuperar la fase superior amb cura de no emportar-se la interfase i posar-la en un tub eppendorf estèril (V. aprox. 200 µl).
- Afegir el mateix volum de cloroform: isoamílic (V.aprox. 200 µl) i agitar 6 o 7 cops.
- Centrifugar a 16.000 r.p.m. durant 5 minuts.
- Recuperar la fase superior en un tub eppendorf net. Repetir l'extracció amb cloroform:isoamílic, agitar per inversió i centrifugar a 16.000 r.p.m.
- Recuperar la fase superior (V. aprox 150 µl). Previ a la precipitació de l'ADN es va incorporar una extracció amb èter per tal d'eliminar totalment les restes de cloroform, ja que aquest podia inhibir l'activitat de la taq polimerasa utilitzada en les reaccions posteriors de PCR. Per dur a terme l'extracció amb èter, s'afegeix al volum recuperat (V. aprox. 150 µl) el mateix volum d'una solució d'èter saturat en aigua, s'agita per inversió i es deixa reposar fins que se separen les fases. Seguidament, s'evaporen les restes d'èter en un bany a 60°C i es procedeix a la precipitació de l'ADN, tal com s'indica a la secció 3.4.4 *Precipitació de l'ADN*.

Un cop l'ADN és sec es resuspèn amb 150 µl d'aigua desionitzada estèril. Per afavorir l'homogenització de l'ADN és necessari incubar a 60°C durant cinc minuts. Per cada reacció de PCR, es van utilitzar 17 µl de l'ADN extret com a condició de partida.

3.4.3 PURIFICACIÓ DE L'ADN PER EXTRACCIÓ FENÒLICA

La fenolització de l'ADN s'utilitza per extraure les proteïnes que poden contaminar les preparacions d'ADN en solució. Es va seguir el protocol descrit per Sambrook *et al*, 1989 que es resumeix a continuació.

- S'afegeix a la solució d'ADN un volum igual de solució de fenol equilibrat i s'agita fins aconseguir una emulsió.
- Es centrifuga durant 5 minuts per a separar les dues fases.
- Es transfereix la fase superior aquosa a un tub net, s'hi afegeix un volum igual d'una solució de fenol:cloroform i s'agita fins aconseguir l'homogenització.
- Es centrifuga durant 5 minuts.
- Es transfereix la fase superior aquosa a un tub net i es repeteix el mateix procés però amb una solució de cloroform isoamílic. Aquesta extracció permet eliminar les restes de fenol que hagin pogut quedar en la fase aquosa.
- Es centrifuga durant 5 minuts i es transfereix la fase superior a un tub net. Seguidament, es precipita l'ADN.

Solució de fenol equilibrat: Fenol bidestil·lat (pH 7,8). A 250 ml de fenol s'hi afegeixen 0,25 g de 8-hidroxiquinoleïna que actua com antioxidant i proporciona una coloració groguenca que permet distingir la fase fenòlica de l'aquosa. Es barreja amb un excés de tampó Tris-HCl 0,5 M pH 8,0 i es deixen separar les dues fases. S'elimina periòdicament el tampó i es canvia per nou. Es controla el pH de la fase aquosa un cop separada de la fenòlica i un cop el pH es situï per sobre de 7,8 es pot donar per finalitzat l'equilibrat. El fenol es conserva a 4°C protegit de la llum.

Solució cloroform: isoamílic: 24 volums de cloroform per 1 volum d'alcohol isoamílic.

Solució fenol: cloroform: mescla 50% de solució de fenol i solució de cloroform:isoamílic.

3.4.4 PRECIPITACIÓ DE L'ADN

La precipitació de l'ADN es va dur a terme seguint el mètode descrit per Maniatis *et al.*, 1982, que consisteix en l'addició de 0.1 volums d'acetat sòdic 3M pH 4,8 a la solució d'ADN i en afegir seguidament el doble del volum obtingut en el pas anterior d'etanol al 98% fred. Aquesta mescla es manté a -20°C durant 2 hores o alternativament, es pot posar a refredar en un bany de gel sec/etanol durant 30 minuts. Posteriorment, es centrifuga a $10.000 \times g$ (15.000 r.p.m) durant 15 minuts a 4°C i es descarta el sobrenedant. Finalment, es realitza un rentat amb etanol al 70% fred, es centrifuga durant 10 minuts i s'asseca la mostra al buit (*Speed-Vac*, Savant) durant 20 minuts o bé per evaporació de l'etanol durant tota la nit.

3.4.5 ELECTROFORESI DE L'ADN

L'electroforesi en gels d'agarosa s'utilitza per a separar i identificar fragments d'ADN. Aquesta tècnica es basa en el fet que l'ADN en solució i a pH neutre adquireix càrrega negativa, de manera que quan se'l sotmet a l'acció d'un camp elèctric migra cap al pol positiu amb diferents velocitats en funció de la seva mida i/o conformació. La velocitat de migració és inversament proporcional al logaritme del pes molecular de manera que per comparació amb un patró de mides conegudes es pot extrapolar la mida dels diferents fragments d'ADN presents a la solució. D'altra banda, modificant la concentració d'agarosa pot aconseguir-se separar amb bona resolució fragments d'ADN de longituds diverses. Les concentracions emprades oscil·laren entre 0,5% (per resoldre fragments grans) fins al 2% (per fragments al voltant de 100 pb) (Maniatis *et al.* 1982).

L'agarosa es va gelificar en tampó TAEx1 preparat a partir d'una solució concentrada de TAEx50 (veure Taula 3.4). L'agarosa que es va utilitzar va ser del tipus electroendosmosis, és a dir, amb baixa densitat de càrrega pròpia que pugui distorsionar la migració de l'ADN.

Les mostres d'ADN es van mesclar per a la seva càrrega en el gel amb tampó de mostres (veure Taula 3.4) en una proporció 1/5 respecte al volum total. El tampó té bàsicament dues funcions: a) augmentar la densitat de la mostra facilitant la introducció de la mateixa en els pous del gel i evitant la difusió; b) poder seguir el curs del procés

electroforètic gràcies a la presència dels dos colorants que conté el tampó (blau de bromofenol i xilencianol).

L'electroforesi es va dur a terme en cubetes d'electroforesi horitzontals Hoefer HE 33 de Pharmacia (GE Healthcare, anteriorment Amersham Biosciences) aplicant un voltatge entre 80-100 volts.

Per visualitzar l'ADN es va afegir al gel un agent intercalant, el bromur d'etidi, a una concentració de 0,5 µg/ml. Aquest agent es fixa entre les bases de l'ADN i permet visualitzar i/o fotografiar-lo en un transil·luminador de llum ultraviolada ($\lambda = 302$ nm).

Taula 3.4. Composició del tampó TAE_{x50} i del tampó de mostres

TAMPÓ TAE _{x50}		TAMPÓ DE MOSTRES	
Components	Quantitat	Components	Quantitat
Tris	242 g	Blau de bromofenol	0,25%
EDTA 0,5M (pH8,0)	100 ml	Xilencianol	0,25%
Àcid acètic glacial	57,1 ml	Glicerol	30%
Aigua bidestil·lada	q.s. 1 l	–	–

3.4.6 PURIFICACIÓ D'ADN A PARTIR DE GELS D'AGAROSA

La purificació de fragments d'ADN a partir de gels d'agarosa es va realitzar mitjançant el sistema QIAEX (QIAGEN) seguint el protocol recomanat pel fabricant del kit. El sistema es basa principalment en la retenció de l'ADN en una matriu de sílice en presència d'elevada concentració de salts. Seguidament, rentats posteriors permeten eliminar les impureses no desitjades (agarosa, proteïnes, bromur d'etidi). Finalment, s'elueix l'ADN purificat amb una solució amb baixa concentració de salts com aigua bidestil·lada o tampó Tris.

3.4.7 QUANTIFICACIÓ DE L'ADN

Habitualment, la quantificació de l'ADN es va dur a terme a partir de la intensitat de fluorescència que emet el bromur d'etidi quan s'intercala entre les bases de l'ADN. Aquesta emissió és directament proporcional a la massa total d'ADN.

En un gel d'agarosa amb 0,5 µg/ml de bromur d'etidi dissolts en l'agarosa, es carregaren diferents quantitats de l'ADN a quantificar i una quantitat coneguda d'ADN (0,4 µg de l'ADN del fag λ digerit amb l'enzim de restricció HindIII, el patró del qual es coneix). La concentració d'ADN de la mostra problema es va estimar per comparació de la intensitat de les bandes del patró.

En altres casos, es va determinar la concentració d'ADN mesurant l'absorbància en un espectrofotòmetre. A partir de la mostra problema es va preparar 1 ml d'una solució 1/10 en aigua desionitzada estèril i es va mesurar l'absorbància a 260 nm. La concentració d'ADN es calcula sabent que 50 µg/ml d'ADN = 1 (A_{260}) i tenint en compte el factor de dilució.

D'altra banda, a partir del quocient A_{260}/A_{280} es pot estimar el grau de contaminació proteica de la solució d'ADN. Una solució d'ADN pura ha de tenir un quocient A_{260}/A_{280} entre 1,8 i 2,0 i s'aconsella una nova purificació de l'ADN si no es troba entre aquests valors.

3.4.8 PROCESSAMENT ENZIMÀTIC DE L'ADN

3.4.8.1 Digestió amb enzims de restricció

S'utilitzaren diferents enzims de restricció i els corresponents tampons majoritàriament subministrats per la casa comercial GE Healthcare (anteriorment Amersham Biosciences) o Boehringer Mannheim. Les condicions de digestió així com les concentracions adequades de tampó variaren en funció de l'enzim utilitzat i en tots els casos se seguiren les indicacions del fabricant.

Com a regla general, es va diluir l'ADN a digerir (es recomana habitualment utilitzar 0,25 µg d'ADN per a un volum final de reacció de 20 µl, però pot variar en funció de les bandes esperades) en aigua desionitzada estèril i es va mesclar amb l'enzim corresponent (generalment una unitat) i el tampó adequat. Posteriorment i com a regla general, s'incubà 2 hores a 37°C.

En les restriccions dobles, quan els dos enzims necessitaven la mateixa quantitat de tampó, s'afegiren els dos enzims alhora. En cas contrari, primer es duia a terme la digestió amb l'enzim que requeria la concentració més elevada de tampó i posteriorment

es diluïa amb aigua desionitzada estèril fins obtenir la concentració apropiada de tampó pel segon enzim.

3.4.8.2 Desfosforilació de l'ADN

La reacció de desfosforilació es va dur a terme sobre els vectors digerits amb enzims que generaven extrems compatibles a fi d'evitar la re-lligació espontània. Mitjançant la reacció de desfosforilació s'eliminen els grups fosfats 5' terminals dels extrems lliures per tractament amb fosfatasa alcalina (BAP, *Bacterial Alkaline Phosphatase*). Tant l'enzim com el tampó utilitzats foren subministrats per GE Healthcare (anteriorment Amersham Biosciences) i es va seguir el protocol descrit per Sambrook *et al.*, 1989 amb alguna petita modificació, com el fet d'allargar el temps de tractament a 1,5 hores addicionant una nova alíquota d'enzim cada 30 minuts. Un cop acabada la reacció, l'enzim s'inactivà per incubació a 85°C, durant 15 min en presència de 10 mM d'EDTA pH 8.0 i seguidament es realitzà un tractament de fenolització per purificar l'ADN (veure secció 3.4.3 *Purificació de l'ADN per extracció fenòlica*).

3.4.8.3 Reacció de lligació

Les reaccions de lligació es van dur a terme mitjançant l'enzim T4 ADN- lligasa, que catalitza la unió de dos fragments d'ADN, enllaçant els grups OH dels extrems 3' amb els 5' fosfat de nucleòtids adjacents tant en extrems roms com protuberants.

Les reaccions de lligació es van realitzar en una relació molar de 3:1 (insert: vector) tot i que aquesta proporció es va modificar convenientment. Habitualment, per a les reaccions de lligació entre extrems cohesius es van utilitzar al voltant de 100 ng d'ADN total (vector i insert). Als fragments d'ADN a unir (insert i vector) diluïts en aigua, s'hi afegí el tampó de lligació (concentrat x10) en una proporció 1/10 del volum total de la reacció (20 µl) i una unitat d'enzim T4 ADN-lligasa. Ambdós, vector i tampó van ser subministrats per la casa Promega. La mescla s'incubà a 4°C durant tota la nit o bé a 15°C durant 5 hores. En el cas de lligacions amb extrems roms, es recomanable augmentar la quantitat d'ADN i d'enzim i realitzar la incubació a 15 °C durant tota la nit.

3.4.9 TÈCNiques DE TRANSFERÈNCIA DE L'ADN

Existeixen tres tècniques de transferència horitzontal de material genètic entre bacteris (transformació, conjugació i transducció) que permeten l'intercanvi de material genètic entre dos bacteris que no mantenen una relació parental. En aquest treball es va emprar únicament la transformació.

3.4.9.1 Transformació per electroporació

L'electroporació és una tècnica de transformació que permet la introducció d'ADN nu en una cèl·lula bacteriana mitjançant l'aplicació de camps elèctrics intensos en curts intervals de temps. Aquest va ser l'únic mètode de transformació utilitzat en aquest treball ja que *S. marcescens* i *K. pneumoniae* presenten molt baixa eficiència de transformació (nº de transformants/ mg ADN) amb altres mètodes de transformació. A continuació es detallen les condicions metodològiques que es van utilitzar en aquest treball i que estan basades en el mètode descrit per Dower *et al.*, 1988.

