



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**TRANSFORMACIÓN DEL GEN *GFP* EN *E. COLI* W3110**  
**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**  
**ALMA YOLANDA ALVA AVILES**



**CD.MX.**

**2016**

Ciudad Universitaria



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Rodolfo Pastelín Palacios**

**VOCAL:**                   **Profesor: José Adelfo Escalante Lozada**

**SECRETARIO:**           **Profesor: Martha Giles Gómez**

**1er. SUPLENTE:**       **Profesor: Beatriz Ruiz Villafan**

**2° SUPLENTE:**         **Profesor: Francisco Alejandro Domínguez Pineda**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: CEPARIO DEL DEPARTAMENTO DE  
BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

\_\_\_\_\_

M. en B. Martha Giles Gómez

**SUSTENTANTE:**

\_\_\_\_\_

Alma Yolanda Alva Aviles

Esta investigación se realizó con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) y se contó con beca-tesis de licenciatura <PE207315>.

<Transformación bacteriana de genes codificados en plásmidos>

Agradezco a la DGAPA-UNAM por la beca otorgada.

## **AGRADECIMIENTOS:**

- A mis padres, hermana y abuelos por todo el apoyo que me han brindado desde hace muchos años, sin ustedes esto no hubiera sido posible.
- A mi asesora M. en B. Martha Giles Gómez por toda su paciencia, apoyo y enseñanzas. Gracias por su confianza y consejos, la quiero y la estimo mucho.
- Al Dr. Adelfo Escalante por brindarnos las cepas, su apoyo y consejos durante la realización de este proyecto. Gracias por dejarme hacer los primeros experimentos en su laboratorio.
- Al Dr. Rodolfo Pastelín por dejarme formar parte de este bonito proyecto.
- A la Dra. Carmen Urzúa y a Jesica Alejandra Ibarra Barrón por las fotos del microscopio de fluorescencia.
- A Vale y Giovanni, gracias por su amistad y apoyo desde los primeros días que llegué al laboratorio.
- A Zaira, Diego y Ana por hacer los días en el cepario más entretenidos.
- A Lily, Andrés y Moi, sin duda no pude encontrar mejores amigos en la Facultad.
- A Luis, Rebeca Angie y Sof por su amistad y apoyo durante tiempo.
- Alejandro tengo infinitas cosas que agradecerte, tú ya las sabes todas, cada vez estamos más cerca de cumplir todas nuestras metas, te amo.

## **AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS:**

- Al profesor Alejandro Camacho Cruz, profesora María Antonieta Silva Chávez y al laboratorista Manuel Vázquez Quintero por el apoyo técnico brindado durante mi estancia en el cepario.

## ÍNDICE.

<b>A. ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	8
<b>B. ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	10
<b>1. RESUMEN</b> .....	12
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	16
<b>3.1.</b> Transferencia horizontal de genes.....	16
<b>3.2.</b> Descubrimiento de la transformación.....	17
<b>3.3.</b> Transformación de células naturalmente competentes.....	19
<b>3.3.1.</b> Transformación en bacterias Gram-positivas.....	20
<b>3.3.2.</b> Transformación en bacterias Gram-negativas.....	21
<b>3.3.2.1.</b> Competencia basada en el sistema de secreción tipo II.....	21
<b>3.3.2.2.</b> Competencia basada en el sistema de secreción tipo IV.....	23
<b>3.3.3.</b> Procesamiento del ADN en el citoplasma celular.....	23
<b>3.4.</b> Quimiotransformación.....	24
<b>3.5.</b> Electrotransformación.....	25
<b>3.5.1.</b> Electroporador.....	29
<b>3.6.</b> Plásmidos.....	30
<b>3.6.1.</b> Plásmidos como vectores de clonación.....	32
<b>3.6.2.</b> Proteína verde fluorescente.....	33
<b>3.7.</b> <i>Escherichia coli</i> .....	35
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	37
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	38
<b>5.1.</b> Objetivo general.....	38
<b>5.2.</b> Objetivos particulares.....	38
<b>6. MATERIAL Y METODOLOGÍA</b> .....	39
<b>6.1.</b> Cepas y medios empleados.....	39
<b>6.2.</b> Conservación a largo plazo de las cepas.....	39
<b>6.3.</b> Reactivación y propagación.....	40
<b>6.4.</b> Confirmación de la identidad genotípica de las cepas utilizadas.....	40
<b>6.4.1.</b> Extracción de ADN cromosomal y electroforesis en el gel de agarosa.....	40

6.4.2. Amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	41
6.4.3. Purificación y secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S.....	42
6.5. Extracción y purificación de ADN plasmídico.....	43
6.6. Curva de McFarland.....	44
6.7. Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> W3110 y <i>E. coli</i> TOP10.....	45
6.8. Preparación de células electrocompetentes.....	45
6.9. Electroporación.....	46
6.10. Preparación de células quimiocompetentes.....	48
6.11. Quimiotransformación.....	48
6.12. Comparación del fenotipo de las cepas parentales y transformantes.....	49
6.12.1. Características microscópicas y pruebas bioquímicas convencionales presuntivas.....	49
6.12.2. Pruebas bioquímicas miniaturizadas: API 20E® (BioMérieux®).....	50
6.12.3. Pruebas bioquímicas automatizadas: Sistema VITEK 2®.....	51
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
7.1. Propagación y conservación.....	52
7.2. Confirmación de la identidad genotípica de las cepas <i>S. Typhimurium</i> PFV 430 y <i>E. coli</i> DH5α <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i> .....	52
7.2.1. Características microscópicas.....	52
7.2.2. Sistema API 20E®.....	53
7.2.3. Sistema VITEK 2®.....	56
7.3. Confirmación de la identidad genotípica de las cepas utilizadas.....	57
7.4. Extracción y purificación de ADN plasmídico.....	61
7.5. Curva de McFarland.....	63
7.6. Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> W3110 y <i>E. coli</i> TOP10.....	64
7.7. Electrotransformación.....	66
7.8. Quimiotransformación.....	75
7.9. Extracción de plásmidos a partir de las cepas transformantes.....	78
7.10. Identidad genotípica de las cepas transformantes.....	79
7.11. Comparación del fenotipos de las cepas parentales y transformantes.....	82

7.11.1. Tinción de Gram.....	82
7.11.2. Microscopía de fluorescencia.....	83
7.11.3. Pruebas bioquímicas convencionales presuntivas.....	84
7.11.4. Sistema API 20E®.....	87
7.11.5. Sistema VITEK 2®.....	90
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>93</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>94</b>
<b>10.1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>94</b>
<b>10.2. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS.....</b>	<b>98</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>100</b>
11.1. <b>ANEXO I:</b> Formulación de los medios elaborados.....	100
11.2. <b>ANEXO II:</b> Metodología para la extracción de ADN cromosomal con el kit UltraClean™ Microbial ADN Isolation (MOBIO®).....	101
11.3. <b>ANEXO III:</b> Metodología para la purificación de los amplicones obtenidos por PCR y plásmidos con el kit Pure Link™ PCR purification (Invitrogen®)...	102
11.4. <b>ANEXO IV:</b> Composición de los sustratos contenidos en los pozos de las tiras API 20E®.....	103
11.5. <b>ANEXO V:</b> Composición de los sustratos contenidos en la tarjeta para la identificación de bacterias Gram negativas del sistema VITEK 2®.....	104

## A. ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Experimento de Griffith que demostró la transformación bacteriana.....	18
<b>Figura 2.</b> Resumen del proceso de transformación natural en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.....	22
<b>Figura 3.</b> Modelo de la electropermeabilización y electroporación.....	27
<b>Figura 4.</b> Estructura cristalizada de la proteína verde fluorescente.....	34
<b>Figura 5.</b> Mapa de los plásmidos utilizados.....	44
<b>Figura 6.</b> Electroporador MicroPulser™ y cubeta de electroporación de 0.2 mm (BioRad®).....	47
<b>Figura 7.</b> Estándares negativos y positivos de las pruebas del sistema API 20E®.....	51
<b>Figura 8.</b> Tinción de Gram de <i>S. Typhimurium</i> PFV 430 y <i>E. coli</i> DH5α <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i> .....	53
<b>Figura 9.</b> Cambios de color observados en los pozos del sistema API 20E® inoculados con <i>S. Typhimurium</i> PFV 430 y <i>E. coli</i> DH5α <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i> .....	55
<b>Figura 10.</b> Gel de agarosa del ADN cromosomal y el gen que codifica para el ARNr 16S de las cepas utilizadas .....	58
<b>Figura 11.</b> Árboles filogenéticos realizados con las secuencias del gen que codifica para el ARNr 16S de las cepas relacionadas con <i>Salmonella</i> Typhimurium PFV 430 y <i>E. coli</i> DH5α <i>km<sup>R</sup>, gfp<sup>+</sup></i> .....	60
<b>Figura 12.</b> Gel de agarosa de los plásmidos extraídos de <i>Salmonella</i> Typhimurium PFV 430 y <i>E. coli</i> DH5α <i>km<sup>R</sup>, gfp<sup>+</sup></i> .....	62
<b>Figura 13.</b> Curva de absorbancia obtenida de una alícuota del plásmido pBABE-GFP sin purificar .....	63
<b>Figura 14.</b> Curva de McFarland.....	64
<b>Figura 15.</b> Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> TOP10 y <i>E. coli</i> W3110.....	65
<b>Figura 16</b> Comparación de las colonias transformantes de TOP10 y <i>E. coli</i> W3110 plaqueadas en diferentes medios.....	72

<b>Figura 17.</b> Colonias satélite observadas bajo luz UV al plaquear la cepa transformante <i>E. coli</i> W3110 <i>ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i> .....	73
<b>Figura 18.</b> Comparación de la fluorescencia de las colonias transformantes de <i>E. coli</i> W3110 <i>ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i> transformadas con el plásmido pBABE-GFP purificado y no purificado.....	74
<b>Figura 19.</b> Gráfica comparativa de las eficiencias obtenidas mediante electrotransformación y quimiotransformación.....	77
<b>Figura 20.</b> Gel de agarosa de los plásmidos extraídos de las cepas transformantes.....	79
<b>Figura 21.</b> Gel de agarosa del ADN cromosomal y el gen que codifica para el ARNr 16S de las cepas transformantes.....	80
<b>Figura 22.</b> Árbol filogenético de las cepas transformantes.....	81
<b>Figura 23.</b> Tinción de Gram de las cepas a partir de las cuales se obtuvieron los plásmidos y las cepas transformantes.....	82
<b>Figura 24.</b> Frotis fijo observado en el microscopio de fluorescencia de las cepas a partir de las cuales se obtuvieron los plásmidos y las cepas transformantes.....	83
<b>Figura 25.</b> Resultados de las pruebas bioquímicas convencionales presuntivas de las cepas parentales y transformantes.....	86
<b>Figura 26.</b> Resultado de las pruebas bioquímicas incluidas en el sistema API 20E® de las cepas parentales y transformantes.....	88

## B. ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Algunas variedades reportadas en el PDB de la proteína verde fluorescente.....	35
<b>Tabla 2.</b> Cepas y medios empleados.....	39
<b>Tabla 3.</b> Mezcla de reacción utilizada para la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S.....	41
<b>Tabla 4.</b> Características de los primers utilizados.....	41
<b>Tabla 5.</b> Programa utilizado en el termociclador MyCycler™ (BioRad®) para la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S.....	42
<b>Tabla 6.</b> Características de los plásmidos pBABE-GFP y pSUPERGLO-GFP.....	44
<b>Tabla 7.</b> Preparación de la curva de McFarland.....	45
<b>Tabla 8.</b> Identidad de <i>S. Typhimurium</i> PFV 430 y <i>E. coli</i> DH5α <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i> de acuerdo con el sistema API 20E®.....	54
<b>Tabla 9.</b> Resultados de las pruebas incluidas en el sistema API 20E® de <i>S. Typhimurium</i> PFV 430 y <i>E. coli</i> DH5α <i>km<sup>R</sup></i> .....	55
<b>Tabla 10.</b> Identidad de <i>S. Typhimurium</i> PFV 430 y <i>E. coli</i> DH5α <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i> de acuerdo con el sistema VITEK 2®.....	56
<b>Tabla 11.</b> Resultados de algunas de las pruebas incluidas en el sistema VITEK 2® de <i>S. Typhimurium</i> PFV 430 y <i>E. coli</i> DH5α <i>km<sup>R</sup></i> .....	57
<b>Tabla 12.</b> Identidad de las cepas utilizadas de acuerdo a la comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos GenBank.....	59
<b>Tabla 13.</b> Concentración y relaciones 260/230 y 260/280 de los plásmidos extraídos de pBABE-GFP y pSUPERGLO-GFP.....	63
<b>Tabla 14.</b> Eficiencias de transformación obtenidas variando la densidad óptica del cultivo y el plásmido utilizado con un pulso eléctrico de 1.8 kV.....	68
<b>Tabla 15.</b> Eficiencias de quimiotransformación utilizando el plásmido pBABE-GFP variando la densidad óptica del cultivo .....	76
<b>Tabla 16.</b> Identidad de las cepas transformantes de acuerdo a la comparación de las secuencias con el Genbank.....	81

<b>Tabla 17.</b> Resultado de las pruebas bioquímicas convencionales presuntivas de las cepas parentales y transformantes.....	85
<b>Tabla 18.</b> Identidad de las cepas parentales y transformantes de acuerdo con el sistema API 20E® .....	88
<b>Tabla 19.</b> Resultado de las pruebas bioquímicas incluidas en las tiras API 20E® de las cepas parentales y transformantes.....	89
<b>Tabla 20.</b> Identidad de las cepas parentales y transformantes de acuerdo al sistema VITEK 2® .....	91
<b>Tabla 21.</b> Resultado de algunas de las pruebas bioquímicas contenida en la tarjeta de Gram-Negativos del sistema VITEK 2® de las cepas parentales y transformantes.....	92
<b>Anexo IV.</b> Composición de los sustratos contenidos en los pozos de las tiras API 20E® .....	103
<b>Anexo V.</b> Composición de los sustratos contenidos en la tarjeta para la identificación de bacterias Gram-negativas del sistema VITEK 2® .....	104

## 1. RESUMEN.

La transformación bacteriana es uno de los mecanismos por el cual se pueden transferir genes horizontalmente y se lleva a cabo cuando una célula naturalmente competente es capaz de introducir material genético extracelular (en este caso un plásmido) y no es degradado por las diferentes nucleasas presentes en el citoplasma de la célula. En los últimos años, la transformación ha tomado gran importancia en diferentes áreas de investigación y aplicaciones industriales debido a que se pueden obtener cepas recombinantes capaces de producir diferentes metabolitos de interés; la cepa más utilizada es *E. coli* ya que se considera una de las cepas mejor estudiadas, desde su genoma hasta sus características fenotípicas.

En este trabajo se buscaron las condiciones óptimas para lograr la electrotransformación y quimiotransformación de una cepa silvestre de *E. coli* (*E. coli* W3110) y una cepa comercial (*E. coli* TOP10) para obtener cepas recombinantes que expresen la proteína verde fluorescente y que sean resistentes a ampicilina o kanamicina. Se obtuvieron 4 cepas recombinantes y se observó que las mejores eficiencias se conseguían utilizando el método de electrotransformación con un cultivo de *E. coli* TOP10 con una D.O.<sub>600</sub> de 0.9 y un pulso eléctrico de 1.8 kV durante 5 ms.

Se comparó el fenotipo de las cepas parentales y transformantes mediante pruebas bioquímicas convencionales, miniaturizadas y automatizadas, en esta última, se observaron diferentes resultados en las pruebas de fermentación de glucosa, tirosina arilamidasa, D-trealosa, L-lactato, succinato,  $\alpha$ -galactosidasa, lisina descarboxilasa, resistencia a O/129 y ELLMAN probablemente debido al efecto que tiene la presencia del plásmido en las células así como a las condiciones de estrés a las que están sometidas. Así mismo, se realizó un análisis filogenético de estas cepas utilizando el gen que codifica para el ARNr 16S en el cual, se determinó que la carga extra de material genético no altera la identidad de las cepas transformantes.

## 2. INTRODUCCIÓN.

La transformación bacteriana se lleva a cabo cuando una cepa naturalmente competente acepta material genético extracelular y no es degradado en el citoplasma de la misma (Snyder *et al.* , 2013). La primera evidencia de esta transferencia horizontal de genes ocurrió en 1928 cuando Griffith realizaba sus estudios sobre la virulencia en ratones de dos cepas de *Streptococcus pneumoniae*, una cepa con morfología colonial de aspecto liso (patógena) y una cepa de aspecto rugoso (no patógena). En este estudio, Griffith notó que si mezclaba a la cepa rugosa con la cepa lisa después de ser sometida a un proceso de calentamiento, la cepa rugosa era capaz de infectar y matar a los ratones, años después Avery y sus colegas descubrieron que existía una transferencia de ADN que provocaba que la cepa rugosa fuera capaz de infectar a los ratones, este fenómeno fue conocido como transformación y marcó el principio de la era de la genética molecular (Vee Aune y Achmann, 2009).

Hasta el 2014, se tenían registradas 82 cepas diferentes capaces de transformarse de manera natural dentro de las cuales se han utilizado como modelos de estudio a *Streptococcus pneumoniae* (Gram-positiva) y *Haemophilus influenzae* (Gram-negativa), debido a que este número no es tan amplio y a que la eficiencia de transformación es relativamente baja, se han desarrollado diferentes metodologías para que cepas no competentes naturalmente puedan ser transformadas con una mejor eficiencia (Johnston *et al.* , 2014; Vee Aune y Achmann, 2009) y así ser utilizadas con diferentes propósitos industriales y de investigación como son la producción de diferentes metabolitos de interés a nivel industrial y la creación de bibliotecas de clonas.

Los métodos utilizados para la transformación de cepas no competentes son muy variados y tienen diferentes fundamentos, sin embargo, en la mayoría de los protocolos se siguen tres pasos fundamentales: preparación de células competentes, etapa de “choque” y recuperación de las células (Vee Aune y Achmann, 2009). Uno de los métodos más utilizados para la transformación de cepas no competentes naturalmente es la transformación química o

quimiotransformación, la cual consiste en tratar a las células con cloruro de calcio para hacer más lábil a la membrana y así, al ser sometidas a un choque térmico, se generen poros no selectivos lo que facilita el paso del ADN al interior de la célula (Snyder *et al.*, 2013).

Otro de los métodos más utilizados se conoce como electrotransformación y consiste en mezclar al ADN desnudo con células electrocompetentes, a esta mezcla se le aplican pulsos eléctricos los cuales generan poros no selectivos en la membrana de la célula para que de esta manera el ADN pueda atravesarla (Eynard y Teissié, 2000; Snyder *et al.*, 2013). El pulso eléctrico es generado por un equipo llamado electroporador el cual almacena la energía en un capacitor que se encuentra dentro del equipo para que después, este voltaje sea descargado mediante unos electrodos en la cubeta de la electroporación dónde se encuentra la muestra (Puc *et al.*, 2004).

La transformación de cepas no competentes naturalmente en lo general, se realiza utilizando ADN plasmídico debido a que al ser una doble cadena circular covalentemente cerrada presenta una menor susceptibilidad a ser degradada por las endonucleasas presentes en el citoplasma de las bacterias (Snyder *et al.*, 2013), además, actualmente existen plásmidos sintéticos y diferentes metodologías mediante las cuales se pueden introducir genes de selección así como genes que codifican para diferentes metabolitos de interés. Otra de las ventajas de los plásmidos es que su replicación es independiente del ADN cromosomal y a diferencia de este, puede existir más de una copia del plásmido en una célula (Snyder *et al.*, 2013). Debido a estas características, los plásmidos han sido utilizados desde hace varios años como vectores de clonación para la transformación de diferentes cepas bacterianas.

Los dos plásmidos utilizados en este proyecto codifican para la proteína verde fluorescente (GFP) la cual se encuentra de manera natural en las medusas (*Aequorea victoria*), sin embargo, debido a sus variadas aplicaciones el gen que la codifica fue clonado desde 1992 en *Escherichia coli* y *Caenorhabditis elegans* (Ferrer, 2008). El uso más común de la proteína GFP ha sido como marcador *in*

vivo para el estudio de la localización y tráfico intracelular de las proteínas, ya sea en organismos procariontes o eucariontes ya que se ha demostrado que esta proteína no genera un efecto tóxico en las células (Micklos *et al.*, 2003).

Debido a la importancia de la transformación utilizando los métodos de electrotransformación y quimiotransformación este proyecto tiene como objetivo estudiar y determinar cuáles son las mejores condiciones para llevar a cabo la transformación en las cepas *E. coli* TOP10 y *E. coli* W3110 utilizando dos plásmidos, el primero codifica para la resistencia a ampicilina y la producción de proteínas GFP mientras que el segundo codifica para la resistencia a kanamicina y la producción de la misma proteína.

### 3. ANTECEDENTES.

#### 3.1. Transferencia horizontal de genes.

La transferencia horizontal de genes (HGT por sus siglas en inglés), es el proceso en el cual el material genético es transmitido entre dos células de manera diferente al proceso habitual de herencia, es decir, el material genético no se transmite de una célula madre a una célula hija (Madigan *et al.*, 2009). En bacterias, se conocen 3 mecanismos diferentes que ocurren naturalmente mediante los cuales se pueden transferir genes horizontalmente, los cuales son:

- Transformación: en el cual el ADN desnudo del ambiente extracelular se introduce a la célula quedando en el citoplasma o introduciéndose al cromosoma.
- Transducción: la cual esta mediada por bacteriófagos y solo se transmiten los genes entre las bacterias que pueden ser reconocidas por cierto tipo de virus.
- Conjugación: en el cual se necesita de un contacto mediante el pili sexual de una célula donadora (F<sup>+</sup>) y una célula receptora (F<sup>-</sup>) para el caso de *E. coli* (Dutta y Sarkar, 2015).

Para que los genes que se transmiten por cualquiera de estos tres mecanismos se encuentren estables en la célula y puedan ser heredados a las siguientes generaciones debe de ocurrir alguno de los siguientes procesos: recombinación homóloga, recombinación en sitios específicos, que el fragmento que se esté transmitiendo se comporte como un episoma o la integración del fragmento transmitido al cromosoma mediado por elementos genéticos móviles (Dutta y Sarkar, 2015).

La transferencia horizontal de genes ha sido de gran importancia ya que se han logrado modificar diferentes tipos de organismos con la finalidad de obtener productos de interés como son diferentes aditivos alimentarios, hormonas, enzimas e incluso plantas transgénicas con una mayor resistencia a condiciones ambientales, entre muchos ejemplos más (Madigan *et al.*, 2009). A pesar de esta gran ventaja, estos mecanismos también han generado cambios drásticos en la

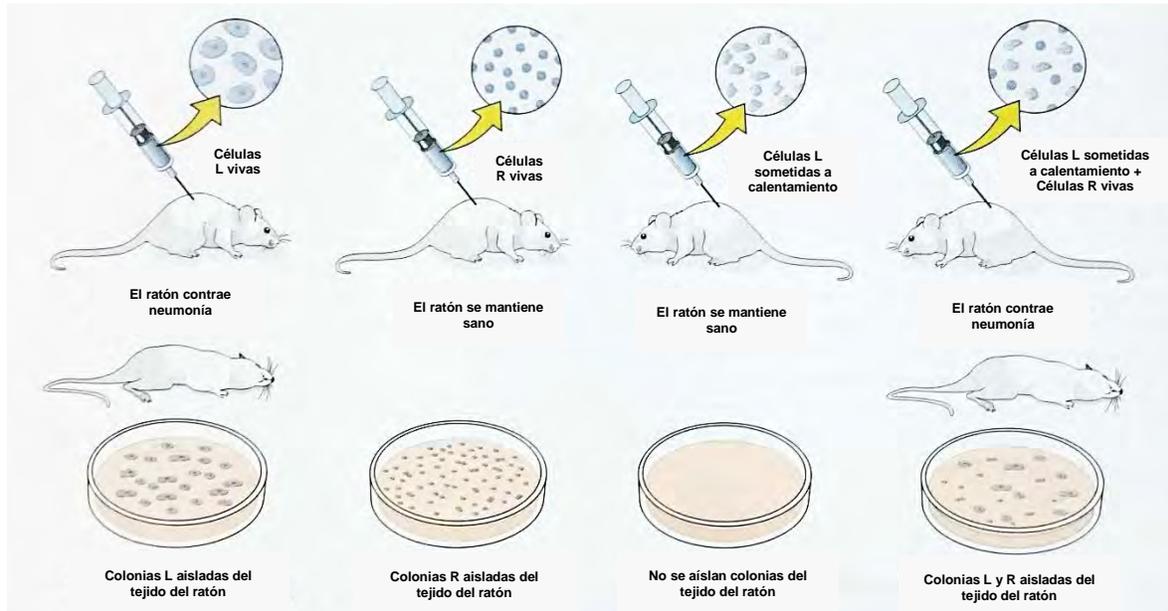
ecología y patogenicidad de los microorganismos ya que, por lo general, los genes que se transfieren de esta manera codifican para la resistencia a diferentes antibióticos, factores de virulencia, resistencia para desarrollarse en ambientes adversos, complementación de auxotrofias, entre otros (Madigan *et al.*, 2009).

Los tres mecanismos mencionados anteriormente han sido utilizados como modelo en muchos de los protocolos que actualmente se utilizan en el área de biotecnología ya que a diferencia de la evolución adaptativa en laboratorio (ALE, por sus siglas en inglés), la transferencia horizontal de genes genera cambios en un menor tiempo, sin embargo, no es posible generar varias modificaciones en el material genético del microorganismo al mismo tiempo como es en el caso de la evolución adaptativa en laboratorio ya que los vectores de clonación utilizados limitan el número de genes que se pueden introducir a una célula. En ambos casos, se prefiere utilizar microorganismos como *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae* ya que, al ser unicelulares, pequeños y con un genoma relativamente simple, los cambios en su metabolismo son más evidentes (Dragosits y Mattanovich, 2013; Dutta y Sarkar, 2015).

### **3.2. Descubrimiento de la transformación.**

La transformación fue el primer mecanismo de intercambio genético en ser descubierto por Griffith en 1928 cuando realizaba estudios sobre la virulencia en ratones de dos cepas de *Streptococcus pneumoniae*. La virulencia de esta cepa depende de la producción de una cápsula de exopolisacarido (cepa lisa) la cual protege a la célula del sistema inmune del huésped provocando así neumonía, esta enfermedad puede llegar a ser letal si el paciente no es tratado adecuadamente, adicionalmente, Griffith logró aislar algunas colonias mutantes de esta cepa que no producían exopolisacárido (cepa rugosa) la cual, no era letal para los ratones. En experimentos posteriores, se probó que la cepa lisa al ser sometida a altas temperaturas no afectaba a los ratones, sin embargo, al mezclarla con la cepa rugosa, esta era capaz de infectarlos (Figura 1).

Durante años, se creía que las células capaces de infectar al ratón contenían un “principio de transformación” compuesto de una molécula desconocida hasta que en 1944, O. Avery, C. MacLeod y M. McCarty descubrieron su composición química.



**Figura 1. Experimento de Griffith que demostró la transformación bacteriana.** Los ratones morían por neumonía cuando se les inyectaba la cepa virulenta lisa (L) de *Streptococcus pneumoniae*, sin embargo, el ratón se mantenía sano cuando era infectado con la cepa rugosa (R) no virulenta o la cepa L sometida a calentamiento. La células R combinadas con las células L sometidas a calentamiento lograban infectar al ratón debido a que ocurría el proceso de transformación (Tropp, 2014).

Sus experimentos consistieron en aislar el “principio de transformación” de la cepa patógena el cual, era incubado con células vivas de la cepa rugosa y después de cierto tiempo, la mezcla era plaqueada en agar, después de la incubación de las cajas Petri observaron células rugosas y algunas células lisas las cuales fueron sembradas para demostrar que existía un cambio genético permanente en la célula. Para que pudieran determinar que la molécula era ADN realizaron lo descrito anteriormente únicamente con el polisacárido de la cápsula sin obtener ninguna célula lisa, posteriormente el “principio de transformación” fue tratado con tripsina, quimiotripsina y/o RNasa y se observó que se obtenían células lisas y rugosas concluyendo así que las moléculas de ARN y proteínas no eran las

responsables de la transformación; por último, el “principio de transformación” se incubó con DNasa la cual era capaz de inactivarlo y por lo tanto, no se obtenía ninguna cepa lisa (Tropp, 2014). A pesar de los resultados obtenidos por Avery y sus colegas, su teoría no fue totalmente aceptada hasta que 5 años después, Rollin Hotchkiss repitió el experimento utilizando ADN altamente purificado (solo 0.02% de proteína) y en lugar de solo observar las características morfológicas de las cepas, obtuvo otras cepas transformantes resistentes a la penicilina (Tropp, 2014).

