

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo, sus características más relevantes y su procedencia se resumen en la Tabla 2.1 y la lista de oligonucleótidos (Roche Diagnostics S.L.) utilizados para amplificar diferentes fragmentos mediante PCR se indica en la Tabla 2.2.

2.2. Métodos microbiológicos

2.2.1. Métodos de cultivo y conservación de cepas

Los cultivos de las diferentes cepas bacterianas de *E. coli*, *R. metallidurans* y *D. radiodurans* se realizaron en medio rico Luria-Bertani (LB) (Miller, 1992), y para los cultivos de noche para las extracciones de DNA de *E. coli* se utilizó el medio altamente rico Terrific Broth (TB), (Tartof y Hobbs, 1987), suplementados con las concentraciones de antibióticos adecuadas para cada microorganismo (Tabla 2.3). Las siembras en medio sólido se realizaron en placas Petri con medio LB con 17% de agar. La temperatura de incubación de *E. coli* fue de 37°C, mientras que tanto *R. metallidurans* como *D. radiodurans* se incubaron a 30°C.

Para realizar los cultivos de noche se partía de colonias aisladas de los microorganismos que eran inoculadas en 10 ml del medio de cultivo con los suplementos necesarios, a la temperatura adecuada con una agitación de 110 rpm. Los cultivos de *E. coli* tardaban en llegar a la fase estacionaria aproximadamente 16 horas, mientras que los cultivos de *R. metallidurans* y *D. radiodurans* tardaban entre 20-36 horas. Para obtener cultivos en la fase exponencial se hacía una resiembra del cultivo en medio fresco (1:50) y se incubaba en las mismas condiciones hasta llegar a la concentración esperada. El crecimiento del cultivo era controlado mediante la medida de la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 550 nm.

La conservación de las cepas de *E. coli* se realizó en placas de LB suplementadas según el caso, que se mantenían a 4°C y se resemebraban cada mes y también se mantenían las cepas congeladas a -20°C, en forma de viales del cultivo glicerinados [Glicerol (Scharlau) al 50%, como agente crioprotector]. Las cepas de *R. metallidurans* y *D. radiodurans* se mantenían a 4°C en placas de LB con los suplementos necesarios y se resemebraban cada semana. Para el almacenamiento prolongado se utilizaba el sistema de criopreservación de bacterias con perlas porosas que se mantienen a -70°C (Protect).

TABLA 2.1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo

CEPAS	Características relevantes	Procedencia
<i>E. coli</i>		
HB101 <i>immE3</i>	<i>thi-1 hsdS20 (r_B⁻,m_B⁻) supE44 recA13 ara-14 leuB6 proA2 lacY1 galk2 rpsL20 (str^r) xyl-5 mtl-1 Tn5::immE3</i>	Díaz <i>et al.</i> , 1994
DH5α	<i>supE4 ΔlacU169 (Ø80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Clontech
MC1061	<i>ΔlacX74 hsdR2 mcrB araD139 Δ(araABC-leu)7679 galU galk rpsL thi</i>	Casadaban y Cohen, 1979
S17λpir	<i>recA⁻ RP4 Tc::Mu Km::Tn7 λpir</i>	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990; Herrero <i>et al.</i> , 1990
BL21(DE3)	<i>F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻,m_B⁻) dcm gal λ(DE3)</i>	Clontech
UA6185	MC1061/pUA985	Este estudio
UA6186	DH5α/pUA988	Este estudio
UA6187	MC1061/pUA983	Este estudio
UA6188	BL21(DE)/pUA998	Este estudio
<i>R. metallidurans</i>		
CECT 4424	salvaje	CECT
UA12000	CECT 4424, Rif ^r	Este estudio
UA12001	UA12000/pUA985	Este estudio
UA12002	UA12000 <i>lexA::ΩTc</i>	Este estudio
UA12003	UA12000 mutante RecA(Def)	Este estudio
UA12004	UA12002/pUA985	Este estudio
UA12005	UA12003/pUA985	Este estudio

D. radiodurans

CECT 833T	salvaje	CECT
PLÁSMIDOS		
pBluescriptSK(+)	Ap ^r	Stratagene
pGEM-T [®]	vector de clonación de PCR, Ap ^r	Promega
pAgrR4	contiene el <i>recA</i> de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	W. Buikema
pRK2013	Tra ⁺ del replicón RK2 ColE1, Km ^r	Ditta <i>et al.</i> , 1985
pUA949	pBSKΩKm	Este laboratorio
pHRP309	Gm ^r <i>lacZ</i> vector para hacer fusiones <i>lacZ</i>	Parales y Harwood, 1993
pHP45ΩTc	Cassette Tc	Fellay <i>et al.</i> , 1987
pJQ200KS	Gm ^r <i>sacB</i>	Quandt y Hynes, 1993
pSUP202	Cm ^r Tc ^r Ap ^r Mob ⁺	Simon <i>et al.</i> , 1983
pET22b(+)	Vector de sobreexpresión y clonación de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	Novagen
pUA980	pBSK(+) que contiene el gen <i>recA</i> de <i>R. metallidurans</i> en un fragmento <i>Clal</i> de 3.5 kb	Este estudio
pUA982	pGEM-T [®] que contiene fragmento +562 a +875 ^a del gen <i>recA</i> de <i>R. metallidurans</i>	Este estudio
pUA983	pSUP202 que contiene fragmento +562 a +875 ^a del gen <i>recA</i> de <i>R. metallidurans</i>	Este estudio
pUA985	pHRP309 que contiene la fusión del fragmento -477 a +80 ^a del gen <i>recA</i> de <i>R. metallidurans</i> ΩKm con el gen <i>lacZ</i>	Este estudio
pUA986	pGEM-T [®] que contiene el gen <i>lexA</i> de <i>R. metallidurans</i> y su promotor (-240 a +975) ^b	Este estudio
pUA987	pGEM-T [®] que contiene el gen <i>lexA::ΩTc</i> de <i>R. metallidurans</i>	Este estudio
pUA988	pJQ200KS que contiene el gen <i>lexA::ΩTc</i> de <i>R. metallidurans</i>	Este estudio
pUA989	pGEM-T [®] que contiene el promotor del gen <i>lexA</i> de <i>R. metallidurans</i> (-240 a +38) ^b	Este estudio
pUA990	pGEM-T [®] que contiene el promotor del gen <i>recA</i> de <i>R. metallidurans</i> (-193 a +80) ^a	Este estudio
pUA991	pGEM-T [®] que contiene el promotor del hipotético gen de la familia <i>impB/samB/mucB</i> de <i>R. metallidurans</i> (-222 a +39) ^c	Este estudio

pUA992	pGEM-T [®] que contiene el promotor del hipotético gen <i>uvrA</i> de <i>R. metallidurans</i> (-224 a +43) ^d	Este estudio
pUA993	pGEM-T [®] que contiene el promotor del hipotético gen <i>ruvAB</i> de <i>R. metallidurans</i> (-194 a +34) ^e	Este estudio
pUA994	pGEM-T [®] que contiene el promotor del hipotético gen <i>dinG</i> de <i>R. metallidurans</i> (-216 a +43) ^f	Este estudio
pUA996	pGEM-T [®] que contiene el gen <i>lexA</i> de <i>D. radiodurans</i> y su promotor (-427 a +777) ^g	Este estudio
pUA997	pGEM-T [®] que contiene el fragmento <i>NdeI</i> +1 a +777 ^g del gen <i>lexA</i> de <i>D. radiodurans</i>	Este estudio
pUA998	pET22b(+) que contiene el fragmento <i>NdeI-NotI</i> del gen <i>lexA</i> de <i>D. radiodurans</i> (+1 a +777) ^g	Este estudio

- Posición con respecto al punto de inicio de traducción del gen *recA* de *R. metallidurans*
- Posición con respecto al punto de inicio de traducción del gen *lexA* de *R. metallidurans*
- Posición con respecto al punto de inicio de traducción del hipotético gen de la familia *impB/samB/mucB* de *R. metallidurans*
- Posición con respecto al punto de inicio de traducción del hipotético gen *uvrA* de *R. metallidurans*
- Posición con respecto al punto de inicio de traducción del hipotético gen *ruvAB* de *R. metallidurans*
- Posición con respecto al punto de inicio de traducción del hipotético gen *dinG* de *R. metallidurans*
- Posición con respecto al punto de inicio de traducción del gen *lexA* de *D. radiodurans*

2.2.1.1. Medios de cultivo

Medio LB (Luria Bertani) (Miller, 1992)

A 950 ml de agua destilada se añaden:

Bacto-triptona (DIFCO)	10 g
Extracto de levadura (DIFCO)	5 g
Cloruro de sodio (NaCl) (Panreac)	10 g

Mezclar hasta disolver los componentes y ajustar el pH a 7 con NaOH 5 N. Ajustar el volumen a 1 l con agua destilada. Esterilizar en el autoclave (121°C por 15 min).

Tabla 2.2. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Oligonucleótido	Secuencia ^{a, b}	Posición	Aplicación
Dir-dig	5'-dig-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	+2964 ^c	Oligonucleótido directo universal del vector pGEM-T [®] marcado con digoxigenina en el extremo 5', utilizado para obtener sondas para ensayos EMSA
Rev-dig	5'-dig-GGAAACAGCTATGACCATG-3'	+175 ^c	Oligonucleótido inverso universal del vector pGEM-T [®] marcado con digoxigenina en el extremo 5', utilizado para obtener sondas para ensayos EMSA
Direct-Cy5	5'-Cy5-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'	+2957 ^c	Oligonucleótido directo universal del vector pGEM-T [®] marcado con Cy5 en el extremo 5', utilizado para marcar clones para secuenciación
Reverse-Cy5	5'-Cy5-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	+177 ^c	Oligonucleótido inverso universal del vector pGEM-T [®] marcado con Cy5 en el extremo 5', utilizado para marcar clones para secuenciación
T7 prom-Cy5	5'-Cy5-TAATACGACTCACTATA GGG-3'	+2987 ^c	Oligonucleótido del promotor del fago T7 marcado con Cy5 en el extremo 5', utilizado para marcar clones para secuenciación
A. tumefaciens			
UprecA Agro	5'-TCTAGAGCGCTCGGCATCGGC GGC-3'	+181 ^d	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar un fragmento del gen <i>recA</i> de <i>A. tumefaciens</i>
LorecA Agro	5'-GTCGACGAGAGCGTTACCGCC CGT-3'	+678 ^d	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar un fragmento del gen <i>recA</i> de <i>A. tumefaciens</i>
R. metallidurans			
Banda A2	5'-CACCTCCTCGGCCGACTCGGC-3'	+1294 ^e	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar fragmentos del gen <i>recA</i> de <i>R. metallidurans</i>
FrecA3	5'-GAATTCGCAGTCAGAATCAGC-3'	-477 ^e	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener el promotor del gen <i>recA</i> de <i>R. metallidurans</i> utilizado en la construcción de la fusión
FreacA dw	5'-GGATCCTTCTCAATCTGGGAGAG CGCGGC-3'	+80 ^e	Oligonucleótido <i>lower</i> para obtener el promotor del gen <i>recA</i> de <i>R. metallidurans</i> utilizado en la construcción de la fusión y para clonarlo
FrecA up	5'-GAATTCTGCCGGTGGGGCTTGC AAGCATAC-3'	-193 ^e	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar la región promotora del gen <i>recA</i> de <i>R. metallidurans</i>
Baint1	5'-ATCTTGGCGTCCACGCCAGG-3'	+875 ^e	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar una región interna del gen <i>recA</i> de <i>R. metallidurans</i> utilizada en la construcción del mutante
Baint2	5'-ACCGGCACGATCAAGCGCACG-3'	+562 ^e	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar una región interna del gen <i>recA</i> de <i>R. metallidurans</i> utilizada en la construcción del mutante
LexA Rals1	5'-GATATCGGTCCAGAGAACGG GCTGCC-3'	+975 ^f	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar el gen <i>lexA</i> de <i>R. metallidurans</i>
LexA Rals2	5'-GATATCGCGAGCACAACGATAC GAGGC-3'	-240 ^f	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar el gen <i>lexA</i> de <i>R. metallidurans</i> y su promotor
LexA Rals5	5'TCGAAAATCTGCTGCTGCCGG-3'	+38 ^f	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar el promotor del gen <i>lexA</i> de <i>R. metallidurans</i>
ImpB/samB/mucB Rals1	5'-GCCTGCTTGTCAGCAAAGTGC-3'	-222 ^g	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar el promotor del hipotético gen de la familia <i>impB/samB/mucB</i> de <i>R. metallidurans</i>
ImpB/samB/mucB Rals2	5'-GTAGCGCAACAGTTCGACGG-3'	+39 ^g	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar el promotor del hipotético gen de la familia <i>impB/samB/mucB</i> de <i>R. metallidurans</i>

RuvAB Rals1	5'-GTGACGATGCCACACGCAACC-3'	-194 ^h	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar el promotor del hipotético gen <i>ruvAB</i> de <i>R. metallidurans</i>
RuvAB Rals2	5'-TTTCGAGCAGGGTGCCAGCG-3'	+34 ^h	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar el promotor del hipotético gen <i>ruvAB</i> de <i>R. metallidurans</i>
UvrA Rals1	5'-AACGCCGGGAAGTTGCTGACG-3'	-224 ⁱ	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar el promotor del hipotético gen <i>uvrA</i> de <i>R. metallidurans</i>
UvrA Rals2	5'-TCAGGTTGTGGGTACGCGCC-3'	+43 ⁱ	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar el promotor del hipotético gen <i>uvrA</i> de <i>R. metallidurans</i>
DinG Rals1	5'-CCGCGGAAAAGCAGAATCAGC-3'	-216 ^j	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar el promotor del hipotético gen <i>dinG</i> de <i>R. metallidurans</i>
DinG Rals2	5'-TTGAGCCGGCGCTTCTTGAGC-3'	+43 ^j	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar el promotor del hipotético gen <i>dinG</i> de <i>R. metallidurans</i>
HisS Rals up	5'-TCACTTCGAGGGCGTTCA-3'	+726 ^k	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar una región interna del gen <i>hisS</i> de <i>R. metallidurans</i> para ensayos de cuantificación de m-RNA
HisS Rals rv	5'-CGTATCCGGCACCAGGTTTC-3'	+996 ^k	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar una región interna del hipotético gen <i>hisS</i> de <i>R. metallidurans</i> para ensayos de cuantificación de m-RNA
RecA Rals up	5'-TCGGTGTGATGTTTGTTCT-3'	+623 ^e	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar una región interna del hipotético gen <i>recA</i> de <i>R. metallidurans</i> para ensayos de cuantificación de m-RNA
RecA Rals rv	5'-GATCTTCTCGCCGTTGTAGC-3'	+921 ^e	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar una región interna del gen <i>recA</i> de <i>R. metallidurans</i> para ensayos de cuantificación de m-RNA
LexA Rals up	5'-CCGGCAGCAGCAGATTTTC-3'	+18 ^f	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar una región interna del gen <i>lexA</i> de <i>R. metallidurans</i> para ensayos de cuantificación de m-RNA
LexA Rals rv	5'-GATCGGGTCGTTCCAGAGTC-3'	+238 ^f	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar una región interna del gen <i>lexA</i> de <i>R. metallidurans</i> para ensayos de cuantificación de m-RNA
ImpB/samB/ mucB Rals up	5'-GGCGTTACTCCGGGTTGTCA-3'	+275 ^g	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar una región interna del hipotético gen de la familia <i>impB/samB/mucB</i> de <i>R. metallidurans</i> para ensayos de cuantificación de m-RNA
ImpB/samB/ mucB Rals rv	5'-CCAGCGGCCAGATTCGTGT-3'	+556 ^g	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar una región interna del hipotético gen de la familia <i>impB/samB/mucB</i> de <i>R. metallidurans</i> para ensayos de cuantificación de m-RNA
RuvAB Rals up	5'-CACCCCTGCTCGAAAAGAATCC-3'	+21 ^h	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar una región interna del hipotético gen <i>ruvAB</i> de <i>R. metallidurans</i> para ensayos de cuantificación de m-RNA
RuvAB Rals rv	5'-GCACCGACAGCCCAGACAG-3'	+268 ^h	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar una región interna del hipotético gen <i>ruvAB</i> de <i>R. metallidurans</i> para ensayos de cuantificación de m-RNA
UvrA Rals up	5'-GGAAATTACCGCCCGGCTCAAC-3'	+1419 ⁱ	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar una región interna del hipotético gen <i>uvrA</i> de <i>R. metallidurans</i> para ensayos de cuantificación de m-RNA
UvrA Rals rv	5'-GCGCGGATCATGTCTTCGTCG-3'	+1694 ⁱ	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar una región interna del hipotético gen <i>uvrA</i> de <i>R. metallidurans</i> para ensayos de cuantificación de m-RNA
DinG Rals up	5'-CGCGGCGCAGGAGAAGATG-3'	+375 ^j	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar una región interna del hipotético gen <i>dinG</i> de <i>R. metallidurans</i> para ensayos de cuantificación de m-RNA