3.4.9.1.1 Preparació de les cèl·lules

Les cèl·lules a electroporar s'han d'aclimatar des de les seves condicions de cultiu original fins a un medi de molt baixa conductivitat, ja que en cas contrari s'estableixen arcs voltaics dins la cambra de polsos elèctrics que provoquen una mortalitat cel·lular gairebé total. Això s'aconsegueix amb rentats successius en aigua bidestil·lada que permeten reduir les sals dissoltes. D'altra banda, cal assolir una elevada concentració de cèl·lules que s'obté amb una reducció successiva dels volums de rentat. El protocol que es va seguir es detalla a continuació:

- A partir d'un cultiu de la soca a electroporar crescut durant una nit en el medi LB-Lúria (veure secció 3.3.1 *Medis Líquids*), es realitza un subcultiu en el mateix medi i s'incuba a la temperatura òptima de creixement amb agitació fins arribar a una DO ($\lambda = 600$ nm) entre 0,5 i 0,8.
- Es posa a 4°C durant 15 minuts per aturar el creixement. A partir d'aquest moment tot el material (aigua bidestil·lada, tubs, cubetes d'electroporació...) s'ha de mantenir a la temperatura de 4°C aproximadament.
- Es recullen les cèl·lules per centrifugació. S'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules amb 5 ml d'aigua bidestil·lada estèril freda (4°C).
- Es repeteixen cicles successius de centrifugació i resuspensió amb volums decreixents d'aigua bidestil·lada (mínim quatre cicles més) per tal de concentrar la mostra.
- Acabats els rentats, es resuspenen les cèl·lules amb 40 µl d'aigua bidestil·lada estèril i es mantenen a 4°C.

3.4.9.1.2 Electroporació

Un cop acabats els rentats, es posà en contacte la solució d'ADN amb les cèl·lules. El volum de suspensió bacteriana va ser de 40 µl i el de la solució d'ADN, que havia de ser molt pura, d'entre 5-10 µl (aproximadament 0,1-0,4 µg d'ADN). Per a la generació dels polsos elèctrics es va utilitzar l'aparell *BTX Electro Cell Manipulator 600*, amb cubetes *BTX* de 2 mm. L'aparell s'ajustà a 2,5 kV, 25 µF de capacitància i 18 Ω de resistència. En aquestes condicions, s'obté un camp amb una intensitat propera als 12 kV/cm amb una constant de pols entre 6-8,5 mseg.

Finalitzada l'aplicació dels polsos elèctrics, les cèl·lules es recuperaren immediatament de la cubeta d'electroporació amb 1 ml de TSB o LB i es van sotmetre a un període d'expressió fenotípica a 30°C o 37°C (en funció de la soca i dels vectors electroporats) durant 1-2 hores. Passat aquest temps, les cèl·lules es van sembrar en plaques suplementades amb els antibiòtics adequats per a la selecció dels diversos transformants realitzant diferents dilucions (1, 10⁻¹, 10⁻² més un control no transformat).

3.4.10 REACCIONS EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

3.4.10.1 Amplificació de fragments d'ADN

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) és una reacció enzimàtica *in vitro* que permet l'amplificació d'un fragment d'ADN sense necessitat d'aïllar-lo o clonar-lo. Breument, la tècnica es basa en la repetició d'una sèrie de cicles en les que l'ADN es desnatura, s'hibrida amb els oligonucleòtids que serveixen de encebadors, es sintetitza el fragment d'ADN complementari a l'ADN motlle i, de nou, es desnatura per donar pas al següent cicle, de manera que l'augment és exponencial enlloc de lineal. L'enzim responsable del procés és una ADN polimerasa (Taq polimerasa) termostable aïllada de *Thermus aquaticus*.

El protocol de PCR es va dur a terme segons les indicacions generals de la bibliografia (Sambrook *et al.*, 1989) amb modificacions adaptades a cada cas particular. Habitualment, es va utilitzar l'enzim termoestable Taq polimerasa de la casa Invitrogen™ seguint les indicacions del fabricant. La composició del tampó de PCR utilitzat es mostra a la Taula 3.5.

Taula 3.5. Composició del tampó de PCR (x 10)

Components	Quantitat
Glicerol	5%
Tris HCl pH 8,9	250 mM
DMSO	5%
KCl	200 mM

Per a la reacció d'amplificació es van mesclar els components indicats en la Taula 3.6 en les quantitats assenyalades. En algun cas, per tal d'optimitzar la reacció d'amplificació es va augmentar la concentració de clorur de magnesi ($MgCl_2$) i més rarament, la concentració dels encebadors.

Taula 3.6. Composició quantitativa i qualitativa d'una reacció d'amplificació estàndard per PCR

Components	Quantitat
Tampó de PCR (x 10)	5 μ l
Tampó $MgCl_2$ (50 mM)	1,5 μ l*
Mescla de nucleòtids (2,5 mM dNTP)	5 μ l
Encebador A (30 ng/ μ l)	1 μ l
Encebador B (30 ng/ μ l)	1 μ l
ADN motlle	0,25 - 0,1 μ g
Taq polimerasa	1,25 U
Aigua bidestil·lada estèril	q.s. 50 μ l

* Les concentracions de magnesi poden variar entre 1,5 mM a 2,5 mM per tal d'optimitzar la quantitat del producte amplificat. La presència d'ions magnesi és indispensable per a l'activitat de la Taq polimerasa

Les reaccions de PCR es van dur a terme en el termociclador *GeneAmp System 2400* de Perkin-Elmer. Habitualment, es va realitzar un cicle inicial de desnaturalització a 94°C durant 3 minuts, seguit posteriorment d'uns 30 a 35 cicles en les condicions indicades en la Taula 3.7. Finalment, es va realitzar un cicle a 72°C durant 10 minuts per a completar l'amplificació del segment i assegurar la formació de les cues d'adenina en els fragments amplificats. Aquestes condicions estàndard (temperatura d'hibridació dels encebadors, temps extensió, etc.) es van modificar convenientment per tal de modificar l'especificitat de la reacció i aconseguir el producte d'amplificació desitjat.

Taula 3.7. Cicles d'amplificació per la reacció de PCR

Nº cicle	Descripció del procés	Condicions	
		Tª	Temps
1	Desnaturalització de l'ADN motlle	94°C	3 minuts
30-35 cicles	Desnaturalització de l'ADN	94°C	30 segons
	Hibridació dels encebadors	Tª hibridació ADN/encebador (*)	30 segons
	Extensió de la cadena	72°C	temps necessari per l'amplificació del fragment (1 Kb / minut)
Últim cicle	Formació de les cues d'adenina dels fragments amplificats	72°C	10 minuts

(*) La Tª hibridació (Ta) va ser calculada a partir de la temperatura de fusió dels encebadors tenint en compte que la diferència de temperatura d'hibridació dels dos encebadors no pot ser normalment superior a 5°C

Un cop acabada la reacció de PCR es van conservar les mostres a 4°C i els fragments amplificats es van comprovar per electroforesi en gels d'agarosa.

3.4.10.2 Seqüenciació de l'ADN

Per a la seqüenciació de fragments d'ADN es va utilitzar el protocol descrit en el sistema *ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer Corporation), basat en el mètode dels dideoxinucleòtids terminals de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). El kit conté dideoxinucleòtids marcats amb fluorocroms, de manera que cada fragment interromput per la incorporació d'un dideoxinucleòtid tindrà una fluorescència associada. Així, separant els fragments generats en la reacció a través d'una electroforesi en gels de poliacrilamida i determinant la fluorescència emesa, podem conèixer la seqüència de nucleòtids des del encebador utilitzat fins a uns 300 o 400 pb.

Les quantitats de cada component que es van utilitzar en les reaccions de seqüenciació foren les recomanades pel fabricant del kit i estan indicades en la Taula 3.8.

Taula 3.8. Composició qualitativa i quantitativa d'una reacció de seqüenciació

Reactiu	Quantitat
Mescla <i>Terminator Ready Reaction</i>	4 µl
ADN motlle	200-500 ng
Encebador	3,2 pmols
Aigua desionitzada	q.s 10 µl

La reacció de seqüenciació es va dur a terme en el termociclador *GeneAmp System 2400* de Perkin Elmer. Es va realitzar un cicle inicial de desnaturalització de l'ADN seguit de 25 cicles segons la pauta descrita a la Taula 3.9.

Taula 3.9. Condicions de temps i temperatura emprades en les reaccions de seqüenciació

Nº cicle	Condicions	
	T ^a	Temps
1	96°C	4 minuts
25 cicles	96°C	30 segons
	T ^a hibridació ADN/encebador (*)	15 segons
	60°C	4 minuts
Últim pas	4°C	Mantenir fins precipitar

(*) La T^a hibridació (Ta) va ser calculada a partir de la temperatura de fusió dels encebadors (veure secció 3.4.10.3 *Encebadors usats en aquest treball*)

Posteriorment, la reacció de seqüenciació es va precipitar amb etanol (veure secció 3.4.4 *Precipitació de l'ADN*) i seguint les recomanacions del fabricant del kit (1µl acetat sòdic 3M (pH 4,6), 25µl etanol 95%). L'obtenció de la seqüència es va dur a terme pels Serveis Científic – Tècnics de la Universitat de Barcelona en un seqüenciador *ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer*. El cromatograma es va visualitzar a través del programa Chromas (versió 1.4.3).

3.4.10.3 Encebadors usats en aquest treball

Els oligonucleòtids encebadors específics utilitzats tant en les reaccions d'amplificació de fragments d'ADN per PCR com en les reaccions de seqüenciació es van dissenyar en el nostre laboratori amb el suport del programa informàtic *Amplify* (*University of Wisconsin, 445 Henry Mall, Madison 53706*) i foren sintetitzats per GE Healthcare (anteriorment Amersham Biosciences) segons la seqüència nucleotídica indicada per nosaltres.

En la majoria dels casos, quan la mida de l'encebador era igual o inferior a 20 pb, la temperatura de fusió (T_m) dels encebadors es va calcular utilitzant la fórmula següent:

$$T_m = 2 (A+T) + 4 (G+C)$$

a on A, T, G, C, representen el nombre de residus de cada base nitrogenada que conté l'encebador sintetitzat. Quan l'encebador era llarg (més de 20 pb), particularment en els experiments de mutagènesi (veure secció 3.4.12 *Tècniques de mutagènesi*), la temperatura de fusió (T_m) es va calcular a partir de la següent fórmula:

$$T_m = 63,9 + 0,41 (\% G+C) - 650 / n$$

a on:

T_m : temperatura de fusió
 % G+C: percentatge de citosina i guanina que té l'oligonucleòtid encebador
 n: nombre de bases nucleotídiques de l'encebador.

La temperatura d'hibridació o *annealing* que s'utilitza a les reaccions d'amplificació depèn de la temperatura de fusió dels encebadors i habitualment, sol ser d'entre 1 i 5°C inferior a la temperatura de fusió dels encebadors. Els dos encebadors que s'utilitzen en la reacció de PCR han de tenir una temperatura d'hibridació similar, sinó la reacció d'amplificació podria no funcionar. Habitualment, sol escollir-se una temperatura d'hibridació intermèdia de la dels dos encebadors.

En la Taula 3.10 següent es detallen tots els encebadors emprats en aquest treball, amb la temperatura d'hibridació a la que foren utilitzats i la seva localització.

Taula 3.10. Encebadors usats en aquest treball

Nom Encebador	5' Composició 3'	T ^a hibr. usada	Localització
Encebadors utilitzats per a la construcció de mutants en el cluster <i>waa</i> de <i>S. marcescens</i>			
ORF4.A	5'-cgcggatccaaaagcctcgctacgataa-3'	57°C	<i>waaC</i>
ORF4.B	5'-cccatccactaaacttaaacaccaggttgataatgtgcag-3'	57°C	<i>orf4</i>
ORF4.C	5'-tgtttaagtttagtggatgggttcaagctgagttgacga-3'	57°C	<i>orf4</i>
ORF4.D	5'-cgcggatcctccacgcgaggaatatcca-3'	57°C	<i>waaL</i>
ORF7.A	5'-cgcggatcccgttggcggttcaacgaat-3'	58°C	Regió intergènica entre <i>orf7</i> i <i>orf8</i>
ORF7.B	5'-cccatccactaaacttaaacagaccagtcgcaacctta-3'	58°C	<i>orf7</i>
ORF7.C	5'-tgtttaagtttagtggatgggttcagccgcagcgattat-3'	58°C	<i>orf7</i>
ORF7.D	5'-cgcggatccgcaggggaacgttcgaaga-3'	58°C	<i>orf6</i>
waaQ.A	5'-cgcggatcccacgcacattcatagttgg-3'	61°C	Regió intergènica entre <i>orf7</i> i <i>orf8</i>
waaQ.B	5'-cccatccactaaacttaaacacagaatcgctgtacggatg-3'	61°C	<i>orf8</i>
waaQ.C	5'-tgtttaagtttagtggatgggttcgacctcattctacagac-3'	63°C	<i>orf8</i>
waaQ.D	5'-cgcggatccgatggcggttatagatcaccgt-3'	63°C	<i>orf9</i>
ORF9-10.A	5'-cgcggatccaaatgctggagcgaagaga-3'	55°C	<i>orf8</i>
ORF9-10.B	5'-cccatccactaaacttaaacacgcaaaagaaatgcttc-3'	55°C	<i>orf9</i>
ORF9-10.C	5'-tgtttaagtttagtggatgggaatccgccagataaatca-3'	55°C	<i>orf10</i>
ORF9-10.D	5'-cgcggatccttgggcacgaaagatatca-3'	55°C	<i>orf11</i>
waaE.A	5'-cgcggatcccaccgcaagctgctgga-3'	52°C	<i>waaA</i>
waaE.B	5'-cccatccactaaacttaaacagctttgctgctcattc-3'	52°C	<i>orf13</i>
waaE.C	5'-tgtttaagtttagtggatgggttggtcaacgcgcaatatac-3'	54°C	<i>orf13</i>
waaE.D	5'-cgcggatcctcctcaccagtgatgagga-3'	54°C	<i>coaD</i>

Els nucleòtids subratllats amb una sola ratlla corresponen a la cua de 21 nucleòtids complementaris que s'afegí als encebadors B i C en els experiments de mutagènesi (veure secció 3.4.12 *Tècniques de mutagènesi*). Amb doble subratllat s'indiquen les dianes BamHI