### **3.3. Transformación de células naturalmente competentes.**

La transformación bacteriana ocurre naturalmente cuando existe ADN desnudo en el ambiente extracelular y una célula receptora que sea capaz de introducirlo a su citoplasma sin que sea degradado por alguna nucleasa; para que esto ocurra es necesario que en su genoma contenga diferentes genes que codifiquen para diferentes proteínas que ayudaran a la bacteria a captar el ADN; en la mayoría de las bacterias dichos genes solo se expresan bajo condiciones específicas lo cual hace aún más improbable que las células bacterianas puedan transformarse de manera natural (Johnston *et al.*, 2014).

Hasta el 2014, se estimaba que existían al rededor 82 especies diferentes capaces de transformarse de manera natural dentro de las cuales destacan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, entre otros (Johnston *et al.*, 2014; Snyder *et al.*, 2013).

Las bacterias que son capaces de introducir ADN desnudo a su citoplasma son conocidas como bacterias naturalmente competentes, a pesar de que la transformación natural no ocurre por medio de un mecanismo universal, se han encontrado algunas generalidades que ocurren en este proceso. Debido a que el proceso mediante el cual el ADN es introducido a la célula bacteriana depende de las características de su pared y membrana celular, los modelos más estudiados en el caso de bacterias Gram-positivas son *Bacillus subtilis* y *Streptococcus*

*pneumoniae* mientras que para el caso de las bacterias Gram-negativas son *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae* (Snyder *et al.*, 2013).

### 3.3.1. Transformación en bacterias Gram-positivas.

Para que la transformación pueda llevarse a cabo es necesario tener como sustrato una doble cadena de ADN la cual, en el caso de *B. s subtilis* y *S. pneumoniae* puede provenir prácticamente de cualquier especie, además, las bacterias deben ser capaces de sintetizar diferentes proteínas denominadas Com; en *B. subtilis* estas proteínas están codificadas en diferentes operones (Johnston *et al.*, 2014).

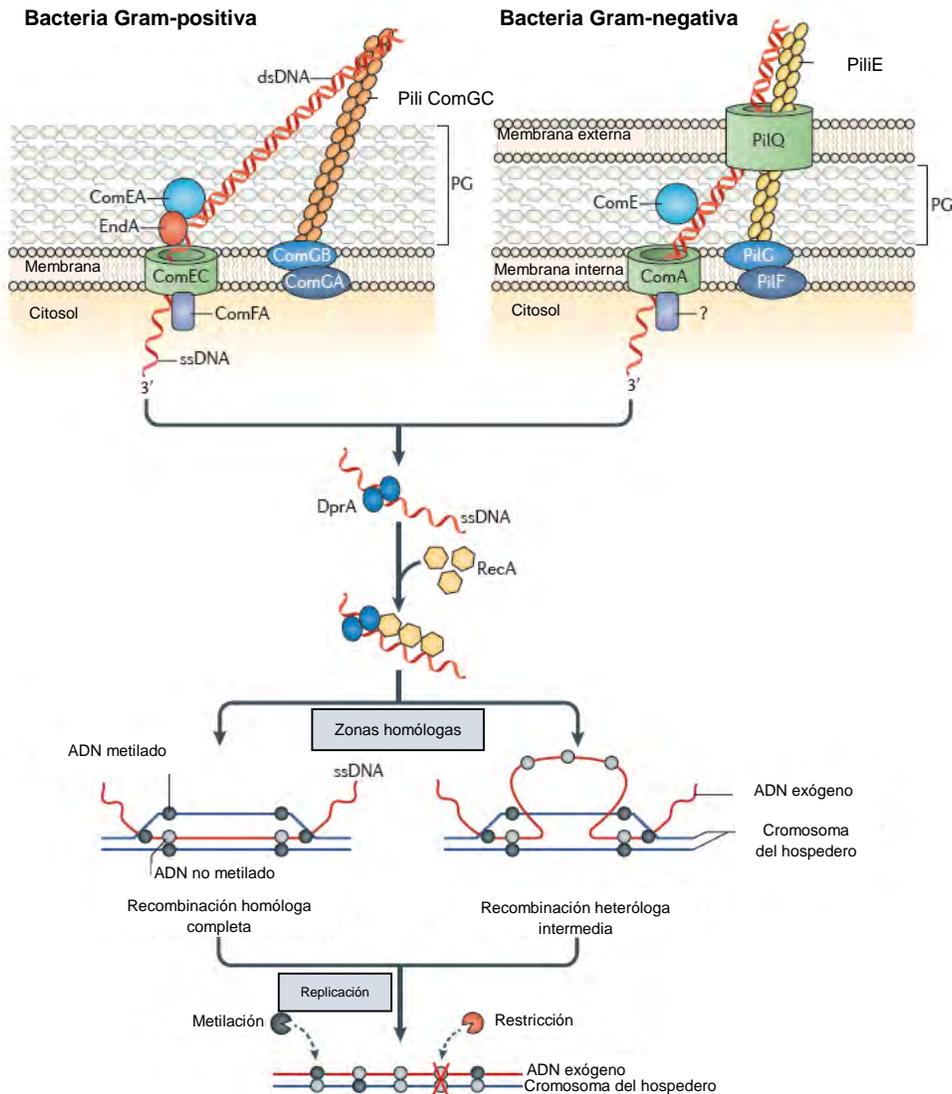
Este proceso natural comienza cuando el ADN se une a la célula mediante un pseudopili de competencia (codificado en el operon *comG*) debido a interacciones electroestáticas; este pseudopili se asemeja a un pili tipo IV el cual es característico del sistema de secreción tipo II; está compuesto de 40-100 monómeros de ComGC los cuales son ensamblados por las proteínas ComGB y ComGA. Una vez que la doble cadena de ADN está unida a la superficie celular, esta comienza a ser degradada por la endonucleasa NucA en fragmentos de aproximadamente 6 kbp en el caso de *S. pneumoniae* mientras que en *B. subtilis* los fragmentos pueden ser de hasta 15 kbp. Estos fragmentos son llevados desde la pared celular hasta la membrana debido a que el pseudopili comienza a despolimerizarse y por tanto a retraerse; una vez que el ADN está en la membrana es unido a su superficie mediante la proteína ComEA y una cadena del ADN es degradada por la nucleasa EndA (la proteína recibe este nombre solo en el caso de *S. pneumoniae*) mientras que la otra es transportada al interior de la célula a través del canal ComEC usando a ComFA como una ADN translocasa dependiente de ATP (Figura 2) (Snyder *et al.*, 2013).

### **3.3.2. Transformación en bacterias Gram-negativas.**

A diferencia de las bacterias Gram-positivas, las bacterias Gram-negativas suelen aceptar solo ADN proveniente de la misma especie o de especies que estén estrechamente relacionadas, esto se ha visto especialmente en algunas cepas patógenas como *Neisseria* spp. y *Haemophilus* spp. Otra diferencia que presentan estos microorganismos es que utilizan dos tipos de mecanismos por los cuales pueden captar el ADN, uno se relaciona con el sistema de secreción tipo II mientras que el otro se relaciona con el sistema de secreción tipo IV (Johnston *et al.*, 2014).

#### **3.3.2.1. Competencia basada en el sistema de secreción tipo II.**

La mayoría de las cepas son capaces de captar el ADN del ambiente extracelular utilizando el sistema de secreción tipo II el cual es necesario para ensamblar el pili tipo IV. El mecanismo por el cual el ADN se introduce a la célula es muy parecido al mecanismo utilizado por las bacterias Gram-positivas, sin embargo, las bacterias Gram-negativas forman el pseudopili de transformación con monómeros de pilina (PilE), además, presentan una membrana externa en la cual se genera un poro formado de 12-14 unidades de secretina (en el caso de *Neisseria* spp. recibe el nombre del PilQ) generando así un canal hidrofílico por donde la doble cadena de ADN atraviesa la membrana externa; una vez que la doble cadena está en la membrana interna una de ellas es degradada mientras que la otra atraviesa otro canal formado por la proteína ComA (Figura 2) (Johnston *et al.*, 2014; Snyder *et al.*, 2013). Recientemente se ha demostrado que en algunas bacterias Gram-negativas como *H. influenzae*, el ADN es capturado inicialmente por unas vesículas asociadas a la membrana llamadas transformasomas las cuales son capaces de transportar al ADN por la membrana externa y procesarlo a ADN de cadena sencilla el cual es capaz de atravesar la membrana interna (Snyder *et al.*, 2013).



**Figura 2. Resumen del proceso de transformación natural en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.** **Gram-positivas:** La maquinaria de captura del ADN extracelular comprende generalmente de un pili de transformación (TfP) el cual consiste principalmente de la subunidad ComGC. El TfP captura el ADN exógeno de doble cadena (dsDNA). En *S. pneumoniae* el receptor ComEA cede el ADN a la nucleasa EndA la cual comienza a degradar una de las cadenas generando así ADN de cadena sencilla (ssDNA). La ssDNA se internaliza al citoplasma a través de la proteína ComEC la cual actúa como una translocasa dependiente de ATP. **Gram-negativas:** La maquinaria consiste en un canal de secretina (PilQ) el cual permite que el pili cruce la membrana externa junto con el dsDNA, el cual atraviesa la proteína ComA para llegar al citosol. En ambos casos, el ssDNA se une con la proteína DprA (Proteína A de procesamiento del ADN) y está a su vez une a la recombinasa RecA. Con ayuda de promotores, la proteína RecA busca secuencias homólogas entre el ADN exógeno y el ADN cromosomal de la bacteria. Si se encuentran secuencias homólogas, se forma un heteroduplex el cual, si presenta una alta homología hay una recombinación, sin embargo, si existen secuencias heterólogas flanqueadas por secuencias homólogas ocurre una recombinación mediada por horquillas de cadena sencilla. Si la secuencia heteróloga de ADN no está metilada (círculos grises), este ADN permanece sin metilar en las células hijas. La actividad de metilación y restricción del sistema restricción-modificación (R-M) (flechas discontinuas), compite por acceder a esta zona del ADN lo cual provocaría la muerte de las células transformantes y limitaría la transformación heteróloga. PG=Peptidoglicano (Johnston *et al.*, 2014).

### **3.3.2.2. Competencia basada en el sistema de secreción tipo IV.**

Hasta el momento, el único microorganismo capaz de transformarse naturalmente basado en el sistema de secreción tipo IV es *Helicobacter pylori*. Se ha sugerido que esta cepa introduce el ADN al periplasma mediante la proteína ComB y posteriormente, el ADN es transportado al citoplasma a través de un poro transmembranal parecido a ComEC (Johnston *et al.*, 2014; Snyder *et al.*, 2013).

Otra gran diferencia de esta cepa con el resto de las bacterias competentes es que se ha demostrado que *H. pylori* es una cepa “competente constitutiva” ya que puede transformarse en la mayoría de las fases de crecimiento (Johnston, *et al.*, 2014).

### **3.3.3. Procesamiento del ADN en el citoplasma celular.**

Debido a que el ADN de cadena sencilla es altamente susceptible a ser degradado, una vez que está dentro del citoplasma es rodeado por proteínas de unión a cadena sencilla de ADN para que posteriormente, la proteína RecA busque zonas homólogas entre la cadena sencilla de ADN y el cromosoma de la célula receptora. Existen algunos casos en los cuales hay una alta homología en las secuencias facilitando así que el fragmento de ADN exógeno se recombine con el cromosoma logrando así que esta información genética pueda ser transmitida a futuras generaciones, sin embargo, hay casos en los que las secuencias no son idénticas lo que provoca la formación de horquillas de cadena sencilla, especialmente si hay zonas heterólogas flanqueadas por zonas homólogas. El ADN que está en estas horquillas es altamente susceptible al sistema de restricción-modificación por lo que es probable que la cepa transformante así como las generaciones futuras pierdan la información adquirida (Figura 2) (Johnston *et al.*, 2014; Snyder *et al.*, 2013).

### 3.4. Quimiotransformación.

Las diferentes metodologías de transformación surgieron con la finalidad de poder tener protocolos más seguros con los cuales se pudieran obtener buenas eficiencias en la transferencia horizontal de genes sin la necesidad de utilizar virus (Young y Dean, 2015). El primer reporte de la utilización de la quimiotransformación fue en 1970 realizado por Mendel y Higa quienes demostraron que al tratar células de *E. coli* (cepa no competente) con  $\text{CaCl}_2$  eran capaces de introducir ADN de un fago sin la necesidad de que este infectara a la célula (Vee Aune y Aachmann, 2009). Años después, Cohen y sus colegas realizaron este mismo experimento pero con la utilización de ADN plasmídico y desde entonces, esta metodología ha sido utilizada para la transformación de bacterias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella Typhimurium* usando combinaciones de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$  para tratar a las células, sin embargo, las eficiencias de transformación no eran las esperadas ya que solo se obtenían de  $10^5 - 10^6$  UFC/ $\mu\text{g}$  de ADN (Vee Aune y Aachmann, 2009).

Para tratar de aumentar la eficiencia de transformación, diferentes investigadores probaron diversos cationes divalentes y se encontró que existía un efecto positivo en la eficiencia de transformación al utilizar  $\text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ , además, si se combinaban con cationes como  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{HACo}^{3+}$  se obtenían mejores resultados (Vee Aune y Aachmann, 2009). Teniendo como antecedente lo anterior, se probaron diferentes concentraciones de  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  encontrándose que las concentraciones óptimas para la quimiotransformación de *E. coli* son de 40 mM y 10 mM respectivamente. Los cationes pueden mejorar la eficiencia de transformación debido a que con su carga positiva logran que el ADN pueda compactarse más facilitando así que pase por la membrana, además, evita que exista una repulsión electroestática entre el ADN y la membrana celular (Vee Aune y Aachmann, 2009).

Con la finalidad de aumentar aún más la eficiencia de transformación se probaron diferentes tratamientos no letales para lograr aumentar la permeabilidad de la membrana dentro de los cuales destacan el tratamiento de las células con EDTA,

choque osmótico y choque térmico, este último fue el único que presentó resultados positivos y se determinó que la temperatura óptima era de 42°C durante 1 minuto o 37°C durante 5 minutos, siendo 42°C/30 segundos las condiciones óptimas para células de *E. coli* (Vee Aune y Aachmann, 2009), además, se demostró que al incubar las células en hielo antes de someterlas al choque térmico aumentaba la eficiencia de transformación debido a que la membrana celular pierde cierta fluidez lo que favorece la interacción de esta con los cationes presentes en el medio evitando así su repulsión con el ADN.

Otro punto importante a considerar para obtener buenos rendimientos de transformación es la fase de crecimiento en la que se encuentre el cultivo antes de preparar las células quimiocompetentes, de acuerdo con Taketo y Kuno (1974), las mejores eficiencias de transformación utilizando células de *E. coli* se obtienen con un cultivo que se encuentre en una etapa temprana de la fase exponencial (D.O.<sub>600nm</sub> 0.3-0.4).

Con el paso de los años, se han empleado diferentes metodologías, cepas y material genético con los que se han obtenido eficiencias de transformación de hasta  $\sim 2 \times 10^9$  UFC/ $\mu$ g ADN (Hanahan *et al.*, 1991), sin embargo, los protocolos utilizados suelen ser bastante tediosos y complejos por lo que son poco utilizados.

### **3.5. Electrotransformación.**

La electrotransformación es un método físico que consiste en dar pulsos eléctricos de alto voltaje a las células lo que genera un aumento en la conductividad eléctrica y permeabilidad de la membrana celular, este efecto es conocido como electroporación de membrana. Esta metodología surgió porque no todas las células podían ser transformadas por el método de quimiotransformación y se obtenían eficiencias de transformación bajas, debido a esto, se realizaron diferentes investigaciones en las cuales se demostró que al aplicar un voltaje de 5-10 kV/cm de 5 – 10 ms a diferentes tipos de células bacterianas, se formaban poros no selectivos en la membrana celular por los cuales el ADN desnudo era

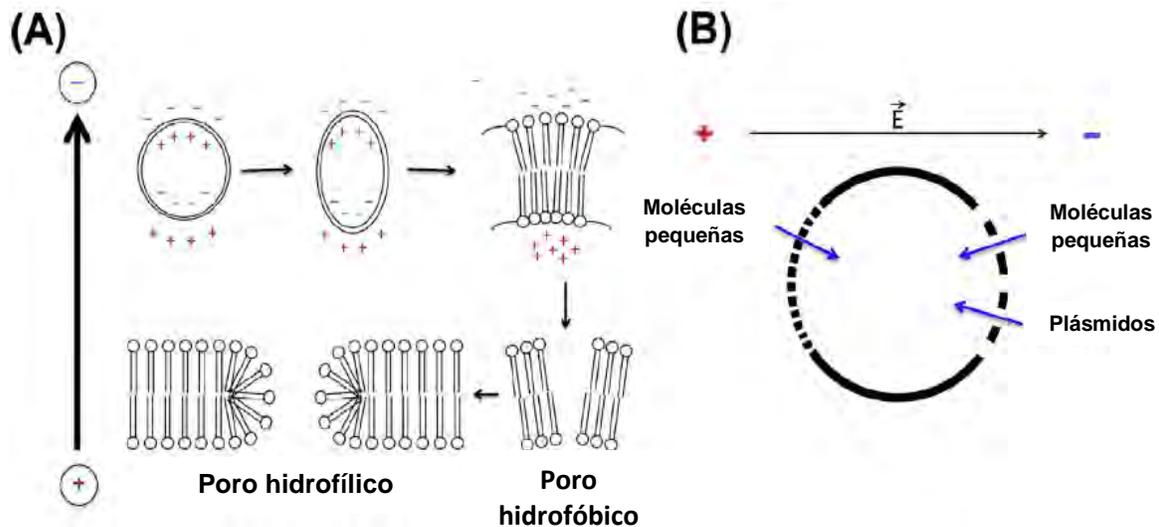
capaz de introducirse a la célula. La primera electroporación exitosa fue realizada en células de *Lactococcus lactis* por Harlander en 1985, años después, la metodología fue optimizada por Chassy y Flickinger logrando así transformar diferentes cepas como *E. coli*, *B. acillus* sp., *B. revibacterium* sp., *Li steria* sp., *Clostridium* sp., entre otras (Vee Aune y Aachmann, 2009).

Se ha demostrado que la transformación por el método de electroporación es más eficiente que la quimiotransformación ya que por lo general, se obtienen eficiencias de transformación de  $10^4 - 10^8$  UFC/ $\mu$ g ADN dependiendo de las características de la pared y membrana celular así como el tipo de material genético que se desea introducir a la célula, debido a esto, es necesario optimizar esta metodología para cada tipo de célula y material genético que se deseé utilizar (Vee Aune y Aachmann, 2009).

La teoría de la electroporación de membrana considera que cuando las células están expuestas a un campo eléctrico, la membrana citoplasmática puede cargarse de tal manera que causa que las cabezas polares de los lípidos adyacentes se reordenen generando así poros no selectivos por los cuales puede entrar el ADN (Figura 3), dichos poros deben de cerrarse (electroporación reversible) después del pulso eléctrico para que las células puedan conservar su viabilidad (Kotnik *et al.*, 2015; Young y Dean, 2015).

El pulso eléctrico aplicado a las células por lo general es de 1 a 20 kV/cm de 1 a 30 ms y depende del tipo de célula y material genético que se someterá a este procedimiento (Kotnik *et al.*, 2015). Se ha demostrado que mientras más largo sea el pulso aplicado a la célula se forman poros no selectivos en la membrana celular más grandes, sin embargo, la eficiencia de transformación no se ve favorecida ya que estos poros tienden a cerrarse más rápido que poros más pequeños, en tanto que estos últimos coalescen generando poros de un mayor tamaño (Young y Dean, 2015).

A pesar de que aún no se ha demostrado como es que el ADN llega hasta el citosol de la célula, diferentes experimentos apuntan a que el ADN es capaz de atravesar directamente la bicapa lipídica (Young y Dean, 2015).



**Figura 3. Modelo de la electroporación y electropermeabilización.** (A) La presencia de un pulso eléctrico induce el movimiento y la redistribución de los dipolos macromoleculares dentro y fuera de la célula resultando en la acumulación de cargas en toda la membrana. Una vez que el potencial transmembranal excede la fuerza dieléctrica de la membrana, el evento de permeabilización ocurre, generando pequeños poros hidrofílicos que se estabilizan y se unen formando poros lo suficientemente grandes que permiten el paso de macromoléculas como ADN plasmídico. (B) La permeabilización de la célula inducido por un campo eléctrico genera poros de diferentes tamaños, los poros pequeños se forman en los dos polos de la célula mientras que los poros más grandes solo pueden formarse en el polo negativo (Young y Dean, 2015).

Para que pueda llevarse a cabo la electrotransformación es necesario someter a las células que se desean transformar a un proceso de preparación de células electrocompetentes el cual, tiene como objetivo quitar los iones presentes en el medio así como, agregar sustancias no iónicas como el glicerol para prevenir un choque osmótico (Snyder *et al.*, 2013). Las células electrocompetentes por lo general se acondicionan cuando el cultivo se encuentra en la mitad de la fase exponencial ya que en esta etapa, tanto la pared como la membrana de las células aún no están totalmente formadas lo cual facilita la formación de los poros no

selectivos al aplicar el pulso eléctrico; debido a esto, se ha demostrado que la eficiencia de transformación en bacterias Gram-negativas es mayor en comparación a las bacterias Gram-positivas, microalgas y levaduras ( $10^7$ - $10^{10}$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN,  $10^5$ - $10^7$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN y  $10^4$ - $10^7$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN respectivamente) (Kotnik *et al.*, 2015). Otro motivo por el cual las células competentes se preparan en esta fase de crecimiento es debido a que si existe una alta cantidad de células (mayor a  $5 \times 10^8$  células por mL en el caso de *E. coli*), éstas aumentarían la conductividad del medio debido a que en sus membranas existe cierta concentración de iones los cuales provocarían una disminución de hasta tres órdenes de magnitud en la eficiencia de transformación (Eynard y Teissié, 2000).

Otro punto importante a considerar en la transformación bacteriana es el tipo de material genético que se desea introducir a la célula ya que se ha demostrado que utilizando ADN circular y superenrollado de doble cadena se obtienen mejores eficiencias de transformación que al utilizar ADN circular de cadena sencilla o ADN lineal ya que los últimos dos presentan un mayor tamaño lo que desfavorece su paso por los poros, además, son más susceptibles a ser degradados por las diferentes nucleasas presentes en el citoplasma celular (Kotnik *et al.*, 2015).

La electrotransformación tiene 4 aplicaciones principales las cuales son la producción de biomoléculas utilizando a las células como “fábricas” para la producción de hormonas, enzimas, antígenos, aditivos alimentarios entre otros; la creación de microorganismos resistentes a diferentes condiciones como es el caso de la producción de cepas probióticas capaces de resistir las diferentes condiciones presentes en el tracto gastrointestinal; en medicina para las electroquimioterapias y por último, en la ciencia básica para poder estudiar uno o varios genes en un célula hospedera (Kotnik *et al.*, 2015; Puc *et al.*, 2004).

### 3.5.1. Electroporador.

Un electroporador es un aparato capaz de generar el pulso eléctrico necesario para que se lleve a cabo la electroporación de las células de una muestra. Desde el punto de vista eléctrico, solo existen dos tipos de electroporadores: aquellos que descargan el voltaje que previamente se almacenó en un capacitor y aquellos que cuentan con un generador de onda cuadrada (Eynard y Teissié, 2000).

Los electroporadores que se basan en la descarga del voltaje realizan esta función en dos fases diferentes, la primera fase consiste en cargar un alto voltaje en el capacitor que se encuentra dentro del equipo para que después, en la segunda fase, este voltaje sea descargado mediante unos electrodos paralelos a la cubeta de electroporación en dónde se encuentra la muestra (Eynard y Teissié, 2000; Puc *et al.*, 2004). Cuando el capacitor es descargado en la muestra, el voltaje a través de los electrodos aumenta rápidamente generando un pico de voltaje, sin embargo, este decrece con forme pasa el tiempo, este decremento es denominado como  $\tau$  y representa el tiempo en el cual la intensidad del pulso eléctrico ha disminuido el 67% (Eynard y Teissié, 2000). La velocidad con la que ocurre este fenómeno afectará la eficiencia de transformación y se ha demostrado que una constante de 5 ms es suficiente para electroporar células de *E. coli* (Puc *et al.*, 2004).

Para lograr obtener resultados favorables se prefieren volúmenes de muestra menores a 40  $\mu\text{L}$  y medios con una baja conductividad eléctrica como es el caso del glicerol, además, tanto las células electrocompetentes y el plásmido deben de ser lavados y purificados adecuadamente con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de sales posibles presentes en el medio ya que éstas aumentan la conductividad del medio lo cual provoca que el pulso eléctrico decaiga con una mayor rapidez (Eynard y Teissié, 2000).

Una de las desventajas de este equipo es que provoca que la muestra se caliente debido a que parte de la energía aplicada a la cubeta de electroporación se disipa en forma de calor lo cual genera un aumento en la temperatura de la muestra que

puede ser desde 1 °C hasta 70 °C dependiendo del capacitor con el que cuente el equipo, este aumento en la temperatura de la muestra puede provocar desde la desnaturalización de las proteínas hasta la desnaturalización del material genético; debido a esto, es de suma importancia colocar tanto la muestra como la cubeta de electroporación en hielo antes de ser sometidas al pulso eléctrico para evitar que la muestra se desnaturalice o se queme (Eynard y Teissié, 2000; Kotnik *et al.*, 2015).

Las cubetas de electroporación utilizadas en estos equipos por lo general están hechas de policarbonato con electrodos de aluminio, oro o platino, cuya distancia entre ellos puede ser de 0.1, 0.2 y 0.4 cm, se eligen de acuerdo al voltaje que se desea aplicar a las células ya que, por lo general, mientras mayor sea la distancia entre los electrodos, mayor es el campo eléctrico que pasa entre ellos. La desventaja de las cubetas que tienen electrodos de aluminio es que normalmente solo se pueden utilizar una sola vez, sin embargo, suelen reutilizarse debido a su precio elevado. Algunos de los problemas que se pueden presentar al usar varias veces una misma cubeta de electroporación es que pueden quedar residuos celulares en los electrodos, pueden dañarse después de la aplicación del pulso eléctrico y con el tiempo, el aluminio tiende a oxidarse provocando que el campo eléctrico sea menor al esperado (Eynard y Teissié, 2000).

### **3.6. Plásmidos.**

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN independientes del cromosoma y se caracterizan por ser una doble cadena, tener su propio sitio de origen de replicación (*ori*) y estar covalentemente cerrados; suelen tener tamaños de varios cientos hasta miles de pares de bases. Los plásmidos codifican para diferentes ARN y proteínas que no son indispensables para el crecimiento de las bacterias (genes no constitutivos); por lo general juegan un papel importante en la adaptación y evolución de las bacterias ya que pueden provocar la adquisición de alguna resistencia a diferentes antibióticos, que produzcan bacteriocinas e incluso

que puedan degradar diferentes solventes orgánicos como el tolueno (Madigan *et al.*, 2009).

Anteriormente el nombre de los plásmidos provenía del gen que estaba codificado en él, es decir, los plásmidos que le confieren al microorganismo una resistencia a algún antibiótico se denominaban plásmidos R, estos plásmidos fueron los primeros en descubrirse ya que en la década de 1950 diferentes investigadores notaron que algunas cepas de *Shigella sp.* y *E. coli* aisladas de la microbiota fecal de pacientes en Japón eran capaces de resistir diferentes antibióticos (Snyder *et al.*, 2013). Actualmente los plásmidos se nombran con una “p” inicial la cual indica que se trata de ADN plasmídico y posteriormente se agregan letras mayúsculas que describen los genes codificados en el plásmido o las iniciales de la(s) persona(s) que lo aislaron o lo construyeron, por último, se agrega una serie de números la cual ayuda a identificar alguna construcción en particular (Snyder *et al.*, 2013).