DinG Rals rv	5'-TGTCCCGCTCCAGGTGATAG-3'	+659'	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar una región interna del hipotético gen <i>dinG</i> de <i>R. metallidurans</i> para ensayos de cuantificación de m-RNA
D. radiodurans			
RecA Dei2	5'-GATATCCAGAGCAGCCACCGAG TCC-3'	+482'	Oligonucleótido <i>lower</i> para amplificar parte del gen <i>recA</i> de <i>D. radiodurans</i> y su promotor
RecA Dei3	5'-GATATCAGGGCCTGACCGAACTC GCGG-3'	-303'	Oligonucleótido <i>lower</i> para amplificar parte del gen <i>recA</i> de <i>D. radiodurans</i> y su promotor
LexA Dei7	5'-GGTGATGCCCACTTCCTGCGC-3'	+105 ^m	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar el promotor del gen <i>lexA</i> de <i>D. radiodurans</i> y utilizarlo en ensayos EMSA como competidor específico
Dig LexA Dei	5'-dig-GGTGATGCCCACTTCCTGC GC-3'	+105 ^m	Oligonucleótido <i>lower</i> para obtener sondas del gen <i>lexA</i> de <i>D. radiodurans</i> marcado con digoxigenina en el extremo 5', utilizado para ensayos EMSA
LexA Dei1	5'-GATATCCTGCTGATGGCCGGGC ACC-3'	-427 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar el gen <i>lexA</i> de <i>D. radiodurans</i> y su promotor y obtener la sonda LexA1
LexA Dei2	5'-GATATCCACCGCGCACTAGACT CCC-3'	+777 ^m	Oligonucleótido <i>lower</i> para clonar el gen <i>lexA</i> de <i>D. radiodurans</i> y su promotor y para clonarlo en el vector pET22b(+)
LexA Dei6	5'-CATATGCCCGCTGAACTGACG CCC-3'	+1 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para clonar el gen <i>lexA</i> de <i>D. radiodurans</i> en el vector pET22b(+)
LexA Dei4	5'-GATATCGGCTCAGACGCTCGAC TGGT-3'	-307 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA2 de <i>D. radiodurans</i>
LexA Dei10	5'-GTTGGGCCGCCGCTTGACCCG-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 de <i>D. radiodurans</i>
LexA Dei5	5'-GTCGACCCCGTGACAAGGG-3'	-33 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA4 de <i>D. radiodurans</i>
LexA Dei26	5'-GTTGGGCCGCCG <u>TGGT</u> ACCCG TGA-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando CTTG por TGGT en la posición -38(motivo izquierdo del palíndromo propuesto)
LexA Dei15	5'-GTTGGGCCGCCGCTTGACCCG TGAT <u>GGT</u> IGCGTGCGG-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando CAAG por TGGT en la posición -26(motivo derecho del palíndromo propuesto)
LexA Dei14	5'-GTTGGGCCGCCGCTTGACCCG TGAT <u>TTTT</u> CAAG GCGT-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 añadiendo 4 T en la posición -27
LexA Dei30	5'-GTTGGGCCGCC <u>C</u> CTTGACCC-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando G por T en la posición -39 (motivo izquierdo del palíndromo propuesto)
LexA Dei31	5'-GTTGGGCCGCCG <u>I</u> TTGACCCG-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando C por T en la posición -38 (motivo izquierdo del palíndromo propuesto)
LexA Dei32	5'-GTTGGGCCGCCG <u>G</u> TGACCC GT-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando T por G en la posición -37 (motivo izquierdo del palíndromo propuesto)
LexA Dei33	5'-GTTGGGCCGCCG <u>T</u> GACCCG TG-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando T por G en la posición -36 (motivo izquierdo del palíndromo propuesto)
LexA Dei34	5'-GTTGGGCCGCCG <u>T</u> IACCCG TGA-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando G por T en la posición -35 (motivo izquierdo del palíndromo propuesto)
LexA Dei35	5'-GTTGGGCCGCCG <u>TG</u> CCCG TGAC-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando A por G en la posición -34 (motivo izquierdo del palíndromo propuesto)
LexA Dei16	5'-GTTGGGCCGCCGCTTGACCCG TGG <u>CA</u> AGGCGT-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando A por G en la posición -27 (motivo derecho del palíndromo propuesto)

LexA Dei17	5'-GTTGGGCCGCGCTT <u>GACCCG</u> GA <u>A</u> AGGCGTG-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando C por T en la posición -26 (motivo derecho del palíndromo propuesto)
LexA Dei18	5'-GTTGGGCCGCGCTT <u>GACCCG</u> TGAC <u>G</u> AGGCGTGC-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando A por G en la posición -25 (motivo derecho del palíndromo propuesto)
LexA Dei19	5'-GTTGGGCCGCGCTT <u>GACCCG</u> TGAC <u>G</u> GGCGTGCG-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando A por G en la posición -24 (motivo derecho del palíndromo propuesto)
LexA Dei20	5'-GTTGGGCCGCGCTT <u>GACCCG</u> TGACAA <u>T</u> CGTGCGG-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando G por T en la posición -23 (motivo derecho del palíndromo propuesto)
LexA Dei21	5'-GTTGGGCCGCGCTT <u>GACCCG</u> TGACAA <u>G</u> TCGTGCGG-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando G por T en la posición -22 (motivo derecho del palíndromo propuesto)
LexA Dei36	5'-GTTGGGCCGCGCT <u>GA</u> ACCCG TGA-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando TG por GA en la posición -36 (motivo izquierdo del palíndromo propuesto)
LexA Dei38	5'-GTTGGGCCG <u>CC</u> TTT <u>GACCCG</u> -3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando GC por TT en la posición -39 (motivo izquierdo del palíndromo propuesto)
LexA Dei37	5'-GTTGGGCCGCGCTT <u>GACCCG</u> TGAC <u>A</u> GTCGTGCGG-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando AG por GT en la posición -24 (motivo izquierdo del palíndromo propuesto)
LexA Dei39	5'-GTTGGGCCGCGCTT <u>GACCCG</u> TGACAA <u>TT</u> CGTGCGG-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 cambiando GG por TT en la posición -23 (motivo izquierdo del palíndromo propuesto)
LexA Dei43	5'-GTTGGGCCGCGCTT <u>GACCCG</u> TGAC <u>ATTTA</u> GGCGTGC-3'	-50 ^m	Oligonucleótido <i>upper</i> para obtener la sonda LexA3 añadiendo 3 T en la posición -25 (motivo derecho del palíndromo propuesto)
LexA2 Dei5	5'-GCATTTGCGAATGAGGAAGCG-3'	-251 ⁿ	Oligonucleótido <i>upper</i> para amplificar parte del hipotético gen <i>lexA2</i> de <i>D. radiodurans</i> y su promotor
LexA2 Dei6	5'-CGCCGCGCTGGTAGCAAGTGA-3'	+75 ⁿ	Oligonucleótido <i>lower</i> para amplificar parte del hipotético gen <i>lexA2</i> de <i>D. radiodurans</i> y su promotor

- Las dianas de restricción se presentan en cursiva.
- Los cambios (mutaciones, inserciones, etc) se presentan subrayados
- Posición 5' del oligonucleótido con respecto al punto de inicio de traducción del vector pGEM-T[®] de Promega
- Posición 5' del oligonucleótido con respecto al punto de inicio de traducción del gen *recA* de *A. tumefaciens*
- Posición 5' del oligonucleótido con respecto al punto de inicio de traducción del gen *recA* de *R. metallidurans*
- Posición 5' del oligonucleótido con respecto al punto de inicio de traducción del gen *lexA* de *R. metallidurans*
- Posición 5' del oligonucleótido con respecto al punto de inicio de traducción del hipotético gen de la familia *impB/samB/mucB* de *R. metallidurans*
- Posición 5' del oligonucleótido con respecto al punto de inicio de traducción del hipotético gen *ruvAB* de *R. metallidurans*
- Posición 5' del oligonucleótido con respecto al punto de inicio de traducción del hipotético gen *uvrAB* de *R. metallidurans*
- Posición 5' del oligonucleótido con respecto al punto de inicio de traducción del hipotético gen *dinG* de *R. metallidurans*
- Posición 5' del oligonucleótido con respecto al punto de inicio de traducción del hipotético gen *hisS* de *R. metallidurans*
- Posición 5' del oligonucleótido con respecto al punto de inicio de traducción del gen *recA* de *D. radiodurans*
- Posición 5' del oligonucleótido con respecto al punto de inicio de traducción del gen *lexA* de *D. radiodurans*
- Posición 5' del oligonucleótido con respecto al punto de inicio de traducción del hipotético gen *lexA2* de *D. radiodurans*

Agar LB

A 950 ml de agua destilada se añaden:

Bacto-triptona (DIFCO)	10 g
Extracto de levadura (DIFCO)	5 g
Cloruro de sodio (NaCl) (Panreac)	10 g
Agar (DIFCO)	17 g

Mezclar hasta disolver los componentes y ajustar el pH a 7 con NaOH 5 N. Ajustar el volumen a 1 l con agua destilada. Esterilizar en el autoclave (121°C por 15 min). Repartir en placas Petri.

Medio TB (Terrific Broth) (Tartof y Hobbs, 1987)

A 900 ml de agua destilada se añaden:

Bacto-triptona (DIFCO)	12 g
Extracto de levadura (DIFCO)	24 g
Glicerol (Scharlau)	4 ml

Mezclar hasta disolver los componentes. Esterilizar en el autoclave (121°C por 15 min). Dejar enfriar hasta 50-60°C y añadir 100 ml de solución salina estéril KH_2PO_4 0.17 M y K_2HPO_4 0.72 M.

- Solución salina

A 90 ml de agua destilada se añaden:

KH_2PO_4 (Merck)	2.31 g
K_2HPO_4 (Merck)	12.54 g

Mezclar hasta disolver los componentes y ajustar el volumen a 100 ml con agua destilada. Esterilizar en el autoclave (121°C por 15 min).

BHI (Brain heart infusion) (OXOID)

A 1000 ml de agua destilada se añaden

BHI (OXOID) 37 g

Mezclar hasta disolver y esterilizar en el autoclave (121°C por 15 min).

2.2.1.2. Antibióticos

Los diferentes antibióticos se guardan en soluciones concentradas a -20°C y una vez diluidos se mantenían a 4°C . Para diluirlos se utilizaba agua ultrapura estéril en todos los casos, a excepción de la rifampicina que se disuelve en metanol. En los casos que hacía falta, se suplementaban los antibióticos antes de preparar las placas o en los medios líquidos se añaden directamente las cantidades necesarias. Las concentraciones de antibióticos que se utilizaron en este trabajo se detallan en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. Concentraciones de los antibióticos utilizados para cultivos de *E. coli* y *R. metallidurans*

Antibiótico	Conc. stock (mg/ml)	Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)	
		<i>E. coli</i>	<i>R. metallidurans</i>
Ampicilina (Ap) (Roche Diagnostics S.L.)	50	50	50
Sulfato de kanamicina (Km) (Roche Diagnostics S.L.)	50	50	600
Clorhidrato de tetraciclina (Tc) (Acofarma)	17	17	17
Sulfato de gentamicina (Gm) (Roig Farma)	10	10	100
Rifampicina (Rif) (Roig Farma)	15	75	75

2.2.1.3. Otras soluciones y productos químicos

Para suplementar los medios de cultivo se utilizaron otras soluciones y productos químicos en diferentes pruebas realizadas en este trabajo.

Metilmetanosulfonato (MMS) (SIGMA)

Este agente mutagénico se utilizó para suplementar placas de LB a una concentración de 0.02%, disuelto en DMSO.

Mitomicina C (SIGMA)

La mitomicina C se utilizó a concentraciones de 0.4 y 1.2 $\mu\text{g/ml}$ para suplementar medios líquidos de LB, disuelta en agua ultrapura estéril.

5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) (Apollo)

Se utilizó para suplementar placas de LB a una concentración de 40 mg/l, disuelto en *N,N* dimetil formamida.

2.2.2. Pruebas de supervivencia celular

2.2.2.1. Prueba de complementación del gen *recA* con MMS

Esta prueba se utilizó para determinar la presencia del gen *recA* en clones de una subgenoteca de *R. metallidurans*. Se realizaron réplicas de los clones sospechosos de portar el gen *recA* en placas de LB y en placas de LB suplementadas con MMS al 0.02%. Seguidamente, se analizaron los clones que crecieron en los dos medios con el objetivo de conseguir un clon que contuviera el gen *recA* de *R. metallidurans*.

2.2.2.2. Resistencia a la radiación ultravioleta (Test de la gota) (Ames *et al.*, 1973)

Esta prueba se utilizó para determinar la sensibilidad de las diferentes cepas a la radiación ultravioleta (UV). Para esto, en una placa de LB se depositaron en fila 6 gotas de 10 μ l del cultivo de noche de la cepa en cuestión; se dejaron secar y se irradió cada gota a 2 J/m²s con una lámpara de luz ultravioleta (254 nm) a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 20 y 25 segundos). Se incubó la placa 24 h a 37°C y se observó el crecimiento. Como cepas control se utilizaron cultivos de *E. coli* MC1061 (positivo) y *E. coli* DH5 α (negativo).

Para obtener resultados óptimos, se recomienda mantener la lámpara de ultravioleta encendida durante 20 minutos antes de realizar la prueba para que se estabilice. La dosis de irradiación fue determinada con un dosímetro de luz ultravioleta (*UVX Radiometer* de *UVP inc.*).

2.2.2.3. Supervivencia a la radiación ultravioleta

Siguiendo el protocolo descrito por Cárdenas y colaboradores (2001), se realizó un cultivo de noche en LB de la cepa en cuestión y se resembró (1:50) en medio fresco, incubando a las condiciones óptimas hasta llegar a la fase exponencial, alcanzando una DO_{550nm} de 0.4 (aproximadamente 10⁸ cfu/ml). Seguidamente, se preparó un banco de diluciones del cultivo en una solución de NaCl 0.9% y se irradiaron 5 ml de la dilución 10⁻⁴ en una placa de Petri de vidrio estéril, con una lámpara de luz ultravioleta de 254 nm, a una dosis de 1 J/m²s, a diferentes tiempos (0, 10, 20, 40, 60 y 80 segundos). Después de cada tiempo de irradiación se tomaron muestras de 300 μ l. Se sembraron por duplicado 100 μ l en placas del medio adecuado y se incubaron las placas en las condiciones óptimas. Finalmente, se realizó el recuento de las colonias.

2.2.3. Inducción de la respuesta SOS

Los ensayos de inducción de genes SOS se realizaron utilizando dos tratamientos inductores, la mitomicina C y la radiación UV.

2.2.3.1. Inducción con mitomicina C

Este método se aplicó para lograr la inducción del sistema SOS en cepas de *R. metallidurans*. Para realizar esta técnica se hacía un cultivo de noche de la cepa en 10 ml de LB y se incubaba a 30°C durante 20-36 horas a una agitación de 110 rpm. Se resembraba en 10 ml de medio fresco (1:50) y se incubaba en las mismas condiciones, hasta que el cultivo llegaba a fase exponencial (DO_{550nm} aproximada de 0.3-0.4). Se añadía mitomicina C a una concentración final de 1.2 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaba durante dos horas manteniendo las mismas condiciones. Finalmente, se centrifugaba el cultivo a 10 000 rpm durante 10 min y se guardaba el sedimento de células congelado a -80°C hasta su utilización.

2.2.3.2. Inducción por radiación ultravioleta (Ausubel *et al.*, 1995)

Este método se aplicó para lograr la inducción del sistema SOS en cepas de *D. radiodurans*. Para realizar esta técnica se hacía un cultivo de noche de la cepa en 10 ml de LB y se incubaba a 30°C durante 20-36 horas a una agitación de 110 rpm. Se resembraba en 10 ml de medio fresco (1:50) y se incubaba en las mismas condiciones, hasta que el cultivo llegaba a fase exponencial (DO_{550nm} aproximada de 0.5-0.6). Se centrifugaba el cultivo a 10 000 rpm durante 10 min, se eliminaba el sobrenadante y se resuspendía el sedimento en 10 ml de una solución de NaCl 0.9%. Este proceso de lavado se repetía de nuevo y, seguidamente, se colocaban 5 ml de la suspensión de células en una placa de Petri de vidrio estéril y se irradiaba con una lámpara de luz ultravioleta de 254 nm a una dosis de 800 J/m^2 . Se volvía a repetir el mismo proceso con el resto de la suspensión de células. Finalmente, se centrifugaba todo el volumen a 10 000 rpm durante 10 min y se guardaba el sedimento congelado a -80°C hasta su utilización.

2.3. Métodos genéticos

2.3.1. Transformación

El método de la transformación consiste en incorporar DNA exógeno por parte de la célula bacteriana. En el presente trabajo se han utilizado dos metodologías diferentes, una química, utilizando cloruro cálcico 50 mM, y otra física utilizando un campo eléctrico, para introducir DNA plasmídico en diferentes cepas de *E. coli* (BL21, DH5 α , MC1061, HB101*immE3*).

2.3.1.1. Transformación con cloruro cálcico (CaCl₂)

El método que se utiliza es el descrito por Hanahan (1988) con ligeras modificaciones. Se basa en la exposición del cultivo bacteriano en fase exponencial a una solución hipotónica de cloruro de calcio 100 mM a 0°C, que provoca la formación de células competentes, que son capaces de captar DNA exógeno. Este proceso se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* BL21.

Preparación de células competentes

- Hacer una resiembra 1:50 a partir de un cultivo de noche de la cepa en 100 ml de medio LB.
- Incubar a 37°C 110 rpm de agitación hasta alcanzar una DO_{550nm} de 0.4 correspondiente a la mitad de la fase exponencial del ciclo de crecimiento celular.
- Centrifugar el cultivo en un tubo de propileno estéril a 5000 rpm durante 10 min a 4°C, eliminar el sobrenadante en condiciones de esterilidad y resuspender el sedimento en 100 ml de CaCl₂ 100 mM frío.
- Mantener el tubo en hielo durante 15 min.
- Centrifugar a 5000 rpm durante 10 min a 4°C y resuspender el sedimento suavemente en 5 ml de CaCl₂ 100 mM frío.
- Mantener el tubo en hielo durante 1 h.

- Añadir 1 ml de glicerol estéril al 100%, hacer alícuotas de 200 μ l y congelar a -80°C .

Transformación

- Mezclar en un tubo de vidrio 200 μ l de células competentes con 10-100 ng de DNA plasmídico y mantenerlo en hielo durante 30 min. En este paso el DNA se adhiere a la pared de las células competentes.
- Incubar el tubo a 42°C durante 90 s. Con este choque térmico el DNA es incorporado dentro de la célula.
- Mantener el tubo en hielo durante 5 min.
- Añadir 0.8 ml de LB e incubar a 37°C durante 45-60 min con agitación. Este paso permite la expresión fenotípica.
- Sembrar en placas selectivas adecuadas e incubar a 37°C durante 12-18 horas. Se debe tomar en cuenta este tiempo de incubación, sobretodo cuando se seleccionan resistencias a antibióticos β -lactámicos, para evitar el crecimiento de colonias satélites alrededor de los transformantes.