Taula 3.10 (cont.) Encebadors usats en aquest treball

Nom Encebador	5' – Composició – 3'	T ^a hibr. usada	Localització
Encebadors utilitzats per a la comprovació de la deleció dels mutants <i>waa</i> de <i>S. marcescens</i> (amplificació i o seqüenciació)			
RSC.3	5'-aaacatggccccggactgcaaa-3'	61°C	<i>waaC</i>
COMGT	5'-accgtggcgcgatcgaagta-3'	61°C	<i>waaL</i>
COMF1	5'-ggacgccttccagacaaaa-3'	59°C	Regió intergènica entre <i>orf7</i> i <i>orf8</i>
COMF2	5'-gcctacgacttttctctgt-3'	59°C	<i>orf6</i>
SB9	5'-gcgaactcgacgtaagcc-3'	57°C	Regió intergènica entre <i>orf7</i> i <i>orf8</i>
FUN12	5'-tgcacgcccataaagtga-3'	57°C	<i>orf9</i>
SB11	5'-ggattggcagacctgtga-3'	56°C	<i>orf8</i>
VAG2	5'-attgtgttgatttatctcg-3'	56°C	<i>orf10</i>
NIH3	5'-cacaatgaccccgacaggtca-3'	64°C	<i>waaA</i>
NIH4	5'-atgaacgaccactcttcggaag-3'	64°C	<i>coaD</i>
Encebadors utilitzats per a les complementacions i amplificacions de gens <i>waa</i> de <i>S. marcescens</i>			
Amplificació de <i>orf8</i> (Fragment de 2,27Kb)			
SB9	5'-gcgaactcgacgtaagcc -3'	57°C	Regió intergènica entre <i>orf7</i> i <i>orf8</i>
FUN12	5'-tgcacgcccataaagtga -3'		<i>orf9</i>
Amplificació de <i>orf9</i> (Fragment de 1,74Kb)			
CNN1	5'-tcaaatgctggagcgaagag -3'	56°C	<i>orf8</i>
CNN2	5'-cctgataatcaatgcctgac -3'		<i>orf10</i>
Amplificació de <i>orf10</i> (Fragment de 1,32Kb)			
CNN3	5'-cagctcatttccctetataa-3'	56°C	<i>orf9</i>
CNN4	5'-tgttctttggcgataccgata -3'		<i>orf11</i>
Amplificació de <i>orf9-10</i> (Fragment de 3,06Kb)			
CNN1	5'-tcaaatgctggagcgaagag -3'	58°C	<i>orf8</i>
CNN4	5'-tgttctttggcgataccgata -3'		<i>orf11</i>
Amplificació de <i>orf13</i> (Fragment de 3,06Kb)			
S4M2	5'-acctcaactttaaagaca -3'	48°C	<i>waaA</i>
F800	5'- aaagtcagacaccgcccg-3'		<i>coaD</i>

3.4.11 SOFTWARE UTILITZAT PER A L'ANÀLISI DE LES SEQÜÈNCIES

Per a l'anàlisi i estudi de les diferents seqüències d'ADN i de proteïnes s'utilitzaren diferents programes informàtics. Per a la localització de les dianes de restricció, de les pautes de lectura oberta i traducció de les seqüències d'ADN a proteïna s'utilitzà el programa Sequaid 3.81 (Rhoads i Roufa, Molecular Genetics Laboratory, Center for Basic Cancer Research, Kansas State University, 1991). Alhora aquest programa permet establir el perfil d'hidrofobicitat d'una proteïna mitjançant el mètode de Kyte i Dolittle, 1982.

La cerca de seqüències d'ADN i proteïnes homòlogues en les bases de dades de GenBank i EMBL es va realitzar mitjançant els programes BLAST (Altschul *et al.*, 1990, 1997) i FASTA (Pearson i Lipman, 1988) del servei en xarxa del Centre Nacional d'Informació Biotecnològica (NCBI) i de l'Institut Europeu de Bioinformàtica (EBI), respectivament. Les seqüències d'aminoàcids també es compararen enfront a les bases de dades Pirprot i Swiss-Prot a través del programa FASTA.

Els alineaments múltiples entre seqüències que presenten major similitud amb la deduïda per a la nostra seqüència es van dur a terme mitjançant el programa *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994). L'agrupació de les proteïnes en famílies segons els seus dominis conservats es va dur a terme gràcies a la base de dades de famílies proteiques pFAM, de l'Institut Sanger i a la base de dades de glicosiltransferases CAZY (*Carbohydrate-Active EnZYme*) (Coutinho *et al.*, 1999).

3.4.12 TÈCNIQUES DE MUTAGÈNESI

Per a generar els diferents mutants del nucli del LPS de *Serratia marcescens* N28b (N28b Δ orf4, N28b Δ orf7, N28b Δ waaQ, N28b Δ orf9-orf10 i N28b Δ waaE) s'utilitzà un sistema de mutagènesi descrit per Link *et al.*, 1997 que permet crear delecions cromosòmiques dirigides mantenint la pauta de lectura dins d'una mateixa agrupació gènica. Aquest sistema es basa en la síntesi *in vitro* d'una còpia delecionada del gen a mutar que respecti la seva pauta de lectura mitjançant PCRs entrecruades i posteriorment aquesta còpia delecionada és introduïda en el cromosoma per doble recombinació mitjançant el plasmidi pKO3 (veure Figura 3.1). Aquest vector conté un origen de replicació *RepA* sensible a la temperatura, un marcador de resistència al

cloramfenicol (gen *cat*) i un marcador de contraselecció, el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, que codifica per un enzim que catalitza la hidròlisi dels residus de sacarosa. L'avantatge d'aquesta tècnica és que permet minimitzar el possibles efectes polars que la mutació pot provocar sobre l'expressió dels gens distals dins d'un mateix operó.

En el nostre cas, donat que *S. marcescens* era resistent al cloramfenicol, es va introduir un casset de kanamicina en el plasmidi pKO3, generant-ne el plasmidi pKO3Km, que és el que s'utilitzà per als experiments de mutagènesi. A la secció 4.2.1.1 *Construcció del plasmidi pKO3Km* s'explica com es construí aquest vector pKO3Km.

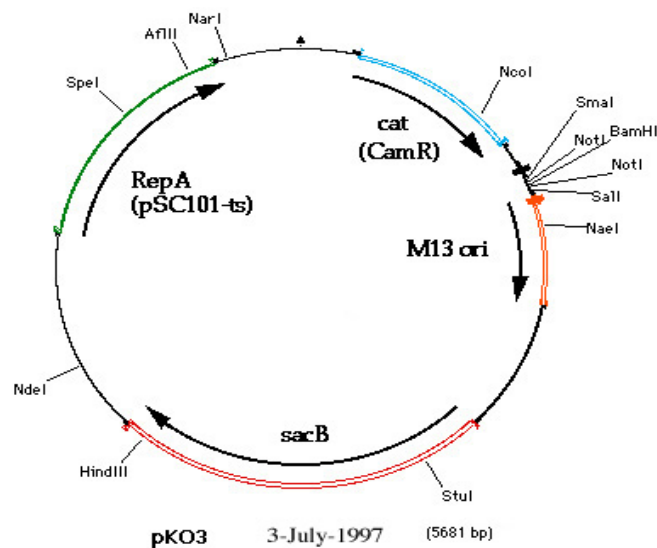


Figura 3.1. Representació esquemàtica del plasmidi pKO3

De manera general, la construcció de la còpia delecionada del gen per PCR es va realitzar en dos passos diferents. En primer lloc, es van realitzar dos PCRs asimètriques per generar fragments a l'esquerra i a la dreta del gen a deleccionar. Per això es va emprar una primera parella d'encebadors, anomenats genèricament A i B, que amplificaven una regió d'uns 500–700 parells de bases (pb) que comprenia la regió immediatament anterior al gen i els primers 5–15 codons d'aquest.

D'altra banda, s'emprà una segona parella d'encebadors, anomenats genèricament C i D, que també amplificaven una regió d'uns 500–700 pb, que comprenia la regió immediatament posterior al gen i els últims 15–24 codons d'aquest. Ambdós encebadors B i C van ser dissenyats amb una cua de 21 nucleòtids complementaris, de

manera que quan els dos productes de PCR fossin mesclats, aquestes regions complementàries poguessin hibridar i posteriorment es pogués així amplificar un sol fragment que contenia la deleció. D'altra banda, els encebadors A i D van ser dissenyats amb una cua que contenia la diana *Bam*HI per facilitar el subclonatge en el plasmidi pKO3Km. El procés emprat per a la construcció de deleccions en pauta de lectura s'esquematitza a la Figura 3.2.

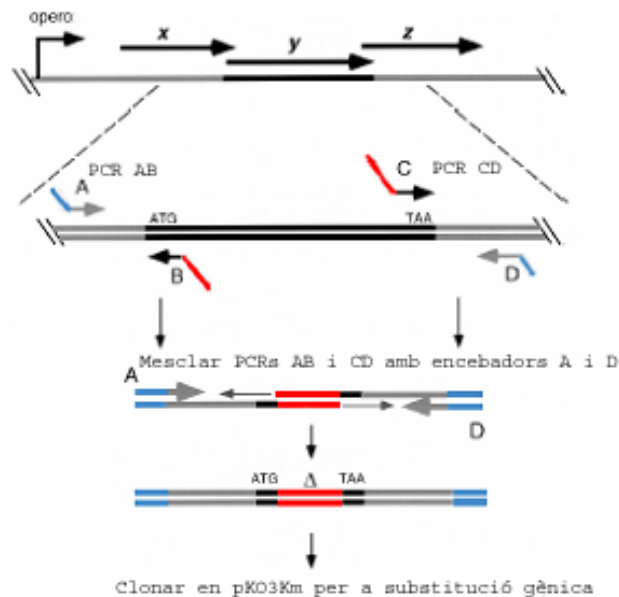


Figura 3.2. Esquema del procés de construcció de deleccions en pauta de lectura (adaptat de Link *et al.*, 1997)

La línia superior representa una regió del cromosoma on els gens *x*, *y* i *z* formen un operó policistrònic. La segona línia correspon a una visió ampliada del gen *y* on es mostren les dos PCRs utilitzades per a generar els fragments (AB i CD), que un cop fusionats formaran una deleció en pauta de lectura del gen *y*. Els encebadors B i C presenten 21 nucleòtids complementaris (línies vermelles) de manera que quan els productes de les PCRs siguin mesclats, les regions complementàries hibridaran i en la seva zona 3' corresponent a aquests 21 nucleòtids actuaran com encebadors per a una extensió 3' de la cadena complementària. En la tercera línia, la molècula fusionada és amplificada per PCR mitjançant els encebadors A i D. Al mateix temps, aquests dos encebadors es dissenyen amb la diana de restricció *Bam*HI en el seu extrem 5' (línies blaves) per tal que el producte final pugui ser digerit i clonat en pKO3Km

Per a cada construcció es varen realitzar les dues PCRs asimètriques amb els parells d'encebadors A-B i C-D. Les condicions emprades per a la PCR van ser les habituals, descrites anteriorment en la secció 3.4.10.1 *Amplificació de fragments d'ADN*, excepte que en les dues PCRs (AB i CD), es va utilitzar per als encebadors una relació molar de 10:1 (encebador extern: intern) (en la majoria de casos 30 pmol per als encebadors externs A i D i 3 pmol per als encebadors interns B i C). Els productes amplificats AB i CD (habitualment 1µl de cadascun d'ells) foren utilitzats com a motlle per a una última PCR amb els encebadors A i D. En aquesta PCR es van realitzar 5 cicles previs

d'amplificació sense els encebadors A i D, segons el que es descriu a continuació, per a permetre la hibridació de les cues de 21 nucleòtids:

94°C durant 30''

54°C durant 30''

72°C durant 30''

Passats aquests 5 cicles, s'afegiren els encebadors A i D (30 pmols de cadascun d'ells) i es realitzaren 35 cicles d'amplificació, usant com a temperatura d'hibridació la adequada per als encebadors utilitzats i el temps d'extensió necessari en funció de la mida dels fragments a amplificar.

D'aquesta manera es generà un fragment de PCR que contenia una regió anterior al gen a mutar, varis triplets inicials del gen, una regió de 21 parells de bases que respectava la pauta de lectura, varis triplets de la regió final del gen i una regió posterior al gen a mutar (veure Figura 3.2). Les característiques específiques (encebadors utilitzats, fragments amplificats, localització de les delecions) de cada una de les construccions de les delecions creades per a la generació dels diferents mutants de l'agrupació gènica *waa* de *S. marcescens* N28b s'especifiquen a la secció 4.2.1.3 *Característiques genètiques dels mutants*.

Els productes de fusió que contenien els gens delecionats es varen purificar, digerir amb BamHI (cal remarcar que els encebadors externs foren dissenyats afegint una "cua" amb aquesta diana) i finalment es varen lligar al vector pKO3Km, prèviament digerit amb BamHI i desfosforilat per tractament amb fosfatasa alcalina. La lligació es va electroporar a *E. coli* DH5α i es va plaquejar a 30°C a plaques que contenien un medi LB especial per als experiments de mutagènesi (veure composició a la secció 3.3 *Medis de cultiu, antibiòtics i altres additius*) complementades amb kanamicina 50µg/ml per obtenir els plasmidis amb les construccions dels diferents gens delecionats (pKO3KmΔorf4, pKO3KmΔorf7, pKO3KmΔwaaQ, pKO3KmΔorf9-10 i pKO3KmΔwaaE). Els clons recombinants que contenien el gen delecionat es van seleccionar per digestió amb BamHI i/ o PCR. En alguns casos, addicionalment, es va seqüenciar la banda obtinguda per PCR per comprovar que la construcció de la deleción en el plasmidi pKO3Km fos correcta.

Un cop clonada la construcció en pKO3Km, es va electroporar sobre *S. marcescens* N28b per tal d'obtenir els diferents mutants (veure Figura 3.3). Seguint el protocol proposat per Link *et al.*, 1997, les cèl·lules transformades es van fer créixer en el medi agar LB-Mutagènesi complementat amb kanamicina 50 µg/ml a 30°C i a 42°C. El plasmidi pKO3Km té un origen de replicació *repA* termosensible que no permet la replicació del plasmidi a 42°C. D'aquesta manera, s'esperava que les colònies que creixien a 42°C havien d'haver integrat el plasmidi en el cromosoma per recombinació homòloga. En alguns casos, particularment en els que l'obtenció del mutant comportà més dificultats, es va fer una PCR amb primers externs a la construcció per seleccionar aquelles colònies que havien integrat correctament el plasmidi. D'aquesta manera, si el plasmidi s'integrava en el cromosoma s'esperava que no s'amplifiqués cap banda o bé l'aparició de dues bandes, una corresponent al gen intacte i l'altra al gen delecionat.