A diferencia del ADN cromosomal, puede existir más de una copia del plásmido en una célula, este número de copias dependerá de los mecanismos de regulación del sitio *ori* de cada uno y de acuerdo a esto los plásmidos se puede clasificar como de bajo número de copias (plásmidos astringentes) o de alto número de copias (plásmidos relajados).

La replicación de los plásmidos puede llevarse a cabo de dos maneras diferentes:

- Replicación theta: En la cual las dos hebras de ADN se abren en el sitio *ori* creando una estructura similar a la letra griega theta ( $\theta$ ), una vez que ocurre esto, los primers de ARN comienzan la replicación en una o en ambas direcciones del plásmido (bidireccional); cuando se replica solo en una dirección la horquilla de replicación se mueve alrededor del plásmido hasta llegar de nuevo al sitio *ori* en el cual las dos moléculas de ADN se separan. En el caso de la replicación bidireccional dos horquillas de replicación se mueven desde el sitio *ori* y las dos moléculas se separan hasta que las horquillas se

encuentran. Este tipo de replicación es muy común en bacterias Gram-negativas y en los plásmidos ColE1, RK2 y F (Snyder *et al.*, 2013).

- Replicación del círculo rodante: Este tipo de replicación ocurre comúnmente en plásmidos conocidos como RC. Este proceso comienza cuando se realiza un corte en el plásmido por la proteína Rep generando un extremo 3' OH<sup>-</sup> libre el cual es utilizado como primer por la ADN polimerasa III, esta enzima comienza a replicar una de las hebras mientras la otra la va desplazando. Una vez que la polimerasa sintetizó una hebra completa, el extremo 5' PO<sub>4</sub><sup>-</sup> es transferido de la tirosina de la proteína Rep al extremo 3' OH<sup>-</sup> libre produciendo una cadena sencilla de ADN en la cual se une un primer de ARN para que se pueda sintetizar la cadena complementaria (Snyder *et al.*, 2013).

El sitio *ori* también es el responsable de controlar en qué tipo de bacterias los plásmidos pueden replicarse así como la compatibilidad entre ellos, es decir, la capacidad que tienen dos plásmidos de coexistir de manera estable en una misma célula. En caso de que los plásmidos presentes en una célula no sean compatibles uno de ellos se pierde ya que pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad (Inc) (Snyder *et al.*, 2013).

### **3.6.1. Plásmidos como vectores de clonación.**

Los plásmidos han sido utilizados desde hace varios años como vectores de clonación debido a las características antes mencionadas, además, con ayuda de algunas construcciones sintéticas se han logrado obtener vectores de clonación que presentan 3 características importantes las cuales son la capacidad de replicarse de manera autónoma, presentar genes de selección como son la resistencia a diferentes antibióticos y presentar un sitio de clonación múltiple (Snyder *et al.*, 2013). Gracias a la universalidad del código genético los genes que se pueden insertar en los vectores de clonación puede proceder no solamente de bacterias, sino que también pueden utilizarse genes de organismos eucariontes.

La mayoría de los vectores de clonación son derivados de plásmidos aislados de diferentes bacterias, especialmente de *E. coli*, sin embargo, han sido modificados con la finalidad de obtener plásmidos más pequeños, con un alto número de copias y con marcadores de selección fáciles de identificar. Dentro de los marcadores de selección más comunes se encuentran la resistencia al cloranfenicol (Cam<sup>R</sup>), a la tetraciclina (Tet<sup>R</sup>), a la ampicilina (Amp<sup>R</sup>) y a la kanamicina (km<sup>R</sup>) (Snyder *et al.*, 2013).

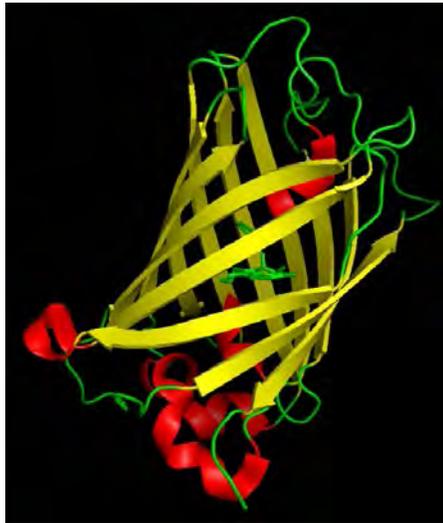
Como se mencionó anteriormente, otra característica que presentan los vectores de clonación es el sitio de clonación múltiple en el cual están codificadas secuencias únicas que son reconocidas por enzimas de restricción con la finalidad de que una vez que el plásmido ha sido digerido con alguna enzima se le puedan insertar uno o varios de genes de interés con ayuda de una ligasa. La mayoría de los sitios de restricción están ubicados en los genes de selección (normalmente es un gen que no codifica para la resistencia a un antibiótico) con la finalidad de poder determinar cuál de las células recombinantes contiene el plásmido con el inserto de interés, uno de los genes más utilizados para esto es el gen *lacZ* el cual codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa (Snyder *et al.*, 2013).

### **3.6.2. Proteína verde fluorescente.**

Como una alternativa al uso de los genes que codifican para alguna resistencia a antibióticos en los vectores de clonación se ha optado por utilizar como genes de selección a diferentes proteínas que son capaces de fluorescer sin causar ningún daño a la viabilidad de las células que la estén sintetizando. Un claro ejemplo de esto es el uso de la proteína verde fluorescente (GFP) la cual se encuentra de manera natural en las medusas (*Aequorea victoria*); el gen que la codifica fue clonado en 1992 en células de *E. coli* y *Caenorhabditis elegans* (Ferrer, 2008).

La proteína presente de manera natural en *A. victoria* está compuesta de 238 aminoácidos y presenta una estructura en forma de barril  $\beta$  (Figura 4), en el centro se encuentra el compuesto cromóforo (p-hidroxibencilidenimidazolinona), el cual

es capaz de absorber luz azul o luz ultravioleta y emitirla como un haz de luz de mayor longitud de onda regresando así a su estado basal (Ferrer, 2008). El uso más común de la proteína GFP ha sido como marcador *in vivo* para el estudio de la localización y tráfico intracelular de las proteínas, ya sea en organismos procariontes o eucariontes ya que se ha demostrado que esta proteína no genera un efecto tóxico en las células (Micklos *et al.*, 2003).



**Figura 4. Estructura cristalizada de la proteína verde fluorescente.** Estructura terciaria de la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* expresada en *E. coli* y determinada mediante difracción de rayos X. (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4KW4>, último acceso 06/02/16)

La secuencia de la proteína GFP ha sido modificada y clonada en diversas ocasiones por lo que existen hasta 269 variedades de esta proteína reportadas en el Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, último acceso 27/06/16). Cabe mencionar que la mayoría de las modificaciones que se han realizado afectan el sitio catalítico de la proteína por lo que se han obtenido variedades de esta proteína que emiten luz azul (BFP) así como proteínas capaces de emitir una fluorescencia más intensa (Ferrer, 2008).

En la tabla 1 se muestran algunas de las proteínas reportadas en el PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>, último acceso 27/06/16)

**Tabla 1.** Algunas variedades reportadas en el Protein Data Bank (PDB) de la proteína verde fluorescente.

Clave del PDB	Organismo original	Organismo de expresión	Número de mutaciones	Característica
<b>5DY6</b>	<i>A. victoria</i>	<i>E. coli</i>	8	Mejora en el plegamiento
<b>1BFP</b>	<i>A. victoria</i>	<i>E. coli</i>	4	Fluorescencia azul
<b>3K1K</b>	<i>A. victoria, Camelus dromedarius</i>	<i>E. coli</i>	8	Unida a nanocuerpo
<b>3U8P</b>	<i>A. victoria, E. coli</i>	<i>E. coli</i>	5	Unida a citocromo b562

### 3.7. *Escherichia coli*.

*Escherichia coli* es bacilo corto Gram-negativo con un cromosoma circular de aproximadamente 4.5 Mbp. Este microorganismo es ubicuo del intestino de los mamíferos y su desarrollo en condiciones de laboratorio es relativamente rápido en medios mínimos, esta velocidad puede aumentar cuando el medio de cultivo contiene factores de crecimiento como son diferentes aminoácidos y precursores de nucleótidos logrando así que la concentración de células se duplique cada 20 o 30 minutos (Ausubel *et al.*, 1999).

Desde la década de 1960 se lograron realizar muchos avances en el área de biología molecular utilizando diferentes cepas de *E. coli*, debido a esto y a que se considera que este microorganismo tiene un metabolismo relativamente sencillo, esta cepa sigue siendo una de las más utilizadas en el área de biología, medicina y en la industria. Por lo general se utilizan cepas que derivan de *E. coli* K-12 ya que se tienen un amplio conocimiento acerca de sus características fenotípicas y genotípicas (Ausubel *et al.*, 1999; Lee, 2009).

El estudio del genoma de este microorganismo se ha vuelto de gran importancia debido a que puede influenciar la eficiencia de transformación por cualquiera de los métodos utilizados debido a la presencia de genes que se encargan de reparar y recombinar al ADN (incluso al que no pertenece de manera natural a la célula)

así como, genes que se encargan de restringir al ADN exógeno que pueda entrar a la célula (Hanahan *et al.*, 1991).

Dentro de los genes que destacan para reparar y recombinar el ADN se encuentra el gen *recA* el cual se encuentra de manera natural en las cepas derivadas de *E. coli* K-12, la presencia de la proteína que codifica este gen puede favorecer la propagación de algunos vectores de clonación, sin embargo, si existe la presencia de múltiples secuencias palíndromes dentro de ellos, esta proteína provocara su delección. En cuanto a los genes involucrados en la restricción del ADN se encuentran el gen *endA* el cual codifica para una endonucleasa, la cual puede provocar la degradación del plásmido que se introdujo a la célula durante la transformación (Hanahan *et al.*, 1991).

Debido a lo antes mencionado, diferentes empresas se han dedicado a producir cepas mutantes de *E. coli* no patógenas con la finalidad de poder obtener desde cepas que presenten una mayor expresión del gen inserto en el vector de clonación hasta obtener eficiencias de transformación en el orden de  $1 \times 10^9$ , sin embargo, la selección de la cepa a utilizar depende de los objetivos de la transformación así como el tipo de material genético que se utilizara. (Hanahan *et al.*, 1991).

#### 4. JUSTIFICACIÓN.

La transformación de cepas naturalmente no competentes ha tomado gran relevancia para las áreas de biotecnología, medicina, industria e investigación en los últimos años ya que representa una ventaja para obtener diferentes metabolitos que anteriormente solo se encontraban en organismos eucariontes, en cepas viables no cultivables, patógenas o en microorganismos que solo se desarrollan en condiciones extremas, además, también se han logrado obtener cepas sobreproductoras las cuales han favorecido el uso de estas metodologías. En el aspecto de investigación la transformación ha contribuido para tener un mayor conocimiento y entendimiento de diferentes aspectos de las células tanto procariontes como eucariontes.

Debido a lo antes mencionado, en este proyecto se podrán conocer las condiciones óptimas para la electrotransformación de *E. coli*. Se utilizaron dos cepas de esta bacteria con la finalidad de comparar la eficiencia de transformación de cada uno; uno de ellas es una cepa comercial (*E. coli* TOP10), mientras que la otra es una cepa silvestre (*E. coli* W3110).

## 5. OBJETIVOS.

### 5.1. Objetivo general.

Transformar a *E. coli* W3110 y *E. coli* TOP10 para obtener cepas recombinantes resistentes a ampicilina o kanamicina y que expresen la proteína verde fluorescente.

### 5.2. Objetivos particulares.

- Corroborar la identidad de las cepas utilizadas (parentales y transformantes) mediante métodos genotípicos (secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S) y fenotípicos (morfoloniales, pruebas bioquímicas convencionales, sistemas API 20E® y VITEK 2®).
- Conservar a largo plazo las cepas *E. coli* W310, *E. coli* TOP10, *E. coli* DH5α *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* y *S. Typhimurium* PFV 430.
- Obtener los plásmidos pBABE-GFP y pSUPERGLO-GFP mediante el método de extracción de lisis alcalina de las cepas *Salmonella* Typhimurium PFV 430 y *E. coli* DH5α *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* respectivamente.
- Determinar las condiciones óptimas de electrotransformación para *E. coli* TOP10 y *E. coli* W3110.
- Comparar las eficiencias de transformación obtenidas al utilizar dos plásmidos diferentes.
- Transformar a las cepas mediante el método de quimiotransformación para comparar las eficiencias de transformación obtenidas mediante el método de electrotransformación.

## 6. MATERIAL Y METODOLOGÍA.

### 6.1. Cepas y medios empleados.

Las cepas y los medios empleados en este trabajo se encuentran descritos en la tabla 2.

**Tabla 2.** Cepas y medios empleados.

Cepa	Plásmido/Característica	Medio utilizado
<i>Salmonella</i> Typhimurium PFV 430 y <i>Salmonella</i> Typhimurium PFV 435 (Donadas por el Dr. Rodolfo Pastelín Palacios de la Facultad de Química, UNAM)	pBABE-GFP / <i>ap<sup>R</sup>, gfp<sup>+</sup></i>	Caldo y agar Luria- Bertani* (LB) con 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich®)
<i>E. coli</i> DH5α <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i> (Donada por el Dr. José Adelfo Escalante Lozada del Instituto de Biotecnología, UNAM)	pSUPERGLO-GFP / <i>km<sup>R</sup>, gfp<sup>+</sup></i>	Caldo y agar LB con 30 µg/mL de kanamicina (Sigma- Aldrich®)
<i>E. coli</i> TOP10 (Donada por el Dr. José Adelfo Escalante Lozada del Instituto de Biotecnología, UNAM)	-	Caldo y agar LB
<i>E. coli</i> W3110 (Donada por el Dr. José Adelfo Escalante Lozada del Instituto de Biotecnología, UNAM)	-	Caldo y agar LB

\*Elaboración por componentes, ver Anexo I.

Los medios de cultivo se esterilizaron en la autoclave a 121 °C/20 psi/15 min, se enfriaron a 45-50 °C y por último, se les agregó el antibiótico en las concentraciones antes mencionadas en caso de ser necesario (caldo y/o agar luria con ampicilina y/o kanamicina).

### 6.2. Conservación a largo plazo de las cepas.

Para la conservación de las cepas se utilizaron los medios descritos en la tabla 2 y a partir de un cultivo incubado a 37 °C/24 h en agar, se realizó una suspensión saturada en el caldo correspondiente mezclándolo con glicerol al 50 % v/v en crioviales los cuales fueron almacenados a -70 °C.

### **6.3. Reactivación y propagación.**

Para la reactivación de las cepas se tomó una pequeña muestra de la cepa conservada raspando con un palillo de madera estéril e inoculando en el caldo correspondiente para cada cepa (Tabla 2) e incubado a 37 °C/24 h, posteriormente, de este cultivo se inoculó una asada por estría en cuadrante radial en el agar correspondiente y se incubó bajo las mismas condiciones.

### **6.4. Confirmación de la identidad genotípica de las cepas utilizadas.**

#### **6.4.1. Extracción de ADN cromosomal y electroforesis en gel de agarosa.**

A partir de las cepas reactivadas de acuerdo a la metodología descrita en el inciso 6.3, se inoculó cada cepa por estría masiva en los medios sólidos indicados en la tabla 2. Se realizó una suspensión saturada a partir del desarrollo morfológico obtenido en los medios líquidos respectivos (Tabla 2) la cual se utilizó para la extracción de ADN cromosomal siguiendo las instrucciones de uso del kit UltraClean™ Microbial DNA Isolation de MOBIO® (Anexo II). Para confirmar la presencia e integridad del ADN cromosomal se realizó una electroforesis en gel de agarosa (grado biología molecular, ONBIO®) al 1% p/v con 4 µL de bromuro de etidio al 0.04% utilizando como buffer una solución de Tris-Borato-EDTA (TBE) (TRIS base 89 mM, pH = 8; ácido bórico 0.89 mM; EDTA 2 mM). Una vez que la agarosa gelificó en la cámara de electroforesis se cargó 2 µL del marcador de peso molecular O' GeneRuler 1 kb DNA ladder™ (Thermo Scientific®) en el primer pozo mientras que para el resto de los pozos se cargaron 5 µL de muestra mezclados con 3 µL de colorante de carga. Las muestras se corrieron utilizando una corriente de 100 V y 80 A de 30 a 40 minutos y por último, el gel se observó bajo luz UV utilizando el transiluminador 2000 (BioRad®).

#### 6.4.2. Amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Una vez verificada la integridad del ADN cromosomal se realizó la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S mediante PCR utilizando la mezcla de reacción descrita en la Tabla 3, los primers utilizados fueron los descritos por Weisburg *et al.* (1991), por lo que se espera obtener amplicones con un peso aproximado de 1.5 kbp; estos primers fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, las características de cada uno se encuentran descritas en la Tabla 4.

**Tabla 3.** Mezcla de reacción utilizada para la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S (Campos, 2010).

Reactivo	Volumen (µL) para 1 reacción
KCl (10X)	5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	5
dNTP's (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 0.2 mM de cada uno)	1
Primer forward fD1 (1.0 µM)	0.6
Primer reverse rD1 (1.0 µM)	0.6
Agua mili Q	36.55
Taq polimerasa de Thermo Scientific® (5U/µL)	0.25
Templado	1

**Tabla 4.** Características de los primers utilizados.

	Forward (fd1)	Reverse (rd1)
<b>Secuencia (5'-&gt;3')</b>	AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG	AAGGAGGTGATCCAGCC
<b>Longitud</b>	20	17
<b>Coef.</b>	217.4	195.5
<b>NanoDrop A(260)</b>	76.146	70.527
<b>OD's totales</b>	28.57	27.69
<b>Concentración (µg/µl)</b>	1.89	1.83
<b>C+G (%)</b>	50.00	58.82
<b>Tm (1)</b>	64.75 °C	64.26 °C
<b>Tm (2)</b>	60.00 °C	54 °C
<b>p.m.</b>	6471.00	5516.40
<b>Picomol/µL</b>	291.39	331.28

La mezcla de reacción se colocó en el termociclador MyCycler™ (BioRad®) utilizando el programa descrito en la Tabla 5. Como control de reactivos se utilizó

agua mili Q en lugar del templado. Se verificó la integridad de cada amplicon realizando una electroforesis en gel de agarosa como se describió en el inciso 6.4.1.

**Tabla 5.** Programa utilizado en el termociclador MyCycler™ (BioRad®) para la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S (Cervantes, 2010).

Etapa	Número de ciclos		Condiciones
Desnaturalización inicial	1		95°C/5 min
Amplificación	30	Desnaturalización	95°C/1 min
		Alineamiento	49°C/1 min
		Amplificación	72°C/1.5 min
Extensión final	1		72°C/ 5 min

### 6.4.3. Purificación y secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S.

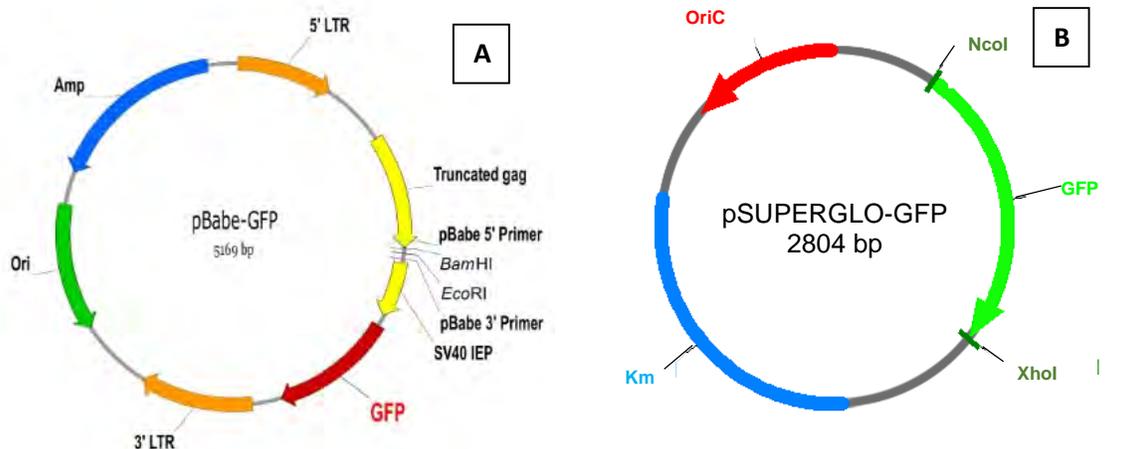
Los amplicones obtenidos se purificaron siguiendo las instrucciones de uso del kit PureLink™ PCR Purification de Invitrogen® (Anexo III), se confirmó la presencia y pureza del amplicon mediante una electroforesis en gel de agarosa y se enviaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM en dónde se entregó una mezcla de 14 µL de muestra, 1 µL de agua mili Q y 1 µL de primer (50 pM) contenidas en microtubos para PCR.

Los resultados obtenidos de la secuenciación se visualizaron con el programa Finch TV de Geospiza Inc (Versión 1.4.0), estas secuencias se compararon con la base de datos del GenBank de la NCBI utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn). Finalmente se realizaron 3 árboles filogenéticos (uno para cepas relacionadas con *S. Typhimurium* PFV 430, otro para cepas relacionadas con *E. coli* TOP10, *E. coli* W3110 y *E. coli* DH5α *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*, y el último para cepas relacionadas con *E. coli* TOP10, *E. coli* W3110 recombinantes) por el método de Neighbor-Joining, el algoritmo de comparación de nucleótidos Jukes-Cantor y un valor de bootstrap de 1000 réplicas, utilizando el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013).

## 6.5. Extracción y purificación de ADN plasmídico.

En la Figura 5 se muestra el diseño de los plásmidos extraídos de *Salmonella* Typhimurium PFV430 (A) y *E. coli* DH5 $\alpha$  (B) en los cuales se observan los genes que los constituyen así como los sitios de restricción que presenta. En la tabla 6 se muestran algunas características de estos plásmidos.

Se siguió la metodología miniprep por lisis alcalina (Ausubel *et al.*, 1999) por lo que, se realizó una suspensión en caldo LB de las cepas (*S. Typhimurium* PFV 430, *E. coli* DH5 $\alpha$  *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*, *E. coli* TOP10 o *E. coli* W3110 transformantes) incubadas a 37 °C/24 h, esta suspensión se alicuotó en microtubos de centrifuga de 2 mL los cuales se centrifugaron (centrífuga Eppendorf centrifuge 5415C<sup>®</sup>) a 10,000 rpm/2 min, el paquete celular se resuspendió en 150  $\mu$ L de la solución I fría (Tris-HCl 0.05 M, EDTA 0.05 M, sacarosa al 8 %, pH = 8), posteriormente se agregó 5  $\mu$ L de RNasa y 350  $\mu$ L de la solución II (SDS al 1 % y NaOH 0.02 M), se mezcló por inversión y se incubó en hielo 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se añadieron 250  $\mu$ L de la solución III fría (acetato de sodio 3M, pH = 5.2), se homogeneizó por inversión y se incubó en hielo 30 min. Esta mezcla se centrifugó a 10,000 rpm/15 min, el sobrenadante obtenido se colocó en un microtubo de centrifuga nuevo al cual se le agregó 1 mL de isopropanol y se centrifugó de la misma manera, la pastilla resultante se disolvió en 1 mL de etanol al 70 % y se centrifugó a 10,000 rpm/10 min, se desechó el sobrenadante y el precipitado (el cual contiene el ADN plasmídico) se secó a 37°C/5 min, este último se resuspendió en 50  $\mu$ L de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM y pH=8). La purificación del plásmido se realizó utilizando el doble de volumen de plásmido sugerido por el kit PureLink<sup>™</sup> PCR Purification de Invitrogen<sup>®</sup> y posteriormente se siguieron las instrucciones del kit (Anexo III); para verificar la presencia e integridad del plásmido se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% p/v como se mencionó anteriormente.



**Figura 5. Mapa de los plásmidos utilizados.** **A:** Plásmido pBabe-GFP extraído de la cepa *S. Typhimurium* PFV 430 (<https://www.addgene.org/10668/> último acceso 16/02/16); **B:** Plásmido pSUPERGLO-GFP extraído de la cepa *E. coli* DH5α km<sup>R</sup> GFP<sup>+</sup> (Construcción sintética, Flores-Ramírez *et al.*, 2007).

**Tabla 6.** Algunas características de los plásmidos pBabe-GFP y pSUPERGLO-GFP.

Característica	pBabe-GFP	pSUPERGLO-GFP
Peso molecular (pb)	5,169	2,804
Número de copias	Alto	-
Microorganismo de obtención	<i>Salmonella</i> Typhimurium PFV 430	<i>E. coli</i> DH5α
Enzimas de restricción	BamHI, EcoRI, StuI, HindIII, ClaI, XhoI.	XhoI, NcoI
Gen de proteína verde fluorescente	hrGFP	sgGFP
Resistencia a antibiótico	Ampicilina	Kanamicina

## 6.6. Curva de McFarland.

A partir de las soluciones de BaCl<sub>2</sub> al 1.0 % y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1 % se realizaron las mezclas descritas en la tabla 7, una vez obtenidas las mezclas, se midió la absorbancia de una con una longitud de onda de 600 nm con el espectrofotómetro Pharmacia Biotech Ultrospec 2000® (Ramírez *et al.*, 2013).

**Tabla 7.** Preparación de la curva de McFarland (Ramírez *et al.*, 2013).

Tubo	BaCl <sub>2</sub> 1% (mL)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1% (mL)	Número aproximado de bacterias representadas (x10 <sup>6</sup> /mL)
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1,200
5	0.5	9.5	1,500
6	0.6	9.4	1,800
7	0.7	9.3	2,100
8	0.8	9.2	2,400
9	0.9	9.1	2,700
10	1.0	9.0	3,000

### 6.7. Curvas de crecimiento de *E. coli* W3110 y *E. coli* TOP 10.

Se realizaron las curvas de crecimiento a partir de un precultivo para lo cual, se tomó un inóculo con palillos de madera estériles de los crioviales correspondientes de cada cepa, se incubó a 300 rpm/37 °C/18 h (incubadora New Brunswick®) en caldo YENB (preparado por componentes, Anexo I). Se inoculó 250 µL del precultivo en 50 mL de medio YENB y se incubó bajo las mismas condiciones. Se determinó la densidad óptica a 600 nm (D.O.<sub>600nm</sub>) por triplicado cada 30 minutos hasta llegar a los inicios de la fase estacionaria de las dos cepas.

### 6.8. Preparación de células electrocompetentes.

Se siguió la metodología anterior hasta obtener 2 matraces con 50 mL de caldo YENB con una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.6 o 0.9, cada uno se decantó en tubos cónicos de 50 mL los cuales se centrifugaron con la centrífuga Kitlab® a 4,000 rpm/5 min, se eliminó el medio y se realizaron dos lavados con 20 y 10 mL de agua destilada pH = 7 respectivamente homogeneizando con el vórtex el paquete celular y centrifugando bajo las mismas condiciones. A la pastilla formada en cada tubo cónico se agregó 1 mL de glicerol al 10 % (J.T. Baker®), posteriormente, todo el volumen se colocó en microtubos de centrífuga los cuales se centrifugaron a 10,000 rpm/1 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet de los tubos se resuspendió en un solo microtubo de centrífuga con 300 µL de glicerol al 10 %, se

homogeneizó y se colocaron 40 µL de células en microtubos de centrifuga de 0.5 mL los cuales se almacenaron a -70 °C (Rakesh *et al.*, 1996).

## 6.9. Electroporación.

Se agregó 1 µL de plásmido a las células electrocompetentes (previamente descongeladas en hielo) con una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.6 o 0.9 y se siguieron las instrucciones de uso del electroporador MicroPulser™ de BioRad® utilizando cubetas de electroporación de 0.2 cm con electrodos de aluminio (BioRad®, Figura 6) y un voltaje de 1.8 y 2.5 kV, posteriormente, las células fueron resuspendidas en 1 mL de medio Súper Óptimo con represión por Catabolito (SOC por sus siglas en inglés, preparado por componentes, Anexo I) y se incubaron a 300 rpm/37 °C/1 h. Por último, se plaquearon 30 µL por extensión superficial (o 100 µL en caso de haber realizado diluciones decimales seriadas) en agar LB con carbenicilina (Sigma-Aldrich®) o ampicilina (100 µg/mL) si se utilizó el plásmido extraído de la cepa *S. Typhimurium* PFV 430 o en agar LB con kanamicina (30 µg/mL) si se utilizó el plásmido extraído de la cepa *E. coli* DH5α *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*, en ambos casos, las cajas Petri se incubaron a 37 °C/24 h. Se contabilizaron las colonias con un brillo verde fluorescente usando como control negativo las cepas sin transformar inoculadas por estría en cuadrante radial en los mismos medios.