Soluciones

Solución CaCl_2 100 mM

A 90 ml de agua ultrapura se añaden:

CaCl_2 (Merck)	1.47 g
-------------------------	--------

Mezclar hasta su total disolución y llevar a un volumen final de 100 ml. Esterilizar por filtración.

2.3.1.2. Electrotransformación

El método que se utiliza es el descrito por Dower *et al.* (1988) con ligeras modificaciones. Es un método más eficaz que el de la transformación con

cloruro cálcico. Se basa en aplicar un pulso eléctrico de alto voltaje que despolariza la membrana celular, de manera que se forman poros, transitoriamente, a través de los cuales puede entrar el DNA a la célula (Shigekawa y Dower, 1988). Se utilizó el *Gene Pulser II* y el *Pulse Controller Electroporation System* de BIORAD y los protocolos recomendados por el fabricante.

Es importante en esta técnica evitar al máximo el contenido de sales de las células competentes, por lo cual, los cultivos se prepararon en medio LB con NaCl a una concentración de 0.5% y el DNA que se utiliza debe estar muy limpio y ser de baja fuerza iónica. Este proceso se empleó para transformar las cepas de *E. coli*. DH5 α , MC1061, HB101*immE3*.

Preparación de células competentes

- Hacer un cultivo de noche en 10 ml de LB preparado con NaCl al 0.5%.
- Hacer una resiembra 1:100 en 1 l de LB (0.5% NaCl) fresco.
- Incubar a 37°C con una agitación de 110 rpm hasta llegar a una DO_{550nm} de 0.2-0.3 (para cepas *recA*⁺) o de 0.6 (para cepas *recA*⁻).
- Mantener el cultivo en hielo durante 15 min. A partir de este paso, todo el material y las soluciones que se utilicen estarán atemperados a 4°C.
- Centrifugar el cultivo en tubos de polipropileno de 250 ml estériles a 6000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante en condiciones de esterilidad y resuspender el sedimento en 1 l de agua ultrapura estéril. Volver a centrifugar en las mismas condiciones y repetir el lavado con agua ultrapura.
- Resuspender las células en 20 ml de glicerol al 10% frío y estéril.
- Centrifugar en un tubo de polipropileno de 30 ml estéril a 6000 rpm durante 15 min a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante en condiciones de esterilidad y resuspender el sedimento en 1 ml de glicerol 10% frío.
- Repartir en tubos eppendorf estériles alícuotas de 50 μ l y congelarlos en nieve carbónica.
- Conservar las células a -80°C.

Transformación

- Descongelar las células competentes, manteniéndolas en hielo.
- Añadir 1-2 μ l de solución de DNA, mezclar con la pipeta y dejar 5 min en hielo.
- Ajustar las condiciones del *Gene Pulser II* y el *Pulse Controller Electroporation System* a 125 μ FD de capacitancia y 200 ohms de resistencia en paralelo.
- Transferir la mezcla de células y DNA a una cubeta de electrotransformación preenfriada estéril y colocarla en la cámara del *Gene Pulser*.
- Aplicar un pulso eléctrico de 2.0 kV de potencial eléctrico.
- Sacar la cubeta y añadir 1 ml de medio BHI. Mezclar y pasar a un tubo estéril de vidrio e incubar a 37°C en agitación durante 45 min para que se pueda realizar la expresión fenotípica.
- Sembrar en placas selectivas adecuadas e incubar a 37°C durante 12-18 horas. Se debe tomar en cuenta este tiempo de incubación, sobretodo cuando se seleccionan resistencias a antibióticos β -lactámicos, para evitar el crecimiento de colonias satélites alrededor de los transformantes.

2.3.2. Conjugación

El método empleado permite transferir o movilizar DNA de un plásmido no autotransferible que contenga la región *mob* a una cepa bacteriana, utilizando un plásmido movilizador que contenga los genes *tra* que codifican las funciones de transferencia o bien una cepa donadora que contenga dentro del mismo cromosoma dicha región. En este trabajo se han utilizado dos tipos de conjugación. La conjugación triparental, en la que se utiliza la cepa receptora, la cepa donadora y una cepa movilizadora (HB101/pRK2013) y la conjugación biparental, en la que se conjuga la cepa receptora con la cepa donadora, portadora de la región *tra* (*E. coli* S17 λ pir).

2.3.2.1. Conjugación triparental

- Preparar cultivos de noche en medio LB de las cepas donadora, movilizadora (HB101/pRK2013) y receptora en los medios de cultivo adecuados, suplementados con los antibióticos correspondientes (a excepción de la cepa donadora, a la que no se adicionan antibióticos) e incubar con agitación a la temperatura óptima de cada microorganismo.
- Hacer resiembras 1:50 de la cepa donadora y de la cepa movilizadora, en 10 ml de medio fresco sin antibióticos.
- Incubar con agitación a la temperatura óptima de las cepas hasta llegar a la fase exponencial a una DO_{550nm} de 0.8.
- Mezclar 0.5 ml de cada una de las cepas (de las resiembras de la donadora y movilizadora y del cultivo de noche de la receptora) en un tubo eppendorf y centrifugar a 12 000 rpm durante 1 min.
- Eliminar en condiciones de esterilidad el sobrenadante y poner la suspensión de células sobre un filtro de nitrocelulosa (0.45 μm de diámetro del poro, Sartorius) colocado sobre una placa de LB. Dejar secar e incubar la placa durante toda la noche a la temperatura óptima de la cepa receptora.
- Resuspender el filtro en 1 ml de LB, hacer un banco de diluciones y sembrar las diluciones adecuadas en placas de medio selectivo e incubar el tiempo y a la temperatura óptimos de la cepa receptora.

2.3.2.2. Conjugación biparental

- Preparar cultivos de noche en medio LB de las cepas donadora y receptora en los medios de cultivo adecuados, suplementados con los antibióticos correspondientes, en el caso de la cepa receptora y sin antibióticos, en el caso de la cepa donadora e incubar a la temperatura óptima de cada microorganismo.
- Hacer una resiembra 1:50 de la cepa donadora, en 10 ml de medio fresco sin antibióticos.
- Incubar con agitación a la temperatura óptima de la cepa hasta llegar a la fase exponencial a una DO_{550nm} de 0.8.

- Mezclar 750 μ l de cada una de las cepas (de la resiembra de la donadora y del cultivo de noche de la receptora) en un tubo eppendorf y centrifugar a 12 000 rpm durante 1 min.
- Eliminar en condiciones de esterilidad el sobrenadante y poner la suspensión de células sobre un filtro de nitrocelulosa (0.45 μ m de diámetro del poro, Sartorius) colocado sobre una placa de LB. Dejar secar e incubar la placa durante toda la noche a la temperatura óptima de la cepa receptora.
- Resuspender el filtro en 1 ml de LB, hacer un banco de diluciones y sembrar las diluciones adecuadas en placas de medio selectivo e incubar el tiempo y a la temperatura óptimos de la cepa receptora.

2.4. Métodos bioquímicos

2.4.1. Ensayo de la actividad β -galactosidasa

Este ensayo basado en el método descrito por Miller (1972), consiste en la hidrólisis del compuesto incoloro o-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG) por parte de la enzima β -galactosidasa (producto del gen *lacZ*) a 28°C y pH 7, dando lugar al producto coloreado o-nitrofenol que puede ser valorado espectrofotométricamente.

Crecimiento y preparación de las células

- Hacer un cultivo de noche en 10 ml del medio adecuado de la cepa que contenga la fusión del gen en cuestión con el gen *lacZ* en las condiciones óptimas para ésta.
- Hacer una resiembra 1:100 para cultivos de *E. coli* o 1:50 para cultivos de *R. metallidurans* en 20 ml de medio fresco e incubar con agitación a la temperatura adecuada hasta llegar al inicio de la fase exponencial a una DO_{550nm} de 0.2.
- En caso de que se haga un estudio de la evolución de la síntesis de β -galactosidasa durante el crecimiento en presencia o no de un agente

inductor, se divide el cultivo original en dos y se continúa la incubación, siendo uno de ellos el control sin tratamiento. Se tomarán las muestras en diferentes tiempo (0, 30, 60, 90, 120 min).

- En cada tiempo se tomará una muestra de 1 ml de cada cultivo. Se mezclan 0.8 ml con 0.1 ml de formol al 10% y será la muestra en la que se determinará la lectura de la DO; los 0.2 ml restantes de la muestra se mezclan con 0.8 ml de tampón Z, se añade 5 ml de tolueno y se agita en el vórtex durante 20 s (el tolueno aumenta la permeabilidad de la pared celular y permite la salida de las moléculas de bajo peso molecular al exterior). Finalmente se evapora el tolueno agitando fuertemente los tubos durante unos 45 min.
- Cuando se han tomado todas las muestras se realiza la lectura espectrofotométrica de la DO de cada muestra a la longitud de onda adecuada (550 nm para LB).
- Cuando se ha evaporado el tolueno de los tubos, éstos se incuban en un baño de agua a 28°C y se procede a realizar el ensayo de β -galactosidasa.

Ensayo de β -galactosidasa

- Añadir a cada tubo 0.2 ml de ONPG (4 mg/ml en tampón fosfato 0.1 M pH 7) y agitar unos segundos y cronometrar el tiempo desde el momento en que se añade el ONPG.
- Una vez se haya desarrollado el color amarillo, se para la reacción añadiendo 0.5 ml de Na_2CO_3 1 M.
- Hacer la lectura espectrofotométrica de la DO a 420 nm y a 550 nm de cada muestra. Se realizan estas dos medidas, ya que a 420 nm se mide la absorción del o-nitrofenol y la dispersión debida a los restos celulares; y a 550 nm se determina únicamente la dispersión.
- Calcular las unidades de actividad enzimática de cada muestra según la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades Miller} = 1000 [\text{DO}_{420\text{nm}} - 1.75 (\text{DO}_{550\text{nm}})/T \times V \times \text{DO}_{550\text{nm}} \text{ cultivo}]$$

T = tiempo del ensayo en min

V = volumen de cultivo utilizado en ml

Las unidades Miller son un tipo de unidad arbitraria, en que una unidad de β -galactosidasa es la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 nmol de ONPG por min a 28°C a pH 7.

Soluciones

Tampón fosfato 0.1 M pH 7

Solución 1

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (Panreac) 0.1 M	6.9 g/500 ml H ₂ O
--	-------------------------------

Solución 2

Na ₂ HPO ₄ (Merck) 0.1 M	7.1 g /500 ml H ₂ O
--	--------------------------------

Mezclar las dos soluciones hasta llegar a un pH de 7.

Tampón Z

A 900 ml de agua ultrapura se le añaden:

NaH ₂ PO ₄ ·7H ₂ O (Panreac) (60 mM final)	16.1 g
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O(Merck) (40 mM final)	5.5 g
KCl (Panreac) (10 mM final)	0.75 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Panreac) (1 mM final)	0.246 g
β -mercaptoetanol (Merck) (50 mM final)	2.7 ml

Llevar a un volumen final de 1 l con agua ultrapura y mantener en la nevera a 4°C.

2.5. Métodos de manipulación de DNA

La mayoría de técnicas utilizadas en este trabajo están basadas en los protocolos de *Molecular cloning: a laboratory manual* (Sambrook *et al.*, 1989) y *Current protocols in molecular biology* (Ausubel *et al.*, 1995) con algunas modificaciones.

2.5.1. Extracción de DNA cromosómico

2.5.1.1. Miniextracción de DNA cromosómico

Este protocolo consiste en una lisis celular utilizando un detergente, seguida de la rotura de las proteínas mediante la proteinasa K. Los restos celulares, proteínas y polisacáridos son secuestrados y precipitados con un tratamiento con hexadecil trimetil bromuro de amonio (CTAB, SIGMA), se extraen con fenol/cloroformo/isoamílico y, finalmente, se recupera el DNA cromosómico por precipitación con 2-propanol (Panreac).

- Se parte de un cultivo de noche realizado en las condiciones óptimas para cada cepa.
- Centrifugar 1.5 ml de cultivo a 12 000 rpm durante 1-2 min.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 567 μ l de tampón TE. Agregar 30 μ l de SDS 10% (Sal sódica de dodecilsulfato) (Merck) y 3 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) (Roche Diagnostics S.L.). Mezclar por inversión e incubar a 37°C durante 1 h o hasta que se haya realizado la lisis celular.
- Añadir 100 μ l NaCl 5 M (AppliChem), mezclar vigorosamente y añadir 80 μ l de solución CTAB/NaCl, precalentada. Volver a mezclar e incubar a 65°C durante 10 min.
- Añadir 1 volumen de solución cloroformo/isoamílico, mezclar vigorosamente y centrifugar a 12 000 rpm durante 5 min.
- Transferir el sobrenadante a otro tubo, utilizando puntas de micropipeta previamente recortadas (para evitar el rompimiento mecánico del DNA),

agregar un volumen de fenol/cloroformo/isoamílico y mezclar vigorosamente.

- Centrifugar a 12 000 rpm durante 5 min y recuperar en otro tubo el sobrenadante. Repetir estos pasos de extracción con fenol/cloroformo/isoamílico hasta que la fase superior sea totalmente transparente y desaparezca la interfase.
- Hacer un paso con cloroformo/isoamílico para eliminar los restos de fenol. Recuperar el sobrenadante en otro tubo.
- Añadir 0.6 volúmenes de 2-propanol (Panreac) absoluto y mezclar por inversión. Se podrá observar la formación de filamentos (precipitado del DNA cromosómico).
- Centrifugar a 12 000 rpm durante 10 min.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 1 ml de etanol (Carlo Erba Reagenti) 70% frío, centrifugando durante 5 min a 12 000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante y secar al vacío en el *SpeedVac* (Savant).
- Añadir 50-100 μ l de tampón TE+RNasa y dejar hasta que se resuspenda a 37°C.

2.5.1.2. Maxiextracción de DNA cromosómico

Cuando se requieren mayores cantidades de DNA cromosómico, se realiza una extracción desde un volumen de cultivo mayor, adaptando las proporciones de las soluciones empleadas. La extracción se purifica por ultracentrifugación en un gradiente de CsCl.

- Seguir el mismo proceso que se utilizó para realizar la miniextracción hasta la precipitación con 2-propanol, aumentando las cantidades según el volumen de cultivo.
- Resuspender el precipitado de DNA cromosómico en tampón TE con RNasa, incubándolo a 37°C hasta su total disolución.
- Medir la concentración de DNA y ajustarla a 100 μ g/ml.
- Pesar 4.3 g de CsCl (Roche Diagnostics S.L.) y añadir 4 ml de suspensión de DNA y 400 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Roche

Diagnosics S.L.). Pasar a un tubo sellable de centrifuga (Beckman) y equilibrarlo exactamente con otro tubo que contenga CsCl. Sellar los tubos y centrifugar en un rotor VTi80 a 70 000 rpm durante 4 h, a 15°C o a 55 000 rpm durante 12-16 h.

- Visualizar el gradiente con una lámpara de luz ultravioleta y extraer la banda de DNA cromosómico con una aguja y jeringa estériles.
- Extraer el bromuro de etidio con lavados de 1-butanol (Panreac), añadiendo cada vez 1 volumen de 1-butanol y centrifugando a 12 000 rpm, hasta que la suspensión de DNA sea totalmente transparente.
- Dializar toda la noche la solución de DNA, utilizando una bolsa de diálisis, en 5 litros de agua ultrapura, para eliminar el CsCl. Pasar el contenido de la bolsa de diálisis a un tubo.

Soluciones

Tampón TE

A 97 ml de agua ultrapura se le añaden:

Solución de EDTA 0.5 M pH 8 (14.6125 g/100 ml) (AMRESCO)	2 ml
Solución de Tris-Cl 1 M pH 7.4 (AppliChem)	1 ml

Mezclar y esterilizar en el autoclave (121°C, 15 min).

Solución CTAB/NaCl

A 80 ml de agua ultrapura se le añaden:

NaCl (Panreac)	4.1 g
CTAB (Hexadecil trimetil bromuro de amonio) (SIGMA)	10 g

Mezclar y si es necesario calentar hasta 65°C hasta su total disolución. Llevar a un volumen final de 100 ml con agua ultrapura. Conservar a temperatura ambiente.

Solución Cloroformo/isoamílico

Triclorometano (Carlo Erba Reagenti)	480 ml
3-metil-1-butanol (Panreac))	20 ml

Solución Fenol/cloroformo/isoamílico

Solución cloroformo isoamílico	250 ml
Fenol (Panreac) bidestilado	250 ml
8-hidroxiquinoleína (Panreac)	0.25 g

Para preparar el fenol bidestilado, éste debe estar equilibrado a un pH superior a 7.8. Para esto se calienta el fenol con la 8-hidroxiquinoleína hasta que se licue, se le añade un volumen de tampón Tris-HCl 0.5 M (pH 8); se dejan separar las fases, se elimina la fase acuosa superior y se hacen lavados añadiendo un volumen de tampón Tris-HCl 0.1 M (pH 8) hasta llegar a un pH mayor a 7.8. Se conserva el fenol con 0.1 volúmenes de tampón Tris-HCl 0.1 M (pH 8) que contenga 0.2% de β -mercaptoetanol, a 4°C en una botella de vidrio oscura.

RNasa

A 987 μ l de agua ultrapura se le añaden

RNasa (Roche Diagnostics S.L.)	0.01 g
Solución de Tris-Cl 1 M pH 7.4 (AppliChem)	10 μ l
Solución NaCl 5 M (AppliChem)	3 μ l

Se mezcla hasta su total disolución y se calienta durante 15 min a 100°C. Se deja enfriar y se hacen alícuotas de 25 μ l que se mantienen a -20°C. Estas alícuotas se utilizan resuspendidas con 500 μ l de TE.