Seguidament, aquestes colònies que havien crescut a la placa de 42°C es van picar en 500 µl de LB-Mutagènesi, es feren dilucions seriades i es varen plaquejar a 30°C en paral·lel en plaques de LB-Mutagènesi agar suplementades amb kanamicina 50µg/ml i en plaques suplementades amb sacarosa 10% (Blomfield *et al.*, 1991). El plasmidi pKO3Km conté el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, que codifica per un enzim que catalitza la hidròlisi de la sacarosa, de manera que quan s'expressa en un bacteri gramnegatiu que creix en un medi que conté sacarosa, aquest gen *sacB* és letal (Gay *et al.*, 1985). Per a seleccionar aquelles colònies que havien eliminat el plasmidi integrat mitjançant una segona recombinació homòloga, les colònies aïllades obtingudes en sacarosa 10% es van estriar per duplicat en plaques de LB-Mutagènesi agar suplementades amb kanamicina 50 µg/ml i en plaques suplementades amb sacarosa 10% i es van buscar les colònies resistents a la sacarosa i al mateix temps sensibles a la kanamicina. Aquesta segona recombinació homòloga podia deixar en el cromosoma bacterià una còpia del gen salvatge o bé la còpia delecionada. La selecció dels mutants delecionats es va realitzar per PCR, amb encebadors externs a la construcció. A més, el fragment de PCR obtingut es va seqüenciar per comprovar que la delecio fos correcta i que es mantingués la pauta de lectura. En alguns casos, la selecció dels candidats a mutants es va fer a través del perfil electroforètic obtingut en gels de SDS-PAGE en comparació amb el del mutant.

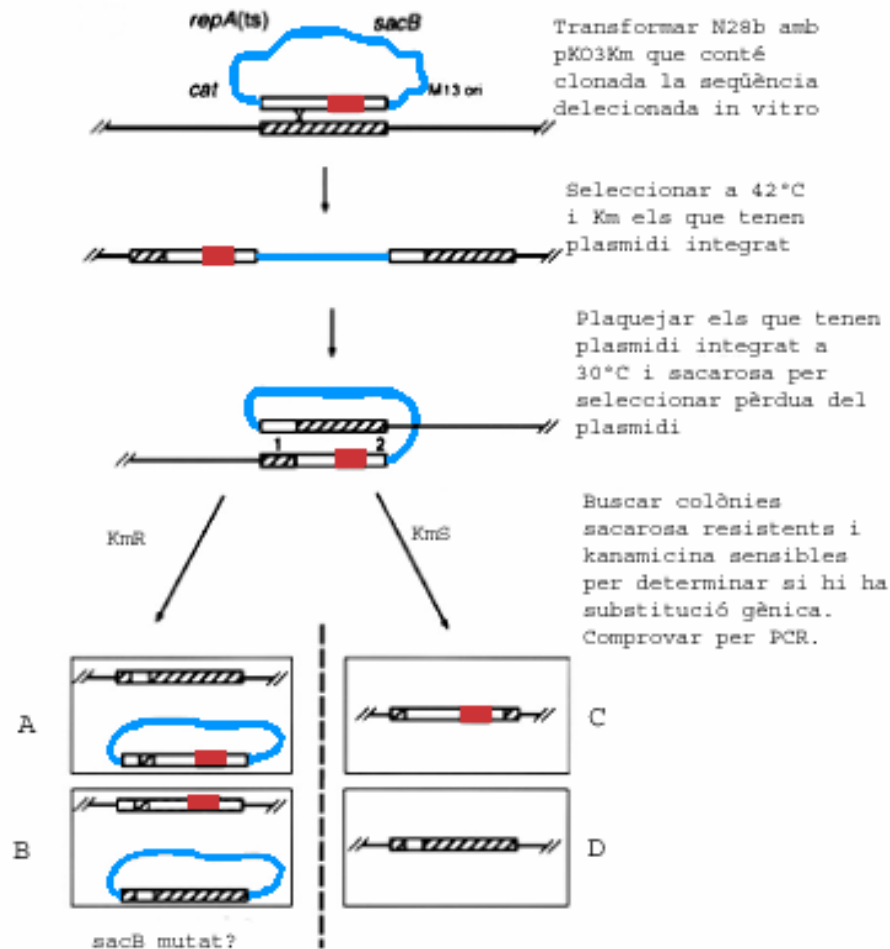


Figura 3.3. Esquema del protocol usat per a la substitució de seqüències salvatges en el cromosoma per seqüències modificades *in vitro* (adaptat de Link *et al.*, 1997)

En blau es representa el vector pKO3Km, en vermell la seqüència delecionada *in vitro*, la línia negra recta representa el cromosoma, les caixes representen les seqüències homòlogues localitzades o bé al cromosoma (a ratlles) o bé en el vector (caixa blanca). El vector pKO3Km que conté clonada la seqüència delecionada *in vitro* és transformat a la soca salvatge i plaquejat a 42°C (temperatura no permissiva per al plasmidi). La integració del plasmidi en el cromosoma permet la replicació de les seqüències plasmídiques a partir de l'origen de replicació cromosòmic. Quan les colònies es fan créixer a 30°C, el plasmidi es pot escindir del cromosoma pels punts de creuament 1 o 2, i donar lloc a les situacions A i D (en el cas que ho faci pel punt de creuament 1) o bé les situacions B i C (en el cas que ho faci pel punt de creuament 2). D'aquestes candidates es fan PCRs per saber si s'ha produït la substitució gènica, és a dir, si s'ha canviat la seqüència salvatge per la que conté la delecio (situació C) o bé s'ha mantingut la salvatge (situació D). L'expressió "sacB mutat?" fa referència a la pèrdua de funció del gen *sacB* per algun mecanisme desconegut, que es podria donar en algun cas.

3.5 ESTUDI DEL LIPOPOLISACÀRID

3.5.1 OBTENCIÓ DEL LIPOPOLISACÀRID (LPS)

Per a l'aïllament i purificació del lipopolisacàrid es va partir de cultius bacterians líquids que foren centrifugats per tal d'obtenir els sediments cel·lulars. Es varen seguir dos mètodes extractius en funció del tipus de LPS a extreure:

- El **mètode del fenol-aigua**, per als LPS clàssicament anomenats de tipus S (de l'anglès *smooth*), que es caracteritzen per la presència de l'antigen O (veure descripció del mètode a la secció 3.5.1.2 *Extracció de LPS pel mètode de fenol - aigua*),
- El **mètode de PCP** (*Phenol-Chloroform-Petroleum ether*), per als LPS clàssicament anomenats R (de l'anglès *rough*) en els quals l'antigen O és absent (veure descripció del mètode a la secció 3.5.1.3 *Extracció de LPS per PCP*).

Abans però de procedir a l'obtenció del LPS per qualsevol d'aquests mètodes fou necessari deshidratar les cèl·lules obtingudes a partir del cultiu bacterià líquid de la soca a estudiar seguint el procediment descrit a la secció 3.5.1.1 *Deshidratació de les cèl·lules*.

En els casos en què es requeria preparacions de LPS més simplifiades per tal de poder obtenir varies mostres de LPS de diverses soques bacterianes d'un sol cop de forma ràpida i senzilla i poder analitzar d'aquesta manera moltes mostres per electroforesis, les mostres de LPS es van obtenir per digestió de les cèl·lules bacterianes amb proteïnasa K, mitjançant el procediment descrit a la secció 3.5.2.1 *Preparació de les mostres* basat en el mètode proposat per Hitchcock i Brown, 1983.

3.5.1.1 Deshidratació de les cèl·lules

La deshidratació de les cèl·lules es va a dur a terme després del creixement cel·lular en medi TSB. Normalment, com que els rendiments d'obtenció de lipopolisacàrid són molt baixos (1-5% del pes sec de les cèl·lules), es van dur a terme creixements de 30 litres en TSB (inòcul de 300 ml) en un bioreactor a 37°C durant 15 hores, en agitació constant de 200 r.p.m, pH inicial 7-7,5 i una oxigenació de 20 l/minut. En certes ocasions, es van fer cultius més petits de 5 litres, però el volum de cèl·lules obtingut limitava molt els estudis posteriors.

Abans de deshidratar les cèl·lules, es realitzaren tres rentats amb aigua bidestil·lada freda per eliminar les restes dels medis de cultiu, centrifugant a baixa velocitat per recollir el sediment cel·lular. El primer pas de deshidratació es va dur a terme resuspenent el sediment cel·lular amb una mescla de cloroform i metanol al 50% i centrifugant a baixa velocitat (8000 x g) per recuperar el sediment cel·lular. Aquests rentats es repetiren tres cops, homogeneïtzant en cada pas la mescla amb un homogeneïtzador. Posteriorment, les cèl·lules es van rentar amb etanol absolut durant tota la nit (16-18h). A continuació, es va centrifugar per a recuperar el sediment cel·lular i es van fer dos rentats més amb acetona, homogeneïtzant bé i centrifugant a baixa velocitat per recuperar el sediment. Finalment, el sediment cel·lular es va resuspendre en dietilèter i es va estendre sobre un recipient de vidre de base ample per a permetre l'evaporació de l'èter i obtenir així les cèl·lules deshidratades.

Partint d'un cultiu inicial de 30 litres, amb el procediment descrit, es varen obtenir entre 30 i 40 grams de cèl·lules deshidratades, depenent de la soca bacteriana. Un cop les cèl·lules estan deshidratades es poden guardar o bé processar per algun dels dos mètodes d'extracció del LPS que es descriuen a continuació.

3.5.1.2 Extracció de LPS pel mètode de fenol - aigua

Aquest mètode, desenvolupat per Westphal i Jann, 1965, és el procediment clàssic per l'aïllament de lipopolisacàrids de tipus S i es basa en l'extracció del lipopolisacàrid usant fenol i aigua en calent. En aquestes condicions, el LPS s'extrau en la fase aquosa, i això està afavorit per la presència d'antigen O, que en ser de naturalesa polisacàridica permet que el LPS sigui soluble en aigua. A continuació es descriu el protocol que es va seguir:

- Les cèl·lules deshidratades es van mesclar amb una solució d'aigua bidestil·lada i fenol al 90% i es van homogeneïtzar manualment amb una espàtula. Habitualment, per cada 20 g de cèl·lules deshidratades s'utilitzà un volum de 150 ml d'aigua bidestil·lada i 100 ml de fenol al 90% i s'escalà el procés en funció de la quantitat inicial de cèl·lules deshidratades.
- La mescla s'incubà en un bany a 68°C durant 20 minuts agitant amb una espàtula cada 5 minuts.
- Es deixà refredar l'emulsió en gel durant 5 minuts i posteriorment es centrifugà a 4.000 r.p.m. durant 30 minuts a 4°C. Es formaren dues fases: una fase superior aquosa (que contenia el LPS) i una fase inferior fenòlica. S'observà una interfase on es trobava un residu insoluble, que contenia mureïna.
- Es recollí la fase aquosa amb una pipeta Pasteur i es guardà per al seu posterior processament. La fase fenòlica i qualsevol residu insoluble es van extraure de nou una segona i tercera vegada amb aigua, amb el mateix volum que anteriorment s'havia utilitzat de fenol, segons el procediment descrit per a la primera extracció.
- Es van ajuntar les fases aquoses de les tres extraccions i es dialitzaren enfront d'aigua bidestil·lada durant 48 - 72 hores a 4°C per a eliminar les restes de fenol que poguessin restar a la fase aquosa.
- Posteriorment es liofilitzà la fase aquosa.

- Amb el residu liofilitzat es preparà una suspensió aquosa de 50 mg/ml en aigua bidestil·lada i es realitzaren tres passos d'ultracentrifugació a 45.000 r.p.m.(equivalent a $100000 \times g$) a 4°C durant 4 hores cadascun. El sediment, d'un aspecte transparent i gelatinós, contenia el LPS. Cal precisar que l'objectiu d'aquests tres passos d'ultracentrifugació fou obtenir un LPS d'elevada puresa, lliure d'impureses tals com àcids nucleics i proteïnes.
- El sediment obtingut després dels passos d'ultracentrifugació, que contenia el LPS, es resuspengué amb el mínim volum d'aigua bidestil·lada i es va liofilitzar conjuntament amb els diferents sobrenedants. Finalment, es comprovà cada fracció per electroforesi SDS-PAGE (veure secció 3.5.2 *Anàlisi del LPS per electroforesi en gels de poliacrilamida*).

Els rendiments que es va obtenir usant aquest mètode foren del voltant del 2-3% del pes de les cèl·lules deshidratades.

3.5.1.3 Extracció de LPS pel mètode PCP

Aquest mètode PCP (*phenol-chloroform-light petroleum*) fou posat a punt per Galanos *et al.*, 1969 per tal d'extraure els lipopolisacàrids de tipus R, ja que el mètode clàssic d'extracció amb fenol i aigua per aquestes formes R donava rendiments molt baixos. Els LPS de tipus R, en estar mancats d'AgO, tenen una proporció més elevada de lípid A, la qual cosa els hi confereix un caràcter més hidrofòbic que els LPS de tipus S i poden romandre en la fase fenòlica en l'extracció pel mètode clàssic. El reactiu PCP, en estar compost d'una mescla de fenol, cloroform i èter de petroli, és més idoni per extraure els LPS- R que són més lipòfils.

En aquest mètode, després de la deshidratació de les cèl·lules, es duu a terme el tractament amb el reactiu PCP i posterior precipitació del LPS. A diferència del mètode anterior, el mètode d'extracció per PCP permet extraure el LPS sense necessitat dels passos de purificació per ultracentrifugació. No obstant, s'ha comprovat que ambdós mètodes d'extracció permeten obtenir preparacions de LPS suficientment pures pels anàlisis químics posteriors o per l'anàlisi per electroforesi (SDS-PAGE) i no es fa necessari cap pas de purificació addicional.

