



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

CLONACIÓN DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DEL SECTOR F1  
DE LA ATP SINTASA DE *Staphylococcus aureus*

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

IRVING RETEGUIN CATALÁN

DIRECTOR DE TESIS

DR. CHRISTIAN AXEL LUVIANO JARDÓN

ASESORES

DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ

QFB. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO



CIUDAD DE MÉXICO

Marzo 2024



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.



La presente tesis fue realizada en el Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Christian Axel Luviano Jardón y la asesoría del Dr. Enrique García Hernández y el QFB. Oscar González Moreno. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través de los proyectos PAPIIT IN206221, IN209624. Se agradece el apoyo de la Dra. Patricia Cano Sánchez del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Química de la UNAM.



## Dedicatorias

### ***A las personas más importantes en mi vida...***

A mis abuelos, Ángela y Pablo.

A mi mamá, Perla.

Las palabras no serán suficientes para agradecer todo el apoyo que me han brindado, gracias por la enseñanzas y sobre todo por su amor incondicional.

### ***A mis hermanos....***

Xochitl, Gabino y Omar, que juntos somos “Los Super conocidos”.

### ***A los Francis...***

Erick (mi primer amor), Aldha, Hiram, Axel y Juan, a quienes agradezco su amistad, todas las risas, los juegos, las bromas, las pequeñas fiestas, el futbolito. Encontrar a personas tan increíbles es difícil y yo tuve mucha suerte. Los quiero mucho, definitivamente la universidad y la vida foranea no hubiera sido igual sin ustedes.

A **Karen**, la mejor comadre, confidente etcétera de la universidad, nunca olvidaré cuando te equivocaste de laboratorio.

A la mejor amiga, **Ingrid**, coincidir con ella en la preparatoria fue genial. Diez años de conocernos y aunque tomamos caminos un poco distintos y la vida nos ha distanciado un poco, siempre la llevaré en mi corazón.

### ***Al team HGM...***

A la tilin Essly, por las platicas después de su turno y ser una excelente roomie, a Paco, por surtirme propofol a las dos de la mañana, a Su y José, los etiquetadores más rápidos del condado.

A **Spider Man**, no importa cuantas veces la vida lo tire, él siempre se levanta.

## **Agradecimientos**

Al **Dr. Axel Luviano**, no solo por ser un gran tutor, también por ser un gran roomie y amigo. Gracias por motivarme a estudiar un posgrado para seguir con algunas anécdotas más.

Al **Dr. Enrique García** por permitirme ser parte de su grupo de investigación.

A la **M. en C. Melisa** y al futuro **Dr. Gustavo** por su apoyo durante mi estancia en el Instituto de Química, alguien tiene que hacer ciencia en este país.

*Lo más importante es siempre creer en uno mismo, pero una pequeña ayuda de los demás es una gran bendición. -Tío Iroh*

*Vas a ir a casa Francis... Francis? -Aldhair*

*Tres punto y cachorro. -Hiram*

*Los buenos tiempos se convierten en buenos recuerdos, pero los malos tiempos se convierten en buenas lecciones. -Tío Iroh*

*Los mal aventurados no lloran. -Ingrid*

*No toda luz es un regalo, ni toda oscuridad una calamidad. -Axel Doc*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	2
1.1 Generalidades estructurales de la ATP sintasa.....	2
1.2 Clonación bacteriana .....	5
1.3 Reacción en cadena de la polimerasa <i>in vitro</i> .....	11
1.4 Resistencia antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	15
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	18
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	18
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos específicos.....	18
<b>5. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	19
5.1 Soluciones y reactivos .....	19
5.2 Enzimas de restricción.....	20
5.3 Purificación de DNA.....	20
5.4 Cuantificación de DNA.....	21
5.5 Transformación de bacterias por choque térmico .....	21
5.6 Electroforesis en gel de agarosa al 1% .....	21
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	22
6.1 Objetivo: Replicar, purificar y digerir el vector de expresión pET-28 c.....	22
6.2 Objetivo: Amplificar mediante PCR, purificar y digerir el fragmento de 4800 pb que codifica para las subunidades del sector F1 de la ATP sintasa de <i>S. aureus</i> . .....	25
6.3 Clonación del gen F1Sa en el vector pET-28 c .....	31
6.4 Objetivo: Comprobar la construcción del plásmido mediante dobles digestiones.....	34
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	40
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	40
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	41

## RESUMEN

La aparición de la resistencia a los antibióticos ha provocado que se busquen nuevas dianas farmacológicas con el fin de desarrollar fármacos contra bacterias de interés médico. Una de estas bacterias es *Staphylococcus aureus*, uno de los principales patógenos para el ser humano. Ha surgido interés por estudiar la ATP sintasa en *S. aureus* debido a que el sector F1 de la enzima difiere al compararlo con el sector F1 de la misma enzima en humanos.

Para lograr la purificación del sector F1 de la ATP sintasa de *S. aureus* y su posterior caracterización bioquímica, primero fue necesario realizar la clonación del gen que codifica para tal sector de la ATP sintasa. Para ello fue necesario aplicar técnicas de biología molecular. En primer lugar, se realizó la doble digestión del vector de clonación pET-28 c con las enzimas de restricción BamHI y NcoI, creando así un sitio de inserción para introducir el gen que codifica para el sector F1 de la ATP sintasa de *S. aureus*.

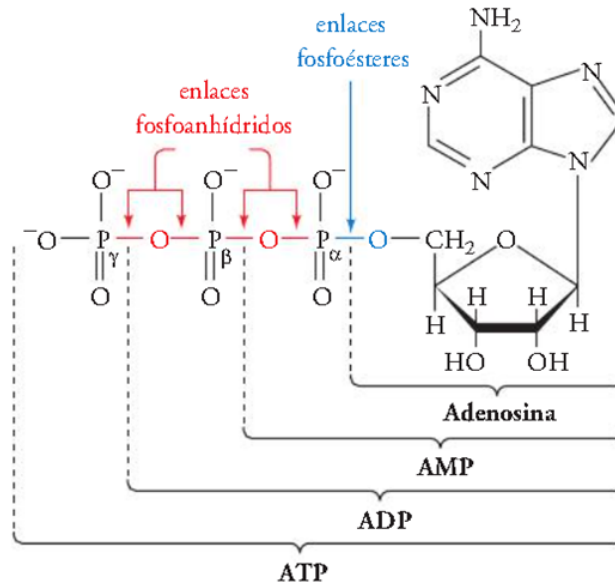
Tanto el vector pET-28 c como el gen de interés, fueron purificados y cuantificados, obteniendo una concentración de 6 ng/μL y 35.2 ng/μL respectivamente. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de ligación utilizando la enzima T4 DNA ligasa, probando diferentes relaciones molares de inserto y vector. A partir de estas reacciones de ligación fueron transformadas células competentes de *Escherichia coli DH5α*, para lograr recuperar el plásmido recombinante. Finalmente, se verificó la construcción del plásmido recombinante mediante un mapeo de restricción utilizando diferentes pares de enzimas de restricción.



# 1. MARCO TEÓRICO

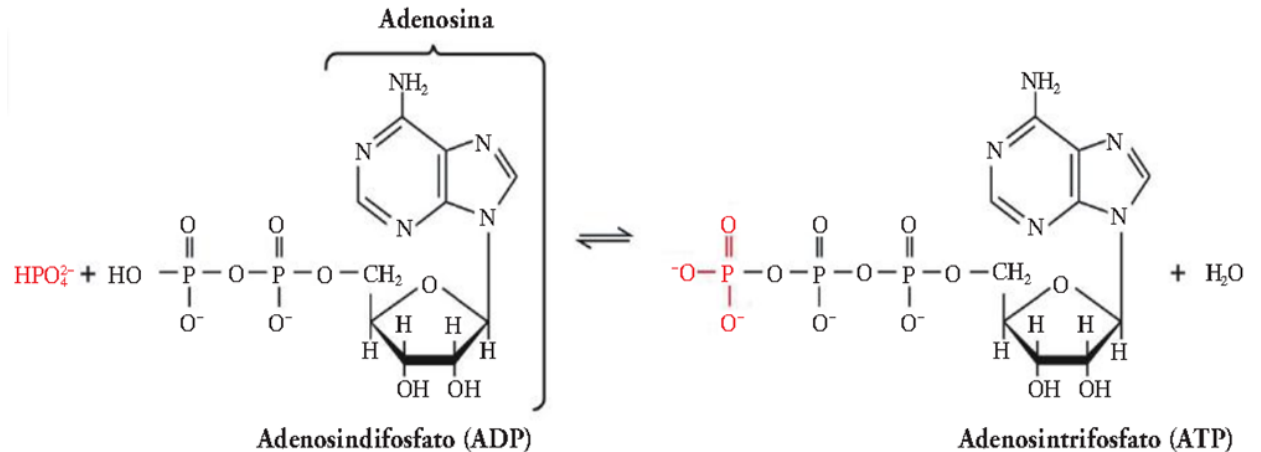
## 1.1 Generalidades estructurales de la ATP sintasa

La molécula de adenosín trifosfato (ATP) es la moneda energética universal de las células. El ATP es un nucleótido conformado por adenina unida a ribosa (adenosina) y por tres grupos fosforilo ( $-\text{PO}_3^{2-}$ ) unidos secuencialmente mediante un enlace fosfodiéster, seguido por dos enlaces fosfoanhídridos (**Figura 1**).<sup>1,2</sup>



**Figura 1.** Estructura de la molécula de ATP. En color azul se encuentra el enlace fosfoéster y en color rojo los dos enlaces fosfoanhídridos. Se muestra la relación que hay con el adenosín difosfato (ADP), el adenosín monofosfato (AMP) y la adenosina. Figura tomada de Voet D et al., 2016.

El ATP y su importancia biológica radica en la energía que es liberada tras la ruptura de uno de sus dos enlaces fosfoanhídridos, la cual es acoplada a otros procesos que la necesitan, como la biosíntesis de DNA, RNA, proteínas o la motilidad.<sup>1,3</sup> La liberación de energía ocurre cuando un grupo fosfato es liberado o transferido a otro compuesto, produciendo ADP o, cuando se transfiere AMP, pirofosfato ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ) (**Figura 2**). En el caso de la molécula de ATP, la hidrólisis hacia ADP y fosfato inorgánico, en condiciones estándar, genera 30.5 kJ/mol (7.3kcal/mol).<sup>2,3,4</sup>



**Figura 2. Esquema de la síntesis e hidrólisis de ATP. Figura tomada de Voet D et al., 2016.**

Para mantener el ciclo energético en la célula, continuamente debe regenerarse el ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. La mayor parte de la síntesis de ATP, bajo condiciones aerobias, es realizada por la ATP sintasa, un complejo enzimático encargado de proporcionar a la célula la energía requerida para realizar todos sus procesos vitales, catalizando la unión de ADP y fosfato. Este complejo también es capaz de llevar a cabo la hidrólisis del ATP, por lo que también se denomina ATPasa.<sup>4,5</sup>

Con un diámetro y peso molecular aproximadamente de 10 nm y 530 kDa, respectivamente, la F1F0 ATP sintasa es uno de los nanomotores biológicos más pequeños y se localiza en la membrana plasmática de las bacterias, la membrana tilacoidal de los cloroplastos y la membrana interna de las mitocondrias, responsable de la producción de energía celular que se produce por oxidación o fosforilación.<sup>6,7</sup>

La F1F0 ATP sintasa está altamente conservada y es estructuralmente similar en todas las especies. Se puede decir que el nanomotor está conformado a su vez por dos motores, los cuales están definidos por su polaridad.<sup>1,6</sup> El motor F1 o sector F1, es un complejo proteico soluble en agua, que en su forma más simple como en *Escherichia coli*, lo integran las subunidades  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ . Su función es catalizar la síntesis o hidrólisis de ATP mediante un mecanismo rotatorio. El motor F0 o sector F0, se encuentra integrado a la membrana, y en su forma bacteriana más simple tiene la composición de subunidades  $ab_2c_{10-15}$ .**(Figura 3)**.<sup>1,5</sup>

Para la formación de ATP, el complejo enzimático utiliza la energía proveniente de la formación de un gradiente electroquímico compuesto de iones  $H^+$  o  $Na^+$  que son bombeados desde el compartimento contrario de donde se encuentra el sector F1. La ATP sintasa utiliza el movimiento de los iones a través de la membrana, acción realizada por el sector F0, a medida que fluye a favor del gradiente electroquímico, para impulsar la síntesis de ATP, tarea realizada por el sector F1. Por el contrario, las enzimas que actúan como bombas activas de  $H^+$  o de  $Na^+$  deben operar junto con la ATP sintasa para repolarizar la membrana.<sup>1,5</sup>