2.5.2. Extracción de DNA plasmídico

2.5.2.1. Miniextracción de DNA plasmídico

Esta técnica se basa en el protocolo de lisis alcalina (Birboim y Doly, 1979), utilizando SDS como detergente y NaOH. Se neutraliza con acetato de potasio, se desproteíniza con fenol y se precipita el DNA plasmídico con etanol.

- Se parte de un cultivo de noche crecido en las condiciones óptimas para cada cepa.
- Centrifugar 1.5 ml de cultivo a 12 000 rpm durante 1 a 2 min.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender en 100 µl de solución I fría.
- Añadir 200 µl de solución II y mezclar por inversión, hasta que se obtenga una solución viscosa (por la lisis celular). Mantener 5 min en hielo.
- Añadir 150 µl de solución III y mezclar por inversión vigorosamente hasta que se forme un precipitado blanquecino. Mantener de 5-10 min en hielo.
- Centrifugar 5 min a 12 000 rpm.
- Transferir la fase acuosa a un tubo, sin arrastrar la interfase.
- Añadir 1 volumen de fenol/cloroformo/isoamílico y mezclar hasta tener una emulsión homogénea.
- Centrifugar durante 5 min a 12 000 rpm.
- Hacer otro pase de fenol/cloroformo/isoamílico y volver a transferir la fase acuosa a otro tubo.
- Añadir un volumen de cloroformo/isoamílico y agitar enérgicamente.
- Centrifugar durante 5 min a 12 000 rpm.
- Transferir la fase superior acuosa a otro tubo y añadir 2 volúmenes de etanol absoluto frío, mezclar por inversión y dejar precipitando a -80°C durante 20-30 min.
- Centrifugar a 4°C a 12 000 rpm durante 10 min.
- Eliminar el sobrenadante y realizar un lavado con etanol 70% frío.
- Eliminar el sobrenadante y secar al vacío en el *SpeedVac* (Savant).

- Resuspender en 20-30 μ l de tampón TE con RNasa y dejar incubando a 37°C durante 45 min. Se conserva a -20°C.

2.5.2.2. Maxiextracción de DNA plasmídico

Cuando se requieren mayores cantidades de DNA plasmídico, se realiza una extracción desde un volumen de cultivo mayor, adaptando las proporciones de las soluciones empleadas. La extracción se puede purificar por ultracentrifugación en un gradiente de CsCl o por columna.

- Realizar el mismo proceso que se utilizó para realizar la miniextracción aumentando las cantidades según el volumen de cultivo, hasta añadir la solución III.
- Centrifugar durante 15 min y recuperar la fase acuosa superior.
- Añadir 0.6 volúmenes de 2-propanol absoluto (Panreac), mezclar por inversión y dejar 15 min a temperatura ambiente. Se formará un precipitado de color blanquecino.
- Centrifugar, eliminar el sobrenadante y dejar que se seque el precipitado y se evapore totalmente el 2-propanol.
- Resuspender el precipitado de DNA plasmídico en tampón TE con RNasa, incubándolo a 37°C hasta su total disolución.

A partir de este punto el DNA puede purificarse por ultracentrifugación en un gradiente de CsCl o por columna.

Purificación por ultracentrifugación en un gradiente de CsCl

Es el mismo proceso que se utilizó para la extracción de DNA cromosómico. El único cambio que se realiza es que la cantidad de CsCl que se utiliza es de 4.4 g en lugar de 4.3 g y que la ultracentrifugación se realiza a 20°C.

Purificación por columna

Este método se basa en la utilización de una resina que secuestra el DNA, el mismo que es posteriormente purificado a través de una columna *Wizard* de Promega, con un lavado con etanol al 70%. Finalmente se eluye el DNA con tampón TE caliente.

- Repartir 500 μ l de solución de DNA plasmídico en un tubo eppendorf.
- Añadir 1 ml de tierra de diatomeas, mezclar por inversión y esperar 5 min.
- Transferir el contenido a una jeringa, colocada sobre una columna de purificación *Wizard Minicolumn* (Promega) y pasar a través del filtro.
- Extraer la jeringa de la columna. Volver a conectar la jeringa a la columna y pasar 2 ml de etanol 70%.
- Centrifugar la columna a 12 000 rpm durante 5 min para eliminar todos los restos de etanol.
- Añadir de 20-50 μ l de tampón TE caliente a la columna y esperar 5 min para eluir el DNA.
- Centrifugar la columna dentro de un tubo eppendorf y recoger el contenido del tubo, donde estará eluido el DNA.

Soluciones

Solución I

Se prepara una solución *stock* que se mantiene a temperatura ambiente. La solución para uso se preparará diluyendo la solución *stock* 1:1 con agua ultrapura.

A 910 ml de agua ultrapura se le añaden:

Solución de Tris-Cl 1 M pH 8 (AppliChem)	50 ml
Solución de EDTA 0.5 M pH 8 (14.6125 g/100 ml) (AMRESCO)	40 ml

Se mezclan los componentes y se esteriliza en el autoclave (121°C 15 min)

Solución II

A 44 ml de agua ultrapura se le añaden:

SDS 10% (Merck)	5 ml
NaOH 10 N (40 g/100 ml) (Panreac)	1 ml

Solución III

A 200 ml de agua ultrapura se le añaden:

Acetato potásico 5 M (294.4 g/600 ml) (Panreac)	600 ml
Ácido acético glacial (Panreac)	115 ml

Mezclar los componentes y ajustar el pH a 4.8. Llevar a un volumen final de 1 l con agua ultrapura.

Tierra de diatomeas

Tierra de diatomeas (SIGMA)	3.5 g
Hidrocloreuro de guanidina (SIGMA)	100 g
Solución de Tris-Cl 1 M pH 7.4 (AppliChem)	8.75 ml
Solución de EDTA 0.5 M pH 8 (14.6125 g/ 100 ml)(AMRESCO)	14 ml

- Diluir en 50 ml de agua ultrapura la tierra de diatomeas y dejar precipitando por lo menos 3 h. Una vez haya sedimentado completamente la tierra de diatomeas, eliminar el sobrenadante.
- Añadir a 50 ml de agua ultrapura, el hidrocloreuro de guanidina, la solución de EDTA y la solución de Tris-Cl, disolver completamente y llevar a un volumen final de 175 ml con agua ultrapura.
- Añadir esta solución al sedimento de la tierra de diatomeas y mezclar.
- Guardar en una botella protegida de la luz a temperatura ambiente.
- Cuando se utilice la resina, agitarla vigorosamente, para que esté lo más homogénea posible.

2.5.3. Digestión con enzimas de restricción

La digestión de DNA utilizando enzimas de restricción es uno de los métodos más comunes en biología molecular. Se basa en que las endonucleasas de restricción reconocen pequeñas secuencias de DNA (dianas) y cortan el DNA de doble cadena en un sitio específico que está dentro o cerca de esta secuencia diana. Algunos de los factores importantes que deben tenerse en cuenta, para obtener buenos resultados son: la pureza y cantidad del DNA, la temperatura y el tiempo de digestión, los tampones específicos para cada enzima y sus componentes. En este trabajo se han utilizado las enzimas y sus respectivos tampones, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Roche Diagnostics S.L.).

- Añadir en un tubo eppendorf un volumen determinado de una solución de DNA, el tampón de restricción (10 x) en una relación 1:10 con el volumen final de la reacción de digestión y agua ultrapura hasta completar el volumen final.
- Añadir 0.2 a 0.5 unidades de enzima de restricción, teniendo en cuenta que una unidad de enzima es la cantidad que puede digerir 1 μ g de DNA del bacteriófago λ en 1 h.
- Mezclar bien y dar un pulso en la microcentrífuga. Incubar a la temperatura adecuada de 1 a 12 horas.

Consideraciones:

- Si después del tiempo de incubación queda DNA por cortar, se puede añadir más enzima o continuar la incubación un tiempo adicional.
- Se pueden ajustar las condiciones a grandes volúmenes de digestión, manteniendo las proporciones de los diferentes componentes.
- Para realizar digestiones con más de una enzima, se tiene que tener en cuenta los tampones para cada enzima y en caso de que no coincida el mismo tampón para las dos enzimas, se debe realizar, cuando sea posible, la digestión con el tampón que tenga menor concentración salina. Después de esta primera reacción, se añade el

otro tampón y la segunda enzima, manteniendo siempre las proporciones.

- El DNA cromosómico es más difícil de digerir, ya que puede tener mayor cantidad de impurezas y se tienen que utilizar cantidades de enzima con relación al tamaño y cantidad de DNA.
- Utilizando esta técnica pueden construirse mapas de restricción de DNA. El DNA es cortado con varias enzimas por separado o combinándolas entre sí y los productos resultantes pueden ser visualizados por electroforesis en geles de agarosa. Determinando los tamaños de los fragmentos de restricción producidos por las diferentes digestiones, se puede deducir el mapa de restricción del DNA que interese.

2.5.4. Electroforesis de DNA

2.5.4.1. Geles de agarosa

Esta técnica se utiliza para separar e identificar fragmentos de DNA y también permite aislar dichos fragmentos a partir de una mezcla heterogénea. La electroforesis está basada en que el DNA a pH neutro tiene carga negativa, por lo cual al ser sometido a un campo eléctrico migra hacia el polo positivo. Dependiendo de la concentración de agarosa del gel pueden identificarse fragmentos de DNA de diferente peso molecular. La visualización de las bandas de DNA se realiza por la irradiación de los geles con luz ultravioleta, que provoca la fluorescencia del bromuro de etidio, que es utilizado como agente intercalante.

Consideraciones:

- Longitud del DNA: Las moléculas de DNA lineal migran a una velocidad inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular, de manera que así puede determinarse la longitud de un fragmento dado de DNA. Para ello se utilizan diferentes marcadores de peso molecular que son DNA fágico (λ o ϕ)

cortado con alguna enzima. Los marcadores de peso molecular (kb) utilizados en este trabajo han sido:

$\lambda \perp$ <i>Hind</i> III	23.13,	9.416,	6.557,	4.361,	2.322,	2.027,	0.564,	0.125												
$\lambda \perp$ <i>Bst</i> EII	8.543,	7.242,	6.369,	5.687,	4.822,	4.234,	3.675,	2.323,	1.929,	1.371,	1.264,	0.702,	0.224,	0.117						
$\phi \perp$ <i>Hin</i> fI	0.726,	0.713,	0.553,	0.500,	0.427,	0.417,	0.413,	0.311,	0.249,	0.200,	0.151,	0.140,	0.118,	0.100,	0.082,	0.066,	0.048,	0.042,	0.040,	0.024

- Conformación estructural del DNA: Una misma molécula de DNA plasmídico puede presentar tres formas diferentes (DNA circular cerrado, DNA lineal o DNA circular relajado) y cada una de estas formas presenta una movilidad electroforética diferente.
- Porosidad de un gel: Un fragmento de DNA se mueve a una velocidad directamente proporcional a la porosidad del gel. Los geles de agarosa pueden utilizarse para separar fragmentos de 70 pb (agarosa al 3%) hasta 80 kb (agarosa al 0.1%).
- Corriente aplicada: La velocidad de la migración de los fragmentos es directamente proporcional al voltaje aplicado. Para obtener una buena resolución de los fragmentos de DNA no se debería superar los 5 V/cm.
- Límite de detección: La cantidad mínima de DNA que puede ser detectada en un gel de agarosa es de 10 ng.

- Tipo de agarosa: Pueden utilizarse dos tipos de agarosa diferente según el tamaño de los fragmentos de DNA y su utilización posterior. En caso de que se trate de fragmentos de pequeño tamaño que vayan a ser purificados, lo más adecuado es utilizar agarosa de bajo punto de fusión (LM-sieve PRONADISA). Para el resto de aplicaciones se emplea normalmente agarosa para biología molecular (Roche Diagnostics S.L.).
- Pesar la cantidad de agarosa en polvo y añadir el volumen de tampón de electroforesis (1 x TAE).

Las concentraciones recomendadas de agarosa según el rango de resolución de los fragmentos lineales de DNA (kb) son las siguientes:

% Agarosa	kb de fragmentos de DNA
0.3	60 - 5
0.5	30 - 1
0.7	12 - 0.8
1.0	10 - 0.5
1.2	7 - 0.4
1.5	3 - 0.2
2.0	3 - 0.1

- Calentar hasta fundir la agarosa, evitando que llegue a la ebullición.
- Atemperar la solución a 50°C aproximadamente y añadir bromuro de etidio (Roche Diagnostics S.L.) a una concentración final de 0.5 µg/ml (a partir de una solución concentrada a 10 mg/ml).
- Verter la solución en el soporte del gel, con los extremos sellados con cinta adhesiva. Colocar uno o más peines de acuerdo al DNA que se desee cargar y esperar a que se solidifique.
- Quitar el/los peines y colocar el soporte en una cubeta de electroforesis llena de tampón 1 x TAE.

- Cargar las muestras de DNA en los pozos del gel. Para preparar las muestras se utiliza solución transportadora 6 x en una relación 1:5 con respecto al volumen final de DNA.
- Aplicar un voltaje constante entre 20 y 80 voltios. El tiempo de la electroforesis dependerá del tamaño de los fragmentos de DNA que se quieran identificar o separar.
- Visualizar el gel con un transiluminador de luz ultravioleta (302 nm).
- Una vez acabada la electroforesis, puede fotografiarse el gel, utilizando una cámara polaroid o mediante un digitalizador de imágenes.

Soluciones

Tampón 50 x TAE

Añadir a 750 ml de agua ultrapura:

Trizma Base (SIGMA)	242 g
Solución de EDTA 0.5 M pH 8 (14.6125 g/100 ml) (AMRESCO)	100 ml
Ácido acético glacial (Panreac)	57 ml

Mezclar hasta su completa disolución y llevar a un volumen final de 1 l con agua ultrapura.

Solución transportadora 6 x

Añadir a 90 ml de agua ultrapura

Glicerol (Scahrlau)	30 g
Xilencianol (Clontech)	0.25 g
Azul de bromofenol (Panreac)	0.25 g
Solución de EDTA 0.5 M pH 8 (14.6125 g/100 ml) (AMRESCO)	2 ml

Disolver el glicerol y los colorantes, añadir la solución de EDTA y esterilizarlo en el autoclave (121°C 15 min).

2.5.4.2. Cuantificación de DNA

Existen varios métodos para cuantificar la cantidad de DNA, el método utilizado en este trabajo ha sido el de fluorescencia en geles de agarosa. Este método está basado en que la intensidad de la fluorescencia debida al agente intercalante (bromuro de etidio) es proporcional a la concentración de DNA. El método consiste en cargar diferentes diluciones de la solución de DNA en un gel de agarosa con bromuro de etidio. Paralelamente se carga un patrón de concentración conocida y se hace una comparación con la muestra. No es un método muy exacto, pero puede utilizarse rutinariamente.

2.5.5. Clonación en vectores plasmídicos

Este método es muy utilizado en biología molecular. El vector debe ser digerido por una enzima de restricción para luego poder unirlo al DNA externo (producto de PCR, fragmento de DNA producto de una digestión, etc.). Por un lado debe prepararse el vector en que se realizará la clonación y por otro se deberá preparar el inserto, teniendo en cuenta las incompatibilidades entre los extremos y las cantidades de cada uno, para posteriormente proceder a ligarlos. El producto de la ligación será introducido mediante transformación a células competentes y los transformantes serán identificados por una selección adecuada, haciéndolos crecer en placas selectivas. Finalmente, mediante la extracción del DNA introducido y su análisis por restricción se comprobará que se tiene la construcción deseada.

2.5.5.1. Purificación de fragmentos de DNA

Para realizar la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa (productos de PCR, fragmentos de digestiones, etc.), debe tenerse en cuenta los posibles agentes contaminantes presentes en los geles de agarosa y el bajo rendimiento de la recuperación de los fragmentos. Es importante que el fragmento que se desea aislar tenga una movilidad electroforética diferenciada del resto de fragmentos. Ello evitará

contaminaciones del fragmento que se pretende obtener con otros no deseables.

2.5.5.1.1. Purificación por columna

Este método se utiliza para recuperar fragmentos de DNA de diferentes tamaños, ya sean estos productos de PCR, digestiones de DNA, etc. Dependiendo del tamaño del fragmento se utilizan diferentes tipos de resina. Los de tamaño pequeño así como los productos de PCR se recuperan utilizando la resina *Wizard PCR Preps DNA Purification Resin* (Promega), mientras que para los de mayor tamaño se utiliza como resina, la tierra de diatomeas. La técnica se basa en que el DNA se une a la resina y es secuestrado en el filtro de la columna. Luego se eliminan los posibles contaminantes y restos de agarosa con 2-propanol mediante centrifugación y posteriormente el DNA es eluido del complejo que había formado con la resina con agua ultrapura caliente y recuperado por centrifugación.

- Recuperar la región del gel de agarosa que contiene el fragmento de DNA e introducirla en un tubo eppendorf para pesarla.
- Añadir de 2 a 3 volúmenes de solución de NaI 6 M (Panreac).
- Incubar en un baño de agua a 45-55°C hasta que la agarosa esté completamente fundida.
- Repartir el contenido en tubos eppendorf, de manera que se tengan 500 µl en cada tubo y añadir 800 µl de resina, dependiendo del tamaño del fragmento, mezclar por inversión y esperar 5 min.
- Transferir el contenido del eppendorf a una jeringa montada sobre una columna de purificación de DNA *Wizard* de Promega, colocar el émbolo y pasar por la columna.
- Sacar la jeringa, volver a montarla y pasar 3 ml de 2-propanol (Panreac) al 80%, por la columna que tiene el complejo DNA-resina.
- Centrifugar la columna durante 5 min en un tubo eppendorf para eliminar todos los restos de 2-propanol.

- Añadir a la columna de 15 a 40 μl de agua ultrapura calentada a 55°C y esperar 5 min. Centrifugar la columna en otro tubo eppendorf durante 5 min y así se consigue eluir el DNA.