A continuació es descriu el protocol utilitzat per a l'extracció segons aquest mètode:

- En primer lloc, es preparà el reactiu de PCP en quantitat suficient per a tota l'extracció, afegint, amb agitació constant, els següents reactius en l'ordre i la proporció següent:
 - Fenol al 90%: 2 volums
 - Èter de petroli (40-60): 8 volums
 - Cloroform: 5 volums
- En cas que el reactiu de PCP no quedés completament transparent, s'hi afegí fenol sòlid fins a la dissolució total.
- A les cèl·lules deshidratades s'hi afegí el reactiu de PCP (aproximadament 300-400 ml per 50 g de cèl·lules deshidratades), s'homogeneitzà la suspensió amb un homogeneitzador a màxima velocitat durant 30 segons i s'agità 1 hora en un agitador magnètic.

- Es centrifugà a 4.000 r.p.m. durant 15 minuts. Es guardà el sobrenedant.
- Per augmentar el rendiment, es tornà a repetir l'extracció amb PCP. Al sediment, que tenia un aspecte gomós, se li afegí de nou el reactiu de PCP i s'homogeneitzà com en el pas anterior. En alguns casos, quan el rendiment al final del procés fou baix, es repetí una tercera extracció amb PCP.
- Els sobrenedants obtinguts es combinaren i es filtraren. A continuació, s'evaporaren al rotavapor per tal d'eliminar les restes de cloroform (s'evaporaren fins que no s'observà la presència de condensació en el matrau). En aquest pas, és important assegurar-se que el cloroform ha estat totalment evaporat perquè podria interferir en la precipitació del LPS.
- El següent pas consisteix a precipitar el LPS. Per a això, es transferiren els sobrenedants en tubs de vidre de 30 ml (tubs tipus Corex) i s'hi afegí aigua bidestil·lada gota a gota, fins que s'observà la formació d'un precipitat blanc que era el LPS. Es pot deixar una estona en repòs per observar millor la formació del precipitat. La precipitació és un pas crític: és important no afegir un excés d'aigua ja que sinó es formen dues fases (aigua i fenol) i el LPS després de la centrifugació es queda en la superfície enlloc de dipositar-se en el fons del tub.
- A continuació, es centrifugà a 3.000 r.p.m. durant 10 minuts i s'eliminà el sobrenedant.
- El precipitat, que contenia el LPS, es rentà amb fenol al 80% tres vegades. En cada rentat, s'homogeneitzà amb una espàtula i es centrifugà a 3.000 r.p.m. durant 10 minuts.
- Seguidament, el precipitat es rentà tres cops amb acetona seguint el mateix procediment.
- Després de l'últim rentat amb acetona, el precipitat es va resuspendre amb el mínim volum d'acetona i es va transferir a un tub prèviament tarat, deixant evaporar l'acetona en un bany a 37°C o bé sota la campana d'extracció durant tota la nit, fins a obtenir un residu sec.

Mitjançant aquest mètode es van obtenir rendiments del 2-5% de pes sec. En funció de la soca bacteriana, fou necessari repetir l'extracció amb PCP per tenir millors rendiments.

3.5.2 ANÀLISI DEL LPS PER ELECTROFORESI EN GELS DE POLIACRILAMIDA

L'estudi del perfil electroforètic dels lipopolisacàrids es va realitzar en gels de poliacrilamida amb dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE) amb una concentració de poliacrilamida del 12-15% en el gel de resolució, seguint el mètode descrit per Laemmli, 1970 i modificat posteriorment per Ames *et al.*, 1974. Sovint, per obtenir major resolució de les fraccions de més baix pes molecular del LPS s'utilitzaren gels de Tricina-SDS-PAGE, segons el mètode descrit per Pradel i Schnaitman, 1991, en els que es va utilitzar un percentatge d'acrilamida del 4.5% en el gel de compactació i del 15% en el gel de resolució. En ambdós casos, els gels es van visualitzar per tinció amb nitrat de plata en les condicions descrites per Tsai i Frasch, 1982. La preparació de les mostres de LPS és la mateixa pels dos tipus de gels descrits, essent la única diferència la composició del tampó de mostra utilitzat.

A continuació es descriu la preparació de les mostres per cadascun dels gels així com el mètode utilitzat per la tinció.

3.5.2.1 Preparació de les mostres

Per a l'anàlisi electroforètic de mostres de LPS pures extretes per un dels dos mètodes anteriorment descrits (el mètode de fenol i aigua o bé el de PCP), es va preparar una solució de 1 mg/ml del LPS extret en aigua bidestil·lada. D'aquesta solució s'agafaren alíquotes de 10 µl (equivalents a 10 µg de LPS) i s'hi afegí 20 µl del tampó de mostres corresponent, la composició dels quals està descrita a la Taula 3.11 i Taula 3.12. Seguidament, es portaren les mostres a ebullició (100°C) durant 5 minuts i es carregaren en el gel.

D'altra banda, tal i com s'ha mencionat anteriorment, en altres casos en què es requeria preparacions de LPS molt més senzilles i ràpides amb la finalitat únicament d'analitzar els perfils electroforètics de moltes mostres d'un sol cop es va utilitzar un mètode basat en el descrit per Hitchcock i Brown, 1983. Segons aquests autors, els perfils electroforètics dels lisats cel·lulars digerits amb proteïnasa K són comparables als perfils obtinguts amb els corresponents lipopolisacàrids purificats.

A continuació es descriu el procediment utilitzat per a l'obtenció de mostres de LPS amb la única finalitat d'analitzar els seus perfils electroforètics. El mètode és comú pels dos tipus d'electroforesis (SDS-PAGE o Tricina-SDS-PAGE), essent la única diferència el tampó de mostra emprat.

- Es centrifugà una alíquota de 200 µl de cultiu bacterià en fase estacionària ($DO_{600\text{ nm}} = 0,8$) preparat en aproximadament 5 ml de TSB.
- El sediment es va resuspendre en 25 µl del tampó de mostres o de lisi corresponent (veure la composició en Taula 3.11 per als gels de SDS-PAGE o bé Taula 3.12 per als gels de Tricina-SDS-PAGE).
- S'incubà en un bany a 100°C durant 15 minuts.
- Un cop fred, es van addicionar als lisats 25 µl d'una solució de proteïnasa K (1 mg/ml) per a degradar les proteïnes presents a la mostra, les quals podrien interferir en la migració electroforètica i en la tinció.
- S'incubà en un bany a 65 °C durant dues hores.
- Per a l'anàlisi per SDS-PAGE es varen utilitzar entre 10 i 15 µl d'aquesta solució que contenia LPS mentre que per l'anàlisi per Tricina-SDS-PAGE s'utilitzà 5 µl.

La composició del tampó de mostres per a l'anàlisi electroforètica de les mostres de LPS amb gels de SDS-PAGE es descriu a la Taula 3.11. En els casos en què es requeri una major resolució de les fraccions de baix pes molecular del LPS, s'usaren gels de Tricina-SDS-PAGE i es prepararen les mostres de la mateixa manera però amb un tampó de mostres diferent, la composició del qual està descrita a la Taula 3.12.

Taula 3.11. Composició del tampó de mostres per a gels SDS-PAGE

Reactiu	Quantitat
Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8)	2,5 ml
Glicerol	2 ml
SDS 20%	1 ml
β -mercaptoetanol	200 μ l
Blau de bromofenol	0,1 mg
Aigua bidestil·lada	4,3 ml

Taula 3.12. Composició del tampó de mostres per a gels Tricina-SDS-PAGE

Reactiu	Quantitat
0,06 M Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0 2% SDS	5,9 ml
Glicerol	4 ml
β -mercaptoetanol	0,8 ml
Solució saturada de blau de bromofenol	0,4 ml

3.5.2.2 Preparació dels gels de SDS-PAGE

L'estudi del perfil electroforètic dels lipopolisacàrids es va realitzar en gels de poliacrilamida amb dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE) seguint el mètode descrit per Laemmli, 1970 i modificat posteriorment per Ames *et al.*, 1974, basat en un sistema de discontinu format per un gel de compactació i un gel de resolució. Aquests gels permeten visualitzar la característica aparença d'escala que confereixen les diferents unitats de repetició de l'antigen O unides al nucli del LPS.

Els gels es prepararen a una concentració entre el 12 i el 15% d'acrilamida en el gel de resolució (fase inferior) i al 5% a la fase de compactació (fase superior). La composició del gels de resolució i de compactació d'un gel d'acrilamida al 14% es descriu a la Taula 3.13.

Les mostres es van córrer en tampó de correguda Tris-Glicina-SDS (veure composició a la Taula 3.14) aplicant un corrent de 10 mA (60 volts) fins que les mostres superaren la fase de compactació i a un corrent constant de 20 mA (150 volts) en la fase de resolució. El tampó de correguda es preparà concentrat 5 vegades (x5) i en el moment de l'electroforesi es va diluir amb aigua bidestil·lada fins a un volum final de 1 litre.

Taula 3.13. Composició dels gels de resolució i compactació en els gels de SDS-PAGE al 14% d'acrilamida

Composició	Gel resolució	Gel compactació
Solució d'acrilamida-bisacrilamida 30 % ⁽¹⁾	4,7 ml	1,3 ml
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	2,5 ml	—
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	—	2,5 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl
Aigua bidestil·lada	2,65 ml	6,1 ml
Persulfat amònic 10%	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	10 µl

¹ Composició: 29,2 g d'acrilamida + 0,8 g de bisacrilamida + aigua bidestil·lada q.s. fins 100 ml. Un cop preparada la solució, es filtra i es conserva a 4 °C protegida de la llum.

Taula 3.14. Composició del tampó de correguda per als gels SDS-PAGE (x1)

Components	Quantitat
Tris base	3,02 g
Glicina	14,4 g
SDS 20%	5 ml
Aigua bidestil·lada	q.s. 1 litre

3.5.2.3 Preparació dels gels de Tricina-SDS-PAGE

Per a obtenir una millor resolució de les fraccions del LPS de més baix pes molecular s'utilitzaren gels de Tricina-SDS-PAGE, segons el mètode descrit per Pradel i Schnaitman, 1991 i anteriorment utilitzat per Lesse *et al.*, 1990 per l'anàlisi de LPS, de mutants R (sense AgO) i lipooligosacàrids. El canvi de glicina a tricina en aquest sistema permet augmentar la resolució de les fraccions de més baix pes molecular sense la necessitat d'utilitzar gels de gran format i per tant, són particularment útils per l'anàlisi de la regió del nucli del LPS i d'aquells LPS que no presenten AgO o amb poques unitats de repetició.

Aquests gels Tricina-SDS-PAGE es basen també en un sistema discontinu format per un gel de compactació i un gel de resolució i el sistema de preparació fou el mateix que el descrit pels gels de SDS-PAGE. La diferència radica en la composició dels gels de resolució i compactació, que es mostra a la Taula 3.15. En aquest casos, s'utilitzà una concentració d'acrilamida del 15% en la fase de resolució i d'un 4,5% en la fase de compactació.

Taula 3.15. Composició dels gels de resolució i compactació en els gels de Tricina-SDS-PAGE

Composició	Gel resolució	Gel compactació
Acrilamida-bisacrilamida (49.5% / 6%)	4,15 ml	—
Acrilamida-bisacrilamida (49.5% / 3%)	—	250 µl
3M Tris + 0,3% SDS (pH 8,45)	4,15 ml	775 µl
Glicerol	1,3 ml	—
Aigua bidestil·lada	2,84 ml	2,10 ml
Persulfat amònic 10%	50 µl	37,5 µl
TEMED	5 µl	3,7 µl

Les mostres es van córrer en tampó càtode (veure composició a la Taula 3.16) aplicant un corrent constant de 10 mA en les dos fases del gel.

Taula 3.16. Composició del tampó càtode

Components	Quantitat
Tris base	12,10 g
Tricina	17,92 g
SDS	1 g
Aigua bidestil·lada	q.s. 1 litre

3.5.2.4 Tinció dels gels

Per a visualitzar els perfils electroforètics, els gels (tant els SDS-PAGE com els Tricina-SDS-PAGE) un cop correguts es van tenyir amb nitrat de plata segons el mètode descrit per Tsai i Frasch, 1982. Aquesta tècnica permet tenyir el LPS gràcies a les interaccions d'alta afinitat que estableix la plata amb els grups aldehids, que resulten de l'oxidació amb àcid periòdic dels sucres que constitueixen el LPS.

El procediment que es seguí per la tinció es descriu a continuació. La composició de les solucions que s'utilitzaren s'indica a la Taula 3.17.

- Abans de la tinció, el gel es submergí en aproximadament 100 ml de la Solució I (solució deshidratant) i es deixà entre 2 i 3 hores amb agitació, o alternativament, tota la nit.
- Es retirà la solució I, s'hi afegí de nou la solució I però addicionant-hi àcid periòdic amb una concentració final de 0,7% i es deixà en agitació durant 7 minuts.
- Posteriorment, es realitzaren tres rentats amb 100 ml d'aigua bidestil·lada durant 10 minuts cadascun, mantenint agitació constant.
- S'eliminà l'aigua bidestil·lada de l'últim rentat, s'hi afegí la solució II (solució de nitrat de plata) i s'incubà amb agitació durant 10 minuts.
- Es retirà la solució II i es rentà tres vegades amb aigua bidestil·lada. Cada rentat es feu amb 100 ml d'aigua bidestil·lada durant 5 minuts.

- S'eliminarà l'aigua de l'últim rentat i s'hi afegirà 100 ml de la solució III (solució de revelat) i es deixarà sense agitació fins observar l'aparició de les bandes.
- S'aturarà el procés retirant la solució III i afegint-hi 100 ml de la solució IV (solució de parada). Per a evitar la pèrdua d'intensitat de les bandes és convenient, un cop aturat el procés (1 hora aproximadament), retirar la solució IV i afegir-hi 100 ml d'aigua bidestil·lada, rentant-ho amb aigua 2 o 3 cops. En alguns casos, amb posterioritat a la tinció amb nitrats de plata, els gels es van tenyir durant 1 hora amb una solució de Blau de Coomassie (2,75 g Blau de Coomassie, 100 ml àcid acètic glacial, 500 ml de metanol i 500 ml d'aigua bidestil·lada) per a descartar la presència de proteïnes. Passat una hora, els gels s'incubaren en una solució destenyidora (200 ml metanol, 150 ml àcid acètic, 650 ml aigua bidestil·lada) i s'observà l'absència de bandes proteiques.