Para determinar la eficiencia de transformación se utilizó el siguiente algoritmo de cálculo:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{Volumen plaqueado (mL)}} * \text{Factor de dilución} = \text{UFC/mL}$$

$$\frac{\text{UFC/mL}}{\text{Concentración del plásmido (µg)}} = \text{UFC/mL/µg ADN}$$

Una vez determinada la eficiencia de transformación, esta se comparó con la cantidad de células presentes en el cultivo que fue utilizado para la preparación de células electrocompetentes, para esto, se utilizó una curva de McFarland (Sección 7.5.) cuya ecuación de la recta fue:

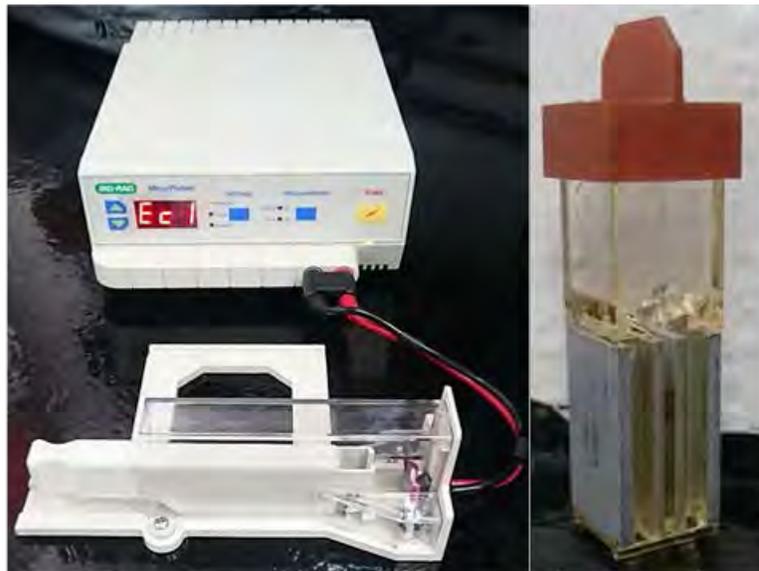
$$D.O._{600nm} = 6 \times 10^{-10} [\text{Células}] - 0.0145 \frac{D.O._{600nm}}{[\text{Células}]}$$

La ecuación anterior se despejó con la finalidad de poder determinar la concentración de células presentes en un cultivo obteniendo lo siguiente:

$$\frac{D.O._{600nm} + 0.0145}{6 \times 10^{-10}} = [\text{Células}] \text{ (Bacterias/mL)}$$

Después de determinar la concentración de células que se tenía al iniciar la preparación de células electrocompetentes se realizó el siguiente cálculo para conocer el porcentaje de células que se recuperaron después del proceso de transformación:

$$100 * \frac{\text{Cantidad de células transformantes}}{\text{Cantidad de células iniciales}} = \text{Porcentaje de células recuperadas}$$



**Figura 6.** Electroporador MicroPulser™ de BioRad® y cubeta de electroporación de 0.2 mm utilizados durante el desarrollo del proyecto.

### **6.10. Preparación de células quimiocompetentes.**

Se partió de un precultivo para el cual se tomó un inóculo con palillos de madera estériles de los crioviales correspondientes de cada cepa, este inóculo se colocó en 3 mL de caldo LB y se incubó a 300 rpm/37 °C/18 h. Se inocularon 200 µL del precultivo en 10 mL de caldo LB y se incubó bajo las mismas condiciones hasta obtener una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.6 o 0.9, el cultivo se decantó en tubos cónicos y se centrifugó a 4,000 rpm/5 min. Se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 3 mL de NaCl 10 mM frío, se centrifugó bajo las mismas condiciones y se retiró el sobrenadante, la pastilla se mezcló con 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 30 mM frío y se incubó en hielo durante 20 minutos; transcurrido el tiempo, el homogeneizado se centrifugó a 2,500 rpm/7 min. Por último, se decantó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 500 µL de CaCl<sub>2</sub> 30 mM frío y se alicuotaron 40 µL del homogeneizado en tubos para microcentrífuga de 2 mL (Sánchez *et al.*, 2012).

### **6.11. Quimiotransformación.**

Se agregó un 1 µL de plásmido a las células quimiocompetentes, se homogeneizó y se incubó durante 30 min en hielo. Las células se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 45 segundos y posteriormente se agregaron 450 µL de medio SOC, se mezcló por inversión y se incubó el homogeneizado a 300 rpm/37 °C/1 h. Se inoculó por extensión superficial 100 µL de las células por duplicado en agar LB con ampicilina (100 µg/mL) y las cajas Petri se incubaron a 37 °C/24 h. Se contabilizaron las colonias con un brillo verde fluorescente y se utilizó como control negativo a la cepa sin transformar en el medio antes mencionado (Sánchez *et al.*, 2012).

## **6.12. Comparación del fenotipo de las cepas parentales y transformantes.**

### **6.12.1. Características microscópicas y pruebas bioquímicas convencionales presuntivas.**

A partir de un cultivo incubado a 37 °C/24 h en agar LB, se realizó un frotis fijo (observado en el microscopio de fluorescencia con el objetivo de 100X) y una tinción de Gram (observada en el microscopio de campo claro con el objetivo de 100X) para cada cepa. Utilizando este mismo cultivo se seleccionaron colonias aisladas de cada cepa y sembraron en los siguientes medios por duplicado:

- Agar MacConkey (DIBICO®): Se inoculó una colonia aislada por estriado en cuadrante radial, se incubó bajo las condiciones antes mencionadas y se consideró como lactosa-positivas a aquellas colonias que presentaran un color rojo.
- Medio SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad, DIBICO®): Se inoculó una colonia por picadura y se incubó a 37 °C/24 h, transcurrido el tiempo, se interpretó la prueba considerando como un resultado positivo lo siguiente:
  - Ácido sulfhídrico: Presencia de precipitado negro.
  - Indol: Aparición de un anillo rojizo después de agregar el reactivo de Kovac (para-dimetilamino benzaldehído, alcohol amílico y HCl).
  - Movilidad: Crecimiento alrededor de la picadura realizada.
- Agar citrato de Simmons (DIBICO®): Se inoculó una colonia aislada por picadura y estría, se incubó bajo las condiciones mencionadas anteriormente y posteriormente se interpretó la prueba considerando como un resultado positivo un cambio de color (de verde a azul) en el agar.
- Caldo Rojo de Metilo – Voges Proskauer (RM-VP, elaboración por componentes, Anexo I): Se inoculó una colonia aislada en el caldo, se incubó a 37 °C/24 h y una vez transcurrido el tiempo, el cultivo se homogeneizó y se dividió en 2, a una mitad se le agregó 3 gotas de rojo de metilo considerando como resultado positivo la aparición de un color rojo; a la otra mitad se le agregó 5 gotas de  $\alpha$ -naftol al 5 % seguido de 3 gotas de KOH al 40 % esta

última prueba se interpretó 10 minutos después de agregar los reactivos considerando como resultado positivo la aparición de un color rojo.

- Agar Kligler (BIOXON®): Se inoculó una colonia aislada en el agar inclinado por picadura y estría, se incubó bajo las condiciones mencionadas anteriormente y posteriormente se interpretó la prueba considerando lo siguiente:
  - Fermentador de glucosa: Presencia de un color rojo en el pico de flauta y un color amarillo en el fondo del tubo.
  - Fermentador de glucosa y lactosa: Presencia de un color amarillo en el pico de flauta y en el fondo del tubo.
  - No fermentador de glucosa y lactosa: Presencia de un color rojo en el pico de flauta y en el fondo del tubo.
  - Producción de gas: Presencia de burbujas o ruptura del agar.
  - Producción de ácido sulfhídrico: Presencia de un precipitado negro.

#### **6.12.2. Pruebas bioquímicas miniaturizadas: API 20E® (BioMérieux®).**

Este sistema consiste en una batería de 21 pruebas bioquímicas miniaturizadas las cuales son útiles para la identificación de bacterias Gram-negativas. A partir del cultivo del cual se tomaron las colonias para realizar las pruebas bioquímicas convencionales, se hizo una suspensión al 0.5 en la escala de McFarland en 5 mL de solución salina isotónica, se homogeneizó y se colocó en los pozos de la tira API 20E® (BioMérieux®). Las pruebas que tenían la abreviatura dentro de un marco se llenaron tanto el pozo como la cúpula mientras que las pruebas que estaban subrayadas únicamente se colocó el cultivo en el pozo y la cúpula se llenó con aceite mineral; al resto de las pruebas solo se les colocó el inóculo en el pozo. Las tiras se incubaron a 37 °C/24 h. La interpretación de los resultados para cada pozo incluido en la tira se encuentra descrito en el Anexo IV de acuerdo a lo recomendado por el proveedor. En la figura 7, se presenta un ejemplo de los resultados positivos y negativos para cada pozo.



**Figura 7.** Estándares negativos y positivos de las pruebas del sistema API 20E®. (Apiweb® [CD-ROM] BioMérieux. 2010).

### 6.12.3. Pruebas bioquímicas automatizadas: Sistema VITEK 2® (BioMérieux®)

El VITEK 2® es una herramienta automatizada que utiliza una tecnología basada en el crecimiento en la cual, incuba a las tarjetas a una temperatura de  $35.5 \pm 1$  °C y cada 15 minutos, las transporta a un sistema óptico en el cual, analiza los cambios de color y/o de turbidez que presentan los 64 pozos de la tarjeta con una base de datos construida a partir de diferentes cepas bien caracterizadas e incubadas bajo diferentes condiciones a partir de la cual se obtiene la identidad de la cepa (Pincus, 2013).

Para la utilización de este sistema se realizó una suspensión del cultivo utilizado para las pruebas bioquímicas antes mencionadas en tubos de poliestireno del 0.5-0.63 en la escala de McF (este valor se comprobó utilizando el DensiCheck™) en 3 mL de solución salina de 0.45%-0.5% la cual se colocó en la tarjeta de Gram-Negativos proporcionado por el proveedor; esta tarjeta fue registrada e introducida al equipo. La composición de las pruebas incluidas en la tarjeta se encuentra descritas en el Anexo V.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

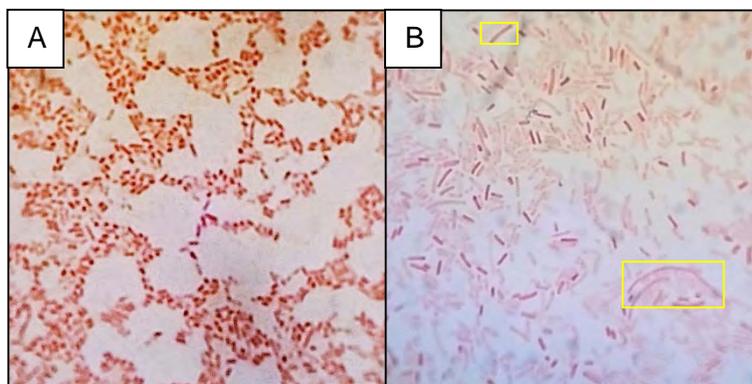
### 7.1. Propagación y conservación.

Las cepas *E. coli* TOP10, *E. coli* W3110, *Salmonella* Typhimurium PFV 430 y *E. coli* DH5 $\alpha$  *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* se conservaron a -70 °C en 23 crioviales cada una y hasta el momento, se ha logrado su recuperación (sección 6.3) para la propagación y preparación de células electrocompetentes y quimiocompetentes considerando así que todas las cepas presentan una buena viabilidad.

### 7.2. Confirmación de la identidad fenotípica de las cepas *Salmonella* Typhimurium PFV 430 y *E. coli* DH5 $\alpha$ *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*.

#### 7.2.1. Características microscópicas.

La tinción de Gram realizada a *S. Typhimurium* PFV 430 y *E. coli* DH5 $\alpha$  *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* (Figura 8) muestra que son microorganismos Gram-negativos que presentan una morfología bacilar lo cual concuerda con lo reportado por Jay (2005); pocas células de *E. coli* DH5 $\alpha$  *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* presentaron una morfología filamentosa (enmarcadas en cuadros amarillos) las cuales corresponden a la misma cepa pero, al contener un plásmido exógeno, este puede provocar que las células repliquen su ADN y se elonguen de manera normal, sin embargo, debido a la inactivación de algunos genes involucrados en la división celular (por lo general los genes *fts*) por la presencia del plásmido, no se logra formar el septo evitando así que estas células se dividan (Haddadin y Harcum, 2005; Silva *et al.*, 2012). Así mismo, esta morfología puede ser atribuida a la activación del sistema SOS el cual puede activarse debido a que las células se encuentran en condiciones de estrés (presencia de antibióticos en el medio) y/o a que la mayoría de los plásmidos sintéticos presentan secuencias trinucleotídicas repetidas las cuales inducen la activación del gen *sulA* el cual codifica para un inhibidor de la formación del septo (Silva *et al.*, 2012).



**Figura 8.** Tinción de Gram observada en el microscopio óptico de campo claro con el objetivo de 100X de las cepas que originalmente contenían los plásmidos utilizados. **A:** *S. Typhimurium* PFV 430; **B:** *E. coli* DH5α *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*. Cepas cultivadas en agar LB con ampicilina y LB con kanamicina respectivamente e incubadas a 37 °C/24 h.

### 7.2.2. Sistema API 20E®.

La identidad de las cepas de acuerdo a este sistema de pruebas bioquímicas miniaturizadas se muestran en la Tabla 8. De acuerdo con los resultados de cada pozo (Tabla 9, Figura 9A), la cepa *S. Typhimurium* PFV 430 se identificó con una calidad excelente como un microorganismo perteneciente al género *Salmonella* con un porcentaje de identidad del 99 % sin embargo, no se logró identificar la especie y serovariedad por lo que se recomienda realizar pruebas serológicas. En la tabla 9 se muestran los resultados típicos de este microorganismo (MacFaddin, 2003).

La identificación de *E. coli* DH5α *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* presentó una baja discriminación (Tabla 8, Figura 9B) ya que de acuerdo a la base de datos de este sistema, los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas pueden pertenecer a *Shigella* sp. (porcentaje de identificación de 89.8 %) o *E. coli* biotipo I (porcentaje de identificación de 9.4 %). Este resultado puede deberse a que en algunos casos, es muy difícil distinguir entre algunas cepas de *E. coli* (especialmente *E. coli* enteroinvasiva, EIEC) y *Shigella* sp.; se han encontrado cepas de *E. coli* inmóviles, lisina descarboxilasas-negativas, indol-negativas y/o no fermentadoras de glucosa, dichas características fenotípicas son típicas en las cepas de *Shigella*. Se cree

que esta similitud entre los fenotipos puede ser debida a que se han encontrado grandes semejanzas en los genes constitutivos presentes en ambas cepas, por lo que, en la mayoría de las ocasiones, es necesario realizar PCR de genes que solo estan en una cepa u otra y/o tipificación serológica (Rodríguez, 2016). Esta baja discriminación también puede deberse a que el plásmido que contiene la cepa esta afectando el metabolismo del microorganismo de tal manera que no cumple con el perfil típico de *E. coli* (Silva *et al.*, 2009), además, el ser una cepa comercial utilizada en la tecnología del ADN recombinante presenta varias mutaciones entre las cuales destaca la mutación *lacZΔM15* (<http://lifescience.biomedal.com/es/productos/vectores-de-clonacion-y-cepas/cepas-e-coli/>, último acceso 22/05/2016) la cual evita que el microorganismo sea capaz de hidrolizar el enlace β-glicosilico presente en el ONPG lo que genera que no cumpla con un perfil bioquímico típico.

En la Tabla 9, se muestra el perfil típico de este microorganismo (MacFaddin, 2003).

**Tabla 8.** Identidad de las cepas *S. Typhimurium* PFV 430 y *E. coli* DH5α *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* de acuerdo con el sistema API 20E<sup>®</sup>.

Cepa	Identidad	Porcentaje de identificación	Calidad de identificación	Pruebas en contra
<i>S. Typhimurium</i> PFV 430	<i>Salmonella</i> spp.	99 % Confirmar con pruebas serológicas	Excelente	-
<i>E. coli</i> DH5α <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>Shigella</i> spp.	89.8 %	Baja discriminación	RHA 7 %
	<i>E. coli</i> biotipo I	9.4 % Confirmar con pruebas serológicas		MAN 84 %, ARA 90 %

**Tabla 9.** Resultado de las pruebas bioquímicas incluidas en las tiras API 20E® de las cepas *S. Typhimurium* PFV 430 y *E. coli* DH5α *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*.

Prueba	Reacción y/o enzima	Perfil típico* de <i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> PFV 430	Perfil típico* de <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> DH5α <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>
ONPG	β-galactosidasa	-	-	90 % (+)	-
ADH	Arginina dihidrolasa	+	+	-	-
LDC	Lisina descarboxilasa	+	+	26 % (-)	-
ODC	Ornitina descarboxilasa	+/-	+	30 % (-)	-
CIT	Uso de citrato	+/-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	Producción de H <sub>2</sub> S	+	+	-	-
URE	Ureasa	-	-	-	-
TDA	Triptófano desaminasa	-	-	-	-
IND	Producción de indol	-	-	90 % (+)	+
VP	Producción de acetoina	-	-	-	-
GEL	Gelatinasa	-	-	-	-
GLU	F / O de glucosa	+	+	+	+
MAN	F / O de manitol	+	+	+	-
INO	F / O de inositol	+/-	+	-	-
SOR	F / O de sorbitol	+	+	+	-
RHA	F / O de ramnosa	+	+	82 % (+)	+
SAC	F / O de sacarosa	-	-	64 % (-)	-
MEL	F / O de melibiosa	+	+	75 % (+)	-
AMY	F / O de amigdalina	-	-	-	-
ARA	F / O de arabinosa	+	+	+	-
NO <sub>2</sub>	Producción de NO <sub>2</sub>	+	+	+	+
N <sub>2</sub>	Producción de N <sub>2</sub>	-	-	-	-

\*Resultados reportados en la bibliografía (MacFaddin, 2003).

F / O= Fermentación / Oxidación.



**Figura 9.** Cambios de color observados en los pozos incluidos en el sistema API 20E® después de ser incubadas a 37 °C/24 h. **A:** *S. Typhimurium* PFV 430; **B:** *E. coli* DH5α *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*.

### 7.2.3. Sistema VITEK 2®.

Con este sistema se logró corroborar la serovariedad de *S. Typhimurium* PFV 430 con una identificación excelente y un 97 % de probabilidad (Tabla 10) ya que cuenta con una mayor batería de pruebas bioquímicas lo cual le da un mayor poder discriminatorio.

Al igual que con las pruebas bioquímicas miniaturizadas, *E. coli* DH5α *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* fue identificada como *Shigella* sp. con una probabilidad del 92 % y una calidad de identificación buena. Este microorganismo no se identificó como perteneciente al género y especie esperado ya que, como se menciona antes, es muy difícil discernir entre estos 2 microorganismos, además, tanto las diferentes mutaciones que tiene como la presencia del plásmido pSUPERGLO-GFP están afectando su metabolismo lo cual evita que presente un perfil típico de *E. coli*.

**Tabla 10.** Identidad de *S. Typhimurium* PFV 430 y *E. coli* DH5α *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* de acuerdo con el sistema VITEK 2®.

Cepa	Identidad	Probabilidad (%)	Nivel de confianza	Perfiles típicos contradictorios
<i>Salmonella</i> Typhimurium PFV 430	<i>Salmonella</i> Typhimurium	97	Identificación excelente (Confirmar con pruebas serológicas)	PHOS
<i>E. coli</i> DH5α <i>km<sup>R</sup>, gfp<sup>+</sup></i>	<i>Shigella</i> sp.	92	Identificación buena	dMAL y dMAN

PHOS= Fosfatasa; dMAL= D-maltosa; dMAN= D-manitol.

Comparando los resultados obtenidos utilizando este sistema con las tiras API 20E®, es notable que los resultados de algunas pruebas bioquímicas presentes en ambos fue similar para las dos cepas. En la tabla 11 se muestran los resultados de aquellas pruebas bioquímicas que están presentes en ambos sistemas.

**Tabla 11.** Resultados de algunas de las pruebas bioquímicas contenidas en la tarjeta de Gram-Negativos del sistema VITEK 2® de *S. Typhimurium* PFV 430 y *E. coli* DH5α *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*.

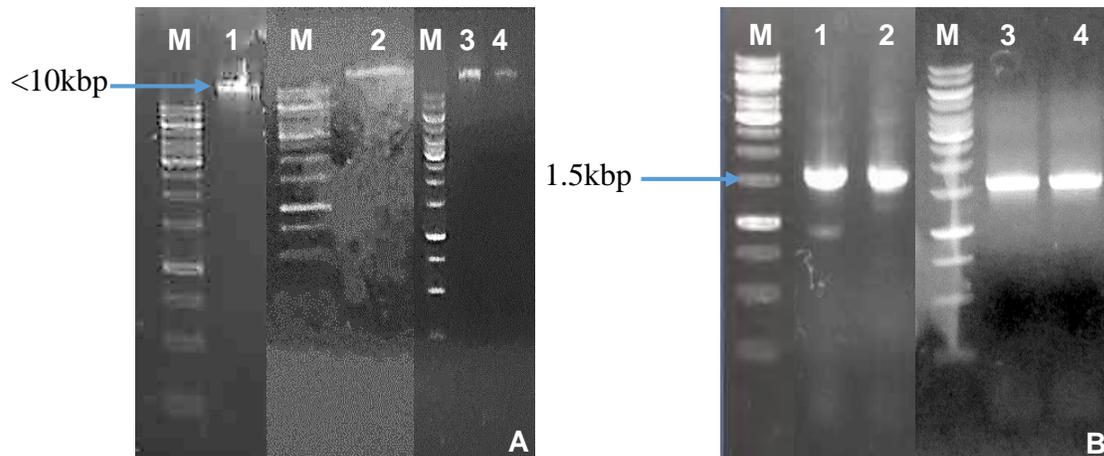
Prueba	Reacción y/o enzima	<i>S. Typhimurium</i> PFV 430	<i>E. coli</i> DH5α <i>km<sup>R</sup></i> <i>gfp<sup>+</sup></i>
<b>BGAL</b>	β-galactosidasa	-	-
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Producción de H <sub>2</sub> S	+	-
<b>dGLU</b>	D-glucosa	+	+
<b>OFF</b>	Fermentación de glucosa	+	+
<b>dMAN</b>	D-manitol	+	-
<b>URE</b>	Ureasa	-	-
<b>dSOR</b>	D-sorbitol	+	-
<b>SAC</b>	Sacarasa	-	-
<b>CIT</b>	Citrato de sodio	+	-
<b>ODC</b>	Ornitina descarboxilasa	+	-
<b>LDC</b>	Lisina descarboxilasa	+	-

### 7.3. Confirmación de la identidad genotípica de las cepas utilizadas.

En la figura 10A, se muestra el gel de agarosa obtenido de la extracción de ADN cromosomal de *S. Typhimurium* PFV 430, *E. coli* TOP10, *E. coli* W3110 y *E. coli* DH5α *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*, en el cual, se apreciaron bandas moderadamente intensas e íntegras con un tamaño mayor a 10 kbp, esto corresponde con lo descrito por Lodish *et al.* (2013) quién menciona que el tamaño promedio del ADN cromosomal de *E. coli* del ADN es de 4.5 Mbp.

En la figura 10B se observó que a pesar de que las bandas de ADN cromosomal no eran muy intensas se logró la amplificación adecuada del gen que codifica para el ARNr 16S, después de la purificación de los amplicones empleando el kit PureLink™ PCR purification (Invitrogen®, Anexo III) se determinó que las bandas tenían un peso aproximado de 1.5 kbp, este resultado concuerda con los reportado por Weisburg *et al.* (1991) además, dichas bandas eran intensas y definidas sin la presencia de productos inespecíficos; debido a esto, se consideró que los amplicones estaban lo suficientemente concentrados y puros para que pudieran ser secuenciados.

Una vez que se obtuvieron las secuencias completas de cada cepa, se compararon con la base de datos del GenBank utilizando el programa BLAST nucleotide® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, último acceso 22/05/2016), los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.



**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/V, 100V y 4  $\mu$ L de EtBr 0.04 %. **A:** ADN cromosomal de las cepas: **Carril 1.** *S. Typhimurium* PFV 430; **Carril 2.** *E. coli* TOP10; **Carril 3.** *E. coli* W3110; **Carril 4.** *E. coli* DH5 $\alpha$  *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*; **B:** Amplicones purificados del gen ARNr 16S de las cepas: **Carril 1.** *S. Typhimurium* PFV 430; **Carril 2.** *E. coli* TOP10; **Carril 3.** *E. coli* W3110; **Carril 4.** *E. coli* DH5 $\alpha$  *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*. **M**=Marcador de peso molecular O'Gen Ruler® 1kbp de Thermo Scientific™.

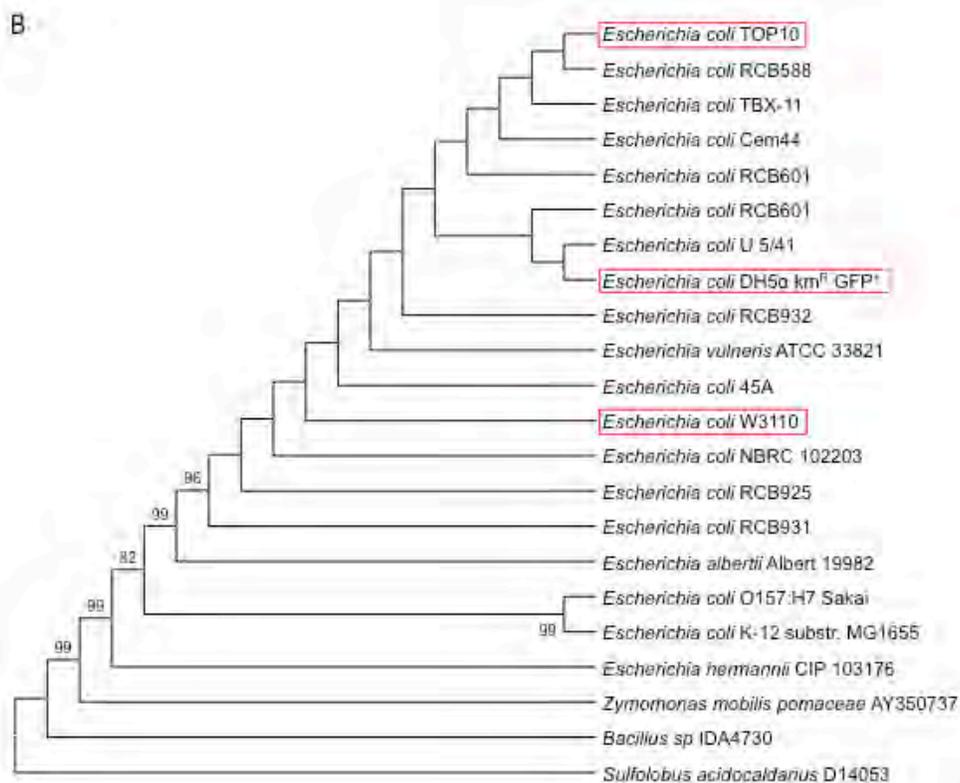
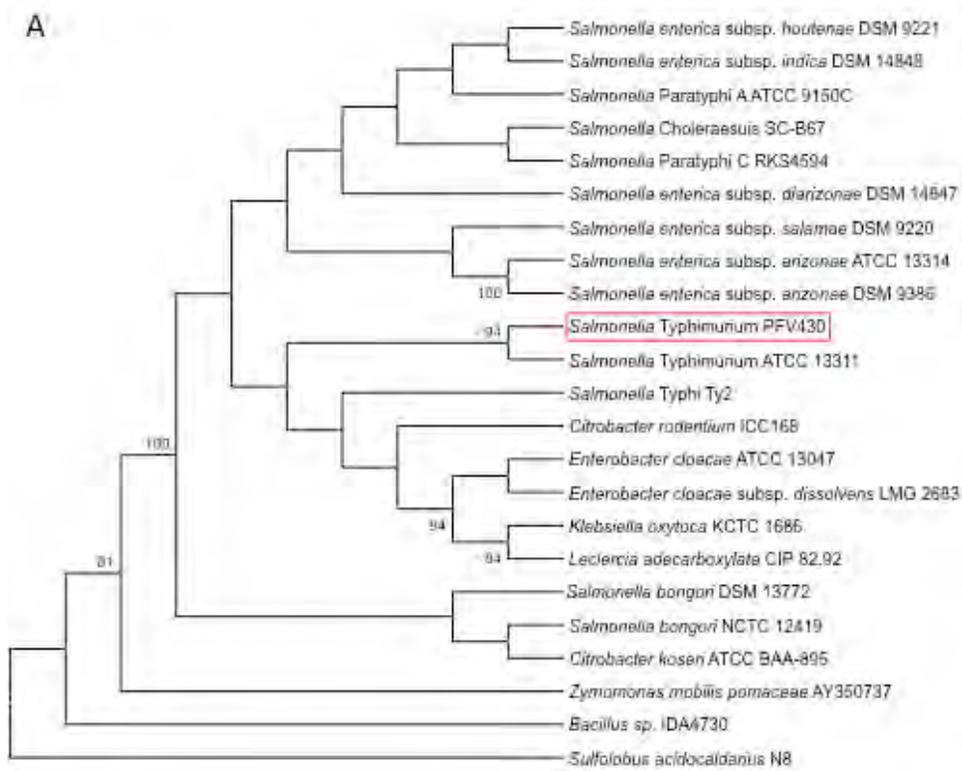
De acuerdo con este programa y al análisis filogenético realizado (Figura 11A, Tabla 12) la identidad de la cepa nombrada como *S. Typhimurium* PFV 430 es *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 13311 (Genbank: NR\_119108.1) ya que entre ellas se forma una rama monofilética lo que indica que las secuencias del gen que codifica para el ARNr 16S de estas dos cepas presenta una alta homología.