2.5.5.2. Preparación del vector y del inserto

El vector que se desee utilizar será digerido previamente por una o más enzimas de restricción y linearizado. Para evitar posibles recircularizaciones del mismo al realizar la ligación, después de la digestión se realiza un proceso de defosforilación para eliminar los grupos fosfato del extremo 5'.

El inserto normalmente será un producto de PCR o un fragmento de una restricción, por lo tanto al igual que el vector, podrá tener dianas de restricción en los extremos. Dependiendo de la compatibilidad de las dianas, ya que éstas pueden generar extremos romos o extremos cohesivos, se deberán rellenar los extremos del inserto, del vector o de ambos.

Después de haber sometido el DNA a una digestión, a una defosforilación o a un rellenado de extremos puede purificarse por extracción con fenol y precipitación final.

Defosforilación del producto de una restricción

El proceso que se describe a continuación se ha utilizado para la defosforilación de un producto de una restricción de DNA con un volumen final de 100 μl . Las cantidades pueden ser adaptadas a otros volúmenes finales.

- Añadir en un tubo eppendorf 100 μl de producto de restricción de DNA, 20 μl de tampón de fosfatasa alcalina (10 x) (Roche Diagnostics S.L.), 80 μl de agua ultrapura y 1 μl de fosfatasa alcalina (1 unidad/ μl) (Roche Diagnostics S.L.).

- Mezclar bien y dar un pulso en la microcentrífuga. Incubar a 37°C durante 30 min.
- Añadir 1 µl de enzima e incubar a 37°C durante 30 min adicionales.
- Detener la reacción, incubando durante 10 min a 70°C.

Rellenado de extremos

Mediante la aplicación de esta técnica, se pretende conseguir fragmentos de DNA con extremos romos. Este protocolo está adaptado a un volumen final de 100 µl, rellenando 5 µg de DNA en disolución, pero estas cantidades pueden ser modificadas para otros volúmenes, manteniendo siempre las proporciones.

- Añadir el volumen de DNA en solución, 20 µl de tampón de DNA polimerasa del T4 (5 x) (Roche Diagnostics S.L.), 20 µl de la mezcla de dNTPS (5 x) (Roche Diagnostics S.L.), 5 µl de DNA polimerasa del T4 (1 unidad/µl) (Roche Diagnostics S.L.) y la cantidad necesaria de agua ultrapura para llegar a un volumen final de 100 µl.
- Incubar a 37°C durante 15 min.
- Inactivar la reacción incubándola 10 min a 70°C.

Precipitación de DNA

Este protocolo permite obtener DNA purificado, después de que éste haya sido sometido a cualquier reacción (digestión, rellenado de extremos, defosforilación, etc.).

- Llevar el volumen de la reacción a 400 µl con agua ultrapura.
- Realizar un lavado con un volumen de fenol/cloroformo/isoamílico. Mezclar bien y centrifugar durante 5 min.
- Recuperar el sobrenadante y añadir un volumen de cloroformo/isoamílico. Mezclar bien y centrifugar durante 3 min.

- Recuperar la fase superior y añadir 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M (Merck).
- Dejar precipitando a -80°C de 1 a 12 h.
- Centrifugar a 4°C , eliminar el sobrenadante y lavar con 1 ml de etanol 70%.
- Centrifugar 10 min a 4°C y secar el sedimento al vacío.
- Resuspender el DNA en 20-30 μl de TE.

2.5.5.3. Reacción de ligación

Las diferentes reacciones de ligación se realizan entre un vector plasmídico linearizado y un fragmento de DNA. Se utiliza una enzima, que es la DNA ligasa del T4 (Promega), capaz de catalizar la formación de uniones fosfodiéster entre los extremos terminales 5'-fosfato y 3'-hidroxil en DNA de doble cadena. Permite la unión de fragmentos de restricción que tengan extremos cohesivos o romos. La reacción depende de la concentración de extremos compatibles entre el vector y el inserto. Se debe contar con una misma proporción de extremos de los dos DNAs, por lo que no solamente se tiene presente la concentración de DNA que reacciona, sino también el tamaño de cada molécula. Cuando se trata de una reacción entre fragmentos con extremos cohesivos, la relación vector-inserto será 1:2; si la reacción es entre extremos romos, la relación vector-inserto será de 1:1. Se utiliza un tampón 2 x (Promega) y las reacciones se realizan en 2 h a temperatura ambiente.

Para calcular las cantidades de vector e inserto se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{ng de inserto} = [(\text{ng de vector} \times \text{kb de inserto}) / \text{kb de vector}] \times \text{relación inserto/vector}$$

- Mezclar en un tubo eppendorf 2.5 μl de tampón de ligasa 2 x (Promega), el volumen de vector y de inserto de manera que se tenga la relación adecuada, 0.5 μl de DNA ligasa del T4 (Promega) y la cantidad de agua ultrapura hasta obtener un volumen final de 5 μl .

- Incubar la mezcla durante 2 h o más a temperatura ambiente.
- Inactivar la reacción, incubándola durante 10 min a 70°C.

Consideraciones:

- Se puede variar el volumen final de reacción si se mantiene la relación de los componentes.
- Para una mayor eficiencia se puede aumentar el tiempo de incubación de la ligación.
- Se pueden realizar recircularizaciones de un solo fragmento cortado, en este caso se mantendrán las mismas condiciones de ligación y solamente se utilizará el DNA que interese.
- Se utiliza el vector pGEM-T[®] de Promega para clonar productos de PCR. El vector preparado es provisto por el fabricante, está cortado con la enzima *EcoRV* y contiene timidina en ambos extremos terminales 3'. Esto mejora la eficiencia de ligación de un producto de PCR en el plásmido, previniendo la recircularización del vector y además es compatible con muchos productos de PCR (utilizando la *Taq* polimerasa) que añaden una deoxiadenina a su extremo 3'. Este vector además contiene los promotores del T7 y de la RNA polimerasa del SP6 flanqueando el MCS (*Multiple Cloning Site*) dentro de la región codificante α -peptídica de la enzima β -galactosidasa. Al insertar un fragmento, la región α -peptídica se inactiva, de manera que los clones recombinantes pueden identificarse directamente por el color utilizando placas selectivas que contengan X-gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) (Apollo). El MCS (*Multiple Cloning Site*) tiene varias dianas de restricción que permiten liberar los insertos por digestión con diferentes enzimas que cortan una sola vez en el vector. Contiene además las secuencias dianas de los oligonucleótidos universales Direct y Reverse que serán utilizados para amplificar los fragmentos, los cuales pueden ser posteriormente secuenciados mediante el método dideoxi

(Sanger *et al.*, 1977) en un secuenciador ALFexpress (Amersham Pharmacia Biotech).

2.5.6. Amplificación de DNA

2.5.6.1. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La PCR, reacción en cadena de la polimerasa, permite la amplificación de fragmentos específicos de DNA entre dos regiones de secuencia conocida. Es una de las técnicas más utilizadas en la biología molecular y tiene muchas aplicaciones: clonación, mutagénesis, ensayos para determinar la presencia de patógenos, diversos campos del diagnóstico clínico, secuenciación de DNA, etc.

Básicamente la reacción consiste en la realización de una mezcla que contiene el DNA molde de doble cadena, a partir del cual se quiere amplificar un fragmento, dos oligonucleótidos que flanquean la región que se desea amplificar, una mezcla de DNA polimerasas [*Expand High Fidelity System* (*Taq* y *Tog* DNA polimerasas)], un tampón apropiado para esta enzima y los cuatro dNTPs (2'deoxiribonucleósido-5'trifosfato de adenosina, citidina, guanosidina y timidina). El siguiente paso consiste en la repetición de un ciclo que comprende tres fases: la fase de desnaturalización del DNA molde, en la que se calienta la mezcla hasta permitir que la doble cadena del DNA molde se abra; la fase de anillamiento de los oligonucleótidos con la secuencia diana, en la que se utiliza una temperatura adecuada para el funcionamiento ideal de los oligonucleótidos; y finalmente la fase de extensión con la DNA polimerasa. En el primer ciclo se producen cadenas de longitud indeterminada, que sirven igual que el DNA molde inicial y se pueden anillar con los oligonucleótidos y a partir del segundo ciclo se producen cadenas de la longitud del fragmento que se quiere amplificar. Generalmente, se repite 30 veces cada uno de los ciclos de amplificación, aunque se puede aumentar el número de ciclos si se pretende amplificar fragmentos muy grandes. En cada uno de los ciclos se obtiene más DNA molde, de manera que se logra una amplificación exponencial del fragmento

de DNA. En este trabajo se ha utilizado el *Expand High Fidelity PCR System* de Roche Diagnostics S.L., que proporciona la enzima y su respectivo tampón y el termociclador empleado para realizar los ciclos de temperatura es un *Mastercycler personal* de Eppendorf.

Entre los parámetros más importantes a controlar en la amplificación de DNA por PCR cabe destacar:

- Los oligonucleótidos deben ser secuencias complementarias al fragmento de DNA que interese amplificar, de manera que cada uno de ellos hibride con una de las cadenas del DNA molde. Las secuencias de los oligonucleótidos podrán variar del DNA molde, si se desea generar mutaciones en el producto de amplificación o bien si se quiere añadir secuencias dianas de restricción. Los dos oligonucleótidos deben estar adecuadamente orientados de manera que cuando la polimerasa actúe en dirección 5'→3', extienda el fragmento de DNA contenido entre ambos oligonucleótidos. Además se espera que sean específicos para dicho fragmento de DNA y no se obtengan amplificaciones inespecíficas, fruto de la hibridación de los oligonucleótidos con otras regiones del DNA molde. Deben diseñarse oligonucleótidos de una extensión aproximada de 20-30 nucleótidos, procurando evitar la formación de dímeros y estructuras secundarias entre las secuencias de los dos oligonucleótidos. Asimismo, las temperaturas de anillamiento deben ser parecidas, intentando que no tengan más de 5 a 10°C de diferencia entre sí. Es también recomendable que el extremo 5' sea rico en GC, y que la distancia entre los dos oligonucleótidos no sea demasiado alta, ya que fragmentos de más de 5 kb son muy difíciles de amplificar.
- El DNA molde puede ser DNA cromosómico o plasmídico con un buen grado de purificación de manera que esté libre de inhibidores de la DNA polimerasa, como detergentes, alcoholes

y otros productos. La cantidad de DNA debe ser suficiente para poder detectar el producto, pero el exceso de DNA molde, puede producir inhibiciones de la reacción.

- Los dNTPs se utilizan en una concentración de saturación, pero su exceso puede quelar el magnesio, que es uno de los iones claves en la reacción de amplificación. Es recomendable que se parta de una mezcla homogénea de los cuatro dNTPs.
- El tampón de reacción debe ser el adecuado para la enzima que se utilice. Es también importante mantener la cantidad adecuada según el volumen final de la reacción, siendo clave el contenido de iones de magnesio. En algunos casos se tendrá que ajustar la concentración de estos iones para obtener un rendimiento óptimo.
- En este trabajo se ha utilizado el *Expand High Fidelity PCR System* (Roche Diagnostics S.L.) que combina dos polimerasas, la *Taq* DNA polimerasa y la *Tgo* DNA polimerasa. Ambas tienen actividad polimerasa 5'→3' y además la *Tgo* DNA polimerasa también tiene actividad exonucleasa 3'→5'. Ello mejora los resultados de la PCR ya que el sistema no es tan sensible a la variación de la concentración de iones magnesio y tiene una mayor fidelidad. Además acepta nucleótidos modificados por digoxigenina, biotina y fluoresceína. La cantidad necesaria de estas enzimas para una reacción de PCR es mínima y su exceso puede dar lugar a la amplificación de fragmentos inespecíficos.
- El tiempo y la duración de los ciclos deben permitir en cada fase una completa desnaturalización, un anillamiento estable de los oligonucleótidos y una extensión completa. Además el tiempo que transcurre en el cambio de temperaturas entre los ciclos dependerá de la eficiencia del termociclador utilizado. Normalmente previamente a la serie de 30 ciclos, se realiza un ciclo de desnaturalización que dura 5 min a 95°C y al final de los 30 ciclos se hace un ciclo adicional de extensión de 7 min a la temperatura de extensión. Las temperaturas empleadas para

las PCR varían según la reacción. Generalmente se realiza la desnaturalización a 95°C y durante 1 min. La temperatura de anillamiento depende de los oligonucleótidos que se utilicen, siendo normalmente 3°C superior a la temperatura del oligonucleótido que tenga la temperatura de fusión más baja. El tiempo de anillamiento también es de 1 min. La temperatura de extensión puede variar entre 68 y 72°C. Es mayor si la temperatura de anillamiento es más alta. El tiempo de extensión depende del tamaño del fragmento que se quiera amplificar. Generalmente será de 1 min por cada kb a amplificar, utilizando como mínimo un tiempo de un minuto. Finalmente se programa un ciclo final para la conservación a 4°C por tiempo indefinido.

El protocolo habitual utilizado para un volumen final de 25 µl de reacción de PCR es el siguiente:

- Se utilizará todo el material previamente irradiado con luz ultravioleta en una cámara de flujo vertical para PCR (FLV60 Euro Aire) y mantenido en hielo.
- Mezclar en un tubo de 0.5 ml de capacidad:
 - 2.5 µl de tampón de PCR 10 x (*Expand High Fidelity*) (Roche Diagnostics S.L.)
 - 2.5 µl de mezcla de dNTPs (2 mM c/dNTP) (Roche Diagnostics S.L.)
 - 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos (10 pmol/µl)
 - 0.2 µl de la enzima (3.5 unidades/µl) (*Expand High Fidelity*) (Roche Diagnostics S.L.)Agua ultrapura hasta llegar a un volumen final de 25 µl.
- Añadir 0.2 µl de DNA molde (1 µg/µl), mezclar bien y dar un pulso en la microcentrífuga.
- Programar el termociclador según la reacción de PCR que se quiera realizar.
- Colocar los tubos en el termociclador y poner en marcha el programa.

2.5.6.2. Secuenciación

El método utilizado en este trabajo para secuenciar fragmentos de DNA es el de Sanger (1977) modificado y comprende un marcaje utilizando el *fmol*[®]*DNA Sequencing System* de Promega, con oligonucleótidos marcados con Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech) y posteriormente la secuenciación en un gel de acrilamida utilizando el *ALFexpress*[™]*DNA Sequencer* (Amersham Pharmacia Biotech).

El *fmol*[®]*DNA Sequencing System* es un método para análisis de secuencias que utiliza la *Taq* DNA polimerasa, que tiene la capacidad de extender un oligonucleótido e hibridar con el DNA molde hasta que se incorpora un nucleótido de terminación. Cada determinación de una secuencia consiste de cuatro reacciones individuales, cada una de las cuales contiene los cuatro deoxiribonucleósido trifosfatos (dNTP), suplementado con una cantidad limitante de un dideoxiribonucleósido trifosfato diferente (ddNTP). Como a los ddNTP les falta el grupo OH en el extremo 3', necesario para la elongación de la cadena, el oligonucleótido que se obtiene termina selectivamente en una G, A, T o C según el dideoxi análogo que hay en la reacción. La concentración relativa de cada dNTPs y ddNTPs puede ser ajustada para dar lugar a varias cadenas terminadas de cientos a miles de bases. Los fragmentos finales que empiezan en el mismo sitio, pero acaban en un nucleótido diferente, se separan por tamaño en un gel desnaturalizante de electroforesis de alta resolución. La incorporación de una marca fluorescente (con los oligonucleótidos marcados con Cy5) permite la visualización de la secuencia en el gel utilizando el *ALFexpress*[™]*DNA Sequencer*. Durante la electroforesis, los fragmentos marcados en cada pozo, migran por el gel y un láser excita las bandas fluorescentes y la luz emitida es detectada por unos fotodetectores. Las señales son recogidas, digitalizadas y enviadas a un ordenador para ser guardadas y procesadas, utilizando el software proporcionado por el fabricante (Amersham Pharmacia Biotech).

Las PCRs de marcaje con el kit, se realizaron según las instrucciones del fabricante.

2.5.7. Southern blotting

Este método consiste en la transferencia de fragmentos de DNA desde un gel de electroforesis a una membrana. La transferencia permitirá la inmovilización de los fragmentos, de manera que la membrana tendrá una reproducción del patrón de bandas del gel. Tras aplicar un método de fijación del DNA a la membrana, se podrá hibridar con una sonda marcada, de manera que la marca pueda ser detectada con algún método de revelado (Southern, 1975) (Roche Diagnostics S.L.).

2.5.7.1. Transferencia a membrana

Los fragmentos de DNA que se han separado por electroforesis en un gel de agarosa se transfieren a una membrana de nylon cargada positivamente después de depurinizar, desnaturalizar y neutralizar el DNA en el gel. Para ello se utiliza un aparato de transferencia y una bomba de vacío. Finalmente, el DNA es inmovilizado en la membrana mediante radiación ultravioleta. El protocolo es el siguiente.

- Preparar la unidad de transferencia al vacío (*VacuGene XL* de Pharmacia Biotech) con una membrana de nylon cargada positivamente (*Biodyne[®]B Membrane*, 0.45 μm de PALL Gelman Laboratories) del tamaño adecuado al gel y a la ventana.
- Colocar el gel de agarosa sobre la membrana, cuidando de que haga vacío.
- Poner sobre el gel solución depurinizante hasta taparlo completamente.
- Encender la bomba al vacío manteniéndola a 40 cm de H₂O y dejar 4 min para que se realice la depurinización. Eliminar esta solución.
- Poner la solución desnaturalizante hasta cubrir el gel de agarosa completamente y dejar actuar durante 3 min. Eliminar la solución

- Poner la solución de neutralización hasta cubrir el gel del agarosa y dejar actuar durante 3 min. Eliminar completamente la solución.
- Añadir la solución de transferencia (20 x SSC) a la unidad de transferencia hasta cubrir completamente el grosor del gel y dejarla actuar durante 30 a 60 min.
- Eliminar la solución de transferencia con la bomba todavía en marcha y sacar el gel de agarosa.
- Parar la bomba de vacío y sacar la membrana, poniéndola a secar en papel 3MM. Marcarla para posicionar la transferencia.
- Fijar el DNA a la membrana utilizando el *UV Stratalinker 2400* (Stratagene)

Es importante utilizar en el gel de agarosa un marcador de peso molecular marcado con digoxigenina, para poder identificar los tamaños de los diferentes fragmentos de DNA.