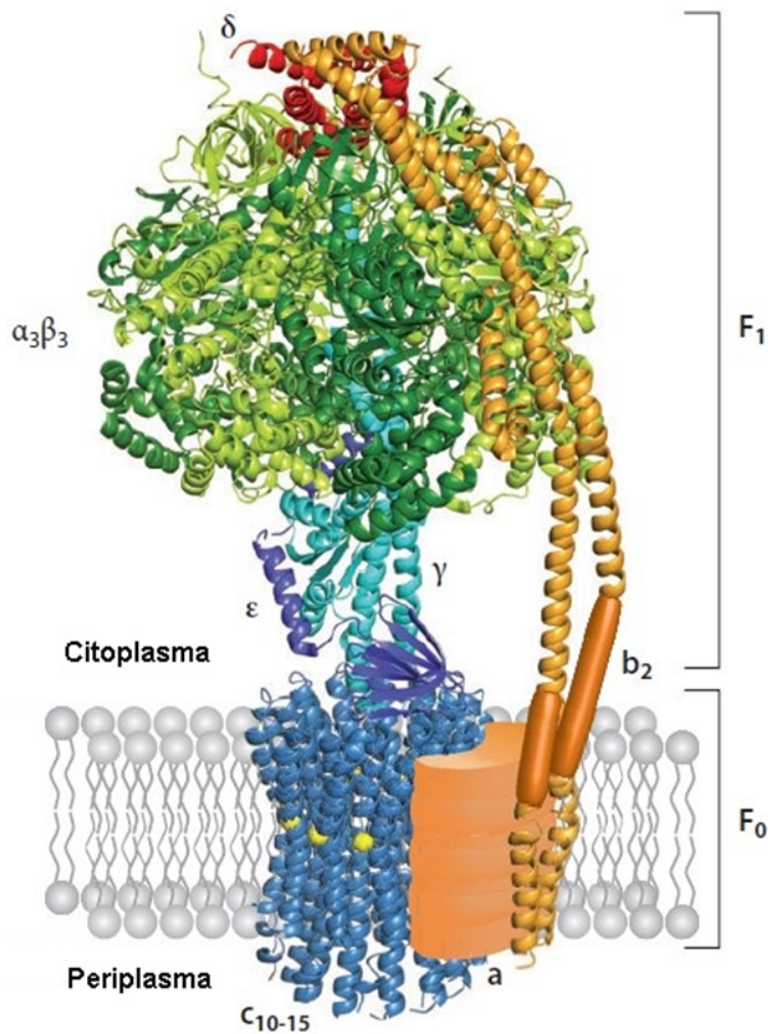
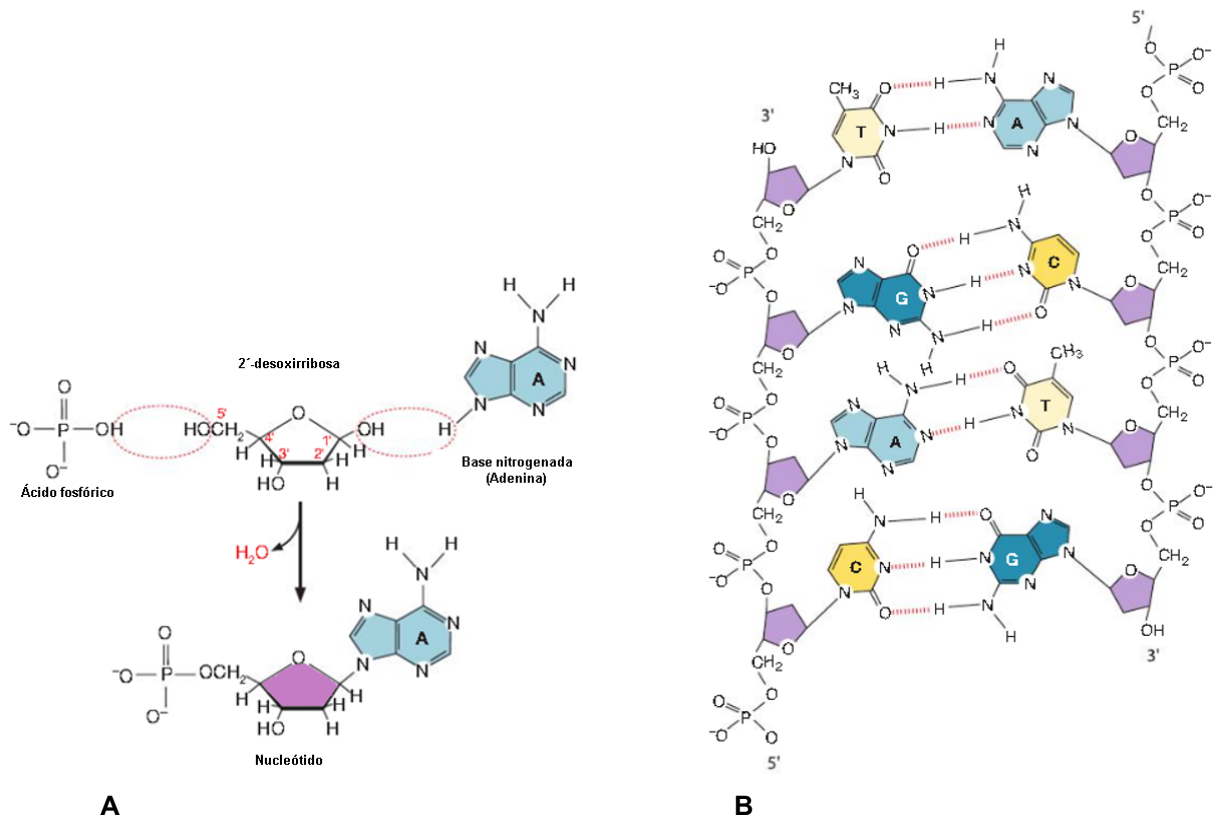


Figura 3. Estructura de la ATP sintasa. Se muestran los dos sectores, F1, compuesto por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que forman un hetero hexámero, las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$  forman el tallo central y la subunidad  $\delta$  interactúa con las subunidades b; F0, compuesto principalmente por la subunidad c, un oligómero que forma un cilindro hueco, al que se le une la subunidad a y se ancla al rotor  $\gamma\delta\epsilon$  gracias a la subunidad b. Figura adaptada de Ballmoos *et al.*, 2009.<sup>1,8</sup>

La estructura de rayos X reveló tres sitios catalíticos en las interfases de  $\alpha$  y  $\beta$ , que presentan asimetría por diferente ocupación de nucleótidos, dos sitios contienen ATP o ADP y un sitio está vacío. En la síntesis de ATP, la subunidad  $\gamma$  gira en el sentido de las manecillas del reloj, impulsada por el gradiente electroquímico, mientras que en la hidrólisis de ATP la rotación de la subunidad  $\gamma$  va en antisentido de las manecillas del reloj.<sup>5,6</sup>

## 1.2 Clonación bacteriana

La unidad funcional de todas las formas de vida son las células. Los organismos simples como bacterias se encuentran como células individuales, mientras en organismos como plantas y animales están conformados por diversos tipos de células altamente organizadas con funciones específicas.<sup>9</sup> Dentro de cada célula se encuentran un tipo de ácidos nucleicos, llamado ácido desoxirribonucleico (DNA), que constituyen el material genético que permite el almacenamiento y expresión de información genética.<sup>10</sup> La unidad fundamental del DNA es el nucleótido, al cual lo constituye; un grupo fosfato, el monosacárido 2-desoxirribosa y una base nitrogenada, que puede ser una purina (adenina o guanina) o una pirimidina (timina o citosina). La molécula de DNA la integran dos cadenas complementarias de polinucleótidos formando una doble hélice enrolladas sobre un eje central (**Figura 4**).<sup>11,12</sup>



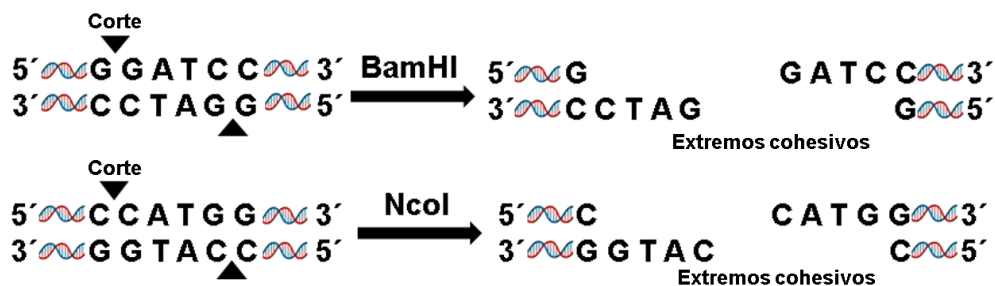
**Figura 4. Estructura del DNA. A. Representa la formación del nucleótido con la base nitrogenada adenina. B Muestra el apareamiento entre las purinas (azul) y pirimidinas (amarillas) a través de puentes de hidrógeno. Los nucleótidos forman la cadena mediante el enlace fosfodiéster, que se produce tras la unión del hidroxilo 3' del monosacárido y el fosfato que se adhiere al hidroxilo 5' del siguiente nucleótido. Figura tomada de Watson JD *et al.*, 2016.<sup>12,13</sup>**

La información contenida en el DNA permite la síntesis de proteínas exclusivas de una célula a través de los procesos de transcripción y traducción. Una molécula de DNA contiene numerosos segmentos con la información necesaria para su expresión, cada uno de estos segmentos es denominado gen, que es la unidad funcional del DNA.<sup>9</sup> La síntesis proteica es altamente regulada y muchos de estos reguladores también son proteínas, que a su vez están codificadas por un conjunto de genes. Tomando en cuenta lo anterior, un gen incluye la secuencia que codifica para la proteína, así como las secuencias que están involucradas en la función regulatoria del proceso.<sup>9,11</sup>

Hasta hace algunos años, el análisis del DNA era difícil debido al gran tamaño de la molécula. De la misma forma, el análisis molecular de las proteínas era sumamente

complicado debido a la escasez y la dificultad para purificar una cantidad suficiente de proteína.<sup>10,14</sup> Gracias al descubrimiento de las enzimas de restricción, fue posible seccionar grandes moléculas de DNA para posteriormente producir y analizar por separado cada fragmento.

Las enzimas de restricción tienen la capacidad de cortar los enlaces fosfodiéster (fosfodiesterasas) de la cadena polinucleótida de los ácidos nucleicos en regiones específicas. Estas secuencias de reconocimiento en la molécula de DNA se denominan sitios de restricción.<sup>9,11</sup> Encontramos aproximadamente 100 enzimas de restricción, cada una de ellas reconoce secuencias específicas de entre 4 a 8 pares de bases.<sup>9,14</sup> Se pueden distinguir de acuerdo al corte que realicen en el DNA, por ejemplo, enzimas como BamHI que proviene de *Bacillus amyloliquefaciens* H<sup>15</sup> y NcoI proveniente de *Nocardia corallina*<sup>16</sup> cortan las hebras de DNA en diferentes sitios obteniendo fragmentos con extremos cohesivos, como se observa en la **Figura 5**; algunas otras enzimas como SmaI, extraída de *Serratia marcescens*<sup>17</sup> y SspI extraída de *Sphaerotilus species*<sup>18</sup> cortan ambas hebras de la molécula de DNA en un mismo eje dando como resultado fragmentos con extremos romos como muestra la **Figura 6**.



**Figura 5.** Las enzimas BamHI y NcoI cortan la doble cadena de DNA en nucleótidos ubicados en diferente posición respecto al eje de simetría del sitio de restricción, generan extremos monocatenarios lo que facilita la interacción con otro fragmento monocatenario de secuencia complementaria dando como resultado la unión de diferentes fragmentos de DNA cortados con la misma enzima.