Taula 3.17. Composició de les solucions utilitzades en la tinció de gels de LPS

SOLUCIÓ I Solució deshidratant		SOLUCIÓ II * Solució de nitrats de plata		SOLUCIÓ III Solució de revelat		SOLUCIÓ IV Solució de parada
Aigua bidestil·lada	55 ml	Aigua bidestil·lada	57,35 ml	Aigua bidestil·lada	100 ml	Solució d'àcid acètic en aigua bidestil·lada al 7%
Etanol absolut	40 ml	NaOH 0,4N	14 ml	Formaldehid 35-40%	50 µl	
Àcid acètic glacial	5 ml	NH ₃ al 30%	1,15 ml	Àcid cítric 10%	50 µl	
		AgNO ₃	0,5g en 2,5 ml			

* Els components de la solució II s'afegeixen en l'ordre indicat i en agitació. Un cop s'ha afegit la solució de nitrats de plata preparada a part, la solució II ha de quedar transparent

3.5.3 MÈTODES COLORIMÈTRICS D'ANÀLISI DEL LIPOPOLISACÀRID

La quantificació del contingut en glucosamina, en àcid 3-deoxi-D-manno-oct-2-ulosonic (Kdo) i fòsfat orgànic es va realitzar pels mètodes colorimètrics que es descriuen a continuació i que han estat àmpliament utilitzats per a la determinació d'aquests components en mostres de LPS (Kaca *et al.*, 1988; Vinogradov *et al.*, 1992; Holst *et al.*, 1993; Süsskind *et al.*, 1998; Molinaro *et al.*, 2002; Silipo *et al.*, 2005).

3.5.3.1 Determinació del contingut en fòsfat total

La determinació del contingut en fòsfat total de les mostres de LPS o d'alguna de les seves fraccions es va dur a terme segons el procediment descrit a continuació, el qual consisteix en una adaptació del mètode colorimètric proposat per Lowry *et al.*, 1954 per a la determinació del contingut total en fòsfat de mostres de cervell.

- Es prepararà una sèrie de parells de tubs amb volums de 2, 4 i 8 µl d'una solució de 5 mg/ml del LPS a analitzar.

- Paral·lelament, es prepararà una altra sèrie de parells de tubs amb volums de 2, 4, 6, 8 i 10 µl d'una solució estàndard de Na₂HPO₄ 5 mM per a fer la recta patró i tres tubs buits addicionals per a preparar el blanc.
- S'afegiren 50 µl d'aigua destil·lada a cada tub.
- Els tubs es deixaren en un dessecador aplicant el buit durant aproximadament 12 hores.
- S'afegí a cada tub 100 µl de l'agent alliberador de fosfat (veure composició a la Taula 3.18). S'escalfaren a 100°C durant 1 hora i posteriorment a 165°C durant 2 hores.
- Es deixaren refredar els tubs i s'afegí a cadascun d'ells 1 ml del reactiu de color (veure composició a la Taula 3.18).
- Els tubs es deixaren durant 90 minuts en un bany a 37°C i es mesurà la seva absorbància amb l'espectrofotòmetre a 820 nm.

Taula 3.18. Composició dels reactius usats per a la determinació de fosfat total

Reactiu	Composició
<i>Agent alliberador de fosfat</i>	62,7 ml d'aigua desionitzada + 30,6 ml H ₂ SO ₄ concentrat + 6,7 ml d'una solució de HClO ₄ al 70 %
<i>Reactiu de color</i>	1,0 ml d'una solució d'acetat sòdic 1M + 1,0 ml d'una solució de molibdat amònic al 2,5% en aigua + 7,0 ml d'aigua desionitzada + 1,0 ml d'àcid ascòrbic al 10% en aigua recent preparat a 0-4°C

3.5.3.2 Determinació del contingut en fosfat inorgànic

Aquest mètode permet determinar el fosfat lliure que hi ha a la mostra però que no forma part del LPS i que podria procedir d'altres constituents cel·lulars o del medi de cultiu. Per tant, el contingut en grups fosfats d'un determinat LPS o d'alguna de les seves fraccions serà el resultat de restar al valor obtingut en la determinació de fosfat total, el valor de la determinació de fosfat inorgànic.

A continuació es descriu el procediment utilitzat que també es basa en una adaptació del mètode colorimètric proposat per Lowry *et al.*, 1954.

- Es prepararà una sèrie de parells de tubs amb 10, 20 i 30 µl d'una solució de 5 mg/ml del LPS a analitzar.
- Paral·lelament, es prepararà una altra sèrie de parells de tubs amb 2, 4, 6, 8 i 10 µl d'una solució estàndard de Na₂HPO₄ 5 mM per a la recta patró i tres tubs buits addicionals per a preparar el blanc.
- S'afegí a cada tub, inclosos els blancs, el volum d'aigua necessari fins a un volum final de 100 µl i seguidament s'afegiren 900µl de reactiu a cada tub (veure composició a la Taula 3.19).
- Els tubs es posaren en un bany amb una temperatura constant de 37°C durant 30 minuts i es mesurà la seva absorbància amb l'espectrofotòmetre a 820 nm.

Taula 3.19. Composició del reactiu usat per a la determinació de fosfat inorgànic

Reactiu	Composició
<i>Reactiu</i>	5,4 ml d'una solució de H ₂ SO ₄ 1,3N preparada en fred + 0,6 ml d'una solució de molibdat amònic al 2,5% en aigua + 3,0 ml d'una solució d'àcid ascòrbic al 10% en aigua recent preparada

3.5.3.3 Determinació del contingut de glucosamina total

Aquest mètode es basa en la reacció clàssica colorimètrica de Morgan-Elson, 1934 per a la determinació de 2-amino-2-deoxi-hexoses, que posteriorment fou optimitzada per White *et al.*, 1983. El mètode es fonamenta en la reacció del reactiu de Ehrlich (dimetilaminobenzaldehyd) amb un cromogen format a partir de les N-acetilglucosamines tractades en condicions alcalines suaus i tampó borat. Per a que es produeixi aquesta reacció, es necessari que el carboni anomèric de les N-acetilglucosamines estigui lliure.

El procediment que es descriu a continuació permet determinar el contingut total de glucosamina en la mostra de LPS o en alguna de les seves fraccions gràcies al primer pas d'hidròlisi amb àcid clorhídric que permet alliberar les glucosamines unides i així poder ser quantificades.

Reacció d'hidròlisi:

A 50 µl d'una solució de LPS 5 mg/ml s'hi afegiren 50 µl d'una solució de HCl 8N (concentració final HCl 4N). Els tubs es segellaren hermèticament i s'escalfaren a 100°C durant 16 hores. Un cop finalitzada la reacció d'hidròlisi, es transferí el contingut en tubs de centrifuga de 1,5 ml i es centrifugà fins obtenir un sobrenedant clar.

Determinació del contingut en glucosamina:

- Es preparà una sèrie de parells de tubs amb volums de 5, 10 i 15µl de la mostra de LPS a analitzar (sobrenedant obtingut en la reacció d'hidròlisi).
- Paral·lelament, es preparà una altra sèrie de parells de tubs amb 2, 4, 6, 8 i 10 µl d'una solució estàndard de glucosamina 5 mM per fer la recta patró i tres tubs buits addicionals per a preparar el blanc.
- S'afegí a tots els tubs 50 µl d'aigua desionitzada i s'assecaren en un dessecador aplicant el buit durant 3 o 4 hores. Es tornà a afegir 50 µl d'aigua desionitzada i es repetí l'operació tres vegades més.
- Finalitzats els cicles successius en el dessecador, s'afegí a cada tub 60 µl de la *solució combinada* recent preparada (veure composició a la Taula 3.20) i es deixà a temperatura ambient durant 10 minuts.
- Posteriorment, les solucions s'escalfaren a 100°C durant 3 minuts i es deixaren refredar.
- S'afegí a cada tub 50 µl d'una solució de tetraborat de potassi ($K_2B_4O_7$) al 5 % i les solucions es tornaren a escalfar a 100°C durant 7 minuts.
- Les solucions es deixaren refredar i se'ls hi afegí a cadascuna 700 µl del reactiu de Morgan-Elson acidificat [2 parts del reactiu Morgan Elson (veure composició a la Taula 3.20) i 5 parts d'àcid acètic].
- Seguidament, les solucions es posaren en un bany a 37°C durant 20 minuts i es mesurà la seva absorbància a l'espectrofotòmetre a 585 nm.

Taula 3.20. Composició dels reactius usats per a la determinació de glucosamina

Reactiu	Composició
<i>Solució combinada</i>	10 µl d'una solució saturada de NaHCO ₃ + 40 µl d'aigua desionitzada + 10 µl d'anhídrid acètic al 5%, recent preparat en gel
<i>Reactiu de Morgan-Elson (MER)</i>	16 g p-dimetilaminobezaldehyd + 95 ml d'àcid acètic + 5 ml d'àcid clorhídric concentrat

El reactiu MER es conserva a 4°C durant una setmana

3.5.3.4 Determinació del contingut de glucosamina lliure

Per aquest mètode, basat en la reacció clàssica colorimètrica de Morgan-Elson, 1934, es determina únicament aquells residus de glucosamina que tenen el carboni anomèric lliure (White *et al.*, 1983). El procediment utilitzat és el mateix que el descrit a la secció 3.5.3.3 *Determinació del contingut de glucosamina total* però sense el primer pas d'hidròlisi. Així, un cop preparades les sèries de parells de tubs de les mostres de LPS (sencer o fraccions) a analitzar, les de la recta patró i els tres tubs pel blanc tal i com es descriu anteriorment a la secció 3.5.3.3, s'afegí a cada tub 50 µl d'aigua desionitzada i es posaren en un dessecador aplicant el buit durant mínim 1 hora. Seguidament s'afegí a cada tub 60 µl de la *solució combinada* recent preparada (veure composició a la Taula 3.20) i es continuà el procediment tal i com es descriu en la secció 3.5.3.3 *Determinació del contingut de glucosamina total*.

3.5.3.5 Determinació del contingut d'àcid 3-deoxi-D-manno-oct-2-ulosonic (Kdo)

La determinació del contingut de Kdo de les mostres de LPS o d'alguna de les seves fraccions es va realitzar segons el mètode clàssic colorimètric de Karkhanis *et al.*, 1978, que permet determinar el contingut en Kdo mitjançant la reacció amb una solució d'àcid tiobarbitúric.

Cal tenir en compte que qualsevol mètode per a la determinació de Kdo en mostres de LPS passa per l'alliberament de Kdo del LPS mitjançant l'hidròlisi en àcid diluït. Aquest procés pot comportar l'aparició de subproductes de degradació que també són reactius en l'assaig. Per això, cal que la solució estàndard de Kdo per fer la recta de

calibració es sotmeti al mateix procés d'hidròlisi que les mostres de LPS. A continuació es descriu el procediment emprat.

Reacció d'hidròlisi:

- Es van addicionar 50 µl de HCl 2M a 50 µl d'una solució estàndard de Kdo 10 mM. En paral·lel, s'afegiren 50 µl de HCl a 50 µl d'una solució de 5 mg/ml del LPS a analitzar.
- Els tubs es tancaren hermèticament per fusió al calor i s'escalfaren a 100°C durant 2 hores.
- Passat aquest temps, els tubs d'assaig que contenien les mostres de LPS a analitzar es van obrir i el seu contingut es centrifugà fins a obtenir un sobrenedant clar.

Determinació colorimètrica:

- Es prepararen els següents parells de tubs d'assaig:
 - Parells de tubs amb volums de 1, 2, 3, 4 i 5 µl de la solució estàndard de Kdo 10 mM prèviament hidrolitzada per a fer la recta de calibració.
 - Parells de tubs amb volums de 5, 10 i 15 µl dels sobrenedants obtinguts després de centrifugar les mostres hidrolitzades de LPS a analitzar.
 - Tres tubs d'assaig buits addicionals per fer els blancs.
- A tots els tubs se'ls hi addicionà 250 µl d'aigua destil·lada, inclosos els dels blancs.
- Seguidament, s'afegiren a tots els tubs 125 µl d'àcid ortoperiòdic (H₅IO₆) en 0,0625 M d'àcid sulfúric (H₂SO₄) i es deixaren a 20-22°C durant 30 minuts.
- S'afegiren 125 µl d'una solució d'arsenit sòdic (NaAsO₂) 0,2 M en 0,5 M de HCl a tots els tubs. Un cop desaparegué la coloració marró de les solucions, s'afegiren 250 µl d'una solució d'àcid tiobarbitúric al 0,6% preparada al moment a 0-4°C.
- Els tubs s'escalfaren a 100°C durant 15 minuts i en calent, s'afegiren 500 µl de dimetilsulfòxid (DMSO) a cada tub i es mesurà l'absorbància de les solucions amb un espectrofotòmetre a 549 nm.

3.5.4 ANÀLISI COMPOSICIONAL DEL LPS MITJANÇANT CROMATOGRAFIA DE GASOS

La cromatografia de gasos (GC) es va utilitzar per a la determinació de sucres neutres i d'àcids urònics de les mostres de LPS o d'alguna de les seves fraccions sotmeses prèviament a un procés de derivatització per tal de convertir els monosacàrids presents en els corresponents alditol derivats i poder ser així analitzats mitjançant cromatografia de gasos. Addicionalment, aquesta tècnica es va dur a terme per a la caracterització del lípid A dels LPS analitzats i per a la determinació de l'àcid *D-glicero-D-talo-oct-2-ulosònic* (Ko).

En les següents subseccions es detallen els protocols utilitzats per a la preparació de les mostres per al seu posterior anàlisi mitjançant cromatografia de gasos i s'estableixen les condicions cromatogràfiques utilitzades per a la determinació d'aquests compostos.

3.5.4.1 Obtenció d'alditol derivats per a la determinació de sucres neutres

Es va seguir el procediment descrit per Vinogradov *et al.* 1992 amb algunes modificacions en les condicions d'hidròlisi. Aquest mètode consisteix en una hidròlisi àcida per tal d'obtenir els monosacàrids lliures, els quals, en solució, es troben en equilibri entre les formes lineals i cícliques. En la forma lineal, el grup aldehid es redueix a alcohol mitjançant l'addició de NaBH₄. Seguidament, un tractament amb anhídrid acètic en condicions bàsiques provoca l'acetilació de tots els grups hidroxils. Els monosacàrids peracetilats són volàtils i poden ser analitzats per cromatografia de gasos. A continuació es descriu el protocol emprat.