Soluciones

Solución depurinizante

A 950 ml de agua destilada se le añaden

HCl 37%	22 ml
---------	-------

Mezclar la solución, ajustar el pH a 1 y llevar a un volumen final de 1 l con agua destilada.

Solución de desnaturalización

A 900 ml de agua destilada se le añaden:

NaCl 37% (Panreac)	87.6 g
NaOH (Panreac)	20.0 g

Mezclar hasta su total disolución, ajustar el pH a 10 y llevar a un volumen final de 1 l con agua destilada.

Solución de neutralización

A 300 ml de agua destilada se le añaden

Solución de Tris-Cl 1 M pH 7.0 (AppliChem)	500 ml
NaCl (Panreac)	175.2 g

Mezclar bien y llevar a un volumen final de 1 l con agua destilada.

Solución de transferencia (20 x SSC)

A 700 ml de agua destilada se le añaden:

NaCl (Panreac)	175 g
Citrato tri-sodio dihidrato (Merck)	88.2 g

Mezclar hasta su completa disolución, llevar a un volumen final de 1 l con agua destilada y esterilizar en el autoclave (121°C 15 min)

2.5.7.2. Marcaje de sondas

El método utilizado para marcar fragmentos de DNA que puedan ser utilizados como sondas en ensayos de *southern blotting*, es el *DIG DNA Labeling and Detection kit Nonradiactive* de Roche Diagnostics S.L., que utiliza el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Es muy eficiente, porque va a sintetizar DNA nuevo a partir del molde, incorporando la marca, y permite trabajar con cantidades pequeñas o grandes. Generalmente se utiliza un fragmento del DNA obtenido por PCR.

Marcaje de la sonda

- Desnaturalizar 500 ng de DNA a marcar, calentándolo a 100°C durante 10 min y después mantenerlo en hielo.
- Preparar la mezcla de reacción:
 - 500 ng de DNA desnaturalizado
 - 2 µl de mezcla de hexanucleótidos 10 x (Roche Diagnostics S.L.)

2 μ l de mezcla *DIG DNA Labeling* (1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0.65 mM dTTP, 0.35 mM DIG-11-dUTP) (Roche Diagnostics S.L.)

1 μ l de *Klenow Enzyme labeling grade DNA polymerase I, large fragment* (2 unidades/ μ l) (Roche Diagnostics S.L.)

agua ultra pura hasta llegar a un volumen final de 20 μ l

- Incubar a 37°C toda la noche.
- Detener la reacción de marcaje añadiendo a la mezcla 2 μ l de EDTA 0.5 M pH 8 (14.6125 g/100 ml) (AMRESCO).
- Añadir 1.25 μ l de LiCl 8 M (0.3312 g/ml) (SIGMA) y 70 μ l de etanol absoluto frío (Carlo Erba Reagenti).
- Dejar 1 h o más a -80°C (para tener una precipitación más eficiente se puede aumentar este tiempo).
- Centrifugar durante 15 min a 4°C a 12 000 rpm.
- Lavar con 100 μ l de etanol 70%.
- Centrifugar 10 min a 4°C a 12 000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante.
- Secar al vacío en el *SpeedVac* (Savant).
- Resuspender el sedimento en 50 μ l de TE y dejar a 37°C durante 30 min.

Determinación de la concentración de una sonda marcada

- Realizar un banco de diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} de la sonda a valorar con agua ultrapura. Realizar también un banco de diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} a partir de una dilución 1:5 del DNA control (*DIG labeled control DNA* 5.2 μ g/ml).
- Colocar 1 μ l de cada dilución en una membrana de nylon positivamente cargada (PALL Gelman Laboratories (*Biodyne[®]B Membrane*, 0.45 μ m)) y colocar a continuación 1 μ l de cada dilución del control.
- Fijar el DNA a la membrana utilizando el *UV Stratalinker 2400* (Stratagene).
- Depositar la membrana en una placa de Petri con 10 ml de Tampón 2 con 2 μ l de anticuerpo (*Anti-Digoxigenin-AP Fab fragment* 150

unidades/200 μ l) (Roche Diagnostics S.L.) y agitar lentamente en una placa agitadora durante 30 min.

- Eliminar el Tampón 2 con anticuerpo, añadir 10 ml de tampón 1 y agitar rápidamente en la placa agitadora durante 5 min.
- Eliminar el Tampón 1 y repetir otro lavado igual con Tampón 1.
- Eliminar el Tampón 1, añadir 10 ml de Tampón 3 y agitar rápidamente en una placa agitadora durante 1 min.
- Eliminar el Tampón 3 y añadir 10 ml de solución colorimétrica.
- Mantener en la oscuridad y sin agitación hasta que aparezcan las bandas.
- Detener la reacción lavando la membrana con agua destilada.
- Hacer una comparación cualitativa de la cantidad de DNA que hay entre la sonda y el control positivo marcado, teniendo en cuenta que la dilución 10^{-1} del control estará a una concentración de 100 pg/ μ l.

Soluciones

Tampón 1

A 1500 ml de agua ultrapura se le añaden:

NaCl (Panreac)	17.5 g
Ácido maléico (Merck)	23.2 g
NaOH (Panreac)	16.0 g

Mezclar hasta su completa disolución, ajustar el pH a 7.5, llevar a un volumen final de 2 l con agua ultrapura y esterilizar en el autoclave (121°C 15 min).

Tampón 2

A 100 ml de Tampón 1 se le añade 1 g de agente de bloqueo (producto lácteo en polvo NESTLÉ).

Tampón 3

A 1500 ml de agua ultrapura se le añaden:

NaCl (Panreac)	11.68 g
Trizma HCl (SIGMA)	1.60 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O (Merck)	20.00 g
Tris-Base (SIGMA)	23.16 g

Disolver todos los componentes, ajustar el pH a 9.5 y llevar a un volumen final de 2 l con agua ultrapura.

Solución colorimétrica

Por cada 10 ml de Tampón 3 se añadirán:

Solución de NBT	45 µl
Solución de BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato)	35 µl

Esta solución se prepara en el momento de usarla y solamente la cantidad que sea necesaria, ya que es fotosensible y no se recomienda su conservación.

NBT

Para preparar 1 ml de solución se añadirá:

NBT (<i>4-Nitroblue tetrazolium chloride crystals</i>) (Roche Diagnostics S.L.)	75 mg
N, N dimetilformamida (Panreac)	700 µl
Agua ultrapura	300 µl

Mezclar por agitación con un vórtex; la solución se puede guardar a -20°C.

BCIP

Para preparar 1 ml de solución se añadirá:

BCIP (<i>5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i> <i>4-toluidine salt powder</i>) (Roche Diagnostics S.L.)	50 mg
N,N-dimetilformamida (Panreac)	1 ml

Mezclar por agitación con un vórtex; la solución se puede guardar a -20°C.

2.5.7.3. Hibridación

La hibridación de sondas de DNA sobre DNA fijado a membranas permite identificar y cuantificar secuencias específicas de DNA. La sonda generalmente se encuentra en exceso frente a la secuencia diana. La reacción de hibridación dependerá de la cantidad de sonda marcada que se utilice, de su longitud, de la complejidad de la molécula, de la temperatura de hibridación, de la fuerza iónica, de la viscosidad y del pH.

Consideraciones:

- La cantidad recomendada de sonda a utilizar es de 30 ng/100 cm² de membrana, diluidos en 10 ml de solución de hibridación
- La temperatura de prehibridación puede variar entre 37 o 42°C, si se quiere realizar la prehibridación a baja o a alta astringencia.
- Las temperaturas de hibridación pueden variar desde 37, 42, 60 y hasta 68°C según la homología entre la sonda y el DNA, y la astringencia en que se realice la hibridación.
- Las variaciones de astringencia se pueden realizar también modificando la concentración salina y de formamida de la solución de hibridación y también variando las concentraciones de sales y las temperaturas en los lavados posteriores.

2.5.7.3.1. Prehibridación

El proceso de prehibridación prepara la membrana, bloqueando los sitios inespecíficos de unión de ácidos nucleicos. De esta manera se disminuirá el ruido de fondo de las membranas.

- Colocar la membrana con el DNA transferido y fijado en una bandeja que contenga solución de prehibridación, de manera que la membrana quede completamente sumergida en la solución.
- Incubar a 37 o 42°C durante 2-4 h con agitación lenta.

Solución de Prehibridación

A 20 ml de agua ultrapura se le añaden:

Formamida (Roche Diagnostics S.L.)	50 ml
SDS (Sal sódica de dodecilsulfato) (Merck)	0.02 g
N-laurilsarcosina, sal sódica (SIGMA)	0.1 g
Agente de bloqueo (Roche Diagnostics S.L.)	2 g
Solución 20 x SSC	25 ml

Agitar hasta la total disolución de los componentes y llevar a un volumen final de 100 ml con agua ultrapura. Si hace falta se puede utilizar un poco de calor para conseguir que los componentes se disuelvan de manera óptima.

2.5.7.3.2. Hibridación y lavados

En este punto se pondrá en contacto la sonda de DNA marcada con el DNA fijado en la membrana. Los tiempos y temperaturas de hibridación dependerán de cada caso.

- Desnaturalizar la sonda, calentándola a 100°C durante 10 min.
- Preparar la solución de hibridación diluyendo la sonda en solución de prehibridación de manera que quede a una concentración de 30 ng/ml.

- Colocar la membrana prehibridada en una bolsa de hibridación (Roche Diagnostics S.L.) y la solución de hibridación con la sonda marcada (10 ml por cada 100 cm² de membrana).
- Sellar la bolsa y dejar incubando toda la noche a la temperatura escogida.
- Al final de la incubación recuperar la sonda en un tubo y guardar a -20°C para posteriores usos (se puede conservar hasta 1 año). Para volver a utilizarla se debe volver a desnaturalizar la sonda, calentándola a 95°C durante 10 min.
- Lavar la membrana dos veces durante 5 min con solución 2 x SSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente, con agitación rápida en una placa agitadora.
- Lavar dos veces la membrana durante 15 min con solución 0.1 x SSC, 0.1% SDS o con solución 1 x SSC, 0.1% SDS, entre 50-68°C. La astringencia de los lavados dependerá de la temperatura y de la concentración de sales que se utilice en este paso.

Soluciones

Solución de lavado 2 x SSC, 0.1% SDS

A 356 ml de agua destilada se le añaden:

Solución SDS 10%	4 ml
20 x SSC	40 ml

Solución de lavado 0.1 x SSC, 0.1% SDS

A 394 ml de agua destilada se le añaden:

Solución SDS 10%	4 ml
20 x SSC	2 ml

Solución de lavado 1 x SSC, 0.1% SDS

A 376 ml de agua destilada se le añaden:

Solución SDS 10%	4 ml
20 x SSC	20 ml

2.5.7.4. Detección y revelado

El método que se ha utilizado en este trabajo es el de la detección colorimétrica, utilizando los reactivos de *DIG DNA Labeling and Detection Kit, Nonradiactive* de Roche Diagnostics S.L., siguiendo las recomendaciones del fabricante. Primero se equilibra la membrana con Tampón 1, luego se bloquea utilizando Tampón 2 y se añade la solución que tiene el anticuerpo antidigoxigenina, marcado con fosfatasa alcalina. Se elimina el exceso de anticuerpo mediante una serie de lavados y finalmente se equilibra la membrana con Tampón 3 y se aplica la solución colorimétrica que dará lugar al desarrollo de color por una reacción redox entre la fosfatasa alcalina unida al anticuerpo y la solución colorimétrica que contiene como sustrato al fosfato (BCIP). Todo el proceso se realiza a temperatura ambiente.

- Equilibrar la membrana con Tampón 1 durante 1 min.
- Bloquear la membrana con Tampón 2 durante 30-60 min con agitación lenta.
- Preparar la solución de anticuerpo, diluyendo el anticuerpo (*Antidigoxigenin-AP Fab Fragment*) 1:5000 (2 μ l/ 10 ml Tampón 2).
- Eliminar el Tampón 2 e incubar la membrana durante 30 min con la solución de anticuerpo. La agitación debe ser muy lenta y la membrana debe estar completamente cubierta de solución para permitir que el anticuerpo se una al DNA.
- Eliminar la solución de anticuerpo y realizar tres lavados de 10 min con Tampón 1 con agitación rápida, esto permitirá la eliminación del anticuerpo no unido.
- Preparar la solución colorimétrica fresca, como se describió anteriormente. Protegerla del contacto con la luz.
- Eliminar el Tampón 1 y equilibrar la membrana durante 3-5 min con Tampón 3.
- Eliminar el Tampón 3 y cubrir la membrana con solución colorimétrica; mantenerla en la oscuridad sin agitación hasta que se desarrolle el color. Esto puede tardar entre unos minutos hasta 12-16 h.

- Cuando ya se visualizan las bandas, lavar la membrana con agua destilada, para detener la reacción.
- Secar y guardar la membrana.

2.6. Métodos de manipulación de RNA

Todos los métodos de manipulación de RNA implican una serie de medidas para evitar su degradación. Todo el material y soluciones que se empleen deberán estar libres de RNasas, que son contaminantes muy importantes y presentes en cualquier laboratorio. Para esto se recomienda realizar tratamientos con algún inhibidor de estas enzimas. El método que se ha utilizado en este trabajo es el uso de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC), con la cual se preparan todas las soluciones acuosas y se lavan todos los materiales.

Es importante tener material esterilizado en el autoclave y en caso de ser posible, debería ser material de uso exclusivo para RNA. Es conveniente trabajar en una cámara de flujo laminar, cambiarse frecuentemente de guantes y tomar medidas para evitar cualquier tipo de contaminación. Para las micropipetas se utilizan puntas resistentes a aerosoles, preesterilizadas.

Agua ultrapura tratada con DEPC

Para realizar el tratamiento se prepara una solución con DEPC al 0.1%. Se incuba durante 16 h a 37°C en agitación. Se autoclava (121°C 15 min) dos veces para esterilizarla y a la vez eliminar el DEPC.

Esta solución se utiliza para lavar el material antes de utilizarlo y para preparar todas las soluciones acuosas, a excepción de las que contengan aminas (por ejemplo soluciones que contengan Tris) ya que produce precipitaciones.

Debe tenerse en cuenta que el DEPC es tóxico y se debe trabajar con la protección adecuada para evitar el contacto con la piel, ojos y vías respiratorias (inhalación de gases).

2.6.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA bacteriano implica un primer paso de lisis celular, seguido de la separación del RNA de las proteínas y de DNA. Se puede realizar la lisis celular mediante diferentes estrategias, utilizando detergentes, enzimas (lisozima) o por sonicación. Después se realizará una extracción orgánica y finalmente una precipitación con alcoholes o sales.

2.6.1.1. Extracción de RNA por fenol ácido (von Gabin *et al.*, 1983)

- Hacer un cultivo de noche de la cepa que interese.
- Hacer una resiembra 1:100 en 40 ml del medio adecuado e incubar en las condiciones óptimas par la cepa hasta llegar a una DO_{550nm} de 0.6.
- Centrifugar el cultivo a 6000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Resuspender todo el sedimento en 400 µl de tampón de lisis, precalentada a 65°C. Para mezclar se utiliza el vórtex.
- Incubar a 65°C durante 90 s.
- Añadir 1 volumen de fenol ácido, precalentado a 65°C.
- Mezclar con el vórtex durante 30 s e incubar a 65°C durante 3 min.
- Congelar en nieve carbónica mezclada con etanol y centrifugar durante 5 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente.
- Recuperar la fase acuosa superior y repetir el proceso de extracción con fenol ácido dos veces.
- Recuperar la fase acuosa superior y añadir 1 volumen de fenol a pH 7.
- Mezclar durante 30 s con el vórtex, centrifugar 5 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente y recuperar la fase acuosa superior.
- Añadir 1 volumen de fenol/cloroformo/isoamílico. Mezclar durante 30 s con el vórtex, centrifugar 5 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente y recuperar la fase acuosa superior.

- Repetir este paso dos veces para eliminar todos los restos celulares de la interfase.
- Añadir 1 volumen de cloroformo/isoamílico. Mezclar durante 30 s con el vórtex, centrifugar 5 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente y recuperar la fase acuosa superior.
- Añadir 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5.3) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Mezclar por inversión y dejar precipitando a -80°C durante 30-60 min.
- Centrifugar 10 min a 12 000 rpm a 4°C . Eliminar el sobrenadante y lavar con etanol 70% frío. Centrifugar durante 5 min a 12 000 rpm a 4°C . Eliminar el sobrenadante y secar al vacío en el equipo *DNA SpeedVac* (Savant).
- Resuspender el sedimento en 180 μl de agua ultrapura tratada con DEPC.

Tratamiento con DNasa

- Añadir 20 μl de tampón de DNasa 10 x y 1 μl de DNasa [*RNase-free DNase I* (Roche Diagnostics S.L.)] e incubar 20 min a 37°C .
- Añadir 200 μl de agua ultrapura tratada con DEPC.
- Añadir 1 volumen de fenol pH 7. Mezclar durante 30 s con el vórtex, centrifugar 5 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente y recuperar la fase acuosa superior.
- Añadir 1 volumen de fenol/cloroformo/isoamílico. Mezclar durante 30 s con el vórtex, centrifugar 5 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente y recuperar la fase acuosa superior.
- Añadir 1 volumen de cloroformo/isoamílico. Mezclar durante 30 s con el vórtex, centrifugar 5 min a 12 000 rpm a temperatura ambiente y recuperar la fase acuosa superior.
- Añadir 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5.3) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Mezclar por inversión y dejar precipitando a -80°C durante 30-60 min.