En el caso de las tres cepas de *E. coli*, todas se identificaron como microorganismos pertenecientes a este género y especie (Tabla 12), sin embargo, no se logró identificar la cepa de cada una ya que con la utilización del gen que

codifica para el ARNr 16S no se tiene el suficiente poder discriminatorio para discernir a nivel de cepa (Janda y Abbott, 2007), además de acuerdo con Vijayendran *et al* (2006), la mayoría de las cepas de *E. coli* utilizadas en biología molecular derivan de *E. coli* K-12, lo cual, se aprecia en la figura 11B ya que es un ancestro en común para estos tres microorganismos.

**Tabla 12.** Identidad de las cepas de acuerdo a la comparación de las secuencias consenso obtenidas con la base de datos GenBank y al análisis filogenético realizado.

Cepa	Identidad	Código de acceso al GenBank	% de cobertura	Valor de Expectancia	Identidad (%)
<b><i>Salmonella</i> Typhimurium PFV 430</b>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 13311	NR_119108.1	99	0.0	98
<b><i>Escherichia coli</i> DH5<math>\alpha</math> km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></b>	<i>Escherichia coli</i> U 5/41	NR_024570.1	100	0.0	97
<b><i>Escherichia coli</i> TOP10</b>	<i>Escherichia coli</i> RCB588	KT260800.1	99	0.0	99
<b><i>Escherichia coli</i> W3110</b>	<i>Escherichia coli</i> NBRC 102203	NR_114042.1	97	0.0	97

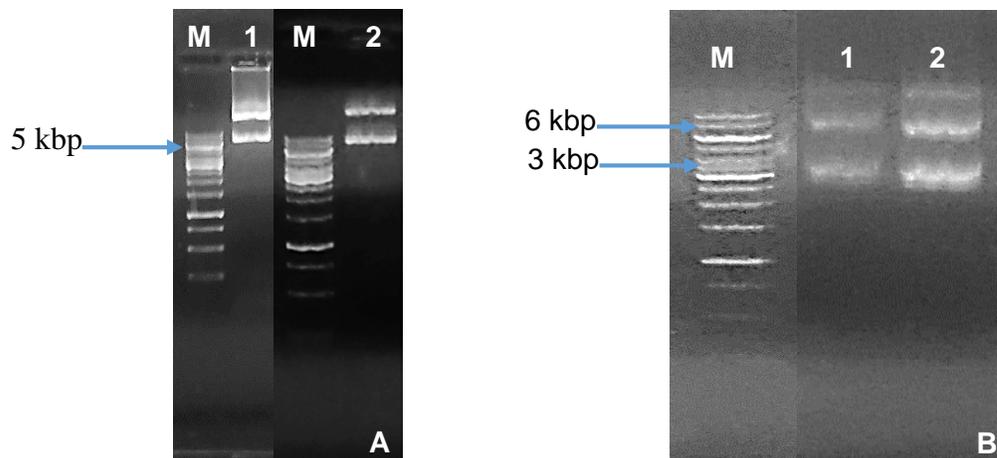


**Figura 11.** Árbol filogenético obtenido por el método de Neighbor-Joining, el algoritmo de comparación de nucleótidos Jukes Cantor y un valor de bootstrap\* de 1000 réplicas. **A:** Comparación de cepas relacionadas filogenéticamente con *S. Typhimurium* PFV 430. **B:** Comparación de cepas relacionadas filogenéticamente con las tres cepas de *E. coli* utilizadas. \*Solo se presentan los valor de bootstrap mayores a 80.

#### 7.4. Extracción y purificación de ADN plasmídico.

El gel de agarosa en el que se analizó el plásmido pBABE-GFP mostró que tiene un peso molecular aproximado de 5 kbp lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (<https://www.addgene.org/10668/>, último acceso 11/02/16), sin embargo, en el gel también se observaron otras bandas de diferente peso molecular y algunas presentaban un ligero color verde (Figura 12A, carril 1) debido a que durante la extracción, quedaron fragmentos de ADN, ARN y proteínas (Micklos *et al.*, 2003), por esto, se purificó utilizando el kit Pure Link™ PCR Purification (Invitrogen®) logrando así obtener dos bandas nítidas (Figura 12A, carril 2), una corresponde al plásmido el cual se encuentra en el peso molecular esperado (5 kbp) mientras que la otra se encuentra por encima de esta banda la cual corresponde al ADN circular cortado, al ADN relajado y/o diferentes topoisómeros del ADN plasmídico los cuales no están en el peso esperado debido a que adoptan diferentes conformaciones tridimensionales las cuales no permiten que pase a través de los poros de agarosa a pesar de la corriente eléctrica aplicada (Micklos *et al.*, 2003). La cepa *S. Typhimurium* PFV 435 dejó de utilizarse debido a que con el tiempo, las colonias formadas en agar luria con ampicilina (100 µg/mL) comenzaron a perder la intensidad del color verde probablemente a que esta cepa no era capaz de expresar la proteína bajo las condiciones de incubación y/o en los medios utilizados o una posible degradación de la misma en el citoplasma del microorganismo.

En el carril 2 de la figura 12B se observó que, al igual que en lo mencionado anteriormente, el plásmido extraído y purificado de la cepa *E. coli* DH5α *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* presentó dos bandas nítidas; la banda de 6 kbp corresponde a fragmentos de ADN cromosomal, ADN circular cortado o a diferentes topoisómeros del mismo (Micklos *et al.*, 2003) mientras que la banda de 3 kbp corresponde al peso molecular del plásmido nativo.



**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% p/V, 100V y 4  $\mu$ L de EtBr 0.04%. **A:** Plásmido pBABE-GFP: **1.** Plásmido no purificado; **2.** Plásmido purificado; **B.** Plásmido pSUPERGLO-GFP: **1.** Plásmido no purificado; **2.** Plásmido purificado .

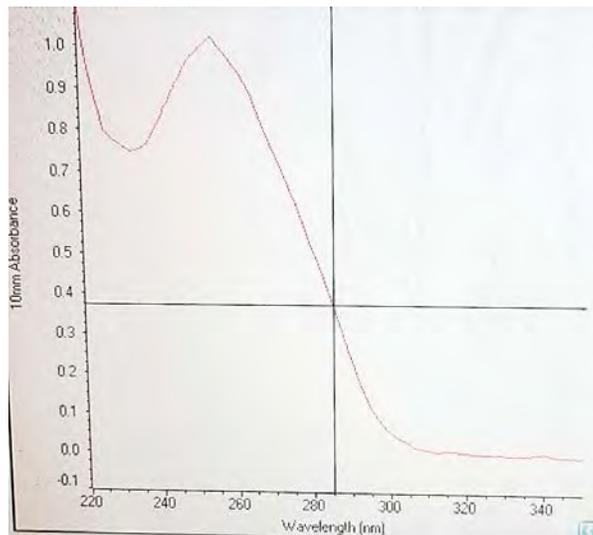
**M=**Marcador de peso molecular O´Gen Ruler® 1kbp de Thermo Scientific™

Con la finalidad de conocer la concentración de ADN obtenida a partir de la extracción por lisis alcalina (la cual se utilizó para determinar la eficiencia de transformación), así como su pureza, se analizaron varias muestras de ellos en el NANODROP™ 2000c Spectrophotometer de Thermo Scientific, los resultados se muestran en la tabla 13. De acuerdo con Thermo Scientific (2011) la relación 260/280 indicó la contaminación con proteínas mientras que la relación 260/230 indicó una contaminación con carbohidratos o derivados de fenol. Los resultados observados señalaron que el plásmido extraído y purificado de la cepa *S. Typhimurium* PFV 430 se encontraba en el rango de aceptable a puro con respecto a la primera relación pero con contaminación de productos derivados de fenol y/o carbohidratos con respecto a la segunda relación. Al realizar la medición de los mismos parámetros de los plásmidos sin purificar extraídos de *S. Typhimurium* PFV 430 y *E. coli* DH5 $\alpha$  *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*, se observó que durante el proceso de purificación se eliminaban parte de los contaminantes, sin embargo, la concentración obtenida disminuía considerablemente y la pureza de los plásmidos determinada bajo estas relaciones era prácticamente igual sin ser sometidos a un proceso de purificación.

**Tabla 13.** Resultados obtenidos de la concentración, relación 260/280 y 260/230 de los plásmidos extraídos de *S. Typhimurium* PFV430 y *E. coli* DH5 $\alpha$  *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*.

	Plásmido pBABE-GFP purificado	Plásmido pBABE-GFP no purificado	Plásmido pSUPERGLO-GFP no purificado
<b>Concentración (ng/<math>\mu</math>L)</b>	47.5	1466.7	852.1
<b>Relación 260/280</b>	1.90	1.88	1.89
<b>Relación 260/230</b>	1.25	1.67	1.88

En la Figura 13 se muestra el espectro de absorbancia del plásmido pBABE-GFP no purificado obtenido con el NANODROP<sup>TM</sup> 2000C en el cual, hay un único pico a una  $\lambda = 260$  nm la cual corresponde a la máxima absorbancia de los ácidos nucleicos (Lodish *et al.*, 2013). La ausencia de otros picos en el espectro son señal de la ausencia de compuestos que puedan absorber a otras longitudes de onda entre 220-340 nm.

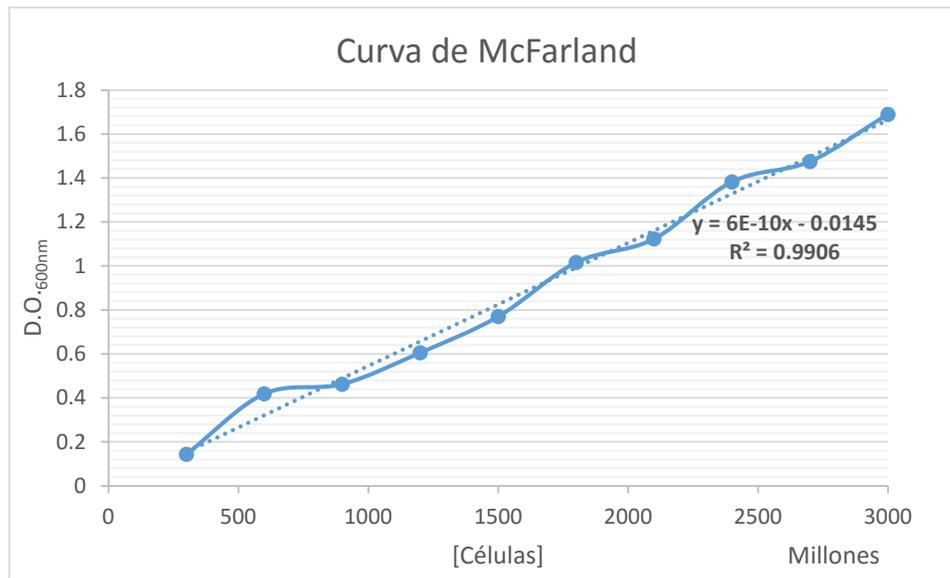


**Figura 13.** Curva de absorbancia obtenida de una alícuota del plásmido pBABE-GFP sin purificar.

### 7.5. Curva de McFarland.

A partir de las D.O.<sub>600nm</sub> obtenidas de cada tubo mencionado en la sección 6.6, se obtuvo la figura 14 en la cual se muestra la absorbancia obtenida contra la concentración aproximada de células correspondiente (Ramírez *et al.*, 2013).

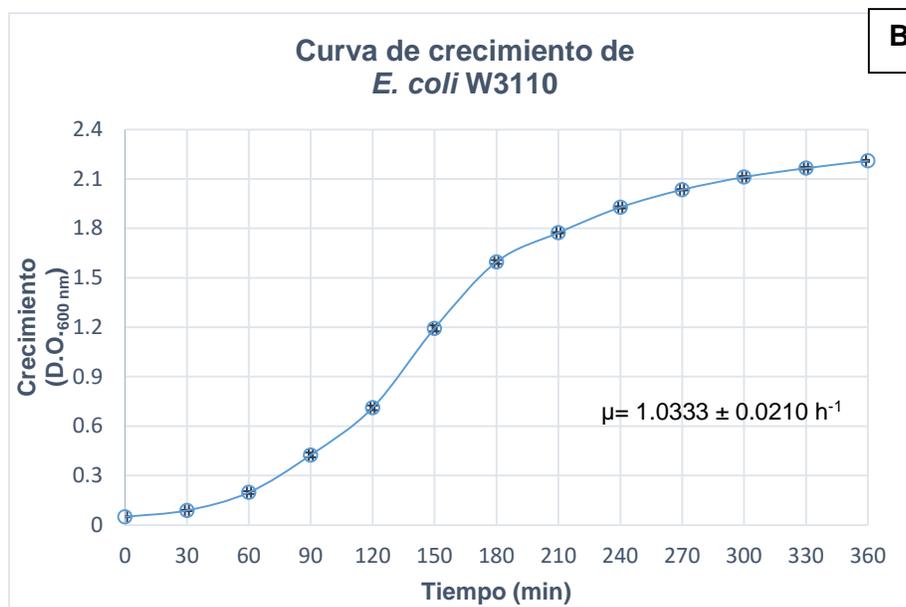
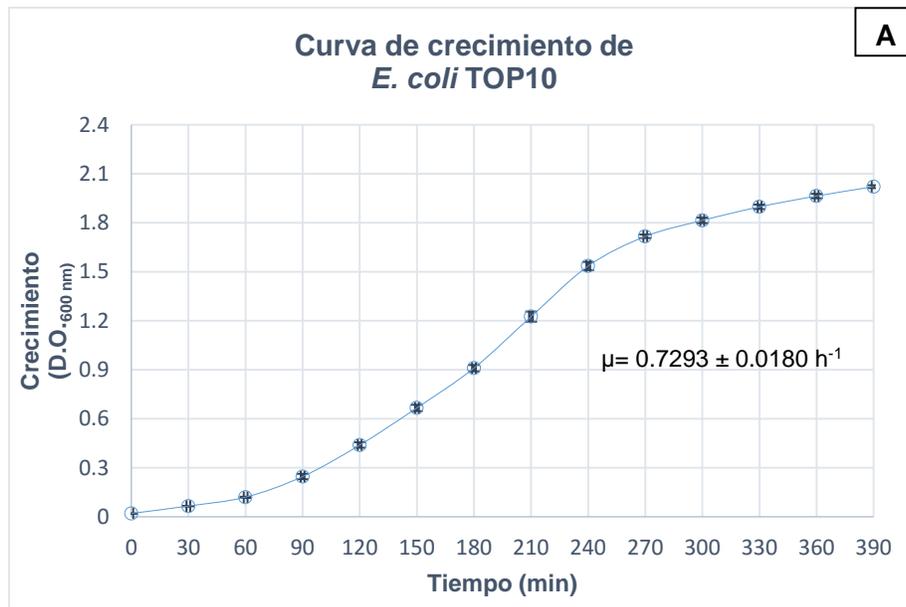
**Figura 14.** Curva de McFarland determinada a 600 nm.



A partir de la gráfica construida se obtuvo la siguiente ecuación de la recta:  $y = 6 \times 10^{-10} - 0.0145$  y un coeficiente de correlación de 0.99064. Esta ecuación fue la utilizada para determinar el porcentaje de células recuperadas.

#### 7.6. Curvas de crecimiento de *E. coli* W3110 y *E. coli* TOP10.

Se observó que las cepas *E. coli* TOP10 y *E. coli* W3110 (Figura 15) presentaron una fase lag relativamente corta, debido a que el caldo YENB y las condiciones utilizadas en el precultivo eran las mismas que se utilizaron para realizar la cinética de crecimiento, además, dicho medio estaba previamente temperizado a 37 °C. A partir de estas curvas de crecimiento se determinó que la velocidad de crecimiento es mayor en la cepa *E. coli* W3110 que en *E. coli* TOP10 ( $\mu = 1.0333 \pm 0.0210 \text{ h}^{-1}$  y  $\mu = 0.7293 \pm 0.0180 \text{ h}^{-1}$  respectivamente) además, se determinó que para que *E. coli* TOP10 llegue a la densidad óptica mencionada en la metodología se necesita incubar durante 2.5 h mientras que para la cepa *E. coli* W3110 se necesita un tiempo de aproximado de 2 horas, estos resultados concuerdan con lo reportado por Sezonov (2007) quien mencionó que para que una cepa de *E. coli* K-12 llegue a una D.O.<sub>600nm</sub> 0.6 se necesita un tiempo aproximado de 2 horas.



**Figura 15.** Curvas de crecimiento promedio de las cepas *E. coli* TOP 10 (A) y *E. coli* W3110 (B). Ambas cepas se incubaron en medio YENB a 300 rpm/37 °C. Se presenta el resultado promedio de 3 determinaciones de las cuales se obtuvo un valor máximo de desviación estándar de 0.03.

## 7.7. Electrotransformación.

Se logró la electrotransformación de la cepa *E. coli* W3110 con el plásmido pBABE-GFP purificado con una concentración de 0.0473  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 0.1085  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  utilizando agar LB con carbenicilina o ampicilina respectivamente. Al obtener las células electrocompetentes de un cultivo en medio YENB a 300 rpm/ 37 °C/24 h de esta cepa, para la primera condición se obtuvo una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.660 ( $[E. coli] = 11 \times 10^8$  UFC/mL) mientras que para la segunda condición el cultivo presentó una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.601 ( $[E. coli] = 10 \times 10^8$  UFC/mL). Al utilizar el medio con carbenicilina se obtuvo una concentración de células transformantes de  $80 \times 10^1$  UFC/mL y una eficiencia de transformación de  $17 \times 10^3$  UFC/mL\* $\mu\text{g}$  ADN mientras que al utilizar el medio con ampicilina la concentración de células transformantes obtenidas fue de  $13 \times 10^1$  UFC/mL y la eficiencia de  $12 \times 10^2$  UFC/mL\* $\mu\text{g}$  ADN (Tabla 14).

Al utilizar los mismos plásmidos y un cultivo de esta misma cepa con una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.931 ( $[E. coli] = 16 \times 10^8$  UFC/mL; plaqueado en el agar con carbenicilina) y 0.925 ( $[E. coli] = 16 \times 10^8$  UFC/mL; plaqueado en el agar con ampicilina), la concentración de células transformantes obtenidas fue de  $13 \times 10^2$  UFC/mL y  $47 \times 10^2$  UFC/mL respectivamente mientras que los valores de las eficiencias de transformación fueron de  $28 \times 10^3$  UFC/mL\* $\mu\text{g}$  ADN y  $43 \times 10^3$  UFC/mL\* $\mu\text{g}$  ADN (Tabla 14).

Con estos resultados se observó que al utilizar un cultivo con densidad óptica mayor, la eficiencia de transformación aumenta. Al realizar la electrotransformación de un cultivo que tenía una D.O.<sub>600nm</sub> de 1.2, no se obtuvieron resultados positivos ya que, como se mostró en las curva de crecimiento obtenida para este microorganismo (Figura 15B), a esta densidad óptica ya se encuentra en una etapa tardía de la fase crecimiento exponencial por lo que la membrana y la pared se encuentran más estables en comparación con un cultivo que está en una etapa temprana de esta fase. Además, al existir una cantidad excesiva de células la conductividad del medio aumentó por los iones presentes en las membranas celulares provocando que el pulso eléctrico decayera

rápidamente lo que evitó que se formaran poros no selectivos lo suficientemente grandes en la membrana (Eynard y Teissié, 2000; Kotnik *et al.*, 2015). Así mismo, estos resultados indicaron que el uso de carbenicilina o ampicilina es indistinto ya que los ordenes de magnitud no variaron al plaqurear las células transformantes en un medio u otro.

Cuando se utilizó la cepa *E. coli* TOP10 la concentración de células recombinantes obtenidas con 0.0473 µg del plásmido pBABE-GFP purificado fue de  $14 \times 10^4$  UFC/mL y una eficiencia de transformación de  $30 \times 10^5$  UFC/mL\*µg ADN utilizando un cultivo inicial con una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.654 (*[E. coli]* =  $11 \times 10^8$  UFC/mL) y como medio selectivo agar LB con carbenicilina. Al utilizar un cultivo con una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.601 (*[E. coli]* =  $10 \times 10^8$  UFC/mL), un plásmido con una concentración de 0.1085 µg/µL y como medio selectivo agar LB con ampicilina se obtuvo una concentración de células transformantes de  $16 \times 10^4$  UFC/mL y una eficiencia de transformación de  $15 \times 10^5$  UFC/mL\*µg ADN.

Al aumentar la D.O.<sub>600nm</sub> que presentaba el cultivo de esta misma cepa al preparar las células electrocompetentes (0.906 y 0.917; *[E. coli]* =  $15 \times 10^8$  UFC/mL y  $16 \times 10^8$  UFC/mL, respectivamente), para la primera condición se obtuvo una concentración de células recombinantes de  $44 \times 10^4$  UFC/mL y una eficiencia de transformación de  $92 \times 10^5$  UFC/mL\*µg ADN utilizando el medio con carbenicilina; en el caso del segundo cultivo, la concentración determinada fue de  $28 \times 10^4$  UFC/mL mientras que la eficiencia fue de  $26 \times 10^5$  UFC/mL\*µg ADN utilizando ampicilina en el medio.

Con los resultados de la cepa *E. coli* TOP10, se puede ver que la eficiencia de transformación es favorecida al aumentar la concentración de células del cultivo inicial, además, no se notó alguna diferencia en los órdenes de magnitud al utilizar ampicilina o carbenicilina. Las eficiencias de transformación obtenidas con esta cepa no concuerdan con lo reportado por Thermo Fisher Scientific Inc. (2015) quien menciona que estos resultados son mayores a  $1 \times 10^9$  UFC/µg ADN, esta diferencia de resultados puede deberse a no haber utilizado el plásmido o bien, las condiciones recomendadas por el proveedor.

**Tabla 14.** Eficiencias de transformación obtenidas variando la densidad óptica del cultivo y el plásmido utilizado con un pulso eléctrico de 1.8 kV.

Plásmido	Cepa	Antibiótico utilizado	D.O. <sub>600</sub>	Concentración de células parentales (UFC/mL)	Concentración de células transformantes (UFC/mL)	Eficiencia de transformación (UFC/mL*µg ADN)	Células transformantes (%)
pBABE-GFP purificado	<i>E. coli</i> TOP10	Carbenicilina	0.654	11x10 <sup>8</sup>	14x10 <sup>4</sup>	30x10 <sup>5</sup>	0.265654
			0.906	15x10 <sup>8</sup>	44x10 <sup>4</sup>	92x10 <sup>5</sup>	0.600832
		Ampicilina	0.601	10x10 <sup>8</sup>	16x10 <sup>4</sup>	15x10 <sup>5</sup>	0.147683
			0.917	16x10 <sup>8</sup>	28x10 <sup>4</sup>	26x10 <sup>5</sup>	0.166225
	<i>E. coli</i> W3110	Carbenicilina	0.660	11x10 <sup>8</sup>	80x10 <sup>1</sup>	17x10 <sup>3</sup>	0.001505
			0.931	16x10 <sup>8</sup>	13x10 <sup>2</sup>	28x10 <sup>3</sup>	0.001778
		Ampicilina	0.601	10x10 <sup>8</sup>	13x10 <sup>1</sup>	12x10 <sup>2</sup>	0.000112
			0.925	16x10 <sup>8</sup>	47x10 <sup>2</sup>	43x10 <sup>3</sup>	0.002776
pBABE-GFP NO purificado	<i>E. coli</i> TOP10	Carbenicilina	0.654	11x10 <sup>8</sup>	56x10 <sup>4</sup>	38x10 <sup>4</sup>	0.034238
			0.906	15x10 <sup>8</sup>	16x10 <sup>5</sup>	11x10 <sup>5</sup>	0.070195
		Ampicilina	0.616	11x10 <sup>8</sup>	10x10 <sup>5</sup>	46x10 <sup>4</sup>	0.044051
			0.909	15x10 <sup>8</sup>	10x10 <sup>5</sup>	46x10 <sup>4</sup>	0.029776
	<i>E. coli</i> W3110	Carbenicilina	0.660	11x10 <sup>8</sup>	71x10 <sup>2</sup>	48x10 <sup>2</sup>	0.000429
			0.931	16x10 <sup>8</sup>	11x10 <sup>3</sup>	76x10 <sup>2</sup>	0.000481
		Ampicilina	0.622	11x10 <sup>8</sup>	17x10 <sup>2</sup>	78x10 <sup>1</sup>	0.000073
			0.991	17x10 <sup>8</sup>	63x10 <sup>2</sup>	29x10 <sup>2</sup>	0.000173
pSUPER GLO-GFP purificado	<i>E. coli</i> TOP10	Kanamicina	0.601	10x10 <sup>8</sup>	40x10 <sup>6</sup>	30x10 <sup>7</sup>	29.266439
			0.917	16x10 <sup>8</sup>	15x10 <sup>7</sup>	11x10 <sup>8</sup>	70.737578
	<i>E. coli</i> W3110	Kanamicina	0.601	10x10 <sup>8</sup>	37x10 <sup>5</sup>	27x10 <sup>6</sup>	2.667229
			0.925	16x10 <sup>8</sup>	35x10 <sup>6</sup>	26x10 <sup>7</sup>	16.684048
pSUPER GLO-GFP NO purificado	<i>E. coli</i> TOP10	Kanamicina	0.616	11x10 <sup>8</sup>	53x10 <sup>5</sup>	53x10 <sup>5</sup>	0.503756
			0.909	15x10 <sup>8</sup>	52x10 <sup>6</sup>	41x10 <sup>6</sup>	2.650690
	<i>E. coli</i> W3110	Kanamicina	0.622	11x10 <sup>8</sup>	42x10 <sup>5</sup>	42x10 <sup>5</sup>	0.399856
			0.991	17x10 <sup>8</sup>	37x10 <sup>6</sup>	29x10 <sup>6</sup>	1.725438

Al utilizar el plásmido pSUPERGLO-GFP purificado (concentración de 0.1334  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y un cultivo de la cepa *E. coli* W3110 con una  $\text{D.O.}_{600\text{nm}} = 0.601$  ( $[E. coli] = 10 \times 10^8$  UFC/mL) se determinó que la concentración de células recombinantes obtenidas era de  $37 \times 10^5$  UFC/mL y la eficiencia de transformación de  $27 \times 10^6$  UFC/mL\* $\mu\text{g}$  ADN. Al realizar la electrotransformación con el mismo plásmido y cepa pero con una  $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$  de 0.925 ( $[E. coli] = 16 \times 10^8$  UFC/mL), la concentración de células transformantes obtenida fue de  $35 \times 10^6$  UFC/mL mientras que la eficiencia de transformación obtuvo un valor de  $26 \times 10^7$  UFC/mL\* $\mu\text{g}$  ADN. Al analizar estos resultados es notable que la eficiencia de transformación aumenta un orden de magnitud al aumentar la concentración de células presentes en el cultivo inicial.