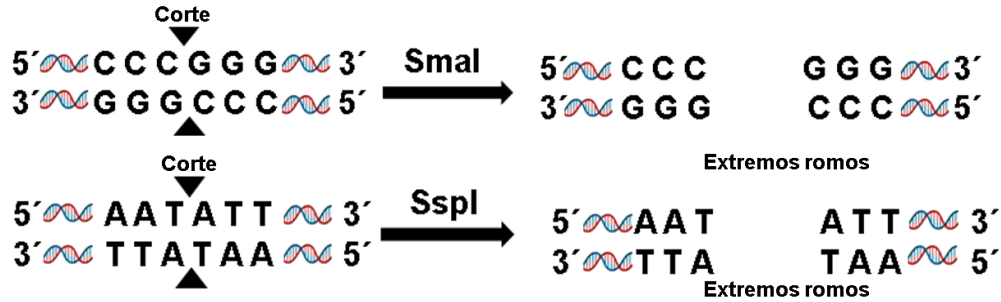
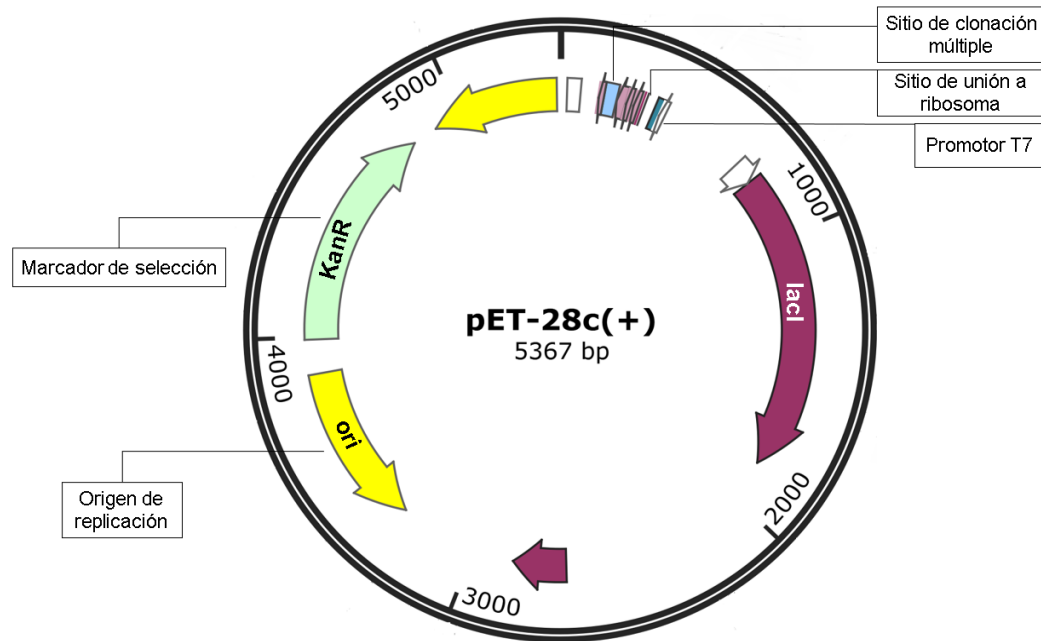


Figura 6. SmaI y SspI son enzimas de restricción, que a diferencia de BamHI y NcoI, cortan la doble cadena de DNA en el mismo eje, generando con ello extremos de doble cadena, por lo que la unión entre fragmentos de este tipo es más inespecífica.

Cortar una secuencia de DNA con enzimas de restricción permite el aislamiento de un fragmento específico. Tal fragmento puede ser ligado en un vector de clonaje, una molécula de DNA cuya replicación es autónoma e independiente dentro de una célula. Dentro de los vectores más utilizados se encuentran los plásmidos (**Figura 7**). Estas secuencias de doble cadena tienen su origen en el DNA circular extracromosómico que se encuentra de manera natural en bacterias.<sup>10</sup> En la actualidad se pueden obtener comercialmente vectores de este tipo.<sup>19</sup> Los plásmidos poseen una serie de elementos estructurales necesarios para realizar la clonación molecular. Deben ser capaces de replicarse dentro de la célula anfitriona, ya que en su secuencia poseen un origen de replicación que se une a la DNA polimerasa de la célula y el vector es replicado en cada división celular. Poseer marcadores de selección, generalmente un gen de resistencia a un antibiótico o que genera un fenotipo con el que se pueden diferenciar las células que incorporan el vector. También debe contener un sitio de clonación múltiple, que es una secuencia de DNA con sitios de reconocimiento para diversas enzimas de restricción.<sup>10,11</sup> Los plásmidos utilizados en la expresión de proteínas contienen, además de los elementos ya mencionados, una secuencia promotora a la cual se le une el ARN polimerasa de la célula anfitriona. Finalmente, otro factor importante dentro del vector para expresión es el sitio de unión a ribosoma para facilitar la traducción del RNA mensajero.<sup>10</sup>



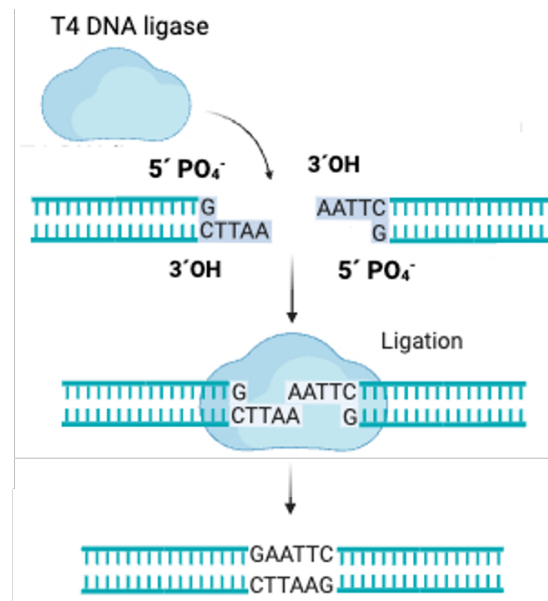
**Figura 7. Mapa del vector pET-28 c (+) utilizado para la expresión de proteínas recombinantes en bacterias. Contiene elementos comunes de un plásmido como el origen de replicación, el marcador de selección que confiere resistencia a kanamicina, el sitio de clonación múltiple, el cual contiene secuencias que son reconocidas por enzimas de restricción, además del promotor T7/lac integrado por el promotor del bacteriófago T7 y el operador de lac, y el sitio de unión a ribosoma que facilita la traducción del RNA mensajero. Figura obtenida de SnapGene.<sup>20</sup>**

La unión del fragmento de DNA (DNA exógeno) con el vector forma DNA recombinante que puede ser replicado de forma independiente cuando es introducido en un organismo hospedero, generando organismos con aspectos genéticos idénticos.<sup>12</sup> El proceso mencionado anteriormente es conocido como clonación del DNA o clonación molecular. Para llevar a cabo la técnica de clonación, es necesario preparar el vector de clonaje para que pueda incorporar el inserto de DNA, por tal motivo es necesario crear un sitio de inserción mediante enzimas de restricción. De igual forma el fragmento de DNA que será introducido en el vector debe ser tratado con las enzimas de restricción necesarias para favorecer la unión. Con ayuda de esta técnica molecular se puede obtener un gran número de copias de un gen o puede servir como paso previo para la expresión y purificación de proteínas.<sup>12</sup>

La unión del DNA exógeno con el vector se lleva a cabo gracias a enzimas denominadas ligasas, como la T4 DNA ligasa, que catalizan la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 5´fosfato y 3´hidroxilo en el DNA o RNA, a expensas de la hidrólisis de ATP (**Figura 8**). Las ligasas actúan con mayor eficacia en extremos



cohesivos, sin embargo, también actúa con menor porcentaje de efectividad en la ligación de extremos romos.<sup>9</sup>



**Figura 8. Representación de una ligación de dos segmentos de DNA por la T4 DNA ligasa. Figura creada en BioRender.**

La mezcla de la ligación puede usarse directamente para transformar células de organismos como bacterias, levaduras, hongos filamentosos y algunas algas unicelulares, capaces de brindar su maquinaria enzimática para producir, ya sea una secuencia de DNA, ARN o una proteína. *E. coli* es el microorganismo anfitrión más utilizado para la introducción de DNA recombinante debido a sus ventajas respecto a otros hospederos, como una cinética de crecimiento rápida, con un tiempo de duplicación aproximado de 20 minutos, se pueden lograr cultivos de alta densidad con facilidad, los medios para su crecimiento son económicos y disponibles y sobre todo el conocimiento sobre su fisiología.<sup>21,22</sup>

El proceso de introducir DNA recombinante en el microorganismo que facilitará su replicación, es llamado transformación, y puede llevarse a cabo por diversos métodos, dependiendo el tipo de microorganismo involucrado y el objetivo de la clonación.<sup>9</sup> Los métodos más comunes son la transformación química que consiste en tratar a las células previamente con una solución hipotónica de CaCl<sub>2</sub>, tras la incubación con CaCl<sub>2</sub> las células son llamadas competentes, las cuales pueden incorporar

moléculas de DNA con mayor facilidad.<sup>10</sup> Posteriormente las células competentes se someten a choque térmico lo que incrementa la permeabilidad de la membrana y aumenta la probabilidad de la introducción del DNA. La eficiencia de este método es de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$  células transformadas por microgramo de la molécula de DNA.<sup>10,12</sup> Otro de los métodos comunes es la transformación por electroporación, en este proceso las células son sometidas a breves pulsos eléctricos mayores de 1500 v/5ms, lo que provoca la desestabilización temporal localizada y ruptura de la membrana celular, siendo permeable a la entrada de moléculas de DNA. La eficiencia de este método es de  $1 \times 10^8$  células transformadas por microgramo de molécula de DNA.<sup>10</sup> De este modo, cuando las células que incorporaron el DNA se replican, también replica la molécula de DNA recombinante, que permitirá la expresión de una cantidad suficiente de proteína recombinante para su purificación y análisis.

### **1.3 Reacción en cadena de la polimerasa *in vitro***

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método que amplifica de manera rápida una secuencia de DNA genómico o complementario. Esto se logra mediante la actividad de la enzima DNA polimerasa, que cataliza la formación de cadenas de DNA a través de una serie de ciclos de temperatura.<sup>10</sup> En el pasado se realizaba esta reacción moviendo tubos a través de baños de agua, pero en la actualidad la temperatura se controla automáticamente usando termocicladores, como el que se muestra en la **Figura 9**.<sup>10,23</sup> El método desarrollado en 1986 por el Dr. Kary Mullis surge ante la necesidad de obtener gran número de copias de un fragmento de DNA específico.<sup>10</sup>



**Figura 9. Termociclador Techne TC-512. Este equipo está diseñado para un control preciso de temperatura de las muestras, el rango de temperatura va de 4° C a 99° C. En la parte superior se colocan los tubos con la mezcla de reacción para llevar a cabo la PCR. Foto tomada en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Química, UNAM.<sup>24</sup>**

En principio, es posible amplificar un segmento de DNA de cualquier fuente con esta técnica, siempre y cuando se tenga la información suficiente de la secuencia. La amplificación in vitro es muy similar a la replicación, donde hay una secuencia de DNA que funciona como molde y por complementariedad de bases, se sintetiza la cadena antiparalela en sentido 5' a 3'.<sup>10,25</sup> Para realizar una PCR es necesario contar con la molécula de DNA, la cual servirá como molde o plantilla para que la secuencia de interés sea sintetizada. El DNA puede ser obtenido de cualquier muestra biológica, pero es importante que conserve su integridad. Con la mayoría de las técnicas disponibles de extracción de DNA se obtienen muestras de buena calidad. Por otra parte, la enzima DNA polimerasa es la encargada de catalizar la reacción, sintetizando la nueva cadena de DNA. La enzima más utilizada es la Taq DNA polimerasa aislada de *Thermus aquaticus*, una bacteria termofílica habitante de los géiseres.<sup>26,27</sup> Se considera una enzima termoestable debido a que es capaz de mantener su funcionalidad a altas temperaturas. La concentración de Taq DNA polimerasa recomendada es de 1 a 2.5 U por reacción de PCR, tiene una tasa de error de  $1 \times 10^{-4}$  error/ nucleótido y es capaz de polimerizar 1000 nucleótidos en un minuto.<sup>10,25</sup>

Para que la reacción sea exitosa se requieren otros elementos como oligonucleótidos, cebadores o *primers*, desoxirribonucleótidos (dNTP's), iones  $Mg^{2+}$  y un amortiguador.<sup>23,25</sup> Los *primers* son secuencias específicas que delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar en el DNA molde y se unen a este por complementariedad. Se utiliza un par de oligonucleótidos llamados *forward* o sentido, el cual es complementario y antiparalelo a la cadena 3'-5' del DNA molde y da origen a una cadena en sentido 5'-3'; y *reverse* o antisentido, que es complementario y antiparalelo a la cadena 5'-3' por lo que origina una cadena 3'-5'.<sup>10,25</sup> El objetivo de los *primers*, además de flanquear la secuencia blanco, es el de proporcionar un extremo 3', libre al cual la DNA polimerasa añade los nucleótidos mediante enlaces fosfodiéster. Generalmente el tamaño de los *primers* va de 15 a 25 nucleótidos, con un contenido de guanina-citosina no mayor al 55%. La concentración óptima de los *primers* para una reacción de PCR es de 0.3 a 1  $\mu M$ , ya que el exceso de estos puede provocar formación de dímeros entre dos *primers* parcialmente complementarios o entre el mismo primer.<sup>10,23</sup> Para la formación de las nuevas cadenas de DNA, son necesarios los dNTP's, que dentro de la reacción funcionan como "ladrillos" para la construcción de las nuevas hebras.<sup>9</sup> Los desoxinucleótidos, cuando no están formando cadenas de DNA, se encuentran en su forma trifosfatada, la cual brinda estabilidad a la molécula y proporciona el grupo fosfato para formar el enlace fosfodiéster cuando se une a otro nucleótido. La concentración de los dNTP's en la mezcla de reacción va de 50 a 200  $\mu M$ , lo cual es suficiente para sintetizar de 6.5 a 25  $\mu g$  de DNA.<sup>23,25,27</sup> La solución amortiguadora utilizada en la reacción brinda el pH y la concentración de sales para un funcionamiento adecuado de la enzima. El amortiguador está compuesto por Tris-HCl y KCl, y tiene un pH de 8.4.<sup>10,27</sup> Finalmente, el ion  $Mg^{2+}$ , proporcionados como  $MgCl_2$ , es un cofactor de la enzima DNA polimerasa que ayuda en la especificidad de la reacción. Una concentración de 1.5 a 2.0 mM es óptima para la mayoría de los productos de PCR generados con Taq DNA polimerasa.<sup>23,27</sup>