- Centrifugar 10 min a 12 000 rpm a 4°C. Eliminar el sobrenadante y lavar con etanol 70% frío. Centrifugar durante 5 min a 12 000 rpm a 4°C. Eliminar el sobrenadante y secar al vacío en el equipo *DNA SpeedVac* (Savant).
- Resuspender el sedimento en 30-50 μl de agua ultrapura tratada con DEPC. Guardar en alícuotas a -20°C .

Cuantificación espectrofotométrica

- Hacer una dilución del RNA 5 μl / ml en agua ultrapura tratada con DEPC.
- Medir utilizando cubetas de cuarzo en un espectrofotómetro a:

$DO_{230\text{ nm}}$ (enlace peptídico)

$DO_{260\text{ nm}}$ (RNA)

$DO_{280\text{ nm}}$ (residuos proteicos)

- Calcular la concentración de RNA en la muestra utilizando la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} \text{Concentración RNA} &= DO_{\text{RNA}} \times \text{dilución RNA} \times \text{concentración RNA} \\ \mu\text{g/ml RNA} &= DO_{260\text{ nm}} \times 200 \times 40\ \mu\text{g/ml}^* \end{aligned}$$

* Cuando la $DO_{260\text{ nm}}$ es igual a 1, la concentración de RNA es de 40 $\mu\text{g/ml}$.

Para comprobar la pureza de la muestra se deben mantener las siguientes relaciones:

$$DO_{260\text{ nm}}/DO_{280\text{ nm}} \geq 1.8$$

$$DO_{260\text{ nm}}/DO_{230\text{ nm}} > 2$$

Para comprobar que no hay una contaminación de DNA, se realiza una amplificación por PCR, utilizando oligonucleótidos del fragmento del que se ha extraído el RNA y usando como control positivo DNA de ese mismo fragmento. Si no hay DNA no debe haber amplificación del fragmento al utilizar el RNA como molde.

En caso de encontrar una contaminación de DNA, se volverá a someter al tratamiento con DNasa y se cuantifica nuevamente el RNA.

Soluciones

Tampón de lisis

Para un volumen de 10 ml se mezclan:

Agua ultrapura tratada con DEPC	6.7 ml
Solución Tris HCl 1 M pH7 (1.567 g/10 ml) (SIGMA)	1.0 ml
Solución EDTA 0.5 M pH 7 (1.46 g/10 ml agua ultrapura tratada con DEPC) (AMRESCO)	0.8 ml
Solución NaCl 2 M (1.168 g/10 ml agua ultrapura tratada con DEPC) (Panreac)	1.0 ml
Solución SDS 10% (1 g/10 ml agua ultrapura tratada con DEPC) (Merck)	0.5 ml

Fenol ácido

- Disolver el fenol (Panreac) a 65°C.
- Añadir 1 volumen de agua ultrapura tratada con DEPC. Mezclar hasta que esté homogéneo.
- Dejar separar las dos fases.
- Añadir 0.1 g de 8-hidroxiquinoleína (Panreac) por cada 100 ml de fenol.
- Guardar protegido de la luz a -20°C.

Fenol pH 7

Para preparar el fenol pH 7 debe equilibrarse el pH. Para ello se calienta el fenol (Panreac) con la 8-hidroxiquinoleína al 0.1% (Panreac) hasta que se licue, se le añade un volumen de tampón Tris-HCl 0.5 M (pH 8); se dejan separar las fases, se elimina la fase acuosa superior y se hacen lavados añadiendo un volumen de tampón Tris HCl 0.1 M (pH 8) hasta llegar a 7. Se

conserva el fenol con 0.1 volúmenes de tampón Tris HCl 0.1 M (pH 7) que contenga 0.2% de β -mercaptoetanol, a 4°C en una botella de vidrio topacio.

Solución Fenol/cloroformo/isoamílico

Fenol pH 7 (Panreac)	500 ml
Triclorometano (Carlo Erba Reagenti)	480 ml
3-metil-1-butanol (Panreac))	20 ml

Acetato sódico 3 M pH 5.3

A 60 ml de agua ultrapura tratada con DEPC se le añaden:

Acetato sódico (Merck)	24.6 g
------------------------	--------

Mezclar hasta su disolución, ajustar el pH a 5.3 y llevar a un volumen final de 100 ml.

Tampón DNasa I (10 x)

A 5 ml de agua ultrapura tratada con DEPC se le añaden:

MgCl ₂ (Merck)	0.057 g
Trizma HCl (SIGMA)	0.630 g

Mezclar los componentes y llevar a un volumen final de 10 ml con agua ultrapura tratada con DEPC.

2.6.1.2. Extracción de RNA utilizando el *RNeasy[®] Mini Kit* (QUIAGEN)

El kit de extracción de RNA de QUIAGEN, permite la extracción partiendo de pequeñas cantidades de material. Se fundamenta en las propiedades de unión selectivas del RNA a una membrana de silica-gel en un medio tamponado con un alto contenido salino. Primero, se realiza un paso de lisis y homogenización en presencia de un tampón altamente desnaturizante (GITC Guanidin-isotiocianato), que inactiva las RNasas. Se añade etanol para mejorar las condiciones de unión y, finalmente, se pasa la muestra por

una mini-columna donde el RNA se une a la membrana y los contaminantes pueden ser eliminados por lavado. Al final se obtiene RNA de alta calidad eluido en agua libre de RNAsas.

En este estudio se utilizó este tipo de extracción, siguiendo las instrucciones del fabricante, y al final del protocolo se realizó un tratamiento para eliminar los posibles restos de DNA, siguiendo el protocolo antes descrito.

Soluciones

Las únicas soluciones que no están provistas por el kit de extracción son:

- Etanol absoluto (Carlo Erba)
- Solución de lisozima (Roche Diagnostics S.L.) 100 mg/ml en agua ultrapura tratada con DEPC.

2.6.2. RT-PCR

Esta técnica se utiliza para determinar la presencia de muestras de RNA o para cuantificar la expresión de genes por análisis de RNA. Es un método muy sensible, que combina una Transcripción Inversa con una Reacción de Polimerasa en Cadena (RT-PCR). En este estudio se ha utilizado el *Titan One Tube RT-PCR System* de Roche Diagnostics S.L., que permite la realización de ambas reacciones en un solo paso.

Es un método que permite un análisis rápido, sensible y reproducible del RNA. La reacción produce la transcripción inversa del RNA generando cDNA (con la enzima *AMV Reverse Transcriptase*) y luego la amplificación del cDNA con una reacción de termociclado (utilizando la mezcla de enzimas del *Expand High Fidelity PCR System*, Roche Diagnostics S.L.).

Para realizar las RT-PCRs en este estudio se siguieron las instrucciones y recomendaciones de Roche Diagnostics S.L. con oligonucleótidos internos de la región codificante de diferentes genes.

El protocolo habitual utilizado para un volumen final de 50 μ l de reacción de PCR es el siguiente:

- Se utiliza todo el material previamente irradiado con luz ultravioleta en una cámara de flujo vertical para PCR (FLV60 Euro Aire) y mantenido en hielo.
- Se preparan por separado 2 mezclas madre.
- La Mezcla 1, para un volumen final de 25 μ l, se realiza en un tubo de 0.5 ml de capacidad:
 - 5 μ l de mezcla de dNTPs (10 mM c/dNTP) (Roche Diagnostics S.L.)
 - 2 μ l oligonucleótido *upper* (10 pmol/ μ l)
 - 2 μ l oligonucleótido *lower* (10 pmol/ μ l)
 - 2.5 μ l solución DTT (100 mM)
 - 13.5 μ l de agua ultrapura tratada con DEPC
- La Mezcla 2, para un volumen final de 25 μ l, se realiza en un tubo de 0.5 ml de capacidad:
 - 10 μ l de tampón 5 x RT-PCR con Mg²⁺
 - 1 μ l de mezcla de enzimas (*AMV+Expand High Fidelity PCR-System*)
 - 14 μ l de agua ultrapura tratada con DEPC
- Unir 25 μ l de cada una de las mezclas madre y añadir el RNA, mezclar bien y dar un pulso en la microcentrifuga.
- Programar el termociclador según la reacción de PCR que se quiera realizar.

El programa debe tener de un paso previo de incubación durante 30 min a 50°C.

Posteriormente se utilizará un programa normal de acuerdo a los oligonucleótidos que se usan en la reacción:

1 ciclo:

1 min a 95°C

30 ciclos

1 min a 95°C

1 min a temperatura de anillamiento

x min a 68 o 72°C (según el tamaño del fragmento)

1 ciclo

7 min a 68 o 72°C

Mantener a 4°C indefinidamente.

- Colocar los tubos en el termociclador y poner en marcha el programa.

2.6.3. RT-PCR *on-line*

Otro método que se utiliza para cuantificar la expresión de genes por análisis de RNA, es la RT-PCR *on line*, que nos permite realizar la RT-PCR en tiempo real.

En este estudio se ha utilizado el kit para RT-PCR en un paso *LightCycler-RNA Master SYBR Green I* de Roche Diagnostics S.L., usando el *LightCycler Instrument* (Roche Diagnostics S.L.).

El *LightCycler-RNA Master SYBR Green I* realiza una amplificación a alta temperatura, utilizando la *Tth* DNA polimerasa combinada con aptámeros. Esta polimerasa es termoestable, tiene actividad de transcriptasa inversa dependiente de RNA y DNA polimerasa dependiente del DNA, por lo que permite la realización de la RT y la PCR en una sola reacción. Los aptámeros son oligonucleótidos que se unen al centro activo de la polimerasa y no permiten la unión de otros ácidos nucleicos a temperaturas inferiores a la óptima para la *Tth* polimerasa. Cuando se aumenta la temperatura, los aptámeros son liberados por la enzima y se puede iniciar la transcripción inversa y la subsiguiente amplificación.

El *SYBR Green I* es un fluoróforo específico para DNA de doble cadena. Está incluido en la mezcla de reacción del kit y actúa uniéndose a los productos de la PCR en cada uno de los pasos de amplificación.

El equipo *LightCycler* permite cuantificar y analizar los productos de la PCR, monitorizando la fluorescencia, a una longitud de onda de 521 nm, durante cada ciclo de la amplificación. Es un termociclador rápido combinado con un fluorímetro de microvolumen, que permite cambios de temperatura veloces, entre los diferentes ciclos.

Con los datos que se obtienen *on-line* se puede hacer un análisis paso a paso de la amplificación, con lo que se podrá cuantificar el RNA que nos interesa. Además se puede determinar el punto de fusión de los fragmentos amplificados y descartar amplificaciones inespecíficas.

Los datos obtenidos se analizan en un ordenador con el *Light Cycler Software version 3*, de Roche Diagnostics S.L. utilizando un sistema operativo Windows NT.

Todos los protocolos que se utilizaron en este trabajo son los descritos por Roche Diagnostics S.L..

El material debe ser previamente irradiado con luz ultravioleta en una cámara de flujo vertical para PCR (FLV60 Euro Aire) y mantenido en hielo. Utilizando el kit *LightCycler-RNA Master SYBR Green I* se realiza la siguiente mezcla de reacción en un tubo de PCR de 0.2 ml:

8 μ l de agua *PCR grade*

0.6 μ l de oligonucleótido *upper* (0.3 μ M de concentración final)

0.6 μ l de oligonucleótido *lower* (0.3 μ M de concentración final)

1.3 μ l $Mn(OAc)_2$ (3.25 μ M de concentración final)

7.5 μ l *LightCycler-RNA Master SYBR Green I*

2 μ l de la dilución de la muestra de RNA que se utilice

Esta mezcla se transfiere a un capilar frío, se sella y se da un pulso en una microcentrífuga (utilizando adaptadores). Se sitúan los capilares en el rotor del aparato y se programan los ciclos a los que serán sometidas las muestras.

El programa que se utiliza comprende diferentes fases que se describen a continuación:

Número	Temperatura diana (°C)	Tiempo (s)	Pendiente (°C/s)	Adquisición de Fluorescencia
Programa: Transcripción Inversa			Nº de ciclos: 1	
1	61	1200	20	Ninguna
Programa: Desnaturalización			Nº de ciclos: 1	
1	95	30	20	Ninguna
Programa: Amplificación			Nº de ciclos: 45	
1	95	1	20	Ninguna
2	65	10	20	Ninguna
3	72	14	20	Ninguna
4	79	5	20	Única
Programa: Curva de "melting"			Nº de ciclos: 1	
1	95	5	20	Ninguna
2	75	15	20	Ninguna
3	95	0	0.1	Continua
Programa: enfriamiento			Nº de ciclos: 1	
1	40	30	20	Ninguna

2.7. Métodos de manipulación de proteínas

Las técnicas utilizadas en este trabajo están basadas en los protocolos de *Molecular cloning: a laboratory manual* (Sambrook *et al.*, 1989) y *Current protocols in molecular biology* (Ausubel *et al.*, 1995) con algunas modificaciones.

2.7.1. Extractos crudos de proteínas

Para obtener extractos crudos de proteínas de diferentes microorganismos, se siguió una técnica que consiste en crecer un cultivo bacteriano hasta su fase exponencial y posteriormente lisar las células por sonicación. Este tratamiento consiste en la aplicación de energía de alta frecuencia de sonido en un medio líquido, produciendo la microdisrupción, emulsificación y suspensión de las muestras. Así, se consigue un homogeneizado celular que permite la salida de las diferentes proteínas citoplasmáticas.

- Se realiza un cultivo de noche en 10 ml de medio rico, bajo las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo.
- Se realiza una resiembra 1:50 en 250 ml de medio fresco y se incuba en las condiciones adecuadas para la cepa hasta llegar a una DO_{550nm} de 0.8 (fase exponencial).
- Centrifugar el cultivo durante 10 min a 10 000 rpm a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y resuspenderlo en 5 ml de tampón de sonicación.
- Centrifugar durante 10 min a 10 000 rpm a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender en 4 ml de tampón de sonicación.
- Sonicar en un tubo de polipropileno de 30 ml, utilizando un homogenizador ultrasónico LABSONIC U (B. Braun), con una sonda mediana de Titanio (12T). Seleccionar la fuente de energía en *low* y aplicar una potencia máxima de 50 W, en ciclos de 0.8 s durante el tiempo necesario hasta conseguir la lisis de las células. Durante el proceso es importante mantener la muestra a baja temperatura (en un recipiente con hielo y nieve carbónica).
- Centrifugar el lisado durante 30 min a 12 000 rpm a 4°C.
- Recuperar el sobrenadante y volver a centrifugar durante 30 min a 12000 rpm a 4°C para eliminar todos los restos celulares y elementos que puedan interferir en los ensayos posteriores.
- Preparar alícuotas de 0.5 ml y guardarlas a -80°C.

Soluciones

Tampón de Sonicación

A 70 ml de agua ultrapura se le añaden

Solución Tris-HCl 1 M pH 7.4 (AppliChem)	5 ml
Glicerol (Scharlau)	5 ml
Solución NaCl 5 M (AppliChem)	2 ml

Mezclar los componentes, ajustar el pH a 7.5, llevar a un volumen final de 100 ml con agua ultrapura y esterilizar por filtración.

Añadir en el momento de uso una tableta *Complete[®]Mini, protease inhibitor cocktail* (Roche Diagnostics S.L.) por cada 10 ml de solución y DTT a una concentración final 1 mM.

Solución DTT 1 M

1,4 *Dithiothreitol* (Roche Diagnostics S.L.) 1.543 g

Diluir en 10 ml de agua ultrapura estéril.

2.7.2. Sobreexpresión de proteínas con el *pET System* (Novagene)

Este sistema se utiliza para clonar y expresar proteínas recombinantes en *E.coli*. Los genes que interesan son clonados en plásmidos pET bajo el control de señales de transcripción y de traducción del bacteriófago T7; la expresión se induce ya que la célula huésped contendrá el gen de la RNA polimerasa del T7. Esta polimerasa es muy activa y selectiva y permitirá, al ser inducida, un altísimo rendimiento de la expresión del gen. El sistema permite además mantener transcripcionalmente "silenciosos" los genes cuando no hay inducción (*pET System Manual*, Novagen).

Primero se realiza una clonación del gen en un huésped que no contenga el gen de la RNA polimerasa del T7. Luego se inicia la expresión de la proteína elegida transfiriendo el plásmido a un huésped que tengan una copia cromosómica del gen de la RNA polimerasa del T7, bajo control de la región promotora del *lacUV5*. La expresión se induce añadiendo IPTG al cultivo bacteriano.

En este estudio se ha utilizado el pET22b(+), que es un vector de traducción que contiene un RBS (*Ribosome Binding Site*) muy eficiente de la proteína mayoritaria de la cápside del fago T7. Además su marco de lectura (+), relativo a la diana de clonación *Bam*HI, cuya secuencia de reconocimiento es GGATCC, se expresa a partir del triplete GAT. Los vectores de traducción se utilizan para la expresión de genes en procariotas que generalmente

tengan RBS compatibles con éstos. Para realizar la clonación de la región codificante de una proteína en el vector, se usan las dianas únicas de restricción del MCS, para orientarla en el vector en la dirección deseada.