Reacció d'hidròlisi:

- Es partí de 100 µl d'una solució de 5 mg/ml de LPS, s'afegí 1 ml de HCl 0.1M i es mantingué a 100°C durant 48 hores. Alternativament, la hidròlisi es va dur a terme afegint 1 ml d'una solució d'àcid trifluoroacètic 4 M (TFA) i deixant la mostra a 100°C durant 4 hores o bé amb 1 ml d'una solució TFA 2M durant 2 h a 120°C.
- A les mostres, un cop refredades, s'hi afegí 30 µg de xilosa (patró intern) i s'evaporaren al rotavapor a aproximadament 40°C. És important evaporar completament les restes d'àcid que podrien interferir en la determinació cromatogràfica (particularment en el cas del TFA), podent-ne realitzar tres rentats addicionals amb aigua bidestil·lada i evaporar al rotavapor.
- Per a eliminar els àcids grassos, es va afegir a cada mostra 1 ml d'èter al 10% en hexà que es retirà amb l'ajuda d'una pipeta pasteur. Es repetí el procés dues vegades més, evaporant si calia les restes al rotavapor.

Reducció:

- Per alcalinitzar les mostres, s'hi afegí 500 µl d'aigua bidestil·lada i es mesurà el pH (havia de ser pH 8). Si fou necessari, s'ajustà amb una o dues gotes de NaOH 1N.
- Per a la carboxireducció, es van addicionar 2 mg de NaBH₄ a cada mostra (s'observà la formació d'efervescència) i es deixà a temperatura ambient com a mínim 4 hores o a 4°C durant tota la nit.
- Per a neutralitzar les mostres, s'hi afegí HCl 2M gota a gota fins que desaparegué l'efervescència i s'evaporà al rotavapor.
- Per a eliminar les restes de borat, s'hi afegí 1 ml d'una solució d'àcid acètic al 5% en metanol, s'agità vigorosament i s'evaporà al rotavapor, repetint-se l'operació dues vegades més. L'addició d'acètic facilita l'eliminació dels subproductes de borat, ja que es forma acetat bòric que s'elimina fàcilment per evaporació.
- Es feren dos rentats més amb 1 ml de metanol, agitant i evaporant posteriorment en cada cas.

Peracetilació:

- S'afegí a cada mostra 200 µl d'anhídrid acètic i s'escalfà durant 15 minuts a 85°C. Posteriorment, s'assecaren sota corrent de N₂.
- S'addicionà a cada mostra 200 µl de piridina i 100 µl d'anhídrid acètic, s'escalfà a 85°C durant 30 minuts i s'assecà sota corrent de N₂. En aquestes condicions alcalines (piridina) es poden acetilar els grups OH dels monosacàrids.
- S'afegí a cada mostra el volum mínim necessari de cloroform per a transferir la fase orgànica (sucres) als vials de cromatografia. Es feu un segon rentat amb cloroform i s'assecà sota corrent de N₂.
- Finalment, la mostra es va resuspendre en 40 µl de metanol o cloroform (segons la columna utilitzada), dels quals s'injectaren en el cromatògraf entre 0,5 i 1 µl.

3.5.4.2 Obtenció d'alditol derivats per a la determinació d'àcids urònics

Aquest procediment es basa en el mateix principi que el mètode descrit per determinar sucres neutres (veure secció 3.5.4.1 *Obtenció d'alditol derivats per a la determinació de sucres neutres*) però incorporant un pas previ de metanòlisi, que és una reacció específica dels àcids urònics (Süsskind *et al.*, 1998a). Mitjançant la reacció de metanòlisi i posterior carboxireducció amb NaBD₄ s'introdueix un grup metà en el grup COOH de l'àcid urònic que posteriorment serà substituït per deuteronomi, de manera que el carboxílic queda protegit i marcat i es pot diferenciar del corresponent sucre neutre en un espectre de masses. Habitualment, l'àcid urònic derivatitzat apareix en el cromatograma en la mateixa posició que el corresponent sucre neutre del qual deriva. Per tant, la mesura de la concentració de l'àcid urònic en la mostra es realitza per la diferència amb la concentració del sucre neutre mesurat pel sistema descrit anteriorment. El protocol que es va utilitzar es descriu a continuació.

Metanòlisi:

- Es partí de 100 µl d'una solució de 5 mg/ml de LPS que es posaren en un tub de vidre dins d'un dessecador connectat a una bomba de buit.
- Quan la mostra va estar completament seca, s'hi afegí 500 µl d'una solució de 0,5M HCl en metanol, es tancà el tub de vidre hermèticament, i es posà a 85°C durant 45 minuts.
- S'evaporà el contingut al rotavapor i seguidament es posà en un dessecador connectat a una bomba de buit durant 1 hora per tal d'eliminar totalment les restes de HCl.

Carboxireducció:

- S'afegí a cada mostra 500 µl d'una solució d'aigua bidestil·lada/ metanol (4:1) i es comprovà que el pH fos 8 (es pot ajustar amb gotes de NaOH).
- S'afegí en fred 3 mg de NaBD₄ i es deixà a 4°C durant tota la nit.
- S'addicionà gota a gota HCl 2M fins que no hi hagué efervescència i posteriorment s'evaporà al rotavapor.
- Es van fer tres rentats amb 1 ml d'una solució d'àcid acètic al 5% en metanol i dos rentats més amb 500 µl de metanol, evaporant al rotavapor en cada rentat.

A partir d'aquest punt, s'enllaçà amb el primer pas (hidròlisi) del mètode per la determinació de sucres neutres (veure secció 3.5.4.1 *Obtenció d'alditol derivats per a la determinació de sucres neutres*), afegint una segona mostra del mateix LPS (100 µl d'una solució de 5 mg/ml) que es va dur en paral·lel però que no havia estat metanolitzada.

3.5.4.3 Determinació de l'àcid D-glicero-D-talo-oct-2-ulosònic (Ko)

La determinació del contingut en Ko es basa en una primera reacció de metanòlisi per a protegir el grup carboxil seguida d'una reacció de peracetilació amb anhídric acètic en condicions bàsiques que permet acetilar tots els grups hidroxils, per convertir-los en compostos més volàtils que poden ser analitzats per cromatografia de gasos. El protocol que es va utilitzar es descriu a continuació.

Metanòlisi:

- Es partí de 100 µl d'una solució de 5 mg/ml de LPS (equivalent a 0,5 mg) que es posaren en un tub de vidre
- S'hi afegí 0,5 ml d'una solució 2M HCl en metanol, es tancà el tub de vidre hermèticament, i es posà a 85°C durant 16 hores.
- Es transferí el contingut a un tub net i es feren 3 rentats amb metanol i 3 amb aigua, agitant i evaporant al rotavapor en cada cas. Posteriorment, s'assecà en una bomba de buit durant 1 hora.

Peracetilació:

- S'afegí a cada mostra 200 µl d'anhídric acètic i s'escalfà durant 15 minuts a 85°C. Posteriorment, s'assecaren sota corrent de N₂.
- S'addicionà a cada mostra 200 µl de piridina i 100 µl d'anhídric acètic, s'escalfà a 85°C durant 30 minuts i s'assecà sota corrent de N₂.
- S'afegí a cada mostra 100 µl de cloroform, dels quals s'injectà 1 µl en el cromatògraf.

3.5.4.4 Determinació d'àcids grassos

Per a la determinació dels àcids grassos que constitueixen part del lípid A dels LPS analitzats s'utilitzà un procediment descrit per Kaca *et al.*, 1988. Breument, aquest mètode consisteix en una reacció inicial d'hidròlisi forta en medi àcid que permet alliberar els àcids grassos units, per enllaços èster i amida, a la glucosamina del lípid A, seguida d'una extracció amb cloroform i derivatització amb diazometà per tal d'obtenir els metil-èster derivats que poden ser analitzats per cromatografia de gasos. El procediment utilitzat es descriu a continuació.

Hidròlisi:

- S'afegí en un tub de vidre, 10 µg de 17:0-Me (0,5 mg/ml), que és el patró intern i es secà sota corrent de nitrogen.
- S'afegí 40 µl d'una solució de 5 mg/ml de LPS (200 µg de LPS que representen aproximadament 100 µg de lípid A).
- S'afegí a cada mostra 1 ml d'una solució de HCl 4M per a la reacció d'hidròlisi. Els tubs es tancaren amb una càpsula metàl·lica per tal d'evitar l'evaporació de les mostres i es van deixar durant 4 hores a 100°C.
- Es centrifugà durant 3 minuts a 3000 rpm.
- S'afegí a cada mostra 1 ml d'una solució de NaOH 5M. Els tubs s'encapsularen de nou i es van deixar durant 30 minuts a 100°C. Aquesta segona reacció d'hidròlisi suau permet hidrolitzar els èsters que s'han pogut regenerar en les condicions enèrgiques de la primera reacció d'hidròlisi.
- Es centrifugà durant 3 minuts a 3000 rpm.

Extracció i derivatització:

- S'afegí a cada tub de vidre 3 ml d'aigua desionitzada aprox.
- S'addicionà 300 µl d'una solució HCl 4M (pH 3). Aquest pas és imprescindible per poder fer l'extracció amb cloroform, ja que permet regenerar l'àcid gras a partir de la sal sòdica de l'àcid gras que és soluble en aigua i no es pot extraure amb un dissolvent apolar com el cloroform.
- Es realitzaren 3 extraccions amb 1 ml de cloroform cadascuna. Per això, s'afegí a cada tub 1 ml de cloroform amb la pipeta Pasteur i es transferí la fase de cloroform (fase inferior) a un altre tub (prèviament rentat amb cloroform), tenint cura de no emportar-se fase aquosa. Es repeteix el procés dues vegades més.
- S'afegí una sal (sulfat sòdic) per tal de comprovar que no hi hagués aigua a la fase de cloroform. Si es feien rocs, s'afegí sal fins a ser fàcilment movibles.
- La fase de cloroform provinent de les tres extraccions s'evaporà sota corrent de nitrogen (sense secar-se!) i es transferí a vials petits.
- S'afegí unes gotes de diazometà (CH₂N₂) fins que estigué groc i s'evaporà sota corrent de nitrogen (sense secar-se!). Es repetí el procés un cop més. Aquest procés de derivatització permet obtenir el metil-èster corresponent.
- Es reduí fins a aprox. 100 µl de cloroform dels quals s'injectaren al cromatògraf 0,5-1 µl.

La identificació dels diferents àcids grassos presents a les mostres de LPS es fa per comparació del temps de retenció amb els dels estàndards. Per a una determinació quantitativa, es van calcular els factors de resposta de l'aparell per cada àcid gras i es va tenir en compte el valor del blanc.

3.5.4.5 Cromatografia de gasos

La cromatografia de gasos (GC) es va utilitzar per a determinar la composició en monosacàrids (sucres neutres, àcids urònics i Ko) i en àcids grassos de les mostres de LPS estudiades, un cop derivatitzades en els corresponents alditol derivats o metil-èsters, respectivament, que poden ser analitzats per cromatografia de gasos. Els protocols de derivatització estan descrits a les seccions 3.5.4.1 *Obtenció d'alditol derivats per a la determinació de sucre neutres*; 3.5.4.2 *Obtenció d'alditol derivats per a la determinació d'àcids urònics*; 3.5.4.3 *Determinació de l'àcid D-glicero-D-talo-oct-2-ulosònic (Ko)* i 3.5.4.4 *Determinació d'àcids grassos*.

Les mostres es van analitzar en dos cromatògrafs diferents:

- El cromatògraf GC-17A (Shimadzu) amb detector de flama (FID) i que usa H₂ com a gas portador s'utilitzà tant per a la determinació de monosacàrids com d'àcids grassos. En el cas de la **determinació de monosacàrids**, el cromatògraf es va equipar amb una columna capil·lar SPB-5 (Supelco) de les següents dimensions: 30 m (l) x 0,32 mm (ID) x 0,25 µm (d_r) i s'utilitzà habitualment, el següent programa de temperatures: 150°C durant 3 minuts, 3°C/ min fins a 300°C i 300°C durant 5 minuts. En el cas de la **determinació d'àcids grassos**, s'utilitzà una columna capil·lar SPB-5 (Supelco) amb les següents dimensions: 30 m (l) x 0,25 mm (ID) x 0,25 µm (d_r) i el següent programa de temperatures: 120°C durant 3 minuts, 5°C/min fins a 300°C i 300°C durant 5 minuts.
- També es va utilitzar l'aparell Hewlett-Packard HP 5890, Serie II amb detector FID i que utilitza He com a gas portador, equipat amb la columna Rtx^R-2330 (Restek Corp.). El programa de temperatures utilitzat habitualment fou el següent: 175°C durant 2 minuts, 8°C/ min fins a 240°C, 240°C durant 1 minut, 8°C/ min fins a 265°C i 265°C durant 12 minuts.

3.5.4.6 Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS)

Aquesta tècnica es va utilitzar per identificar pics nous que sortiren en els cromatogrames de masses i que no es corresponien amb els temps de retenció dels monosacàrids esperats. Fou particularment útil per identificar i corroborar la presència d'àcids urònics en les mostres de LPS (sencer o fraccions), ja que en cas que hi hagués àcid urònic a la mostra, l'espectre de masses seria similar al del monosacàrid corresponent però els pics apareixerien com a dobles per la presència de 2 deuteronomis que hauria incorporat la mostra. També va permetre corroborar la presència inequívoca de Ko en les mostres analitzades.

Les mostres derivatitzades (seguint els procediments descrits anteriorment a les seccions 3.5.4.1, 3.5.4.2, 3.5.4.3 i 3.5.4.4) es varen injectar en un aparell Hewlett-Packard model 5989 A equipat amb una columna capil·lar HP-5 aplicant un gradient de temperatura de entre 150 i 320°C a 5°C/min. L'espectrometria d'impacte electrònic es va dur a terme a 70 keV i la ionització química es va realitzar usant amoníac com a gas reactant.