La cepa *E. coli* TOP10 electrotransformada con el plásmido pSUPERGLO-GFP purificado presentó resultados mucho más cercanos a lo reportado en la literatura (hasta  $1 \times 10^9$  UFC/mL/ $\mu\text{g}$  ADN) obteniendo una concentración de células transformantes de  $40 \times 10^6$  UFC/mL y una eficiencia de transformación de  $30 \times 10^7$  UFC/mL\* $\mu\text{g}$  ADN al utilizar un cultivo con una  $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$  de 0.601 ( $[E. coli] = 10 \times 10^8$  UFC/mL); al usar un cultivo de 0.917 ( $[E. coli] = 16 \times 10^8$  UFC/mL) la concentración de células transformantes fue de  $15 \times 10^7$  UFC/mL mientras que la eficiencia de transformación fue  $11 \times 10^8$  UFC/mL\* $\mu\text{g}$  ADN.

Se logró la electrotransformación de la cepa *E. coli* W3110 con el plásmido pBABE-GFP no purificado (concentración = 1.467  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) utilizando los mismos medios selectivos que en el caso de las electrotransformaciones con el plásmido purificado. La concentración de células transformantes obtenidas a partir de un cultivo con una  $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$  de 0.660 ( $[E. coli] = 11 \times 10^8$  UFC/mL) y agar con carbenicilina (Figura 16A) fue de  $71 \times 10^2$  UFC/mL mientras que la eficiencia correspondiente en estas mismas condiciones fue de  $49 \times 10^2$  UFC/mL\* $\mu\text{g}$  ADN. Al cambiar el antibiótico por ampicilina (Figura 16B), usando un cultivo con una  $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$  de 0.622 ( $[E. coli] = 10 \times 10^8$  UFC/mL) y el plásmido pBABE-GFP no purificado con una concentración de 2.176  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , se obtuvieron  $17 \times 10^2$  UFC/mL células recombinantes con una eficiencia de  $78 \times 10^1$  UFC/mL\* $\mu\text{g}$  ADN.

Aumentando la D.O.<sub>600nm</sub> del cultivo inicial (0.931; [*E. coli*] =  $16 \times 10^8$  UFC/mL), un plásmido con una concentración de 1.467  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y agar LB con carbenicilina la concentración de células transformantes fue de  $11 \times 10^3$  UFC/mL mientras que la eficiencia fue de  $76 \times 10^2$  UFC/mL\* $\mu\text{g}$  ADN. Al utilizar ampicilina, un cultivo con una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.991 ([*E. coli*] =  $17 \times 10^8$  UFC/mL) y un plásmido con una concentración de 2.176  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  la concentración de células recombinantes fue de  $63 \times 10^2$  UFC/mL y la eficiencia de  $29 \times 10^2$  UFC/mL\* $\mu\text{g}$  ADN.

La concentración obtenida de células transformantes en agar LB con carbenicilina para *E. coli* TOP10 con el plásmido pBABE-GFP no purificado (Figura 16A) fue  $56 \times 10^4$  UFC/mL y la eficiencia fue de  $38 \times 10^4$  UFC/mL\* $\mu\text{g}$  ADN partiendo de un cultivo con una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.654 ([*E. coli*] =  $11 \times 10^8$  UFC/mL) y un plásmido con una concentración de 1.467  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; al utilizar ampicilina en el agar LB, la concentración de células transformantes fue de  $10 \times 10^5$  UFC/mL mientras que la eficiencia fue de  $46 \times 10^4$  UFC/mL\* $\mu\text{g}$  ADN partiendo de un cultivo con densidad óptica de 0.616 ([*E. coli*] =  $10 \times 10^8$  UFC/mL) y un plásmido con una concentración de 2.176  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 16B).

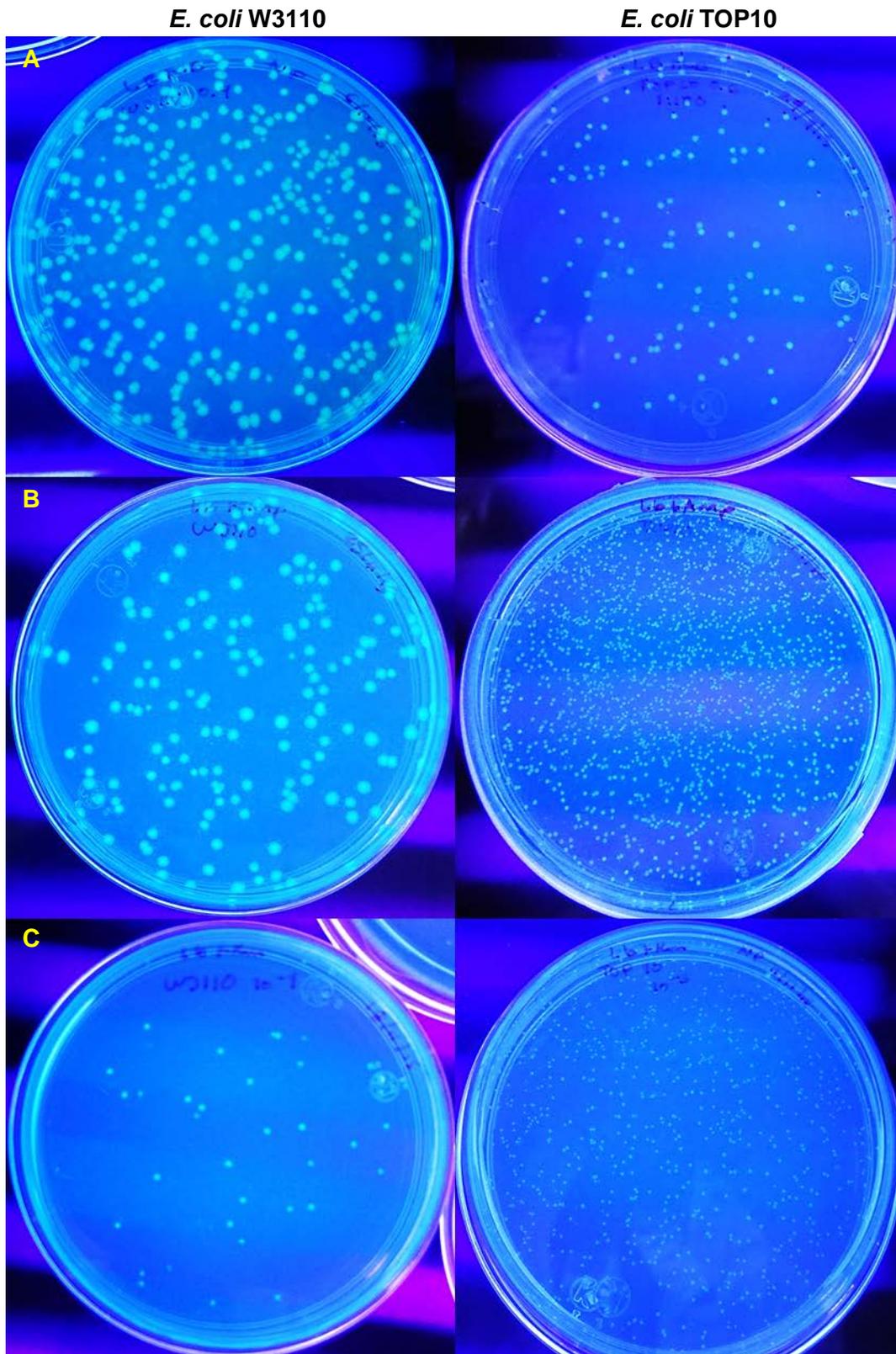
Al probar las mismas condiciones variando la densidad óptica del cultivo inicial de *E. coli* TOP10 se obtuvo una concentración de células recombinantes de  $16 \times 10^5$  UFC/mL y una eficiencia de  $11 \times 10^5$  UFC/mL\* $\mu\text{g}$  ADN con un cultivo de una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.906 ([*E. coli*] =  $15 \times 10^8$  UFC/mL), un plásmido con una concentración de 1.467  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y agar con carbenicilina; al hacer el mismo procedimiento con un cultivo con D.O.<sub>600nm</sub> de 0.909 ([*E. coli*] =  $15 \times 10^8$  UFC/mL), un plásmido con una concentración de 2.176  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y usando ampicilina en el medio, los resultados fueron una concentración de células transformantes de  $10 \times 10^5$  UFC/mL y una eficiencia de  $46 \times 10^4$  UFC/mL\* $\mu\text{g}$  ADN.

La electrotransformación con el plásmido pSUPERGLO-GFP no purificado (concentraciones de 0.8521 y 1.262  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) también presentó resultados favorables, usando la cepa *E. coli* W3110 (Figura 16C) con una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.622 ([*E. coli*] =  $11 \times 10^8$  UFC/mL) se obtuvo una concentración de células recombinantes de  $42 \times 10^5$  UFC/mL y una eficiencia de transformación de  $42 \times 10^5$

UFC/mL\* $\mu$ g ADN. Al realizar la electrotransformación con el plásmido de concentración 1.262  $\mu$ g/ $\mu$ L y la misma cepa pero con una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.991 ([*E. coli*] =  $17 \times 10^8$  UFC/mL) la concentración obtenida de células transformantes fue de  $37 \times 10^6$  UFC/mL mientras que la eficiencia de transformación obtuvo un valor de  $29 \times 10^6$  UFC/mL\* $\mu$ g ADN.

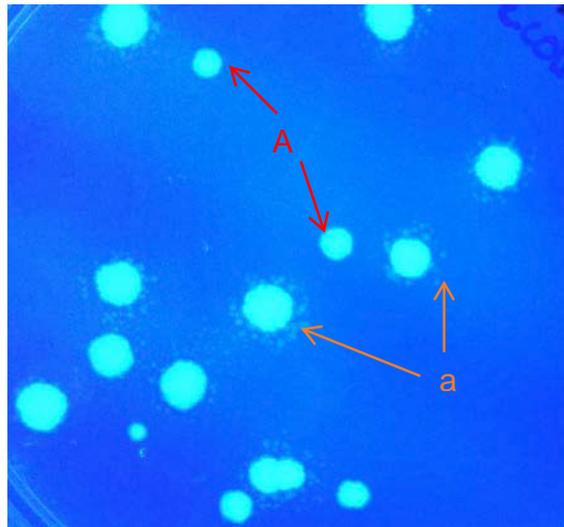
La electrotransformación realizada utilizando la cepa *E. coli* TOP10 con el plásmido pSUPERGLO-GFP no purificado (concentraciones de 0.8521 y 1.262  $\mu$ g/ $\mu$ L) (Figura 16C) obtuvo una concentración de células transformantes de  $53 \times 10^5$  UFC/mL y una eficiencia de transformación de  $53 \times 10^5$  UFC/mL\* $\mu$ g ADN al utilizar un cultivo con una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.616 ([*E. coli*] =  $11 \times 10^8$  UFC/mL); al realizar el mismo procedimiento con un cultivo de una densidad óptica de 0.909 ([*E. coli*] =  $15 \times 10^8$  UFC/mL) y un plásmido con una concentración de 1.262  $\mu$ g/ $\mu$ L la concentración de células recombinantes fue de  $52 \times 10^6$  UFC/mL mientras que la eficiencia de transformación fue  $41 \times 10^6$  UFC/mL\* $\mu$ g ADN.

En la Figura 16 se muestra la comparación de las colonias transformantes obtenidas. Tanto el tamaño como la morfología de las colonias de *E. coli* W3110 y *E. coli* TOP10 no presentaron alguna diferencia al ser plaqueadas en agar LB con ampicilina o carbenicilina ya que, al pertenecer a la familia de las penicilinas actúan de la misma manera afectando la síntesis de la pared celular (Madigan *et al.*, 2009), sin embargo, el tamaño de las colonias disminuyó considerablemente al ser transformadas con el plásmido pSUPERGLO-GFP y plaqueadas en un medio con kanamicina. Este antibiótico se une de manera irreversible a la subunidad 30S del ribosoma evitando así que se una el ARNm y por tanto, la correcta síntesis de proteínas lo que podría estar afectando el tamaño de las colonias formadas (Micklos *et al.*, 2003). A pesar de que las colonias obtenidas presentaban un tamaño más pequeño, este antibiótico pudo evitar la formación de colonias satélite a diferencia de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos utilizados.



**Figura 16.** Comparación de las colonias transformantes obtenidas de las cepas *E. coli* W3110 y *E. coli* TOP10 al ser plaqueadas en los medios correspondientes e incubadas a 37 °C/24 h observadas bajo luz UV. **A:** Cepa transformada con el plásmido pBABE-GFP purificado plaqueada en agar LB + carbenicilina; **B:** Cepa transformada con el plásmido pBABE-GFP purificado plaqueada en agar LB + ampicilina; **C:** Cepa transformada con el plásmido pSUPERGLO-GFP purificado plaqueada en agar LB + kanamicina.

La presencia de colonias satélites solo se observó al utilizar la ampicilina. Una colonia satélite no contiene al plásmido pero es capaz de crecer en este medio selectivo gracias a la degradación del antibiótico por la enzima  $\beta$ -lactamasa la cual, se encuentra codificada en el plásmido pBABE-GFP, debido a esto, estas colonias solo fueron capaces de crecer alrededor de una colonia transformante, no presentaron un color verde fluorescente y además, su tamaño era considerablemente menor (Figura 17). Este fenómeno solo se observó al utilizar la ampicilina debido a que es un antibiótico que presenta una mayor sensibilidad a la  $\beta$ -lactamasa y a un pH ácido que la carbenicilina, la cual, al ser semisintética, tiene otros sustituyentes en su estructura lo que la hace más resistente a las condiciones antes mencionadas (Dumancas *et al.*, 2014; Madigan *et al.*, 2009).

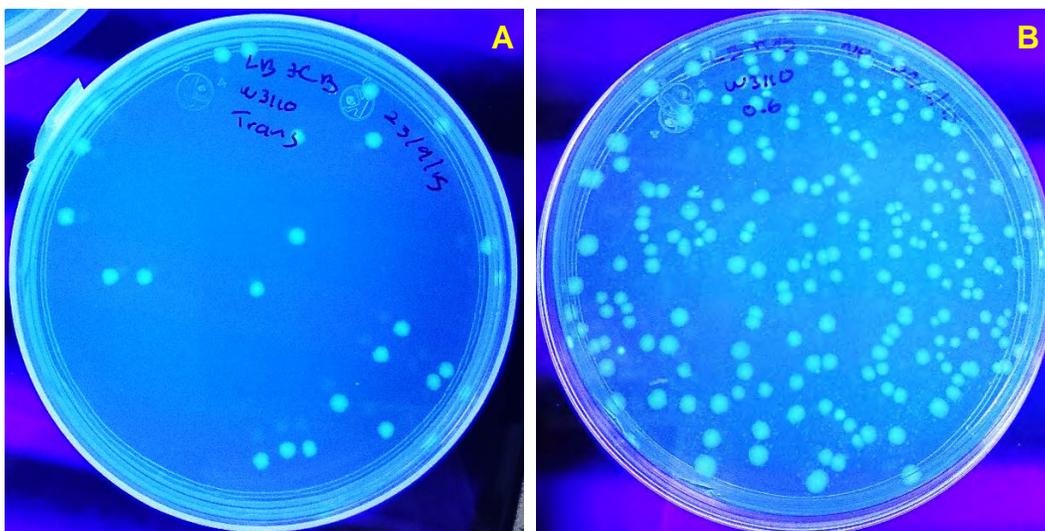


**Figura 17.** Colonias satélite observadas bajo luz UV al plaquear la cepa *E. coli* W3110  $ap^R$   $gfp^+$  en agar LB + ampicilina incubada a 37°C/24 h. Alrededor de las colonias grandes (A) con un color verde fluorescente (correspondiente a las colonias transformantes) se encuentran las colonias satélite (a) las cuales son de menor tamaño y no presentan fluorescencia.

Cuando se utilizaron los plásmidos sin purificar se observó una disminución en la eficiencia de transformación en todas las condiciones probadas esto pudo deberse a dos razones principales: la primera es que es probable que la concentración del plásmido no purificado este sobreestimada ya que aún hay restos de proteínas u

otras sustancias que absorban en 260 nm provocando que, al hacer los cálculos, la eficiencia sea menor a la obtenida con el plásmido purificado; la segunda razón es que dentro de los contaminantes del plásmido aún exista la presencia de diferentes sales que no son detectables mediante la relación 260/230 y 260/280 lo que provocó un aumento en la conductividad del medio (Eynard y Teissié, 2000; Kotnik, *et. al.*, 2015).

Una ventaja que se observó al utilizar el plásmido sin purificar es que las colonias transformantes obtenidas presentaron una mayor intensidad del color verde fluorescente al observarlas bajo luz UV en comparación con las colonias transformantes obtenidas al utilizar el plásmido purificado (Figura 18), esto se debió a que en la alícuota del plásmido no purificado aún se encontraba cierta concentración de la proteína verde fluorescente ya que, debido a su estructura compacta en forma de barril  $\beta$  (Ferrer, 2008), es altamente resistente a la proteólisis, detergentes, calor y agentes desnaturizantes (Flores-Ramírez *et al.*, 2007), por lo que es probable que haya sido capaz de atravesar los poros no selectivos formados en la membrana al aplicar el pulso eléctrico.



**Figura 18.** Comparación de la intensidad de la fluorescencia en *E. coli* W3110  $ap^R$   $gfp^+$  cultivada en agar LB con carbenicilina a 37 °C/24 h al ser observada con luz UV. **A:** Cepa transformada con el plásmido pBABE-GFP purificado; **B:** Cepa transformada con el plásmido pBABE-GFP sin purificar.

Al comparar la eficiencia de transformación utilizando los plásmidos pBABE-GFP y pSUPERGLO-GFP se observó que al utilizar este último se obtenían mejores resultados tanto en la cepa *E. coli* TOP 10 como en la cepa *E. coli* W3110 probablemente a que al ser un plásmido de menor peso molecular, este tuvo una mayor facilidad de entrar por los poros no selectivos formados durante la electroporación (Kotnik *et. al.*, 2015).

### **7.8. Quimiotransformación.**

Se realizó la quimiotransformación de *E. coli* W3110 y *E. coli* TOP10 utilizando el plásmido pBABE-GFP no purificado y como medio selectivo agar LB con ampicilina. Con este método solo se obtuvieron colonias transformantes de la cepa *E. coli* TOP10 la cual, como se ha mencionado anteriormente, es una cepa especialmente diseñada para obtener buenas eficiencias de transformación, sin embargo, los ordenes de magnitud obtenidos no fueron mayores a  $1 \times 10^2$  (Tabla 15).

*E. coli* W3110 no logró quimiotransformarse probablemente debido a que al ser una cepa silvestre, no presenta las mutaciones que por lo general tienen los microorganismos utilizados en tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, mutaciones en los genes *recA* y *endA*), además, es sabido que esta metodología no es tan eficiente como la electroporación ya que se basa en la desestabilización de la membrana utilizando cationes divalentes y un choque térmico, estas condiciones no siempre son capaces de lograr una desestabilización tal que genere poros no selectivos lo suficientemente grandes por los cuales el ADN plasmídico pueda llegar al citoplasma de la célula, debido a esto, esta metodología necesita estar bien estandarizada para cada cepa y plásmido que se desee utilizar. Para lograr obtener resultados favorables con *E. coli* W3110 y aumentar la eficiencia de quimiotransformación de *E. coli* TOP10 es recomendable probar la utilización de otros iones divalentes (como  $Mn^{2+}$ ) así como variar las condiciones del choque térmico aplicado (Vee Aune y Aachmann, 2010).

**Tabla 15.** Eficiencias de quimiotransformación obtenidas variando la densidad óptica del cultivo de la cepa *E. coli* TOP10.

Plásmido	D.O. <sub>.600nm</sub>	Concentración de células parentales (UFC/mL)	Concentración de células transformantes (UFC/mL)	Eficiencia de transformación (UFC/mL/μg ADN)	Células transformantes (%)
pBABE-GFP NO purificado	0.628	11x10 <sup>8</sup>	11x10 <sup>3</sup>	61x10 <sup>2</sup>	0.000572
pBABE-GFP NO purificado	0.898	15x10 <sup>8</sup>	17x10 <sup>2</sup>	92x10 <sup>1</sup>	0.000061

La eficiencia de transformación no aumentó al utilizar un cultivo con una D.O.<sub>.600nm</sub> de 0.898 como en el caso de la electrotransformación, al contrario, esta disminuyó lo cual concuerda con lo reportado por Hanahan (1983) quien demostró que la D.O.<sub>.600nm</sub> óptima de los cultivos de *E. coli* utilizados para quimiotransformación es de 0.45, si se utiliza un cultivo con una mayor densidad óptica, la eficiencia de transformación tiende a disminuir (Hanahan, 1983; Inoue, 1990) ya que para que este método presente buenas eficiencias de transformación es esencial que las células se encuentren en una fase temprana del crecimiento exponencial en la cual, tanto la pared como la membrana de las bacterias aún no está totalmente formadas (Taketo y Kuno, 1974).

En la figura 19 se muestra una gráfica comparativa de los resultados obtenidos mediante electrotransformación y quimiotransformación de la cepa *E. coli* TOP10 utilizando el plásmido pBABE-GFP en la cual, es apreciable que este último es mucho menos eficiente obteniendo diferencias en las eficiencias de transformación de hasta 3 ordenes de magnitud, este resultado concuerda con lo reportado por Vee Aune y Aachmann (2010) quienes mencionan que el método de quimiotransformación es un método mucho más ineficiente debido a que se trata de una metodología menos drástica para formar los poros no selectivos en la membrana de las células.

### Comparación de las eficiencias de quimiotransformación y electrotransformación de *E. coli* TOP10



**Figura 19.** Gráfica comparativa de las eficiencias de transformación obtenidas mediante el método de electrotransformación y quimiotransformación de *E. coli* TOP10 con el plásmido pBABE-GFP utilizando como medio selectivo agar LB con ampicilina incubado a 37 °C/24 h.

A pesar de que este procedimiento es relativamente sencillo y barato (no se necesita utilizar ningún equipo específico), es un método que presentó los siguientes inconvenientes:

- Se obtuvo una menor eficiencia de transformación con las condiciones probadas.
- Las células quimiocompetentes obtenidas siguiendo la metodología descrita en la sección 6.10. debieron ser transformadas el mismo día que se prepararon ya que, se observó que no se obtenía ninguna colonia transformante cuando las células eran almacenadas a -70 °C y posteriormente descongeladas en hielo debido a que no se congelaron lo suficientemente rápido (en la literatura se recomienda utilizar nitrógeno líquido) y no se agregó ningún agente que actuara como crioprotector durante el congelamiento (en células quimiocompetentes generalmente se usa DMSO o polietilenglicol) por lo que

en la mezcla de células, se formaron cristales de hielo lo suficientemente grandes para afectar la viabilidad de las mismas (Inoue *et al.*, 1990).

### 7.9. Extracción de plásmidos a partir de las cepas transformantes.

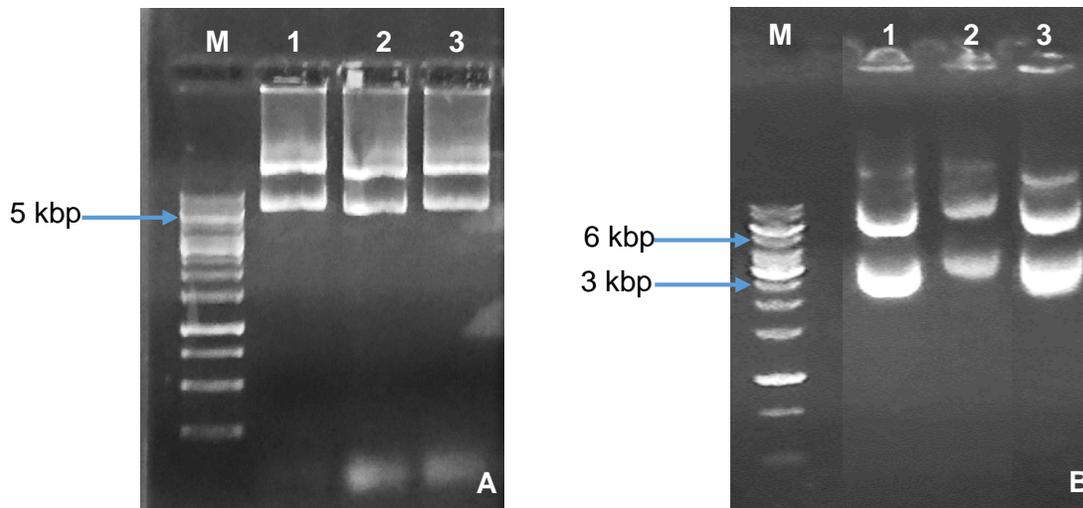
Después de las electrotransformaciones realizadas, se obtuvieron 4 cepas recombinantes a partir de las cuales se extrajo el plásmido presente en cada una de ellas con la finalidad de corroborar que se trataba del mismo que contenían las cepas que originalmente los contenían (*S. Typhimurium* PFV 430 y *E. coli* DH5 $\alpha$ ); para dicho objetivo se siguió la metodología descrita en la sección 6.5.

Las cepas recombinantes son las siguientes:

- 1) *E. coli* W3110 *ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* (Figura 20A, carril 2)
- 2) *E. coli* TOP10 *ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* (Figura 20A, carril 3)
- 3) *E. coli* W3110 *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* (Figura 20B, carril 2)
- 4) *E. coli* TOP10 *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* (Figura 20B, carril 3)

El gel de agarosa (1 % p/v) de estas extracciones así como el plásmido obtenido de las cepas *S. Typhimurium* PFV 430 (Figura 20A, carril 1) y *E. coli* DH5 $\alpha$  *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* (Figura 20B, carril 1) mostró que los patrones de bandeo eran similares. En todos los casos, el plásmido pBABE-GFP tenía un peso molecular de 5 kbp mientras que el plásmido pSUPERGLO-GFP de 3 kbp. Además de las bandas mencionadas anteriormente, se presentaron unas segundas bandas intensas de un peso mayor a 10 kbp y 6 kbp respectivamente las cuales corresponden a ADN circular abierto y/o los diferentes topoisómeros de cada plásmido (Micklos, 2003).

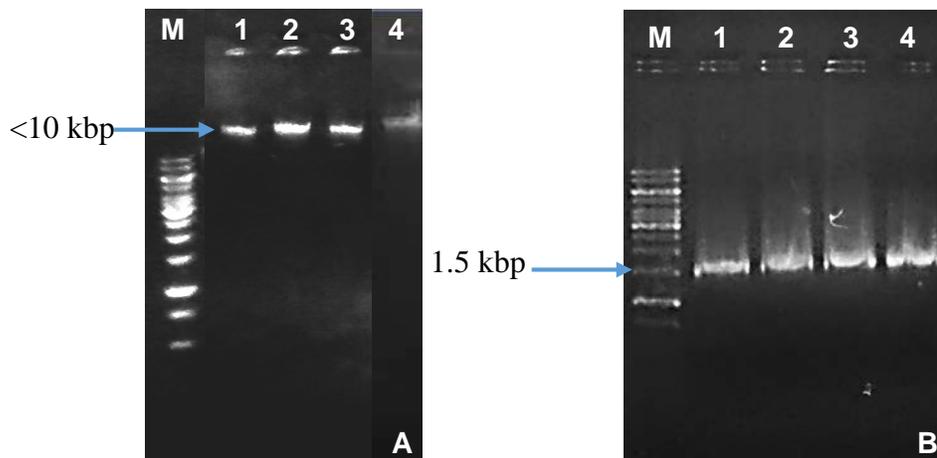
Las bandas que se observaron en el gel de agarosa eran intensas y nítidas lo cual indicó que el plásmido logró heredarse a las siguientes generaciones a partir de las cuales se hizo la suspensión para realizar la extracción como se indicó anteriormente.