Todos los componentes son colocados y mezclados en un tubo, donde se pone en marcha la reacción con la ayuda del termociclador, el cual genera los ciclos de temperatura. De forma general, la PCR se divide en tres etapas, la desnaturalización, la hibridación y la extensión. Primero, es necesario desnaturalizar la cadena del DNA

molde, es decir, separar o romper los puentes de hidrógeno que se forman entre los nucleótidos, lo cual se logra calentando la mezcla de reacción a 95° C durante 20 o 30 segundos. Si la secuencia de templado contiene un gran porcentaje de G-C, será necesario aumentar el tiempo para romper los enlaces, debido a que estos nucleótidos forman tres puentes hidrógeno, por lo que requiere mayor energía. La finalidad es dejar libres las cadenas de DNA para la siguiente etapa.<sup>23,25,27</sup>

Durante la etapa de hibridación, la temperatura se reduce de 45° C a 68° C aproximadamente, esto depende del par de *primers*. A esta temperatura ocurre la alineación de los oligonucleótidos con su secuencia complementaria del DNA molde (previamente separado) en el extremo 3'.<sup>23,27</sup>

La etapa final de la PCR es la extensión, donde la DNA polimerasa cataliza la formación de cadenas complementarias agregando los dNTP's en el sentido 5' a 3'. La temperatura óptima para el correcto funcionamiento de la enzima es de 72° C. Estas tres etapas conforman un ciclo en la amplificación de una secuencia de DNA. En una PCR, los ciclos van de 25 a 35, por lo que las etapas se repiten y con ello la variación de temperaturas hasta completar los ciclos programados. Una vez que los ciclos hayan terminado, la temperatura de extensión se mantiene por cinco minutos, permitiendo a la enzima terminar la extensión de los productos. Posterior a la extensión final, se programa un ciclo a 4° C por varias horas para conservar los productos antes de sacar los tubos del termociclador.<sup>23,27</sup> En la **Figura 10** se observa un esquema de una PCR.

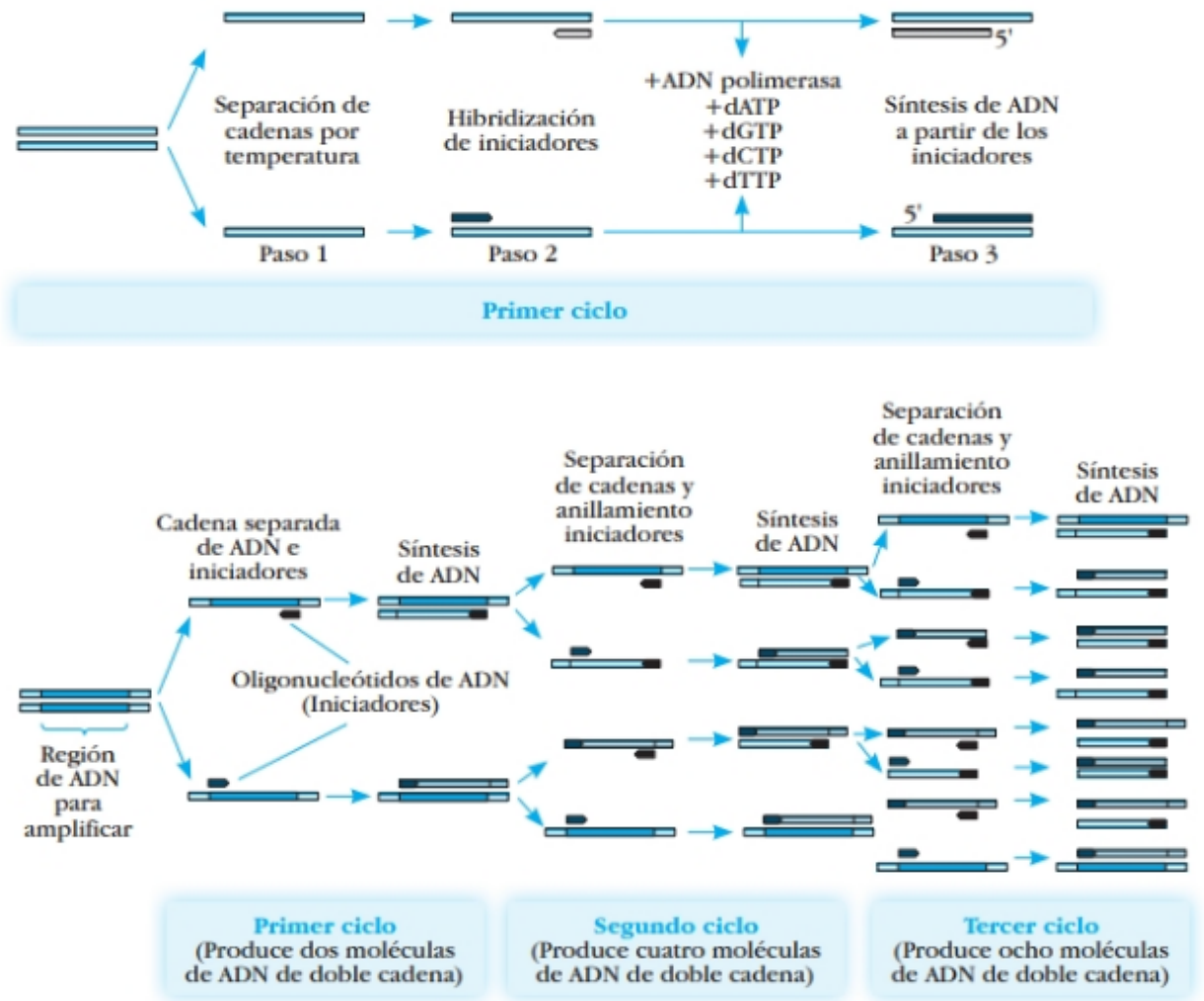


Figura 10. Esquema que representa la amplificación de un gen por PCR. Se observa que a partir de una molécula de DNA después de tres ciclos obtienen ocho moléculas de DNA. Figura tomada de González A., 2019.<sup>28</sup>

#### 1.4 Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*

Dentro de la familia *Micrococcaceae* se encuentra el género *Staphylococcus*, cocos Gram positivos no esporulados con un diámetro aproximado de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ ; tienen varios ejes de división por lo que forman grupos irregulares. Carecen de organelos de locomoción y son resistentes a la desecación por calor.<sup>28,29</sup>

Estos microorganismos son anaerobios facultativos, con excepción de *Staphylococcus saccharolyticus*, y utilizan la materia orgánica como fuente de carbono,

son quimioorganotróficos.<sup>28</sup> Las condiciones de crecimiento óptimo para estas bacterias son  $37\pm 1^\circ\text{C}$  y pH de  $7.03\pm 0.2$ . Una particularidad de la mayoría de las especies de este género es que pueden crecer a altas concentraciones de NaCl (9%).<sup>28,30</sup> Debido a la producción de catalasa, se pueden diferenciar de otros géneros que igualmente son cocos Gram positivos, como *Enterococcus sp* y *Streptococcus sp* los cuales carecen de dicha enzima.<sup>31</sup>

El nombre proviene del griego *staphyle* (racimo de uvas) y *kokkos* (grano o semilla), fue dado por Alexander Ogston en 1882 tras observar las bacterias en muestras purulentas.<sup>32</sup> Dos años más tarde, Anton J. Rosenbach logró aislar una cepa de *Staphylococcus* con una pigmentación amarilla, que llamó *Staphylococcus aureus*, proveniente de la palabra latina *aurum* (oro).<sup>33</sup> *S. aureus* es uno de los principales patógenos para el ser humano que forma parte de la microbiota de la piel y mucosa nasal, entre un 20% y 40% de la población en general es portadora de esta bacteria. Es un microorganismo oportunista causando infecciones principalmente en poblaciones susceptibles como niños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos.<sup>30,34,35</sup> Al ser una bacteria que posee factores de patogenicidad y virulencia como la producción de coagulasa, hialuronidasa, leucocidina, toxinas e invasividad, cuenta con una gran capacidad de adaptarse a diferentes hábitats, convirtiéndola en el agente causal de numerosas infecciones, desde cistitis hasta el síndrome del choque tóxico.<sup>28,29</sup>

El uso extendido de antibióticos llevó a la aparición de cepas de *S. aureus* multirresistentes. Dos años después de la introducción de la penicilina, en 1940, fueron detectadas cepas de *S. aureus* en hospitales que eran resistentes al antibiótico gracias a la producción de betalactamasas.<sup>36</sup> Posteriormente, alrededor de 1960, el 80% de las cepas de *S. aureus* que fueron adquiridas tanto en un hospital como en la comunidad presentaban resistencia a la penicilina. En los años 50, se comenzaron a usar antibióticos nuevos para combatir a este microorganismo, sin embargo, poco tiempo después varias cepas presentaban resistencia múltiple frente a penicilina, estreptomycin, tetraciclinas, cloranfenicol y eritromicina.<sup>35,36</sup> La introducción en 1959 de la metilcilina, una penicilina semisintética resistente a las betalactamasas, permitió por un tiempo controlar las infecciones de *S. aureus*; sin embargo, para 1961 se reportaron

cepas de *S. aureus* resistentes a metilcilina (SARM), presentando además resistencia a otros betalactámicos. Este mecanismo de resistencia lo logra al modificar las proteínas de unión a penicilina (PBP), reduciendo así la afinidad para fijar el antibiótico.<sup>36,37,38</sup>

El uso irresponsable de antibióticos ha dado pie a la aparición de cepas multirresistentes, como es el caso de SARM. En los últimos años, la principal causa de muerte por infecciones relacionadas a la asistencia sanitaria, es la cepa SARM, a la cual se asocian aproximadamente 5400 muertes, además de un millón de pacientes hospitalizados.<sup>39</sup> En Estados Unidos hubo un incremento en la cepa SARM de 4% a 55% en hospitales de tercer nivel, en un periodo comprendido de 1980 a 2001.<sup>34</sup> Velazquez y colaboradores investigaron la presencia de la cepa SARM en 2345 niños de guarderías al norte y sur de la República Mexicana. Encontraron colonización por *S. aureus* en 10% de los niños y en 0.93% colonización por SARM.<sup>38</sup> México cuenta con pocos estudios sobre la susceptibilidad antimicrobiana de SARM. En 1993, en el Hospital de León Guanajuato se identificó una resistencia global a la metilcilina del 24%. Por otro lado, en el Hospital Civil de Guadalajara se reportó un aumento en la resistencia a oxacilina en *S. aureus* pasando del 7% en 1989 al 20% en 1998.<sup>34</sup> En la actualidad, la cepa SARM se encuentra en todo el mundo y está desarrollando resistencia a otros antibióticos como glucopéptido y vancomicina.<sup>40</sup>



## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Staphylococcus aureus* es un patógeno que causa una gran variedad de infecciones, sobre todo aquellas asociadas con la atención hospitalaria. Esta bacteria presenta una enorme capacidad de generar resistencia a los antibióticos. Por esta razón se buscan nuevas dianas farmacológicas que puedan combatir a este microorganismo. La ATP sintasa es una diana que recientemente se ha comenzado a explorar y se sabe que el sector F1 de esta enzima en *S. aureus* diverge con respecto al sector F1 de la enzima en humanos, por lo que existe una mayor probabilidad de inhibir de manera especie-específica. Con la finalidad de estudiar y poder probar moléculas que inhiban el sector F1 de *S. aureus*, se busca producirla de forma recombinante, para poder obtener su estructura por rayos X y subsecuente caracterización bioquímica. Una primera etapa de este reto es la clonación del gen codificante para el sector F1 de la ATP sintasa de *S. aureus* en un vector de expresión como el pET-28 c.