3.5.5 AÏLLAMENT D'OLIGOSACÀRIDS: TÈCNiques DE DEGRADACIÓ DEL LPS I PURIFICACIÓ D'OLIGOSACÀRIDS

Per tal d'aïllar el nucli del lipopolisacàrid de *Serratia marcescens* o bé dels seus mutants cal en primer lloc utilitzar tècniques de degradació que permetin separar la part lipídica de la polisacàridica. Un cop eliminat el component lipídic, cal realitzar diferents tècniques cromatogràfiques per tal d'obtenir la fracció corresponent al nucli (que és l'objectiu d'aquest treball) separant-la de la resta de fraccions corresponents al nucli més antigen o a fraccions de nuclis incomplets. La heterogeneïtat de la molècula de LPS i particularment de la fracció sacarídica dificulta enormement l'aïllament de la fracció del nucli amb una puresa adequada per als estudis estructurals posteriors.

3.5.5.1 Hidròlisi amb àcid acètic

La hidròlisi suau amb àcid acètic al 1% provoca el trencament dels enllaços entre la glucosamina del lípid A i el primer residu de Kdo així com també entre dues molècules de Kdo. D'aquesta manera, es separa el lípid A (lípid A + disacàrid de β -glucosaminil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucosamina) de la fracció polisacàridica, que conté el nucli i l'antigen O, els quals podran ser separats posteriorment en una columna Sephadex G-50. El procediment utilitzat es descriu a continuació:

- A una mostra de LPS, s'hi afegí els volums d'aigua i d'àcid acètic al 10% necessaris per a obtenir unes concentracions finals de 10 mg/ml de LPS i de 1% d'àcid acètic.
- La mostra es posà en un bany a 100°C durant aproximadament 90 minuts (fins observar la formació de precipitat, amb un temps màxim de 2 hores) en agitació constant.
- A continuació, la mostra es centrifugà a baixa velocitat (2.500g) durant 1 hora a 4°C per eliminar el precipitat.
- El sobrenedant es va evaporar, seguidament es va dissoldre amb aigua desionitzada i es centrifugà a 100.000g a 4°C durant 4 hores.
- Es va recollir el sobrenedant i es liofilitzà en un recipient prèviament tarat per tal de conèixer el rendiment del procés.

3.5.5.2 Aïllament i purificació d'oligosacàrids

Un cop separada la fracció sacarídica del lípid A, es varen utilitzar diferents tècniques cromatogràfiques (gel- filtració, d'intercanvi iònic d'alta resolució- HPAEC) per tal d'aïllar i purificar els diferents oligosacàrids que formen part de la regió objecte d'estudi d'aquest treball. A continuació, s'enumeren les diferents tècniques cromatogràfiques emprades i la seva finalitat principal.

3.5.5.2.1 Cromatografia per gel-filtració

Aquesta tècnica permet la separació de molècules en solució en funció de la seva mida forçant el seu pas a través d'una columna que té en el seu interior un medi cromatogràfic que és un gel. D'aquesta manera, els analits més petits que poden difondre cap a l'interior dels porus de la matriu queden retinguts més temps mentre que les molècules més grans que no poden entrar a dins dels porus elueixen ràpidament. Es varen utilitzar dos tipus diferents de columnes: Sephadex G-50 i Sephadex G-10.

- *Sephadex G-50*

Aquesta columna es va utilitzar per separar les diferents fraccions sacarídiques que provenien de la hidròlisi amb acètic, que habitualment corresponen a: una primera fracció d'oligosacàrids del nucli units al polisacàrid de l'antigen O, una segona fracció que conté els oligosacàrids del nucli i una última fracció corresponent a monosacàrids, disacàrids i altres productes de degradació procedents de la hidròlisi.

La columna (2,5 x 70 cm) utilitzada per a la separació cromatogràfica es va empaquetar amb Sephadex G-50 (Amesham Biosciences) i el seu volum mort fou de 50,2 ml. Per a eluir les diferents fraccions, s'utilitzà un tampó d'acetat de piridina (8 ml piridina, 20 ml d'àcid acètic, 2000 ml d'aigua bidestil·lada) habitualment a un flux de 0,8 ml/min. Com a detector s'usà un refractòmetre. Les fraccions positives es van comprovar per cromatografia en capa fina (veure secció 3.5.6 *Cromatografia en capa fina*) i seguidament es liofilitzaren.

- *Sephadex G-10*

Aquesta columna es va utilitzar per eliminar les sals que contaminaven tota fracció oligosacarídica, especialment després d'una cromatografia d'intercanvi iònic d'alta resolució (HPAEC).

La columna que es va utilitzar tenia una dimensió de 1 x 70 cm i es va empaquetar amb Sephadex G-10 (GE Healthcare, anteriorment Amersham Biosciences). Com a eluent s'utilitzà 10 mM NH_4HCO_3 o aigua bidestil·lada a un flux aproximat de 1 ml/min. Com a detector s'usà un refractòmetre. Les fraccions positives es confirmaren per cromatografia en capa fina (veure secció 3.5.6 *Cromatografia en capa fina*) i seguidament es liofilitzaren.

3.5.5.2.2 Cromatografia d'intercanvi iònic d'alta resolució (HPAEC)

Aquesta tècnica HPAEC (High Performance Anion Exchange Chromatography) s'utilitza per a l'aïllament de cadascun dels oligosacàrids que componen les diferents fraccions sacarídiques (mescles d'oligosacàrids) obtingudes després de la separació per la columna Sephadex G-50.

Aquesta tècnica HPAEC acoblada a un detector amperomètric de pulsació (PAD) és una tècnica cromatogràfica optimitzada per a la separació de carbohidrats mitjançant mecanismes d'intercanvi aniònic i es basa en la capacitat que tenen els grups hidroxils dels carbohidrats de poder ser ionitzats en condicions alcalines fortes. Fins el 1963 què és quan es va començar a aplicar als carbohidrats, per al seu anàlisi s'emprava cromatografia líquida utilitzant matrius de sílica acoblada a detecció per índex de refracció. Aquests sistemes però, presentaven baixa sensibilitat i resolució i en molts casos es feia necessari derivatitzar. La posada en funcionament de l'HPAEC acoblada a detector amperomètric de pulsació (PAD) va permetre separar monosacàrids i oligosacàrids amb diferències estructurals mínimes amb una elevada sensibilitat (es detecta a nivells de picomols) i sense necessitat de derivatitzar prèviament.

L'**aparell** que s'utilitza per a l'anàlisi de les mostres fou el model DX500 de la casa Dionex Corp. que incorpora a part del detector PAD que es descriu a continuació, unes columnes especialment dissenyades per a la separació de carbohidrats. L'HPAEC es pot dur a terme en condicions alcalines o neutres, en el cas que els sucres a separar tinguin un nombre important de grups amb càrregues negatives (Kdo, fosfats, àcids urònics...). En condicions alcalines, s'utilitza la **columna CarboPacTM PA-100** (4 x 250 mm, Dionex Corp.) mentre que en condicions neutres s'usà la **columna CarboPacTM PA 1** (4 x 250 mm, Dionex Corp.). Aquestes columnes estan empaquetades amb una resina de 2% de poliestiré entrellaçada amb divinilbenzè recoberta amb un làtex de 500 nm Microbead que porta units grups funcionals d'amoni quaternari. Existeixen per a cadascuna d'aquestes columnes, la versió de la columna semipreparativa, de dimensions diferents (9 x 250 mm, Dionex Corp.) però amb la mateixa resina que la corresponent columna analítica.

Per a l'**elució** dels oligosacàrids s'utilitzaren diferents eluents en funció de si l'anàlisi es realitzava en condicions alcalines o neutres. En condicions neutres, s'utilitzà com a eluent 1M NaAc pH 6 per eluir els oligosacàrids retinguts en la columna. En condicions alcalines, s'utilitzà com a eluent un gradient determinat de 1M NaAc en 0,1M NaOH. En aquestes condicions alcalines fortes (pH>12) els grups hidroxils dels carbohidrats es converteixen en oxianions, cadascun amb un pKa determinat, de manera que les petites diferències existents entre els valors de pKa repercuteixen en la interacció amb la resina de la columna d'intercanvi i per tant, en el temps de retenció. Al fer passar un gradient de 1M NaAc en 0,1M NaOH, l'anió acetat, que en comparació amb l'oxoanió té una interacció més forta amb la resina, desplaça els diferents oligosacàrids units a la columna provocant la seva elució en funció del seu pKa, que estarà influenciat per l'entorn químic (p.ex. el grup hidroxil del carboni anomèric és més acídic que la resta) i per les posicions de l'enllaç en el cas dels oligo i polisacàrids. Cal tenir en compte que a l'utilitzar condicions alcalines fortes poden produir-se reaccions de degradació o epimerització. No obstant, ja que el procés cromatogràfic és curt i que aquestes reaccions no solen tenir lloc a temperatura ambient, el risc és baix.

Per tal d'optimitzar la separació dels oligosacàrids de les nostres mostres s'assajaren prèviament tant condicions neutres com alcalines amb diferents gradients lineals dels eluents corresponents, tot i que per a la majoria d'anàlisis es va optar finalment per a la utilització de condicions alcalines. Habitualment, es provà com a condició inicial gradients de 1% al 100% del corresponent eluent (1M NaAc pH 6 per les condicions neutres o 1M NaAc/ 0,1M NaOH per les condicions alcalines) durant 60 minuts per tal d'observar tots els pics de la mostra i a partir d'aquesta condició es provaren diferents gradients i temps fins aconseguir la màxima separació. Els diferents gradients utilitzats per a l'aïllament dels oligosacàrids de les diferents mostres estudiades s'especifiquen a la secció 4. *Resultats*.

Per a la separació en les columnes analítiques, de cada mostra es va preparar una concentració de 1 mg/ml en aigua bidestil·lada de la qual s'injectà un volum equivalent a 15 µg - 1 mg de mostra a un flux de 1 ml/min. Per a la separació en columnes semipreparatives, s'injectaren entre 10 a 30 mg de mostra dissolts en aigua bidestil·lada (~ 400 µl) a un flux de 4 ml/min.

Per a la detecció dels oligosacàrids aïllats, el sistema porta acoblat un **detector** amperomètric (PAD) de pulsació triple, amb un elèctrode d'or. En aquest sistema l'elèctrode es regenera, de manera que s'eviten els problemes que es produeixen en els detectors amperomètrics clàssics, que no són útils per a la detecció de carbohidrats ja que pateixen una contaminació irreversible de l'elèctrode associada als productes d'oxidació. Cal tenir en compte que, com el detector PAD està preparat per treballar en condicions alcalines, quan es treballa en condicions neutres, cal acoblar una post columna alcalina.

3.5.6 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Aquesta tècnica s'utilitza per tal d'identificar les fraccions positives (que contenen oligosacàrids) després d'una cromatografia gel-filtració o d'intercanvi iònic.

Com a matriu es va fer servir TLC aluminium sheets, Silica gel 60 (MerckR). Es va aplicar un volum inicial de mostra de 10 µl sobre les làmines d'alumini, es submergiren les mostres en una solució d'àcid sulfúric al 10% en etanol (fase mòbil) i s'escalfaren a 100°C. L'aparició d'una taca marró indicava que la reacció era positiva.

3.5.7 ESPECTROMETRIA DE MASSES

Tot espectròmetre de masses consta de tres components bàsics: una font d'ions on es generen els ions en fase gasosa a partir de la mostra, un analitzador on els ions produïts són accelerats i separats segons la seva relació massa-càrrega i un detector que produeix una senyal elèctric proporcional al nombre d'ions que arriben.

Els anàlisis dels oligosacàrids del nucli del LPS es van realitzar mitjançant espectrometria de masses de ressonància d'ió ciclotró per transformada de Fourier i ionització per electrospai (ESI FT-ICR-MS; Ion Cyclotron Resonance Fourier-Transformed Electrospray Ionization Mass Spectrometry) en el mode negatiu utilitzant un espectròmetre de masses Bruker APEX II (Bruker Daltonics) equipat amb un iman de 7 Tesla, activament apantallat i una font d'ions Apollo. Aquesta tècnica d'espectrometria de masses per mitjà de FT-ICR proporciona una resolució extremadament alta. Els espectres de masses foren adquirits amb seqüències estàndards

experimentals segons les proporcionades pel fabricant. Les mostres es varen dissoldre a una concentració aproximada de 10 ng/ml amb una mescla de 50:50: 0,001 (vol/vol/vol) de 2-propanol, aigua i trietilamina i es varen ruixar (*sprayed*) a un flux de 2 µl/min. El voltatge d'entrada al capil·lar s'establí a 3.8 Kv i la temperatura del gas de secat a 150°C. Per a facilitar la interpretació dels espectres de masses que mostraven múltiples estats de càrregues elèctriques per a cada component, se'ls hi va aplicar deconvolució de la càrrega (*charge-deconvoluted*), de manera que els valors de masses mostrats es refereixen únicament a les masses moleculars monoisotòpiques.

3.5.8 RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR (RMN)

Per a les assignacions estructurals, els espectres van ser analitzats en una solució de 0,5 ml dels diferents oligosacàrids [oligosacàrid **1** (5,3 mg), oligosacàrid **2** (1,9 mg), oligosacàrid **3** (1,4 mg)] en aigua deuterada ($^2\text{H}_2\text{O}$) en un aparell Bruker AMX 600 (^1H RMN, 600,13 MHz; ^{13}C RMN, 125,77 MHz) i en un aparell Bruker Digital Advance 800 tan a 27 com 47°C. Les ressonàncies es van mesurar respecte a un patró intern d'acetona: $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ δ_{H} , 2,225; δ_{C} 31,07.

Els experiments bidimensionals de correlació escalar COSY (CORrelated SpectroscopY), TOCSY (TOTAL CORrelated SpectroscopY) i la variant del COSY amb un filtre de doble quantum DQF-COSY (Double-Quantum Filtered COSY) que permet determinar la magnitud de les constants d'acoblament a més de les correlacions escalars, així com els experiments bidimensionals de correlació dipolar NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY) i ROESY (Rotating-frame Overhauser Enhancement SpectroscopY) i els experiments bidimensionals de correlació inversa de ^1H i ^{13}C HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) i HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) que permeten determinar la connectivitat del carboni a l'hidrogen, van ser tots analitzats amb el software estàndard Bruker.