**Figura 20.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, 100V y 4  $\mu$ L de EtBr 0.04%. **A:** Plásmido pBABE-GFP: **Carril 1.** *S. Typhimurium* PFV 430; **Carril 2.** *E. coli* W3110  $ap^R gfp^+$ ; **Carril 3.** *E. coli* TOP10  $ap^R gfp^+$ . **B:** Plásmido pSUPERGLO-GFP: **Carril 1.** *E. coli* DH5 $\alpha$   $km^R gfp^+$ , **Carril 2.** *E. coli* W3110  $km^R gfp^+$ ; **Carril 3.** *E. coli* TOP10  $km^R gfp^+$ . **M=**Marcador de peso molecular O'Gen Ruler<sup>®</sup> 1kbp de Thermo Scientific<sup>™</sup>

### 7.10. Identificación genotípica de las cepas transformantes.

Para corroborar que la identidad genotípica de las cepas transformantes era la misma que la de las cepas parentales, se realizó una extracción del DNA cromosomal de cada una, el gel de agarosa realizado (Figura 21A) mostró bandas intensas e integras en la parte superior del mismo, este resultado concuerda con Lodish *et al.* (2013) ya que el peso promedio del ADN cromosomal de *E. coli* es de 4.5 Mbp. En la Figura 21B se muestra el gel obtenido a partir de la amplificación por PCR del gen que codifica para el ARNr 16S, las bandas presentan un peso molecular de 1.5 kbp lo cual concuerda con lo reportado por Weisburg *et al.* (1991) ya que es el peso reportado de los amplicones obtenidos al utilizar los primers descritos por este autor.



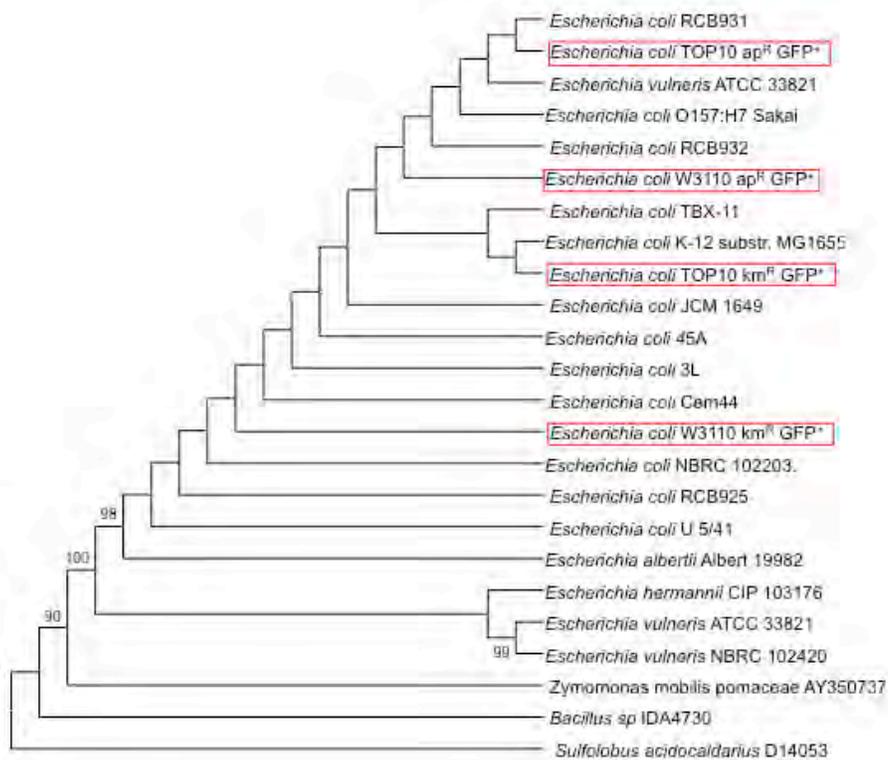
**Figura 21.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/V, 100V y 4  $\mu$ L de EtBr 0.04 %. **A:** ADN cromosomal: **Carril 1.** *E. coli* W3110  $ap^R$   $GFP^+$ ; **Carril 2.** *E. coli* W3110  $km^R$   $GFP^+$ ; **Carril 3.** *E. coli* TOP10  $ap^R$   $GFP^+$ ; **Carril 4.-** *E. coli* TOP10  $km^R$   $GFP^+$ . **B:** Amplicones purificados del gen ARNr 16S: **Carril 1.** *E. coli* W3110  $ap^R$   $GFP^+$ ; **Carril 2.** *E. coli* W3110  $km^R$   $GFP^+$ ; **Carril 3.** *E. coli* TOP10  $ap^R$   $GFP^+$ ; **Carril 4.** *E. coli* TOP10  $km^R$   $GFP^+$ . **M=**Marcador de peso molecular O'Gen Ruler<sup>®</sup> 1kbp de Thermo Scientific<sup>™</sup>.

Cada secuencia obtenida del gen que codifica para el ARNr 16S fue comparada con la base de datos del Genbank utilizando el programa BLASTn<sup>®</sup> de la NCBI y a partir de estos resultados, se obtuvieron secuencias que presentaran una alta homología a partir de las cuales, se generó un árbol filogenético. De acuerdo con este análisis, (Figura 22, Tabla 16) a pesar de la carga genética extra que tenían las cepas recombinantes, todas fueron identificadas como pertenecientes al género y especie *E. coli*.

Como se mencionó anteriormente, el gen que codifica para el ARNr 16S no tiene el suficiente poder discriminatorio para poder discernir entre cepas (Janda y Abbott, 2007) por lo que pudo generar que no se formaran ramas monofiléticas entre las mismas cepas con diferente plásmido ya que se espera que al realizar la transformación, la secuencia del ADN cromosomal no se altere.

**Tabla 16.** Identidad de las cepas de acuerdo a la comparación de las secuencias consenso obtenidas con la base de datos GenBank y al análisis filogenético realizado.

Cepa	Identidad	Código de acceso al GenBank	% de cobertura	Valor de Expectancia	Identidad (%)
<i>Escherichia coli</i> W3110 <i>ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>Escherichia coli</i> TBX-11	KR265355.1	99	0.0	99
<i>Escherichia coli</i> W3110 <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>Escherichia coli</i> NBRC 102203	NR_114041.1	99	0.0	98
<i>Escherichia coli</i> TOP10 <i>ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>Escherichia coli</i> RCB931	KT261143.1	99	0.0	99
<i>Escherichia coli</i> TOP10 <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>Escherichia coli</i> K-12 substr MG1655	NR_102804.1	99	0.0	96

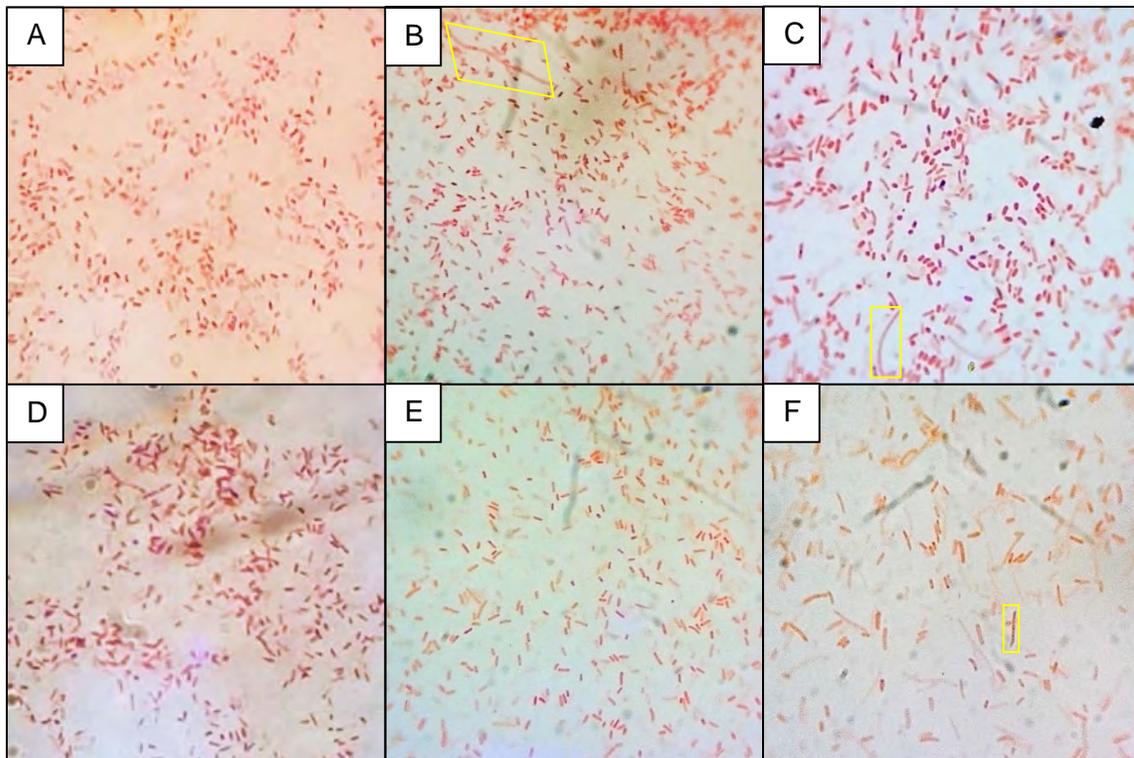


**Figura 22.** Árbol filogenético de las cepas transformantes y cepas relacionadas filogenéticamente a ellas obtenido por el método de Neighbor-Joining, el algoritmo de comparación de nucleótidos Jukes Cantor y un valor de bootstrap\* de 1000 réplicas. \*Solo se presentan los valor de bootstrap mayores a 80.

## 7.11. Comparación del fenotipo de las cepas parentales y transformantes.

### 7.11.1. Tinción de Gram.

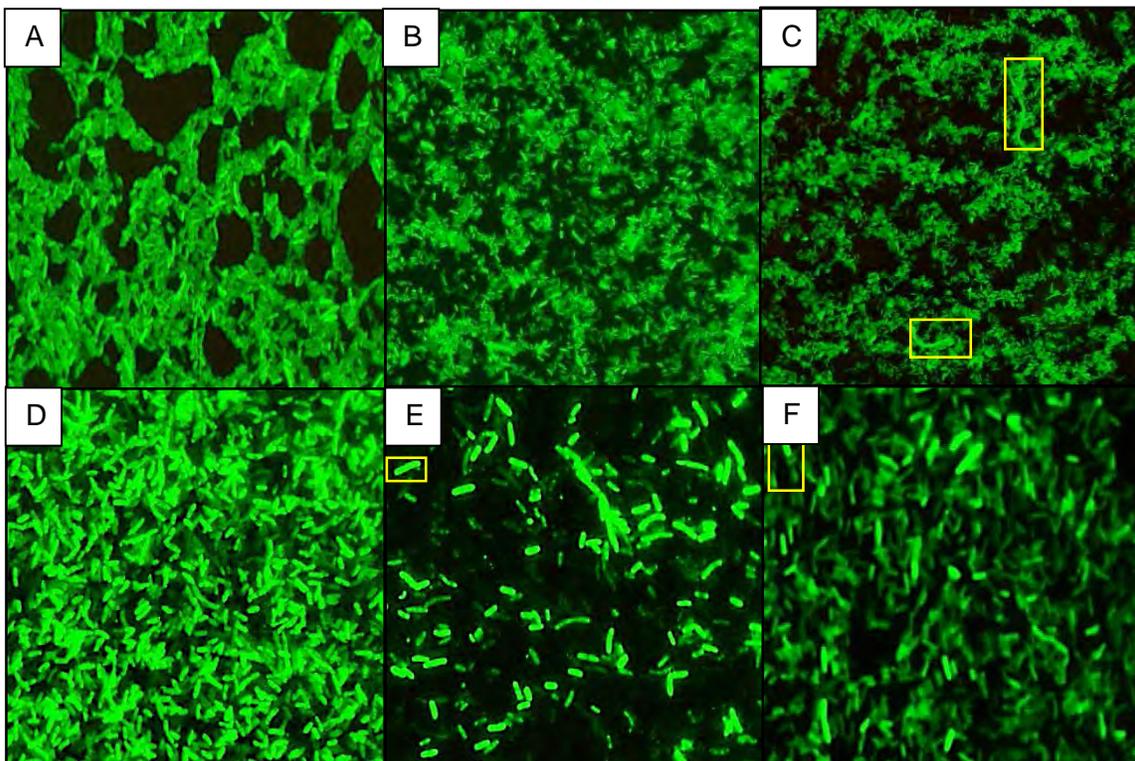
Al comparar las tinciones de Gram de las cepas de *E. coli* W3110 y *E. coli* TOP10 con sus respectivas cepas transformantes (Figura 23) se observó que en los dos casos, las bacterias eran Gram-negativas con morfología bacilar, sin embargo, en los frotis de *E. coli* W3110 *ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*, *E. coli* W3110 *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* y *E. coli* TOP10 *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* había unas pocas células con morfología filamentosa la cual se atribuye, al igual en el caso de la que cepa que contenía originalmente el plásmido pSUPERGLO-GFP, a la inactivación de algunos genes involucrados en la división celular debido a la presencia del plásmido en las células así como a la activación del sistema SOS (Silva *et al.*, 2012).



**Figura 23:** Tinción de Gram observada en el microscopio óptico de campo claro con el objetivo de 100X de las cepas parentales y transformantes incubadas en el agar correspondiente para cada una a 37°C/24 h. **A:** *E. coli* W3110; **B:** *E. coli* W3110 *ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*; **C:** *E. coli* W3110 *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*; **D:** *E. coli* TOP10; **E:** *E. coli* TOP10 *ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*; **F:** *E. coli* TOP10 *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*.

### 7.11.2. Microscopía de fluorescencia.

Los frotis fijos realizados pudieron ser observados en el microscopio de fluorescencia (Figura 24) gracias a que la proteína GFP no es excretada por la célula por lo que se queda en su citoplasma (Ferrer, 2008). Las cepas que contenían el plásmido pBABE-GFP presentaron una fluorescencia parecida la cual era de una menor intensidad a las cepas que contenían el plásmido pSUPERGLO-GFP debido a que en este último, el gen presente en este plásmido codifica para una variante de la proteína verde fluorescente llamada supergloGFP (sgGFP) la cual, es más soluble y plegable a 37 °C que la proteína silvestre lo que genera picos de excitación y emisión a 474 nm 509 nm (Flores-Ramírez *et al.*, 2007). Así mismo, en todos los frotis fijos se observó la característica morfología bacilar de las cepas, sin embargo, al igual que con la tinción de Gram realizada, existía la presencia de algunas células con morfología filamentosa.



**Figura 24:** Frotis fijo observado en el microscopio de fluorescencia con el objetivo de 100X de las cepas cultivadas en el agar correspondiente a 37°C/24 h. **A:** *S.Typhimuirum* PFV 430; **B:** *E. coli* W3110 *ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*; **C:** *E. coli* TOP10 *ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*; **D:** *E. coli* DH5α *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*; **E:** *E. coli* W3110 *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*; **F:** *E. coli* TOP10 *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*.

\*Fotos tomadas por Jesica Alejandra Ibarra Barrón.

### 7.11.3. Pruebas bioquímicas convencionales presuntivas.

El agar McConkey es un medio ampliamente utilizado para el aislamiento de bacilos Gram-negativos en el cual se pueden identificar a aquellas bacterias capaces de metabolizar la lactosa y resistir la presencia de sales biliares así como de cristal violeta. Las cepas de *E. coli* W3110 (Tabla 17, Figura 25 A1-A3), tanto parental como transformantes, fueron capaces de fermentar la lactosa presente en el medio generando un vire en el indicador de pH (rojo neutro) provocando así que las colonias tuvieran un color rosa con un halo al redor de ellas por la precipitación de las sales biliares debido al descenso del pH. Estos resultados son característicos de este microorganismo (MacFaddin, 2003). Las cepas parental y transformantes de *E. coli* TOP10 sembradas en este medio no generaron un vire en el indicador de pH por lo que las colonias formadas fueron incoloras y sin la presencia de algún halo alrededor de ellas (Tabla 17, Figura 25, B1-B3), a pesar de que este resultado no es típico para los microorganismos pertenecientes a este género y especie, hay que recordar que esta cepa es comercial y dentro de las mutaciones reportadas que presenta son la delección parcial del gen *lacZ* lo cual interrumpe la subunidad  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ -galactosidasa evitando así su funcionamiento (Thermo Fisher Scientific Inc, 2015).

Las pruebas IMViC se utilizan principalmente para la identificación de enterobacterias, los resultados obtenidos (Tabla 17, Figura 25) concuerdan con el perfil típico de *E. coli*, excepto el resultado de la prueba de indol de las cepas parental y transformantes de *E. coli* W3110 el cual, en todos los casos fue negativo, este resultado indica que pertenece al biotipo II (Jay *et al.*, 2005) y que no es capaz de separar el anillo indólico del L-triptófano. Las pruebas de rojo de metilo – Voges Proskauer indicaron que *E. coli* W3110 y *E. coli* TOP10 generan ácidos como productos finales de la metabolización de la glucosa; por último, en el agar citrato de Simmons no hubo ningún cambio de color en el medio lo cual indicó que ninguna de las cepas utilizadas es capaz de usar al citrato como única fuente de carbono ni las sales de amonio como fuente de nitrógeno (MacFaddin, 2003).

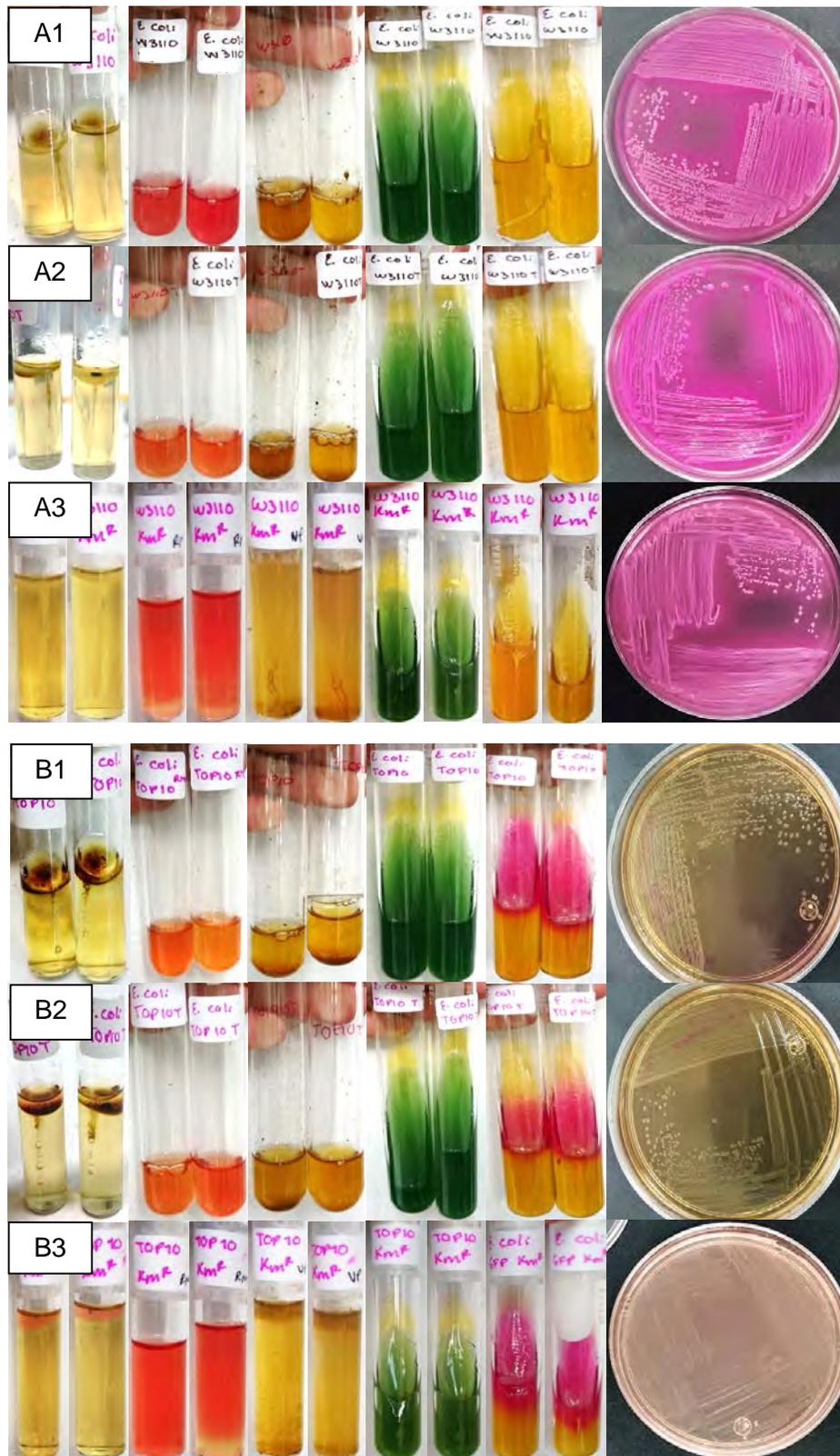
El último medio diferencial utilizado fue el agar Kligler (Tabla 17, Figura 25) en el cual se evaluó la capacidad de las cepas de fermentar glucosa y/o lactosa. Los resultados de las cepas *E. coli* W3110 concuerdan con lo descrito anteriormente ya que presentó un vire de color a amarillo en todo el tubo lo cual indicó que es capaz de fermentar glucosa y lactosa, en cambio, las cepas *E. coli* TOP10 solo presentaron un cambio de color en el fondo del tubo lo que indicó que solo es capaz de fermentar la glucosa (MacFaddin, 2003).

No se encontró diferencia alguna entre las cepas parentales y transformantes, esto es indicativo que la inserción del plásmidos en las bacterias no afectó el metabolismo evaluado en las pruebas bioquímicas convencionales descritas.

**Tabla 17.** Resultado de las pruebas bioquímicas convencionales presuntivas\* realizadas a la cepas parentales y transformantes de *E. coli* W3110 y *E. coli* TOP10

Prueba	Cepa	<i>E. coli</i> W3110	<i>E. coli</i> W3110 <i>ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>E. coli</i> W3110 <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>E. coli</i> TOP10	<i>E. coli</i> TOP10 <i>ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>E. coli</i> TOP10 <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>
Agar McConkey		Colonias rosas, circulares y con bordes ondulados.			Colonias incoloras, circulares y con bordes enteros.		
Indol		-	-	-	+	+	+
Rojo de metilo		+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer		-	-	-	-	-	-
Citrato		-	-	-	-	-	-
Agar Kligler							
Fermentación de glucosa		+	+	+	+	+	+
Fermentación de lactosa		+	+	+	-	-	-
Producción de gas		+	+	+	-	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S		-	-	-	-	-	-

\*Interpretación realizada después de incubarlas a 37 °C/ 24 h.



**Figura 25.** Resultado de las pruebas bioquímicas convencionales presuntivas de las cepas parentales y transformantes. De izquierda a derecha: Medio SIM, caldo RM, caldo VP, agar citrato de Simmons, agar Kligler y agar McConkey. **A1:** *E. coli* W3110; **A2:** *E. coli* W3110  $ap^R$   $gfp^+$ ; **A3:** *E. coli* W3110  $km^R$   $gfp^+$ ; **B1:** *E. coli* TOP10; **B2:** *E. coli* TOP10  $ap^R$   $gfp^+$ ; **B3:** *E. coli* TOP10  $km^R$   $gfp^+$ .

#### 7.11.4. Sistema API 20E®.

La identidad determinada de las cepas parentales y transformantes se muestran en la tabla 18. *E. coli* W3110 (parental y transformante) fue identificada con una buena calidad como un microorganismo perteneciente a este género y especie con un porcentaje de identificación del 89.8 % (Tabla 18). Las características fenotípicas evaluadas con este sistema concuerdan con los resultados obtenidos mediante las pruebas bioquímicas convencionales; a pesar de que con las pruebas bioquímicas miniaturizadas también se identificó a este microorganismo como indol negativo, la base de datos en la que se basa las tiras API 20E® identificaron a esta cepa como perteneciente al biotipo I ya que el perfil que presentó en el resto de las pruebas se asemeja más a este biotipo.

Las cepas de *E. coli* TOP10 fueron identificadas con una calidad muy buena como microorganismos pertenecientes a este género y especie con un porcentaje de identificación del 69.6 %. Al igual que con *E. coli* W3110, los resultados obtenidos con este sistema concuerdan con lo obtenido en las pruebas bioquímicas convencionales. Con esta cepa se obtuvo un porcentaje de identificación menor debido a que no cumple con el perfil típico registrado en la base de datos de las tiras API 20E® probablemente debido a las mutaciones que presenta, entre las cuales destaca su incapacidad de hidrolizar el ONPG (2-nitro-fenil- $\beta$ -D-galactopiranosido) y metabolizar la arabinosa (Thermo Fisher Scientific Inc, 2015).

Es importante destacar que en las 21 pruebas bioquímicas miniaturizadas contenidas en la tira, no se obtuvo ningún resultado diferente entre las cepas parentales y recombinantes (Tabla 19) indicando de nuevo que el plásmido no está afectando las características metabólicas evaluadas hasta ahora.

**Tabla 18.** Identidad de las cepas utilizadas (parentales y transformantes) de acuerdo con el sistema API 20E®.

Cepa	Identidad	Porcentaje de identificación	Calidad de identificación	Pruebas en contra
<i>E. coli</i> W3110	<i>E. coli</i> biotipo 1	89.8 %	Buena	IND 89 %
<i>E. coli</i> W3110 <i>ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>E. coli</i> biotipo 1	89.8 %	Buena	IND 89 %
<i>E. coli</i> W3110 <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>E. coli</i> biotipo 1	89.8 %	Buena	IND 89 %
<i>E. coli</i> TOP10	<i>E. coli</i> biotipo 1	69.6 %	Muy buena	ONPG 88 %, ARA 82 %
<i>E. coli</i> TOP10 <i>ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>E. coli</i> biotipo 1	69.6 %	Muy buena	ONPG 88 %, ARA 82 %
<i>E. coli</i> TOP10 <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>E. coli</i> biotipo 1	69.6 %	Muy buena	ONPG 88 %, ARA 82 %

IND= Indol; ONPG= β-galactosidasa; ARA= Fermentación/oxidación de arabinosa.



**Figura 26.** Resultado de las pruebas bioquímicas incluidas en el sistema API 20E® después de ser incubadas a 37 °C/24 h. **A1:** *E. coli* W3110; **A2:** *E. coli* W3110 *ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*; **A3:** *E. coli* W3110 *Km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*; **B1:** *E. coli* TOP10; **B2:** *E. coli* TOP10 *ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*; **B3:** *E. coli* TOP10 *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*.

**Tabla 19.** Resultado de las pruebas bioquímicas incluidas en las tiras API 20E® de las cepas parentales y transformantes de *E. coli* W3110 y *E. coli* TOP10.

Prueba	Reacción y/o enzima	<i>E. coli</i> típica*	<i>E. coli</i> W3110	<i>E. coli</i> W3110 <i>ap<sup>R</sup></i> <i>gfp<sup>+</sup></i>	<i>E. coli</i> W3110 <i>km<sup>R</sup></i> <i>gfp<sup>+</sup></i>	<i>E. coli</i> TOP10	<i>E. coli</i> TOP10 <i>ap<sup>R</sup></i> <i>gfp<sup>+</sup></i>	<i>E. coli</i> TOP10 <i>km<sup>R</sup></i> <i>gfp<sup>+</sup></i>
<b>ONPG</b>	B-galactosidasa	90 % (+)	+	+	+	-	-	-
<b>ADH</b>	Arginina dihidrolasa	-	-	-	-	-	-	-
<b>LDC</b>	Lisina descarboxilasa	26 % (-)	+	+	+	+	+	+
<b>ODC</b>	Ornitina descarboxilasa	30 % (-)	-	-	-	-	-	-
<b>CIT</b>	Uso de citrato	-	-	-	-	-	-	-
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Producción de H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-
<b>URE</b>	Ureasa	-	-	-	-	-	-	-
<b>TDA</b>	Triptófano desaminasa	-	-	-	-	-	-	-
<b>IND</b>	Producción de indol	90 % (+)	-	-	-	+	+	+
<b>VP</b>	Producción de acetoina	-	-	-	-	-	-	-
<b>GEL</b>	Gelatinasa	-	-	-	-	-	-	-
<b>GLU</b>	F / O de glucosa	+	+	+	+	+	+	+
<b>MAN</b>	F / O de manitol	+	+	+	+	+	+	+
<b>INO</b>	F / O de inositol	-	-	-	-	-	-	-
<b>SOR</b>	F / O de sorbitol	+	+	+	+	+	+	+
<b>RHA</b>	F / O de ramnosa	82 % (+)	+	+	+	+	+	+
<b>SAC</b>	F / O de sacarosa	64 % (-)	-	-	-	-	-	-
<b>MEL</b>	F / O de melibiosa	75 % (+)	+	+	+	+	+	+
<b>AMY</b>	F / O de amigdalina	-	-	-	-	-	-	-
<b>ARA</b>	F / O de arabinosa	+	+	+	+	-	-	-
<b>NO<sub>2</sub></b>	Producción de NO <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+
<b>N<sub>2</sub></b>	Producción de N <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-

\*Resultado reportados en la bibliografía (MacFaddin, 2003). F/O= Fermentación/Oxidación

### 7.11.5. Sistema VITEK 2®.

De acuerdo con los resultados obtenidos con este sistema (Tabla 20), las cepas parentales y transformantes de *E. coli* W3110 fueron identificadas como microorganismos pertenecientes a este género y especie con una probabilidad entre el 94 y 95 %. En la tabla 21 se muestran los resultados de algunas pruebas bioquímicas incluidas en la tarjeta para la identificación de Gram-negativos (solo aquellas que también se evaluaron con las tiras API 20E® y en las que hubo diferencia entre la cepa parental y recombinante), en la cual, se aprecia que *E. coli* W3110 y *E. coli* W3110 *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* obtuvieron los mismos resultados, sin embargo, existieron diferencias con *E. coli* W3110 *ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*. A pesar de estas diferencias, los resultados obtenidos para las 3 cepas concuerdan con las pruebas miniaturizadas así como con las pruebas convencionales presuntivas.