## 3. HIPÓTESIS

La clonación de la secuencia codificante del sector F1 de la ATP sintasa de *S. aureus* en el vector de expresión pET-28 c mediante el uso de enzimas de restricción, amplificación del gen por PCR y ligación permitirá obtener el ensamble de un plásmido capaz de expresar el complejo proteico.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Clonar en el vector de expresión pET-28c un fragmento de 4800 pb del gen que codifica para el sector F1 de enzima ATP sintasa de *Staphylococcus aureus*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Replicar, purificar y digerir el vector de expresión pET-28 c.
- Amplificar mediante PCR, purificar y digerir el fragmento de 4800 pb que codifica para las subunidades del sector F1 de la ATP sintasa de *S. aureus*.
- Comprobar la construcción del plásmido mediante dobles digestiones del plásmido obtenido del proceso de clonación.

## 5. MATERIAL Y MÉTODO

### 5.1 Soluciones y reactivos

Los diferentes reactivos utilizados para la clonación del gen que codifica para el sector F1 de la ATP sintasa de *S. aureus* fueron adquiridos de Sigma Aldrich, Inc. y de New England Biolabs, Inc., y son indicados en la **Tabla 1**.

Medio TB (Terrific Broth)	Aforar a un litro de agua destilada los siguientes reactivos: 24 g de Extracto de levadura 20 g de Triptona 4 mL de Glicerol 100 mL de Amortiguador de fosfatos Esterilizar en autoclave
Medio SOC	2% de Triptona 0.5% de Extracto de levadura 10 mM NaCl 2.5 mM de KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM de Glucosa Esterilizar en autoclave
Amortiguador de fosfatos 10X	0.17 M de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.72 M de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Esterilizar en autoclave
Amortiguador TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X	40 mM de Tris 20 mM de Ácido acético 1 mM de EDTA pH de 8.4
Amortiguador de carga (6x)	15 % Ficoll <sup>R-400</sup> 60 mM EDTA 20 mM Tris-HCl 0.5 mM SDS 0.12 % Colorante 1 (rosa/rojo) 0.006 % de colorante 2 (azul)
Kanamicina	50 mg/mL

**Tabla 1. Soluciones y reactivos**

## 5.2 Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción utilizadas en la creación de extremos cohesivos en vector de clonación pET-28 c como para el gen que codifica para el sector F1 de la ATP sintasa de *S. aureus*, además del mapeo restrictivo, fueron de la marca NEB (**Tabla 2**).

Enzima	Sitio de restricción
BamHI HF <sup>15</sup>	5'... G↓GATCC...3' 3'... CCTAGG▲...5'
NcoI <sup>16</sup>	5'... C↓CATGG...3' 3'... GGTACC▲...5'
NdeI <sup>41</sup>	5'... C↓ATATG...3' 3'... GTATAC▲...5'
XbaI <sup>42</sup>	5'... T↓CTAGA...3' 3'... AGATCT▲...5'
EcoRI <sup>43</sup>	5'... G↓AATTC...3' 3'... CTTAAG▲...5'
NotI HF <sup>44</sup>	5'... GC↓GGCCGC...3' 3'... CGCCGG▲CG...5'
Sall HF <sup>45</sup>	5'... G↓TCGAC...3' 3'... CAGCT▲G...5'

Tabla 2. Enzimas de restricción utilizadas en el proceso de la clonación. Se indica su sitio de restricción.

## 5.3 Purificación de DNA

La extracción de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* DH5α transformados se realizó con ayuda del kit *Zyppy Plasmid Miniprep Kit* (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante, esto para poder tener suficiente pET-28 c.<sup>46</sup> Mientras que la purificación del mismo vector de clonación después de la digestión fue realizada con el kit *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante.<sup>47</sup> Para la purificación de los productos de PCR, se utilizó el kit *DNA Clean & Concentrator®-5* (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante.<sup>48</sup>

## 5.4 Cuantificación de DNA

La cuantificación de DNA se determinó con un espectrofotómetro de microvolúmenes de UV-Vis (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One/OneC), el cual solo requiere 1 µL de muestra para obtener una concentración con exactitud. Como blanco se utilizó agua libre de DNAsas.<sup>49</sup>

## 5.5 Transformación de bacterias por choque térmico

La transformación de la cepa *Escherichia coli* DH5α se realizó mediante el método de choque térmico, basado en el protocolo sugerido por New England Biolabs. Una alícuota de 50 µL de células competentes almacenadas a -70° C fueron descongeladas en hielo durante cinco minutos, pasado el tiempo se adicionó 1 µL del DNA plasmídico (28.2 ng), mezclando cuidadosamente, y se colocó en hielo por 20 minutos. Una vez finalizado el tiempo, la alícuota fue incubada a 42 °C durante 40 segundos en un equipo *thermoblock* (Accublock digital dry bath, Labnet, US) e inmediatamente después la alícuota se colocó en hielo por 5 minutos. Posteriormente se agregaron 200 µL de medio SOC y las células se dejaron recuperar durante una hora a 37 °C. Finalmente, 100 ml de las células fueron cultivados en placas con medio TB suplementado con 50 µg/mL de kanamicina, las placas fueron incubadas a 37° C por 24 horas.<sup>50</sup>

## 5.6 Electroforesis en gel de agarosa al 1%

Los geles de agarosa para realizar la electroforesis se prepararon de la siguiente manera: se pesó aproximadamente 0.4 g de agarosa y esta fue disuelta en 40 mL de amortiguador TAE 1X (para un gel de agarosa al 1% p/v). Para disolver la agarosa, se calentó en el microondas por intervalos de 20 segundos hasta que se observó una disolución transparente. Se montó la caja molde para hacer el gel, se colocó el peine para formar los pocillos y finalmente se vertió la agarosa disuelta. Se dejó solidificar aproximadamente por 20 min.

Una vez que el gel solidificó, se retiró el peine y el gel fue trasladado a la cámara de electroforesis llena con TAE 1X. Las muestras para cargar en los pocillos se realizaron como se indica a continuación: 3  $\mu$ L de muestra + 1  $\mu$ L de buffer de carga Gel Loading Dye, Purple (6X). Se colocaron 3  $\mu$ L de marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder GoldBio. Una vez aplicadas las muestras en el gel, la migración electroforética procedió a 90 Volts durante 60 minutos.

Los geles de agarosa fueron teñidos en solución de bromuro de etidio por 6 minutos. Posteriormente, se realizaron dos lavados con agua, de 8 minutos cada uno. Finalmente, el gel fue revelado con ayuda de un Fotodocumentador ChemidocTM XRS+ de Bio-rad.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Objetivo: Replicar, purificar y digerir el vector de expresión pET-28 c

Una alícuota de 1  $\mu$ L del vector de expresión pET-28 c fue proporcionada por la Dra. Patricia Cano Sánchez del Instituto de Química-UNAM (28.2 ng/ $\mu$ L), el cual es un vector utilizado para la clonación y expresión bacteriana de proteínas recombinantes. Cuenta con un promotor T7lac y proporciona el gen de resistencia a la kanamicina.<sup>20</sup> Para su replicación, fue utilizada la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , igualmente proporcionada por la Dra. Cano. Esta cepa es la más utilizada en procesos de clonación y aislamiento de plásmidos con una eficiencia elevada; la cepa cuenta con dos mutaciones, recA1 y endA1, que dan mayor estabilidad al inserto y mejoran la calidad del DNA plasmídico.<sup>51</sup>

Fueron transformadas células de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante choque térmico con 1 $\mu$ L (28.2 ng) del mismo vector de expresión, pET-28 c. Posteriormente, se realizó la extracción de DNA plasmídico utilizando el kit QIA prep Spin Miniprep (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo con 20  $\mu$ L de agua libre de DNAsas. El plásmido fue cuantificado obteniendo una concentración de 29.2 ng/ $\mu$ L.

Para la linealización del vector y creación de extremos cohesivos NcoI y BamHI, se llevó a cabo la doble digestión con las enzimas de restricción NcoI y BamHI bajo el esquema de la **Tabla 3**.

Componente	Cantidad
NcoI	1 $\mu$ L
BamHI HF	1 $\mu$ L
pET-28 c (vector)	1 $\mu$ g (35 $\mu$ L)
Buffer NEB 10X	5 $\mu$ L
Agua	8 $\mu$ L
Vol. total	50 $\mu$ L

**Tabla 3. Mezcla de reacción para la doble digestión del vector pET-28 c.**

La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante toda la noche. Al terminar la incubación, el total de la mezcla de reacción fue sometida a electroforesis en gel de agarosa al 1 %, observando una banda de aproximadamente a 5000 pb (**Figura 11**). El peso molecular de la banda obtenida es similar al peso molecular teórico para el vector linealizado.

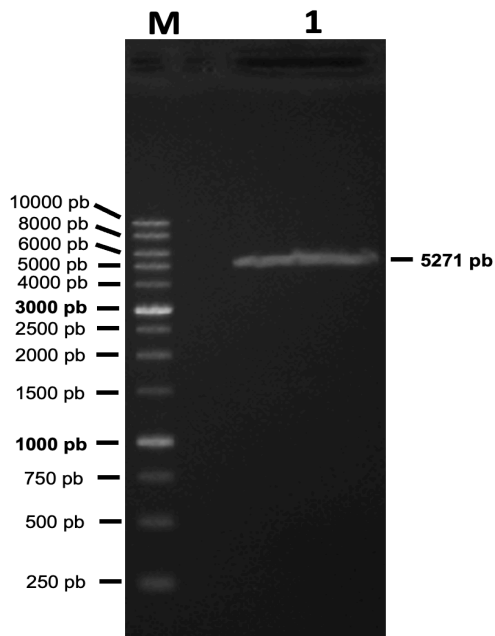


Figura 11. Digestión de pET-28c con las enzimas de restricción BamHI y NcoI. Se analizó la integridad del vector de expresión mediante un gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio. El carril M contiene el marcador de peso molecular 1kb, mientras que el carril 1 contiene el producto de la digestión de pET-28 c con las enzimas de restricción descritas.

A continuación, la banda fue cortada directamente del gel bajo luz UV (**Figura 12**) y purificada mediante el kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante, eluyendo en 20  $\mu$ L de agua libre de DNAsas. Finalmente, el DNA plasmídico fue cuantificado obteniendo una concentración de 6 ng/ $\mu$ L y su integridad fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (**Figura 13**). Se observó una banda de aproximadamente a 5000 pb, acorde al peso molecular de pET-28 c linealizado.

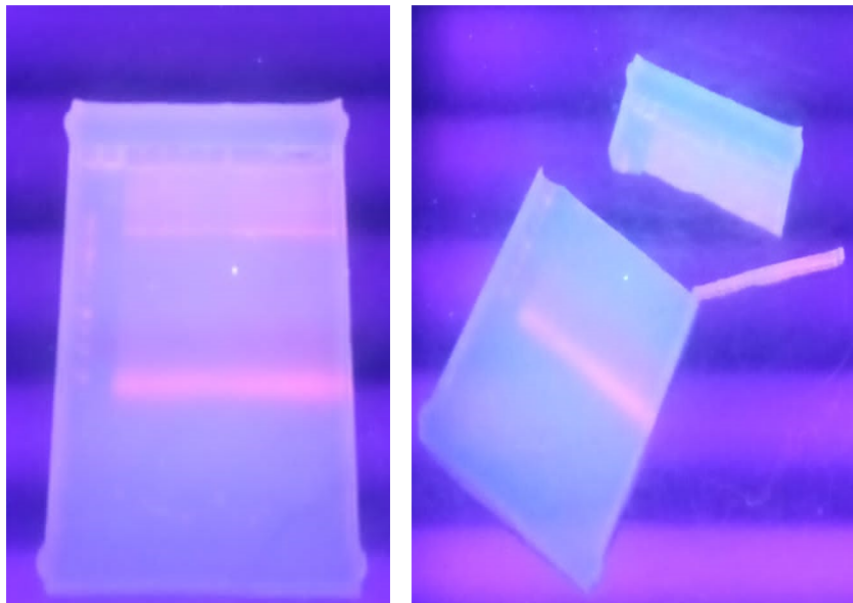
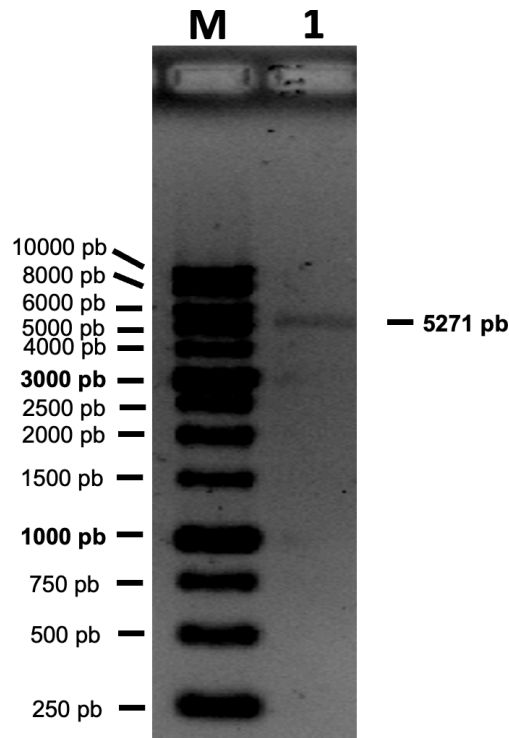


Figura 12. Se observa el gel de agarosa bajo la luz UV antes (izquierda) y después (derecha) de cortar el fragmento que contenía el vector pET-28 c después de realizar la doble digestión con las enzimas de restricción BamHI y NcoI.