Este vector también tiene varias características:

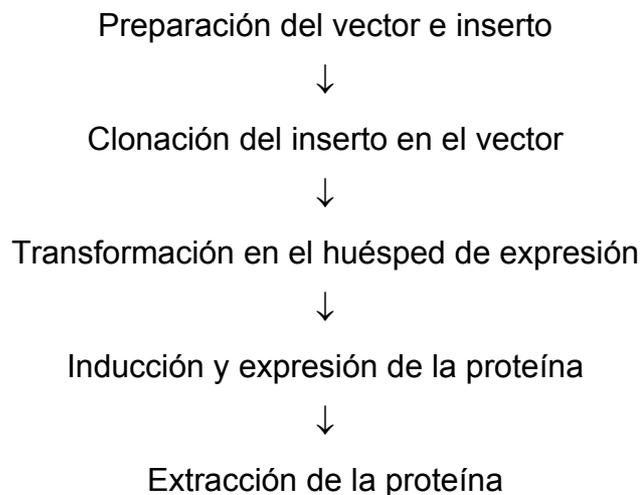
- Expresa proteínas sin incluir secuencias codificadas por el vector; el vector tiene una diana *NdeI* (CATATG) que permite que la clonación empiece en el codón de inicio AUG en el extremo 5' del inserto.
- Tiene unas secuencias cercanas al lugar de clonación que codifican péptidos “tags”, en este caso son “His•Tag”, que se localizan en el extremo carboxi terminal de la proteína.
- Contiene codones de traducción “*stop*” en los tres marcos de lectura a continuación de la región de clonación y un terminador de la transcripción de T7, en sentido opuesto.
- Lleva el gen de resistencia a la ampicilina (β -lactamasa) en el mismo sentido que el gen que se quiere sobreexpresar. Si al realizar la clonación se elimina el terminador de la transcripción de T7, se obtiene una acumulación de β -lactamasa, dependiente de IPTG, junto a la proteína.
- Tiene el promotor T7/*lac* que cuando no hay IPTG en el medio evita la expresión de la RNA polimerasa del T7 desde el promotor *lacUV5* en los lisógenos lambdaDE3,.

El pET22b(+) con el inserto clonado puede utilizarse para transformar células DH5 α , que son *recA*⁻ *endA*⁻. Se consigue una elevada eficiencia de transformación y un alto rendimiento al extraer el plásmido recombinante.

El huésped elegido para la expresión y producción de la proteína deseada ha sido la cepa de *E. coli* BL21DE3, lisogénica para el bacteriofago DE3. Dicho bacteriófago es un derivado de lambda que porta la región de inmunidad del fago 21, un fragmento de DNA con el gen *lacI*, el promotor *lacUV5* y el gen de la RNA polimerasa del T7. En una cepa lisogénica para DE3, el único promotor capaz de producir la transcripción de la RNA

polimerasa del T7 es el *lacUV5*, que además es inducible por IPTG. De esta manera, cuando se añade IPTG al cultivo, se induce la RNA polimerasa del T7, con lo cual se producirá también la transcripción del DNA clonado en el vector pET22b(+). Esta cepa se caracteriza además por ser deficiente en la proteasa Lon y carecer de la proteasa de membrana OmpT, que podrían degradar la proteína.

El proceso completo se puede resumir de la siguiente manera:



Seguidamente se comentan en detalle los pasos seguidos:

- Amplificar mediante PCR el fragmento de DNA que codifica la proteína que se desea sobreexpresar, utilizando oligonucleótidos que incorporen las dianas de restricción adecuadas para su posterior clonación.
- Realizar una electroforesis en un gel de agarosa, recuperar la banda de amplificación y purificar el DNA.
- Clonar el inserto en el vector pET22b(+) mediante ligación y electrotransformar en células competentes de DH5 α . En este paso se comprueban los clones, mediante restricciones y secuenciación del fragmento clonado.
- Extraer el plásmido recombinante y transformarlo en células BL21 DE3.
- Inducir la producción de la proteína en un cultivo:
 - Preparar un cultivo de noche de los clones BL21DE3/pET22b(+)/inserto en 10 ml de medio LB con

- ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$) e incubar con una agitación constante de 110 rpm a 37°C.
- Realizar una resiembra 1:100 en 1 l de medio LB con ampicilina (50 $\mu\text{g/ml}$) e incubar el cultivo con una agitación constante de 110 rpm a 37°C hasta alcanzar una $\text{DO}_{550\text{nm}}$ de 0.8 (fase exponencial).
 - Añadir 1 ml de IPTG 1 M.
 - Incubar en las mismas condiciones durante 3 h.
- Extraer la proteína sobreexpresada:
 - Centrifugar el cultivo durante 10 min a 10 000 rpm a 4°C en 4 tubos de polipropileno de 250 ml.
 - Eliminar el sobrenadante y resuspender cada uno de los sedimentos en 10 ml de tampón de sonicación (descrito anteriormente).
 - Sonicar en las mismas condiciones que se indica en el protocolo de obtención de extractos crudos de proteínas.
 - Centrifugar 10 min a 10 000 rpm a 4°C.
 - Repartir el sobrenadante en alícuotas y guardarlas para posteriores ensayos a -80°C .

Se recomienda hacer primero una inducción a baja escala para ajustar las condiciones y posteriormente realizar un escalado de la misma. Paralelamente, se realiza un cultivo sin inducción en pequeña escala para poder comparar con el cultivo inducido. Durante los diferentes pasos del proceso se tomarán muestras de control que serán analizadas posteriormente.

Soluciones

IPTG 1 M

A 10 ml de agua ultrapura se le añaden:

IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranosido)

(Roche Diagnostics S.L.)

2.38 g

Se mezcla hasta que esté completamente disuelto y se esteriliza por filtración. Se mantiene a -20°C .

2.7.3. Detección de proteínas

2.7.3.1. Electroforesis de proteínas

En este trabajo se realizaron electroforesis de una dimensión de proteínas en minigeles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida (15% de acrilamida), (Sambrook *et al.*, 1989). El aparato de electroforesis utilizado fue *Hofer MINIVE Complete (Vertical electrophoresis system)*, la fuente de electroforesis *APELEX ST304 (Electrophoresis power supply)*, y los vidrios, soportes, peines, etc. fueron de Amersham Pharmacia.

- Preparar el aparato de electroforesis, el cual debe estar perfectamente limpio.
- Preparar los vidrios con el soporte en los que se hará el gel, teniendo en cuenta su limpieza, y que todos los bordes queden herméticamente cerrados.
- Preparar el gel de proteínas, realizando dos mezclas por separado. La parte superior del gel es la zona compresora y el resto del gel es la zona de separación de las proteínas.
- Mezcla del gel compresor 4% (volumen final 6 ml):

30% <i>Acrylamide/Bis solution</i> 37.5:1 (Biorad)	0.78 ml
Tampón compresor 4 x	1.5 ml
APS (<i>Ammonium persulphate</i>) 10% (AMRESCO)	30 μl
Temed (AMRESCO)	6 μl
Agua ultrapura	3.66 ml

Mezcla del gel separador 15% (volumen final 15 ml):

30% <i>Acrylamide/Bis solution</i> 37.5:1 (Biorad))	7.5 ml
Tampón separador 4 x	3.75 ml
APS (<i>Ammonium persulphate</i>) 10% (AMRESCO)	50 µl
Temed (AMRESCO)	10 µl
Agua ultrapura	3.75 ml

Las dos mezclas son de uso inmediato, preparándose justo en el momento de su utilización.

- Transferir la mezcla de gel separador al soporte de vidrio hasta llenar aproximadamente las $\frac{3}{4}$ partes del mismo. Poner algunas gotas de SDS al 1% en la superficie y dejar polimerizar aproximadamente 30 min.
- Transferir la mezcla del gel compresor al soporte con el gel separador ya polimerizado y poner el peine en la parte superior. Dejar que polimerice durante 30 min.
- Preparar las muestras de proteínas que se van a cargar y los marcadores de peso molecular. Las muestras y el marcador de peso molecular (*SDS-PAGE Molecular Weight Standard Low Range* BIO-RAD) (0.25 µl/10 µl tampón transportador) se cargan utilizando el tampón transportador Laemmli 4 x y se preparan según el volumen de muestra que se utilice, diluyendo 1:4. Generalmente el volumen de carga es de 15 o 20 µl.
- Desnaturalizar las muestras durante 5 min a 95°C.
- Sacar el peine y colocar el soporte con el gel en la cubeta de electroforesis y el tampón de electroforesis TGS 1 x.
- La electroforesis se realiza a 20 mA, 200 V si se corre un solo gel y 40 mA, 200 V si se corren dos geles en la misma cubeta.
- Una vez finalizada la electroforesis, se saca el soporte y el gel del soporte.
- Colocar el gel en la solución de tinción y mantenerlo en agitación lenta durante 10 min.

- Descartar la solución de tinción y desteñir el gel con solución de ácido acético glacial 10%.
- Cambiar la solución cuando esté muy coloreada.
- Detener el proceso cuando se visualicen bien las bandas de proteínas en el gel.

El marcador de peso molecular *SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Low Range* BIO-RAD permite ver las siguientes bandas:

Proteínas	Peso molecular (Da)
Fosforilasa b	97 400
Albúmina de suero	66 200
Ovoalbúmina	45 000
Anhidrasa carbónica	31 000
Inhibidor de tripsina	21 500
Lisozima	14 400

Soluciones

Tampón separador 4 x

A 300 ml de agua ultrapura se le añaden:

Tris Base (SIGMA) 91 g

Mezclar hasta que se diluya completamente y ajustar el pH con HCl 37% (Panreac) hasta llegar a 8.8. Llevar a un volumen final de 500 ml con agua ultrapura. Esterilizar por filtración. Añadir 2 g de SDS (Merck) mezclar y guardar a 4°C.

Tampón compresor 4 x

A 40 ml de agua ultrapura se le añaden:

Tris Base (SIGMA) 6.05 g

Mezclar hasta que se diluya completamente y ajustar el pH con HCl 37% (Panreac) hasta llegar a 6.8. Llevar a un volumen final de 100 ml con agua ultrapura. Esterilizar por filtración. Añadir 0.4 g de SDS (Merck), mezclar y guardar a 4°C.

Tampón de electroforesis TGS 1 x

Diluir 1:10 el Tampón TGS 10 x (Tris Glicina SDS, pH 8.3 de BIO-RAD) con agua ultrapura.

Tampón transportador Laemmli 4 x

Tampón compresor 4 x	25 ml
Glicerol (Scharlau)	20 ml
SDS (Merck)	4 g
Azul de bromofenol (Panreac)	0.2 g

Llevar a un volumen final de 50 ml con agua ultrapura. Hacer alícuotas de 900 µl del tampón y conservarlos a 4°C. En el momento de su uso, se añaden 36 µl de 2-mercaptoetanol (Merck) y 64 µl de solución DTT (6.25 M) (9.64 g/10 ml agua ultrapura) (Roche Diagnostics S.L.).

Solución de tinción

A 180 ml de agua ultrapura se le añaden:

<i>Comassie Brilliant Blue</i> (BIO-RAD)	0.5 g
Ácido acético glacial (Panreac)	50 ml
Metanol (Panreac)	250 ml

Mezclar los componentes y llevar a un volumen final de 500 ml con agua ultrapura.

Solución ácido acético glacial 10% (Solución para desteñir)

A 450 ml de agua ultrapura se le añaden:

Ácido acético glacial (Panreac)	50 ml
---------------------------------	-------

Mezclar hasta tener una solución completamente homogénea.

2.7.4. Ensayo de movilidad electroforética (EMSA)

El ensayo de movilidad electroforética (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) en geles de poliacrilamida (PAGE) es un método rápido, simple y extremadamente sensible para la detección de proteínas que se unen a secuencias específicas de DNA. Permite determinar la afinidad, cantidad y especificidad de la unión entre la proteína y el DNA. El protocolo se divide en diferentes fases que incluyen: la preparación del gel de poliacrilamida, la preparación de los fragmentos de DNA, la preparación de la mezcla de la proteína con el DNA marcado y la electroforesis en que se verá la unión. El protocolo que se utiliza es el descrito en el *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1995), con algunas modificaciones.

2.7.4.1. Marcaje de fragmentos de DNA

Los fragmentos utilizados para el ensayo se obtienen mediante amplificación por PCR utilizando uno de los oligonucleótidos marcado con digoxigenina (Roche Diagnostics S.L.). Se realiza una electroforesis con el producto de la amplificación en un gel de agarosa y después se recupera la banda de DNA, utilizando el método de columna (*Wizard* de Promega). Las bandas tendrán la marca de digoxigenina. La visualización y determinación aproximada de la concentración de DNA se realiza por electroforesis como se ha comentado anteriormente.

En el caso de que no se tenga uno de los oligonucleótidos marcados con digoxigenina, lo que se hará es clonar el fragmento de DNA, amplificado por PCR, en el vector pGEM-T[®] y a partir de este plásmido recombinante se

realiza una amplificación utilizando el oligonucleótido Direct o Reverse marcados con digoxigenina y se sigue posteriormente el mismo proceso que el indicado anteriormente. En este caso junto al fragmento de DNA que interese habrá también una parte de la región MCS del pGEM-T[®].

2.7.4.2. Reacción de unión proteína-DNA

Las mezclas de reacción de unión de la proteína al fragmento de DNA se realizan a 4°C y tendrán los siguientes componentes:

Agua ultrapura	12 µl
Fragmento de DNA marcado (20 ng/µl)	1 µl
Tampón de unión	4 µl
DNA inespecífico (pBSK (1µg/µl)	2 µl
Extracto de proteína (dilución adecuada)	1 µl

Cuando se realizan ensayos con competidores se añadirá a la mezcla los diferentes fragmentos específicos o inespecíficos a la concentración elegida. La reacción se mezcla, se da un pulso en la microcentrífuga y se incuba durante 30 min a 30°C.

Soluciones

Tampón de unión

Agua ultrapura	30 ml
HEPES 1 M (4-(2-Hidroxietil)-1-piperazin-etan-sulfonácido 238.3 g/l agua ultrapura) (Roche Diagnostics S.L.)	10 ml
Solución Tris HCl 1 M pH 7.4 (AppliChem)	10 ml
Glicerol (Scharlau)	25 ml
Solución KCl 1 M (74.56 g/l agua ultrapura) (Panreac)	25 ml
Solución EDTA 0.5 M pH 8 (AppliChem)	0.2 ml

Ajustar el pH a 7.5 y guardar a 4°C.

En el momento del uso por cada 500 μ l de tampón se añaden

DTT 0.5 M (1,4 <i>Dithiothreitol</i> 0.0765g/ml)	
(Roche Diagnostics S.L.)	1 μ l
BSA (6 mg/ml) (<i>Bovine Serum Albumine</i>)	
(SIGMA)	4.16 μ l

2.7.4.3. Preparación del gel de poliacrilamida y electroforesis

Los geles de poliacrilamida para los ensayos EMSA se realizaron utilizando vidrios, soportes, espaciadores, peines y cubetas de electroforesis BIO-RAD. La fuente de electroforesis fue de *GROC Instruments* G-201. Las concentraciones de poliacrilamida a las que se trabajaron fueron del 5 o del 6%. Se utilizó una mayor concentración de acrilamida para obtener una mejor resolución de las bandas de electroforesis.

- Preparar el aparato de electroforesis, teniendo cuidado con su limpieza.
- Alistar los vidrios con el soporte, en los que se preparará el gel, teniendo en cuenta su limpieza y que todos los bordes queden herméticamente cerrados.
- Preparar el gel de poliacrilamida 5% (volumen final 55 ml):

30% <i>Acrylamide/Bis solution</i> 37.5:1	
(BIO-RAD)	9.2 ml
Tampón glicina 5 x	11 ml
APS (<i>Ammonium persulphate</i> 10%)	
(AMRESCO)	256 μ l
Temed (AMRESCO)	44 μ l
Agua ultrapura	34.8 ml

Para preparar un gel al 6% se utiliza 11 ml de acrilamida y 33 ml de agua ultrapura.

Los geles son de uso inmediato, se preparan justo en el momento de su utilización.

- Transferir la mezcla del gel al soporte de vidrio y colocar el peine en la parte superior. Dejar que polimerice durante aproximadamente 30 min.
- Sacar el peine y colocar el gel en el soporte de electroforesis. Llenar la cubeta de tampón glicina 1 x y poner el soporte.
- Hacer una precarrera, que consiste en conectar la fuente a 150 V durante 15-30 min sin cargar ninguna muestra. El objetivo es estabilizar el amperaje de la fuente de electroforesis.
- Preparar las mezclas de reacción.
- Cargar las reacciones en los pozos limpios del gel.
- Poner a correr el gel a muy baja potencia, hasta que las muestras hayan salido del pozo.
- La electroforesis se realiza a 150 V y sin que el amperaje pase de 20 mA.
- Tras este tiempo de electroforesis, sacar el soporte y preparar el gel para la transferencia.

Soluciones

Tampón glicina 5 x

A 500 ml de agua ultrapura se le añaden:

Glicina (Roche Diagnostics S.L.)	192.7 g
Tris Base (SIGMA)	30.28 g
EDTA (AMRESCO)	3.92 g

Mezclar de manera que se disuelvan todos los componentes y ajustar el pH a 8.5. Llevar a un volumen final de 1 l con agua ultrapura. Para utilizarlo como tampón de electroforesis se prepara una dilución 1:5 con agua ultrapura.

2.7.4.4. Transferencia

Para poder realizar el revelado y la detección deben transferirse las bandas del gel de electroforesis a una membrana de nylon. El procedimiento es el siguiente.

- Cortar una membrana de nylon cargada positivamente (*Biodyne[®]B Membrane*, 0.45 μm de PALL Gelman Laboratories) del tamaño del gel.
- Sacar uno de los cristales del soporte del gel, de manera que quede expuesta toda la superficie del gel.
- Colocar la membrana sobre el gel de poliacrilamida, con cuidado, evitando la formación de burbujas de aire entre la membrana y el gel. La membrana debe contactar perfectamente con toda la superficie del gel.
- Colocar tres trozos de papel 3MM sobre la membrana.
- Volver a colocar el cristal que se había retirado anteriormente y poner un peso encima para que se produzca la transferencia del DNA desde el gel a la membrana. Dejar aproximadamente 45 min.
- Sacar la membrana y fijar el DNA utilizando el equipo *UV Stratalinker 2400* (Stratagene).
- Se puede guardar la membrana para su posterior revelado, manteniéndola en papel 3MM a 4°C.

2.7.4.5. Revelado y detección.

La marca de los fragmentos de DNA que se utilizan en este ensayo es de digoxigenina, por lo tanto el procedimiento de revelado será el mismo que el comentado anteriormente utilizado para el revelado de un *southern blot*, utilizando los reactivos del *DIG DNA Labeling and Detection kit Nonradiactive* de Roche Diagnostics S.L.

Las membranas reveladas se mantienen protegidas con plástico por un tiempo indefinido.