*E. coli* TOP10 fue identificada como *Escherichia coli* con una probabilidad del 96 %. Al comparar los resultados obtenidos de las cepas recombinantes, se identificaron algunas pruebas que no coincidían con el perfil de la cepa parental, lo cual, al igual que *E. coli* W3110 *ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>*, fue el resultado de cambios en el metabolismo de las cepas debido a que contienen un plásmido exógeno; se ha demostrado que dependiendo del tipo de plásmido que se introduzca al citoplasma de la bacteria este puede alterar diferentes características del metabolismo normal como son un mayor consumo de glucosa lo cual genera un descenso más rápido en el pH del medio, una desregulación (puede aumentar o disminuir la expresión dependiendo del tipo de plásmido y cepa) en la expresión de los genes involucrados en ciclo del ácido tricarboxílico, glucólisis, gluconeogénesis, transporte de carbono, síntesis de aminoácidos, entre otros (Silva *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2006). Cabe mencionar que estas diferencias también se pueden deber a que las cepas necesitaban un mayor tiempo de incubación ya que como se observó en la tabla 21, la mayoría de los resultados en los que hubo diferencia, las cepas parentales presentaron un resultado positivo mientras que las cepas transformantes presentaron un resultado negativo para la misma prueba. De acuerdo con Silva *et al.* (2012), las cepas recombinantes tienden a crecer más lento que las cepas parentales debido al

efecto del plásmido, el cual, provoca que la bacteria produzca metabolitos que naturalmente no produce lo que genera que los nutrientes que obtiene sean desviados para su producción.

A pesar de las diferencias en el perfil bioquímico de *E. coli* TOP10 *ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* con respecto a la cepa parental, fue identificada como un microorganismo perteneciente a este género y especie con una probabilidad del 95 %, sin embargo, *E. coli* TOP10 *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* fue identificada como *Burkholderia gladioli* con una probabilidad del 92 %, esta diferencia se debió a que, como se mencionó anteriormente, el plásmidos exógeno que tienen esta afectando su metabolismo y no cumplió con un perfil típico de *E. coli*.

Los resultados obtenidos de todas las cepas concuerdan con los resultados de las tiras API 20E<sup>®</sup> y las pruebas bioquímicas convencionales excepto en *E. coli* TOP10 *km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup>* en la cual, la prueba de la descarboxilación de la lisina obtuvo un resultado negativo probablemente a que esta cepa necesitaba un mayor tiempo de incubación (de acuerdo con el reporte obtenido, la tarjeta solo se incubó 7.5 h) para que el resultado pudiera ser detectado como positivo.

**Tabla 20.** Identidad de las cepas utilizadas (parentales y transformantes) de acuerdo con el sistema VITEK 2<sup>®</sup>.

Cepa	Identidad	Probabilidad (%)	Nivel de confianza	Perfiles típicos contradictorios
<i>E. coli</i> W3110	<i>Escherichia coli</i>	94	Identificación muy buena	AGAL y BGUR
<i>E. coli</i> W3110 <i>ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>Escherichia coli</i>	95	Identificación muy buena	dSOR y LDC
<i>E. coli</i> W3110 <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>Escherichia coli</i>	94	Identificación muy buena	AGAL y BGUR
<i>E. coli</i> TOP10	<i>Escherichia coli</i>	96	Identificación excelente	PHOS y BGUR
<i>E. coli</i> TOP10 <i>ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>Escherichia coli</i>	95	Identificación muy buena	AGAL, PHOS y BGUR
<i>E. coli</i> TOP10 <i>Km<sup>R</sup> GFP<sup>+</sup></i>	<i>Burkholderia gladioli</i>	93	Identificación muy buena	dMAL

AGAL=  $\alpha$ -galactosidasa; BGUR=  $\beta$ -glucuronidasa; dSOR= D-sorbitol; LDC= Lisina descarboxilasa; PHOS= Fosfatasa; dMAL= D-maltosa.

**Tabla 21.** Resultado de algunas de las pruebas bioquímicas contenidas en la tarjeta de Gram-negativos del sistema VITEK 2® de las cepas *E. coli* W3110 y *E. coli* TOP10 así como de las respectivas cepas transformantes.

Prueba	Reacción y/o enzima	<i>E. coli</i> W3110	<i>E. coli</i> W3110 <i>ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>E. coli</i> W3110 <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>E. coli</i> TOP10	<i>E. coli</i> TOP10 <i>ap<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>	<i>E. coli</i> TOP10 <i>km<sup>R</sup> gfp<sup>+</sup></i>
<b>BGAL</b>	β-galactosidasa	+	+	+	-	-	-
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Producción de H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-
<b>dGLU</b>	D-glucosa	+	+	+	+	+	+
<b>OFF</b>	Fermentación de glucosa	+	+	+	-	+	-
<b>dMAN</b>	D-manitol	+	+	+	+	+	+
<b>TyrA</b>	Tirosina arilamidosa	+	-	+	-	-	-
<b>URE</b>	Ureasa	-	-	-	-	-	-
<b>dSOR</b>	D-sorbitol	+	+	+	+	+	+
<b>SAC</b>	Sacarasa	-	-	-	-	-	-
<b>dTRE</b>	D-trealosa	+	+	+	+	+	-
<b>CIT</b>	Citrato de sodio	-	-	-	-	-	-
<b>ILATk</b>	L-lactato	+	-	+	+	-	-
<b>SUCT</b>	Succinato	+	-	+	+	-	+
<b>AGAL</b>	α-galactosidasa	-	-	-	+	-	-
<b>ODC</b>	Ornitina descarboxilasa	-	-	-	-	-	-
<b>LDC</b>	Lisina descarboxilasa	+	+	+	+	+	(-)
<b>O129R</b>	Resistencia a O/129	-	-	-	+	-	-
<b>ELLM</b>	ELLMAN	-	-	-	+	+	-

\*Se resaltan en azul los resultados que son distintos a la cepa parental.

## 8. CONCLUSIONES.

- Se corroboró la identidad fenotípica (sistema API 20E® y VITEK 2®) y genotípica (amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S) de *S. Typhimurium* PFV430 y *E. coli* DH5α km<sup>R</sup> *gfp*<sup>+</sup>, así mismo, dichas cepas se conservaron a largo plazo en ultracongelación.
- Se logró la electrotransformación de *E. coli* W3110 y *E. coli* TOP10 obteniendo así cuatro cepas recombinantes las cuales son: *E. coli* TOP10 *ap*<sup>R</sup> *gfp*<sup>+</sup>, *E. coli* TOP10 km<sup>R</sup> *gfp*<sup>+</sup>, *E. coli* W3110 *ap*<sup>R</sup> *gfp*<sup>+</sup> y *E. coli* W3110 km<sup>R</sup> *gfp*<sup>+</sup>.
- Las mejores eficiencias de electrotransformación se obtuvieron con la cepa *E. coli* TOP10 con una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.9 transformándola con el plásmido pSUPERGLO-GFP mediante el método de electroporación con un pulso eléctrico de 1.8 kV.
- La quimiotransformación presentó menores eficiencias de transformación al utilizar la cepa *E. coli* TOP10 y el plásmido pBABE-GFP.
- Se comparó el fenotipo (pruebas bioquímicas convencionales, sistema API 20E® y VITEK 2®) y genotipo (amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S) de las cepas parentales y transformantes encontrándose diferencias fenotípicas únicamente con el sistema VITEK 2®.

## 9. PERSPECTIVAS.

- Corroborar la identidad del gen *gfp* contenido en los plásmidos mediante su amplificación por PCR y secuenciación.
- Aumentar la eficiencia de electrotransformación de *E. coli* W3110 variando el voltaje aplicado, el tiempo del pulso eléctrico, la concentración de células iniciales y/o diferentes soluciones no iónicas como el polietilenglicol.
- Variar los parámetros utilizados en la quimiotransformación como la densidad óptica del cultivo así como el catión divalente y el choque térmico utilizado para la desestabilización de la membrana.

## 10. REFERENCIAS.

### 10.1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K., 1999. *Short protocols in molecular biology*. Cuarta edición. Michigan: Wiley.
2. Campos, I., 2010. *Aislamiento e identificación de bacterias lácticas del pulque con capacidad probiótica*. (Tesis de licenciatura). UNAM, Facultad de Química. Ciudad de México.
3. Cervantes, A., 2010. *Identificación de cepas de bacterias lácticas por criterios fenotípicos y análisis de secuencias del gen ADN ribosomal 16S*. (Tesis de licenciatura). UNAM, Facultad de Química. Ciudad de México.
4. Dragosits, M., Mattanovich, D., 2013. Adaptive laboratory evolution – Principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*, 12:64.
5. Dumancas, G., Hikkaduwa, R., Mojica, E., Murdianti, B. y Pham, P., 2014. Penicillins. *Encyclopedia of Toxicology*, Vol. 3, 768-772.
6. Dutta, C. y Sarkar, M., 2015. Horizontal gene transfer and bacterial diversity. **En:** Nelson, K., ed. *Encyclopedia of Metagenomics: Genes, Genomes and Metagenomes: Basics, Methods, Databases and Tools*. Boston: Springer, 251-257.
7. Eynard, N., Teissié, J., 2000. *Electrotransformation of bacteria*. Berlín: Springer-Verlag.
8. Ferrer, J., 2008. Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien, premios Nobel de Química 2008: "por el descubrimiento y desarrollo de la proteína verde fluorescente, GFP". *Real Sociedad Española de Química*, 104(4), 276–279.

9. Flores-Ramírez, G., Rivera, M., Morales Pablos., Osuna, J., Soberón, X. Y Gaytán, P., 2007. The effect of amino acid deletions and substitution in the longest loop of GFP. *BMC Chemical Biology*, 2007, 7:1.
10. Haddadin, F. y Harcum, S., 2005. Transcriptome profiles for high-cell-density recombinant and wild-type *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 90 (2), 127-153.
11. Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 557-580.
12. Hanahan, D., Jese, J. y Bloom, R., 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology*, 204, 63-113.
13. Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96, 23-28.
14. Janda, J. y Abbott, S., 2007. 16S ARNr Gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils and pitfalls: A minireview. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 45, No. 9, 2761-2764.
15. Jay, J., Loessner, M. y Golden, D., 2005. *Microbiología moderna de los alimentos*. Séptima edición. Zaragoza: Acribia.
16. Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P. y Claverys, J., 2014. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control: A review. *Nature Reviews: Microbiology*. 12, 181-196.
17. Kotnik, T., Frey, W., Sack, M., Haberl, S., Peterka, M. y Miklavcic, D., 2015. Electroporation-based applications in biotechnology: A review. *Trends in Biotechnology* (Vol. 33/No. 8), 480-488.
18. Lee, S., 2009. *Systems biology and biotechnology of Escherichia coli*. Países Bajos: Springer.

19. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A. y Scott, M., 2013. *Molecular cell biology*. Séptima edición. Nueva York: Macmillan.
20. MacFaddin, J., 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Tercera edición. Estados Unidos: Editorial Médica Panamericana S.A.
21. Madigan, M., Martinko, K., Dunlap, P. y Clark, D., 2009. *Brock. Biología de los microorganismos*. Doceava edición. Madrid: Pearson Educación.
22. Micklos, D., Freyer, G. y Crotty, D., 2003. *DNA science. A first course*. Segunda edición. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
23. Pincus, D., 2013. Microbial identification using the Biomérieux Vitek 2<sup>®</sup> system. **En:** Miller, M. *Encyclopedia of microbiological methods, volume 4*. Bethesda: PDA, 85-121.
24. Puc, M., Corovic S., Flisar, K., Petkovsek, M., Nastran, J. y Miklavcic, D., 2004. Techniques of signal generation required for electropermeabilization. Survey of electropermeabilization devices. *Biochemistry*, 64, 113-124.
25. Rakesh, S. y Schimke, R., 1996. Preparation of Electro-Competent E. coli Using Salt-Free Growth Medium. *Bio Techniques* Vol 20, no. 1 p 22-44.
26. Ramírez, R., Millán, B., Velázquez, O., Vierna, L., Mejía, A., Tsuzuki, G., Hernández, L., Müggenberg, I., Camacho, A., Urzúa, M., 2013. *Manual de prácticas de microbiología general*. Facultad de Química, Ciudad de México.
27. Rodríguez M., 2016. *Relación antigénica entre Shigella y E. coli enteroinvasiva de diferentes zonas geográficas y su caracterización por métodos genotípicos*. (Tesis de licenciatura). UNAM, Facultad de Química, Ciudad de México.

28. Sánchez, S., Greaves, N., Castellanos, L., Cervantes, A., López, M., Montiel, C., Parra, M., Gonzáles, L. y Sánchez, D. 2012. *Manual de prácticas de bioquímica experimental (0141)*. Facultad de Química, Ciudad de México.
29. Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. y D'Ari, R., 2007. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*, Vol. 189 no. 23 8746-8749.
30. Silva, F., Queiroz, J. y Domingues, F., 2012. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 30, 691-708.
31. Snyder, L., Peters, J., Henkin, T., Champness, W., 2013. *Molecular Genetics of Bacteria*. Cuarta edición. Washington, DC: ASM Press.
32. Taketo, A., Kuno, S., 1974. Sensitivity of *Escherichia coli* to viral nucleic acid: VII. Further studies on Ca<sup>2+</sup> induced competence. *The Journal of Biochemistry*. 75, 59-67.
33. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. y Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
34. Tropp, B., 2014. *Principles of molecular biology*. Burlington: Jones & Bartlett Learning.
35. Vee Aune, T. y Aachmann F., 2009. Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed: a mini-review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85 (2010), 1301-1313.
36. Vijayendran, C., Polen, T., Wendisch, V., Friehs, K., Niehaus, K. y Flaschel, E., 2006. The plasticity of global proteome and genome expression analyzed in closely related W3110 and MG1655 strains of a well-studied model organism, *Escherichia coli*-K12. *Journal of Biotechnology*. 128 (2007), 747-761.

37. Wang, Z., Xiang, L., Shao, J., Wegrzyn, A. y Wegrzyn, G., 2006. Effects of the presence of ColEI plasmid DNA in *Escherichia coli* on the host cell metabolism. *Microbial Cell Factories*, 5 (34), 1-18.
38. Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D. y Lane D., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 697-703.
39. Young, J., Dean, D., 2015. Electroporation-Mediated Gene Delivery, volumen 89. **En:** Huang, L., Liu, D., Wagner, E. *Advances in genetics*. Nueva York: Academic Press, 49-88.

## 10.2. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS.

1. Addgene. *pBABE G FP*. [En línea] (Actualizado el 23 de mayo del 2013). Disponible en: <https://www.addgene.org/10668/> [Último acceso 24/11/15].
2. Biomedal. Cepas *E. coli* [En línea] (Actualizado en 2013). Disponible en: <http://lifescience.biomedal.com/es/productos/vectores-de-clonacion-y-cepas/cepas-e-coli/> [último acceso 22/05/2016].
3. Cherry, J., Hong, E., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E., Christie, K., Costanzo, M., Dwight, S., Engel, S., Fisk, D., Hirschman, J., Hitz, B., Karra, K., Krieger, C., Miyasato, S., Nash, R., Park, J., Skrzypek, M., Simison, M., Weng, S y Wong, E., (2012) *Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast*. *Nucleic Acids Res.* Jan;40 (Database issue):D700-5. [PMID:22110037] [En línea] Disponible en <http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer> [Último acceso 18/08/2015].
4. Geospiza. 2006. FinchTV versión 1.4.0 [Software]. Seattle, USA. Disponible en [www.geospiza.com/ftvdinfo.html](http://www.geospiza.com/ftvdinfo.html).

5. NCBI. 2009. *BLAST*. [En línea] (Actualizado en octubre del 2009). Disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [Último acceso 22/5/16].
6. Protein Data Bank. 2014. *Crystal structure of green fluorescent protein*. [En línea] (Actualizado en abril del 2014). Disponible en: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4KW4> [Último acceso 6/2/16].
7. Protein Data Bank. 2014. [En línea] (Actualizado en abril del 2014). Disponible en: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> [Último acceso 27/7/16].
8. Thermo Fisher Scientific Inc. 2015. *Chemically Competent Cells*. [En línea] (Actualizado en el 2015). Disponible en: <http://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/chemically-competent.html> [Último acceso 24/9/15].
9. Thermo Fisher Scientific Inc. 2010. *Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers*. [En línea] (Actualizado el 2010). Disponible en: [https://www.cuny.edu/research/sr/undergrad-research/faculty/AREM/nanodrop\\_nucleicacid\\_olv\\_rev\\_3\\_11\\_r.pdf](https://www.cuny.edu/research/sr/undergrad-research/faculty/AREM/nanodrop_nucleicacid_olv_rev_3_11_r.pdf) [Último acceso 24/9/15].

## 11. ANEXOS.

### Anexo I: Composición de los medios elaborados por componentes:

- **Caldo luria:**

Tryptona (BD BIOXON®): 1 %  
Extracto de levadura (Merck Mikrobiologie®): 0.5 %  
NaCl: 0.5 %

- **Agar Luria:**

Tryptona (BD®): 1 %  
Extracto de levadura (Merck Mikrobiologie®): 0.5 %  
NaCl: 0.5 %  
Agar bacteriológico (DIBICO®): 2 %

- **Caldo YENB:**

Extracto de levadura (Merck Mikrobiologie®): 0.75 %  
Caldo nutritivo (BD BIOXON®): 0.80 %

- **Medio SOC:**

Tryptona (BD BIOXON®): 2 %  
Extracto de levadura (Merck Mikrobiologie®): 0.5 %  
NaCl: 0.058 %  
MgSO<sub>4</sub> anhidro: 0.12 %  
MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O: 0.2 %  
KCl: 1.25 mM  
Glucosa: 20 mM

- **Caldo RM-VP:**

Glucosa: 0.5 %  
Peptona de carne (BD BIOXON®): 0.5 %  
Fosfato dipotásico: 0.5 %

**Anexo II: Metodología para la extracción de ADN cromosomal con el kit UltraClean™ Microbial DNA isolation (MOBIO®).**

1. Se centrifugó a 10,000 rpm/1 min 1.8 mL de la suspensión saturada del microorganismos al que se le realizó la extracción de ADN cromosomal.
2. El pellet se resuspendió en 300 µL de la solución “MicroBead”, se mezcló con el vórtex y se transfirió todo el volumen al tubo “MicroBead”.
3. Se agregaron 50 µL de la solución “MD1” al mismo tubo y se mezcló en el vórtex a máxima velocidad por 10 minutos.
4. Se centrifugó a 10,000 rpm/30 s y el sobrenadante se transfirió al tubo “collection” de 2 mL.
5. Se añadieron 100 µL de la solución “MD2” al sobrenadante y se homogeneizó en el vórtex por 5 segundos. La solución se incubó a 4°C/5 min.
6. Se centrifugó a 10,000 rpm/1 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo “collection” de 2 mL.
7. Se agregaron 900 µL de la solución “MD3” y se mezcló en el vórtex durante 5 segundos.
8. Se transfirió 700 µL dentro del “Spin Filter” y se centrifugó a 10,000 rpm/ 30 s. Se descartó el sobrenadante, se repitió este paso con el resto del volumen de la solución anterior.
9. Se añadieron 300 µL de la solución “MD4”, se centrifugó a 10,000 rpm/30 s y se descartó el sobrenadante.
10. Se centrifugó de nuevo la solución a 10,000 rpm/1 min y se descartó el sobrenadante. El filtro de este tubo se transfirió a un tubo nuevo “collection” de 2 mL.
11. Se agregaron 50 µL de la solución “MD5” en el centro del filtro y se centrifugó a 10,000 rpm/30 s.
12. Se descartó el filtro y se almacenó la solución con ADN a -20°C.

**Anexo III: Metodología para la purificación de los amplicones obtenidos por PCR y plásmidos con el kit Pure Link™ PCR Purification (Invitrogen®).**

1. A los amplicones o plásmido obtenidos (50  $\mu$ L y 100  $\mu$ L respectivamente) se agregaron 200  $\mu$ L de la solución “Pure Link™ Binding Buffer” con isopropanol y se homogeneizaron.
2. Se colocó la columna “Pure Link™ Spin Column” dentro de un tubo de colección y se transfirió la mezcla anterior.
3. Se centrifugó a 10,000 rpm/min durante 1 minutos y desechó la solución que logró pasar por la columna.
4. Se añadieron 650  $\mu$ L de la solución “Wash Buffer” con etanol, se centrifugó bajo las mismas condiciones y se desechó la solución que logró pasar por la columna.
5. Se centrifugó a máxima velocidad de 2-3 minutos y la columna se colocó en el tubo “1.7 mL PureLink™ Elution Tube” nuevo.
6. El centro de la columna se colocaron 50  $\mu$ L de la solución “Elution Buffer” (10 mM Tris-HCl, pH 8.5).
7. La columna se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y posteriormente se centrifugó a máxima velocidad 2 minutos.
8. Se desechó la columna y el volumen obtenido se almacenó a -20 °C

**Anexo IV: Composición de los sustratos contenidos en las cúpulas de las tiras API 20E®.**

Abreviatura	Componente activo	QTE mg/cúpula	Reacciones / Enzimas	Resultado	
				Negativo	Positivo
<b>ONPG</b>	2-nitrofenil-β-D-galactopiranosido	0.223	β - galactosidasa	Incoloro	Amarillo
<b>ADH</b>	L-arginina	1.9	Arginina-dihidrolasa	Amarillo	Rojo / Anaranjado
<b>LDC</b>	L-lisina	1.9	Lisina descarboxilasa	Amarillo	Rojo / Anaranjado
<b>ODC</b>	L-ornitina	1.9	Ornitina descarboxilasa	Amarillo	Rojo / Anaranjado
<b>CIT</b>	Citrato trisódico	0.756	Uso de citrato como fuente de carbono	Verde pálido / Amarillo	Azul / Verde-azul
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Tiosulfato sódico	0.075	Producción de H <sub>2</sub> S	Incoloro / grisáceo	Precipitado negro
<b>URE</b>	Urea	0.76	Ureasa	Amarillo	Rojo /Anaranjado
<b>TDA</b>	L-triptófano	0.38	Triptófano desaminasa	Amarillo	Rojo / Anaranjado
<b>IND</b>	L-triptófano	0.19	Producción de indol	Incoloro / Verde pálido /amarillo	Rosa
<b>VP</b>	Piruvato sódico	1.9	Producción de acetoína	Incoloro / Rosa pálido	Rosa / Rojo
<b>GEL</b>	Gelatina (Origen bovino)	0.6	Gelatinasa	Sin difusión	Difusión de pigmento negro
<b>GLU</b>	D-glucosa	1.9	Fermentación / Oxidación de glucosa	Azul / Azul verdoso	Amarillo
<b>MAN</b>	D-manitol	1.9	Fermentación / Oxidación de manitol	Azul / Azul verdoso	Amarillo
<b>INO</b>	Inositol	1.9	Fermentación / Oxidación de inositol	Azul / Azul verdoso	Amarillo
<b>SOR</b>	D-sorbitol	1.9	Fermentación / Oxidación de sorbitol	Azul / Azul verdoso	Amarillo
<b>RHA</b>	L-ramnosa	1.9	Fermentación / Oxidación de ramnosa	Azul / Azul verdoso	Amarillo

Continuación Anexo V					
<b>SAC</b>	D-sacarosa	1.9	Fermentación / Oxidación de sacarosa	Azul / Azul verdoso	Amarillo
<b>MEL</b>	D-melobiosa	1.9	Fermentación / Oxidación de melobiosa	Azul / Azul verdoso	Amarillo
<b>AMY</b>	Amigdalina	0.57	Fermentación / Oxidación de amigdalina	Azul / Azul verdoso	Amarillo
<b>ARA</b>	L-arabinosa	1.9	Fermentación / Oxidación de arabinosa	Azul / Azul verdoso	Amarillo
<b>Reducción de nitratos</b>	Nitrato potásico	0.076	Producción de NO <sub>2</sub>	Amarillo	Rojo
			Reducción de N <sub>2</sub>	Naranja-rojo	Amarillo

**Anexo V: Composición de los sustratos contenidos en la tarjeta para la identificación de bacterias Gram-negativas del sistema VITEK 2®.**

Prueba	Reacción y/o enzima	Cantidad (mg)
<b>APPA</b>	Alanina-fenilalanina-arilamidasa	0.0384
<b>ADO</b>	Adonitol	0.1875
<b>PyrA</b>	L-pirrolidoniil-arilamidasa	0.018
<b>IARL</b>	L-arabitol	0.3
<b>dCEL</b>	D-celobiosa	0.3
<b>BGAL</b>	β-galactosidasa	0.36
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Producción de H <sub>2</sub> S	0.0024
<b>BNAG</b>	β-N-acetil-glucosamina	0.0408
<b>AGLTp</b>	Glutaminil arilamina pNA	0.0324
<b>dGLU</b>	D-glucosa	0.3
<b>GGT</b>	γ-glutamyl-transferasa	0.0228
<b>OFF</b>	Fermentación de glucosa	0.45
<b>BGLU</b>	β-glucosidasa	0.036
<b>dMAL</b>	D-maltosa	0.3
<b>dMAN</b>	D-manitol	0.1875
<b>dMNE</b>	D-manosa	0.3
<b>BXYL</b>	β-xilosa	0.0324
<b>BAIap</b>	β-alanina arilamidasa pNA	0.0174
<b>ProA</b>	L-prolina arilamidasa	0.023
<b>LIP</b>	Lipasa	0.0192
<b>PLE</b>	Palatinosa	0.3
<b>TyrA</b>	Tirosina arilamidosa	0.0276
<b>URE</b>	Ureasa	0.15
<b>dSOR</b>	D-sorbitol	0.1875

<b>Continuación Anexo VI</b>		
<b>SAC</b>	Sacarasa	0.3
<b>dTAG</b>	D-tagatosa	0.3
<b>dTRE</b>	D-trealosa	0.3
<b>CIT</b>	Citrato de sodio	0.054
<b>MNT</b>	Malonato	0.15
<b>5KG</b>	5-ceto-D-gluconato	0.3
<b>ILATk</b>	L-lactato	0.15
<b>AGLU</b>	$\alpha$ -glucosidasa	0.036
<b>SUCT</b>	Succinato	0.15
<b>NAGA</b>	$\beta$ -N-acetil-galactosamidasa	0.0306
<b>AGAL</b>	$\alpha$ -galactosidasa	0.036
<b>PHOS</b>	Fosfatasa	0.0504
<b>GlyA</b>	Glicina aralamidasa	0.012
<b>ODC</b>	Ornitina descarboxilasa	0.3
<b>LDC</b>	Lisina descarboxilasa	0.15
<b>IHISa</b>	Asimilación de L-Histidina	0.087
<b>CMT</b>	Cumarato	0.126
<b>BGUR</b>	$\beta$ -glucoronidasa	0.0378
<b>O129R</b>	Resistencia a O/129	0.0105
<b>GGAA</b>	Glu-Gly-Arg-Arilamidasa	0.0576
<b>IMLTa</b>	Asimilación de L-malato	0.042
<b>ELLM</b>	ELLMAN	0.03
<b>ILATa</b>	Asimilación de L-lactato	0.186