**Figura 13.** Vector de expresión linealizado y purificado. Una muestra de 3  $\mu$ L de pET-28 c fue analizada en un gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio. En el carril M se colocó el marcador de peso molecular 1kb, en el carril 1 se encuentra la muestra de pET-28c purificado después de la doble digestión.

## **6.2 Objetivo: Amplificar mediante PCR, purificar y digerir el fragmento de 4800 pb que codifica para las subunidades del sector F1 de la ATP sintasa de *S. aureus*.**

El plásmido ATPasa\_pUC18 que contiene el gen para el sector F1 de la ATP sintasa de *S. aureus* (F1Sa), fue adquirido de la empresa GenScript USA Inc. Como se muestra en la **Figura 14**, las secuencias codificantes para cada subunidad, cada una con su respectivo codón de inicio y de paro, fueron separadas por un *linker* de diferente longitud, para permitir la sobreexpresión de todas las subunidades en un mismo sistema de forma independiente.



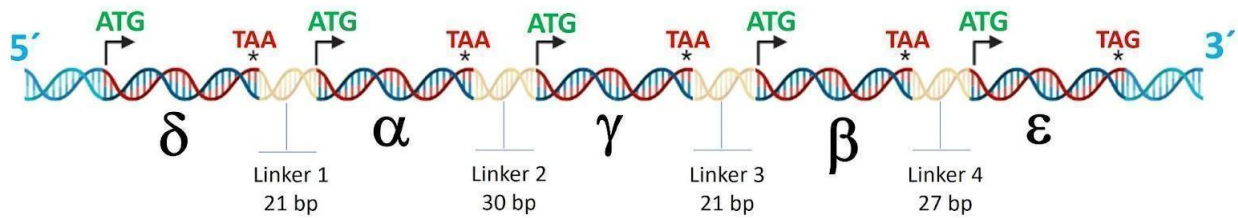


Figura 14. Gen que codifica para las subunidades del sector F1 de la ATP sintasa de *S. aureus*.

Se diseñaron dos oligonucleótidos, directo FwATPasa y reverso RvATPasa. Para el diseño del *primer* FwATPasa se tomaron las primeras 32 bases de nucleótidos del extremo 5' de la secuencia del gen completo y se agregó el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción NcoI y una secuencia de bases extra (CATG) que promueve la actividad de la enzima de restricción, como se muestra en la **Figura 15**. Para el oligonucleótido RvATPasa, se tomaron las últimas 32 bases nucleotídicas del extremo 3' y se agregó un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BamHI y una secuencia de bases (CG) la cual promueve la actividad de la enzima de restricción. A continuación, se obtuvo la cadena complementaria y finalmente su reverso, como se observa en la **Figura 16**.

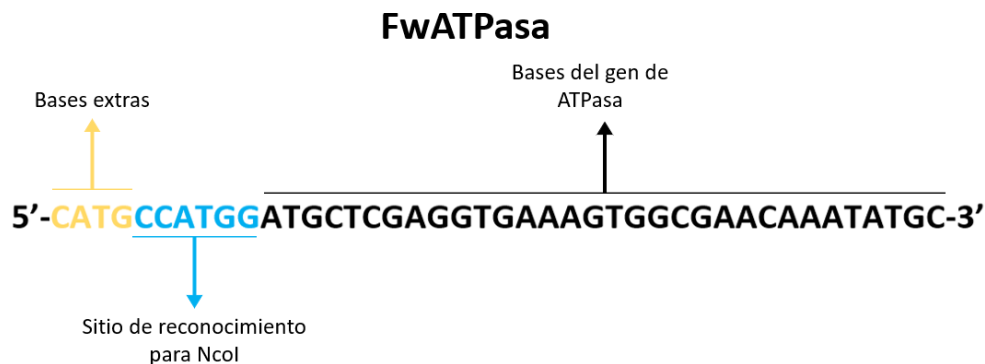


Figura 15. Secuencia del oligonucleótido FwATPasa para montar la PCR.

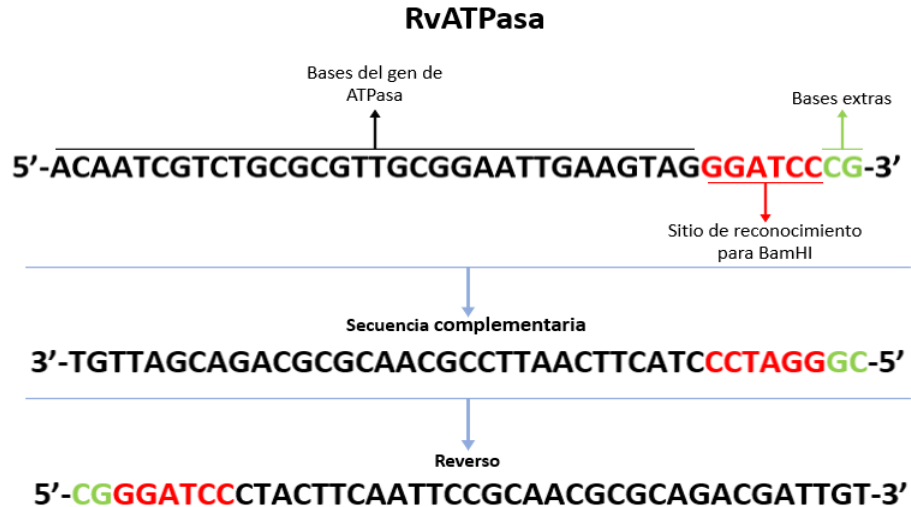


Figura 16. Secuencia del oligonucleótido RvATPasa para montar la PCR.

La amplificación del gen F1Sa se realizó mediante PCR tomando como plantilla el plásmido ATPasa\_pUC18, utilizando los oligonucleótidos diseñados (FwATPasa y RvATPasa) y la polimerasa Q5 High-Fidelity 2XMaster Mix. Esta polimerasa presenta ciertas ventajas respecto a la Taq polimerasa convencional, como una alta fidelidad para lograr amplificación de genes largos, una tasa de error 280 veces menor, además de una mayor estabilidad a temperatura ambiente y una mayor resistencia frente a inhibidores que puedan estar presente en las muestras.<sup>52</sup>

Los componentes de la mezcla de reacción para montar las reacciones de PCR son indicados en la **Tabla 4**. Las condiciones de reacción para la PCR (**Tabla 5**) fueron basadas en el protocolo para la polimerasa Q5 High-Fidelity 2X Master Mix, tomando en cuenta también la longitud del gen que fue amplificado, de 4880 pares de bases. Esto debido a que, al ser un gen grande, requirió más tiempo para la etapa de desnaturalización inicial. Para la etapa de extensión, el protocolo recomienda de 20 a 30 segundos por cada 1000 pares de bases. Arbitrariamente, se tomó un tiempo de 25 segundos por cada kilo base, dando un tiempo total de extensión de 2 minutos en cada ciclo. El número de ciclos se determinó a partir del promedio de los ciclos recomendados en el protocolo, que son de 25 a 35.

Componente	Cantidad
Q5 High-Fidelity 2XMaster Mix	12.5 $\mu$ L
10 $\mu$ M FwATPasa	1.25 $\mu$ L
10 $\mu$ M RvATPasa	1.25 $\mu$ L
ATPasa_pUC18	1.5 $\mu$ L
Agua	8.5 $\mu$ L
Vol. total	25 $\mu$ L

**Tabla 4. Componentes utilizados para montar la reacción de PCR. Fue tomado como base el protocolo para la polimerasa Q5 High-Fidelity 2XMaster Mix.**

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	98° C	1 minuto
30 ciclos	98° C	10 segundos
	72° C	30 segundos
	72° C	2 minutos
Extensión final	72° C	5 minutos
Almacenaje	4° C	----

**Tabla 5. Condiciones de reacción para la amplificación del gen F1Sa a partir del plásmido ATPasa\_pUC18.**

Con ayuda del servidor *T<sub>m</sub>calculador* de NEB ([www.tmc calculaneb.com](http://www.tmc calculaneb.com)), se determinó la temperatura de alineación como 72° C (**Figura 17**). La temperatura de alineación o hibridación permite a los oligonucleótidos alinearse con la secuencia complementaria del DNA molde y generalmente es de 5 a 10 ° C por debajo de la T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos. Para la polimerasa utilizada tiende a ser más alta si la comparamos con la Taq polimerasa tradicional, ya que pertenecen a una diferente

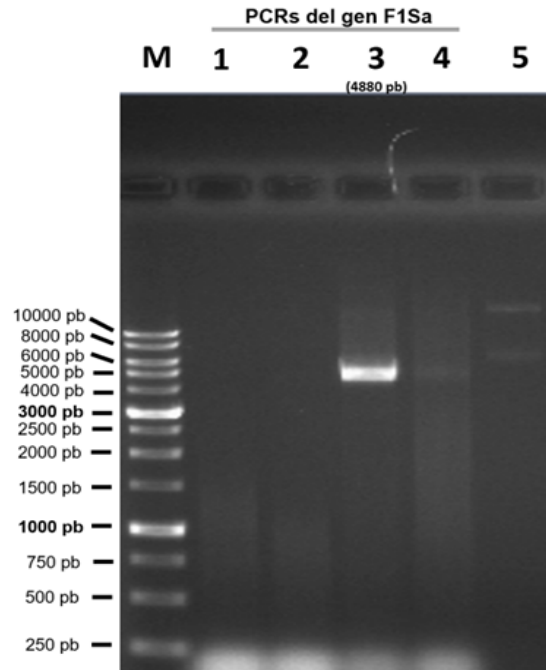
familia de polimerasas y la composición del *buffer* para Q5 favorece también temperaturas más altas. La calculadora de NEB incorpora toda la información y brinda una  $T_m$  óptima para el proceso.

The image shows a web-based calculator interface for determining the annealing temperature ( $T_m$ ) for PCR. The interface includes several input fields and buttons:

- Product Group:** A dropdown menu set to "Q5".
- Polymerase/Kit:** A dropdown menu set to "Q5 High-Fidelity 2X Master Mix".
- Primer Concentration (nM):** A text input field containing "500". A "Reset concentration" button is located to its right.
- Primer 1:** A text input field containing the sequence "CATGCCATGGATGCTCGAGGTGAAAGTGGCGAACAAATATGC".
- Primer 2:** A text input field containing the sequence "CGGGATCCCTACTTCAATTCGCAACGCACAGACGATTGT".
- Buttons:** "Switch to batch mode", "Clear", and "Use example input".
- Results:** On the right side, there are three green boxes:
  - Anneal at:** A box displaying "72 °C". Below it is a link "Why is this so high?".
  - Primer 1:** A box displaying "42 nt", "50% GC", and "Tm: 79°C".
  - Primer 2:** A box displaying "40 nt", "55% GC", and "Tm: 81°C".

**Figura 17.** La temperatura de alineación fue calculada de acuerdo con la polimerasa y *primers* utilizados en el servidor *T<sub>m</sub> calculator* de NEB.

El producto de la amplificación (amplicón) se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, tomando 2  $\mu$ L como muestra. En la **Figura 18** se observa la amplificación en una de las cuatro reacciones de PCR montadas, se encuentra una banda de aproximadamente 4880 pb, acorde al peso molecular del gen F1Sa. A continuación, el amplicón fue mezclado y purificado mediante el kit Clean and Concentrator-5 (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo con 20  $\mu$ L de agua libre de DNAsas, obteniendo una concentración de 93.7 ng/ $\mu$ L.



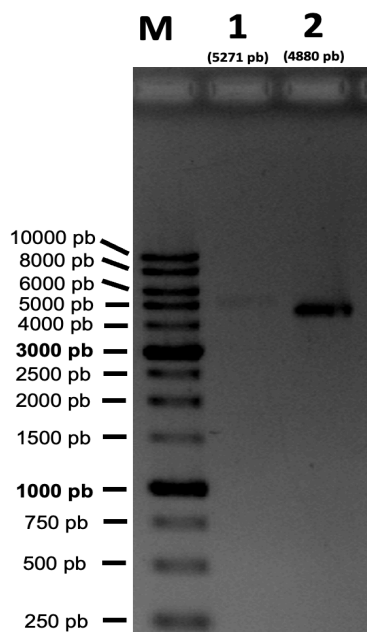
**Figura 18.** Análisis de la integridad del producto de las PCRs en gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio. El carril M es el marcador de peso molecular 1kb. En los carriles 1, 2 y 4 no se obtuvo amplificación del gen, sin embargo en el carril 3 se observa una banda de aproximadamente 5000 pb, que corresponde a un amplicón del gen F1Sa, de 4880 pb. Finalmente en el carril 5 se muestra del plásmido ATPasa\_pUC18 que fue utilizado como plantilla para la amplificación.

Los extremos cohesivos BamHI y NcoI en el amplicón F1Sa fueron creados mediante la doble digestión con las enzimas de restricción correspondientes siguiendo el esquema de la **Tabla 6**.

Componente	Cantidad
NcoI	1 $\mu$ L
BamHI HF	1 $\mu$ L
Gen F1Sa (amplicón)	1 $\mu$ g (11 $\mu$ L)
Buffer NEB 10X	5 $\mu$ L
Agua	32 $\mu$ L
Vol. total	50 $\mu$ L

**Tabla 6.** Mezcla de reacción para la doble digestión del gen F1Sa.

La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C durante toda la noche. Finalmente, la purificación del gen se realizó con el kit Clean and Concentrator-5(Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo en 20 µL de agua libre de DNAsas. El DNA fue cuantificado, obteniendo una concentración de 35.2 ng/µL y su integridad verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, **Figura 19**, tomando 2 µL de muestra.



**Figura 19.** Para el análisis de la integridad del gen F1Sa posterior a la restricción enzimática, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio. El carril M contiene el marcador de peso molecular 1kb, el carril 1 contiene a pET-28 c linealizado (5271 pb) y el carril 2 es la muestra del gen F1Sa purificado y digerido (4880 pb).

### 6.3 Clonación del gen F1Sa en el vector pET-28 c

Una vez que se obtuvieron los fragmentos de interés, se realizó la ligación de éstos. Para favorecer el resultado, cuando se coloca la reacción de ligación, se recomienda configurar múltiples reacciones con diferentes proporciones molares de inserto:vector, generalmente se colocan relaciones molares de 1:1 a 5:1.<sup>53</sup> Para montar el experimento se tomaron tres relaciones molares únicamente, 2:1, 3:1 y 5:1. Los cálculos se realizaron en el servidor *NEBioCalculator* utilizando los valores que se muestran en la **Figura 20**. También se colocó una autoligación (SL) para tener un control negativo.

Ligation Calculator

This tool will calculate the mass of insert required at several molar insert:vector ratios in the range needed for typical ligation reactions.

Ligation **Tutorials**

Insert DNA length

Vector DNA length

Vector DNA mass

Required insert DNA mass

**Figura 20. Valores utilizados para el cálculo de las relaciones molares para las reacciones de ligación. Se resaltan en rojo las tres relaciones molares utilizadas.**

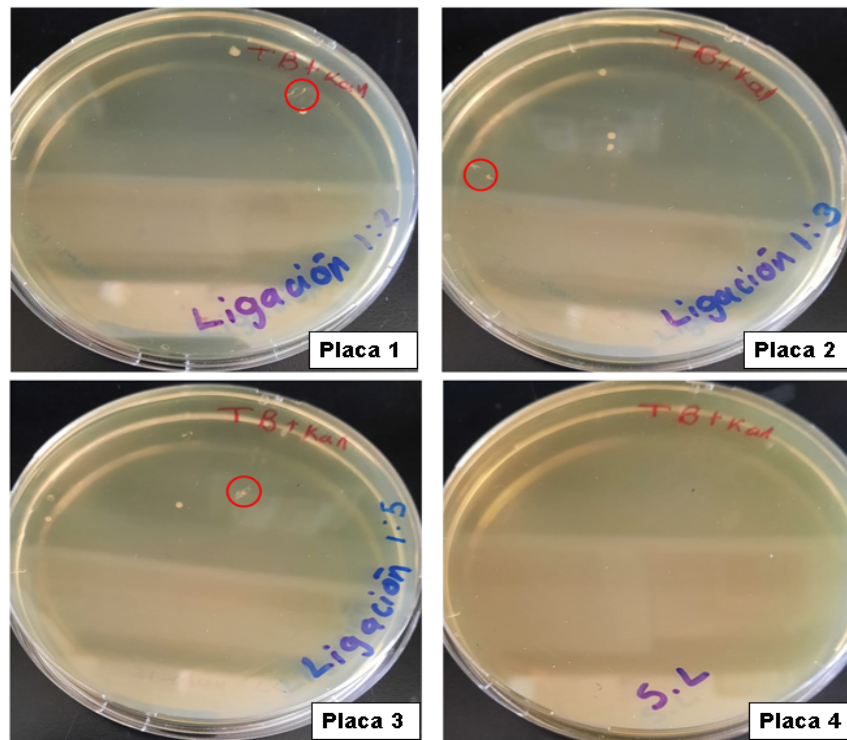
El esquema utilizado para montar las reacciones de ligación se muestra en la **Tabla 7**, fueron mezcladas y posteriormente incubadas a 4° C durante toda la noche.

Inserto:Vector	2:1	3:1	5:1	SL
T4 ligasa	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Buffer T4 ligasa 10X	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
pET-28 c (Vector)	3 µL (20 ng)	3 µL (20 ng)	3 µL (20 ng)	3 µL (20 ng)
Gen F1Sa (amplión)	1 µL (35 ng)	2 µL (70 ng)	3 µL (105 ng)	-----
Agua	13 µL	12 µL	12 µL	15 µL
Vol. total	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

**Tabla 7. Esquema utilizado para montar las reacciones de ligación a diferentes relaciones molares, en la reacción de autoligación no se adicionó inserto.**

Las reacciones de ligación fueron utilizadas para llevar a cabo la transformación de células químicamente competentes de la cepa *E. coli* DH5α mediante la técnica de choque térmico. Por cada ligación fue transformada una alícuota de 50 µL de células competentes, adicionando 10 µL de la reacción de ligación. Posterior a la transformación, las células se cultivaron en placas con medio TB suplementado con 50

$\mu\text{g/mL}$  de kanamicina y fueron incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Terminado el tiempo de incubación, como se observa en la **Figura 21**, hubo crecimiento de clonas en todas las placas, excepto en donde la cepa fue transformada con el producto de la reacción de autoligación.



**Figura 21.** Crecimiento de colonias de *E. coli* DH5 alfa transformadas con las reacciones de ligación. Se pueden observar varias clonas en las primeras tres placas donde la transformación se realizó con las ligaciones 1:2,1:3 y 1:5 respectivamente, a diferencia de la placa 4, donde la transformación se realizó con la autoligación (SL) y no se observan colonias. Se señalan en un círculo rojo las colonias que fueron tomadas para extraer el DNA plasmídico.

Para el escrutinio de las clonas positivas se llevó a cabo la extracción de DNA plasmídico de tres clonas. Para ello, parte de la colonia fue tomada y cultivada en 5 mL de medio TB líquido suplementado con  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$  de kanamicina. Los cultivos fueron incubados a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h. La extracción del DNA plasmídico fue realizada mediante el kit QIA prep Spin Miniprep (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo con  $20\text{ }\mu\text{L}$  de agua libre de DNAsas. La integridad del DNA plasmídico fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Figura 22**).



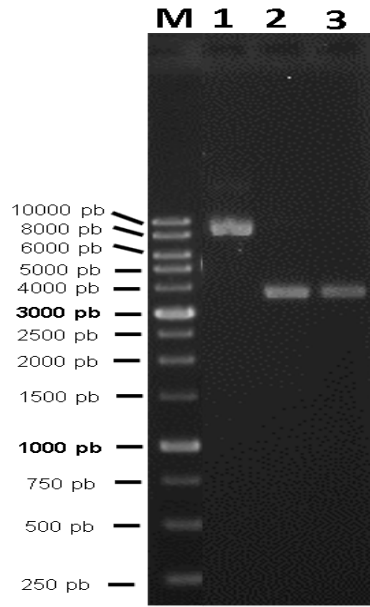


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio, mediante el cual se realizó el análisis del DNA plasmídico extraído de las colonias seleccionadas. Carril M contiene el marcador de peso molecular 1kb, los carriles del 1 al 3 contiene muestras de DNA plasmídico extraído de las diferentes colonias señaladas en la Figura 21.

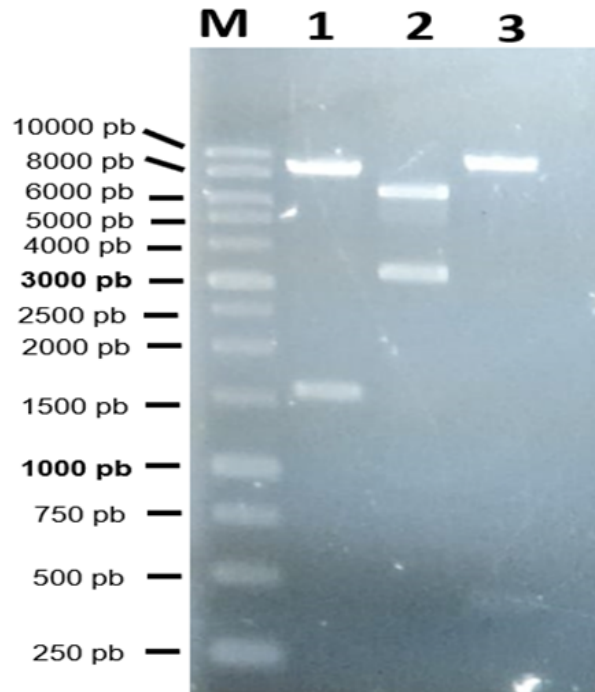
#### 6.4 Objetivo: Comprobar la construcción del plásmido mediante dobles digestiones.

Para verificar la construcción del plásmido recombinante se realizó un mapeo de restricción utilizando tres pares de enzimas bajo el esquema de la **Tabla 8**:

Digestión 1		Digestión 2		Digestión 3	
NdeI	0.2 µL	EcoRI	0.2 µL	NotI HF	0.2 µL
XbaI	0.2 µL	NdeI	0.2 µL	Sall HF	0.2 µL
pET-28 c-F1Sa (Construcción)	1.5 µL	pET-28 c-F1Sa (Construcción)	1.5 µL	pET-28 c-F1Sa (Construcción)	1.5 µL
Buffer NEB 10X	1 µL	Buffer NEB 10X	1 µL	Buffer NEB 10X	1 µL
Agua	7.1 µL	Agua	7.1 µL	Agua	7.1 µL
Vol. total	10 µL	Vol. total	10 µL	Vol. total	10 µL

Tabla 6. Esquema con el cual se realizó el análisis del DNA plasmídico producto de la clonación del gen F1Sa en pET-28 c.

Las mezclas de reacción fueron incubadas a 37° C por una hora. Una vez terminado el tiempo establecido, las reacciones de digestión fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, el cual se muestra en la **Figura 23**.



**Figura 23.** Análisis de la construcción del plásmido pET-28 c-SaF1. Los productos de la digestión se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, revelado con bromuro de etidio. El carril M es el marcador de peso molecular 1kb. El carril 1 contiene el producto de la digestión realizada con las enzimas de restricción NdeI y XbaI, se observa una banda ligeramente arriba de 8000 pb y otra por encima de 1500 pb. El carril 2 es la digestión realizada con las enzimas de restricción EcoRI y NdeI, se obtuvieron dos bandas, una de 6000 pb y otra de 3000 pb aproximadamente. Finalmente, el carril 3 contiene la digestión realizada con las enzimas NotI HF y Sall HF, se observa una banda muy clara cerca de 10000 pb y otra banda no tan clara aproximadamente a 500 pb.

Se realizó una simulación de la clonación utilizando el software Snap Gene para comparar los resultados obtenidos experimentalmente. El mapa del vector pET-28 c que se muestra en la **Figura 7** fue obtenido en el sitio web [www.snapgene.com](http://www.snapgene.com); mientras que el mapa del gen fue proporcionado por la misma empresa que diseñó el plásmido ATPasa\_pUC18, GenScript USA Inc. **La Figura 24** es una representación de cómo se llevó a cabo la clonación en Snap Gene, la imagen fue generada por el mismo software. De igual forma que en la parte experimental, se generó el amplicón del gen que codifica para el sector F1 de la ATP sintasa de *S. aureus* tomando como plantilla el

plásmido ATPasa\_pUC18 utilizando los oligonucleótidos FwATPasa y RvATPasa. Posteriormente, tanto el producto de la PCR como el vector pEt-28 c, fueron digeridos con las enzimas BamHI y NcoI para generar los extremos cohesivos y finalmente llevar a cabo la ligación de ambos fragmentos de DNA.

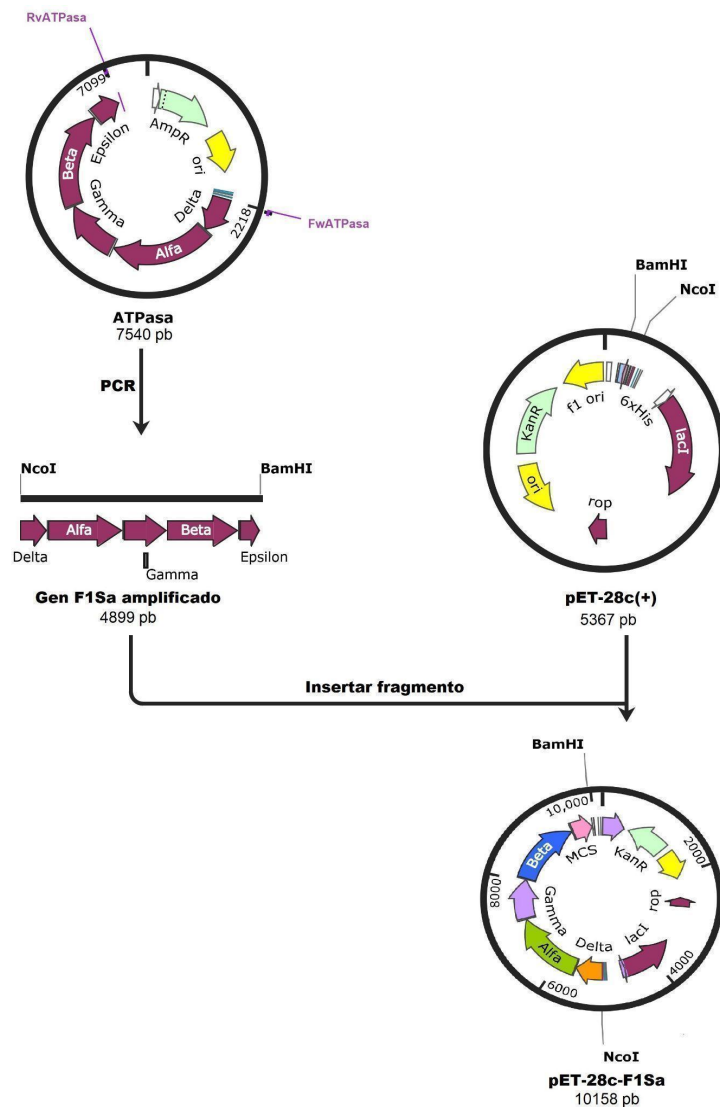


Figura 24. La clonación del sector F1 de la ATP sintasa de *S. aureus* fue simulada en Snap Gene, generando la construcción plásmido pET-28 c-F1Sa con un total de 10158 pb.

Una vez obtenida la construcción del plásmido pET-28 c- F1Sa (Figura 25), se simuló un mapeo de restricción en gel de agarosa al 1% utilizando los tres pares de enzimas de la parte experimental (Tabla 6). En la Figura 26, se presenta el gel de

agarosa generado en Snap Gene tras la digestión con los pares de enzimas correspondientes, el cual fue comparado con el gel de agarosa (Figura 23) que se obtuvo experimentalmente.

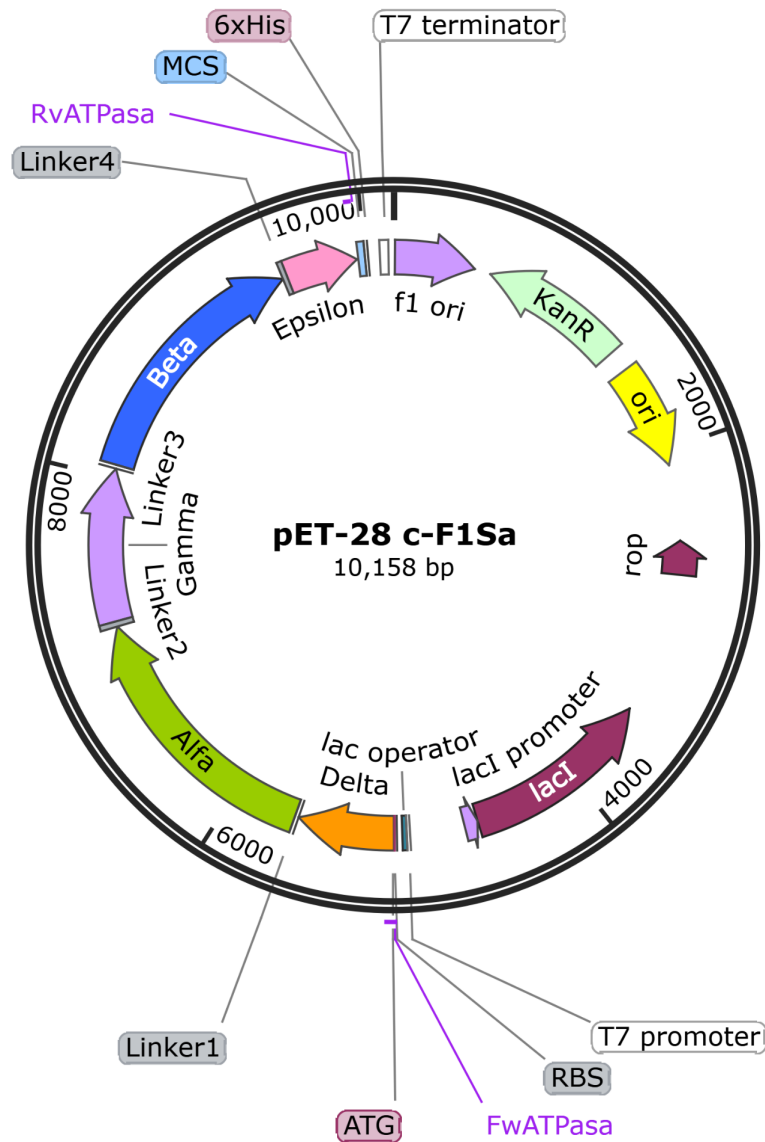
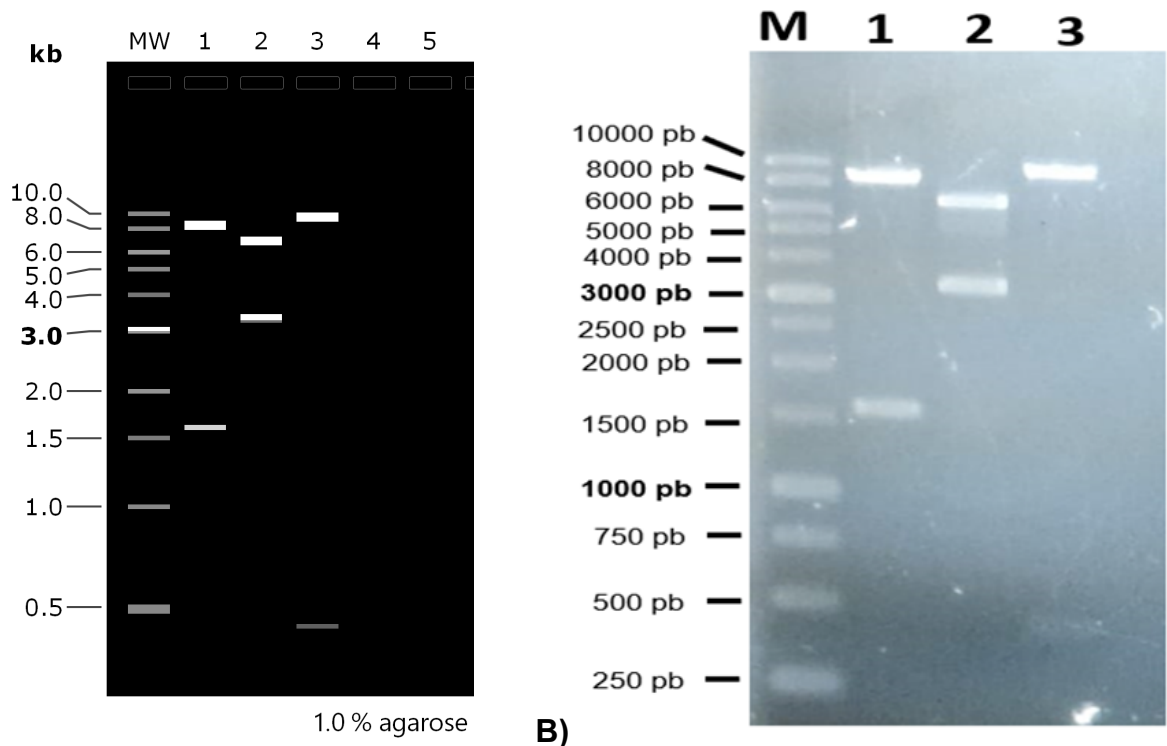
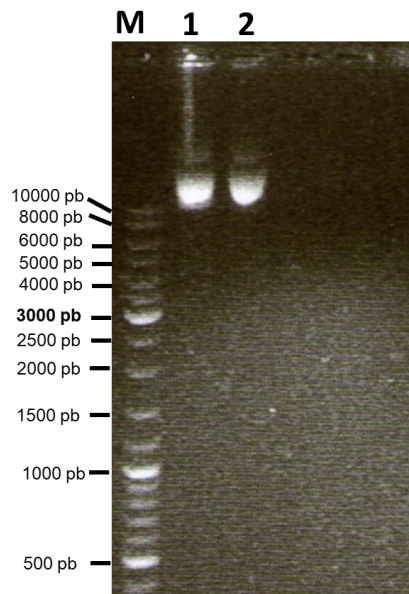


Figura 25. Mapa de la construcción del plásmido. El gen que codifica para la ATP sintasa de *S. aureus* fue introducido en el vector de expresión pET-28 c entre los sitios de restricción BamHI y NcoI. El peso final del plásmido es de 10158 pares de bases que es corroborado a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se puede observar en el plásmido a las 5 subunidades del sector F1 de la ATP sintasa. Por otro lado el plásmido contiene los elementos propios de pET-28 c, que permitirán la expresión del gen.



**A)** Gel de agarosa al 1% simulado en Snap Gene. MW: Marcador de peso molecular. Carril 1 se encuentran dos fragmentos de DNA tras ser digerido con NdeI y XbaI. Carril 2 resultado de la digestión con NdeI y EcoRI. Carril 3 corte realizado con NotI y Sall. **B)** Se presenta nuevamente la Figura 23 para poder comparar el mapeo de restricción.

A partir de la construcción obtenida, se realizó nuevamente una transformación de células *E. coli* DH5 $\alpha$  para lograr obtener una mayor cantidad del plásmido, siguiendo las técnicas anteriormente descritas. Al final se obtuvieron 40  $\mu$ L del plásmido con una concentración de 26.4 ng/ $\mu$ L, el cual fue almacenado a -20  $^{\circ}$ C para que posteriormente sea utilizado en pruebas de expresión. La integridad del plásmido fue corroborada por medio de electroforesis en gel de agarosas al 1% (**Figura 27**).



**Figura 27. Verificación de la construcción del plásmido. Gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio. Carril M es el marcador de peso molecular, en el carril 1 y 2 se observa el DNA plasmídico con un peso molecular de 10 kb.**

## 7. CONCLUSIONES

- El vector de expresión pET-28 c fue replicado y purificado con éxito transformando células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ .
- Utilizando los oligonucleótidos FwATPasa y RvATPasa fue posible amplificar el gen que codifica el sector F1 de la ATP sintasa de *S. aureus*, sin embargo no se puede asegurar que el protocolo utilizado tiene una alta eficiencia debido a que no todas las reacciones de PCR montadas fueron positivas.
- Haciendo uso de técnicas de biología molecular se logró la clonación del gen que codifica para el sector F1 de la ATP sintasa de *S. aureus* en el vector de expresión pET-28 c, demostrando la viabilidad de estas técnicas para manipular y estudiar genes de interés.
- La verificación de la construcción del plásmido recombinante mediante dobles digestiones confirma la correcta inserción del gen de interés en el vector, un paso importante para investigaciones futuras que podrían contribuir al entendimiento de la biología y la fisiología de *S. aureus*, así como a la búsqueda de posibles blancos terapéuticos para combatir la resistencia antimicrobiana asociada a esta bacteria.

## 8. PERSPECTIVAS

- Secuenciar la construcción del plásmido recombinante para confirmar la correcta inserción del gen de interés y verificar la integridad de la construcción molecular.
- Realizar pruebas de expresión en células *E. coli* BL21 para purificar la proteína correspondiente al sector F1 de la ATP sintasa de *S. aureus*.
- Desarrollar protocolos de purificación de la proteína expresada para llevar a cabo su caracterización bioquímica y estructural, lo que permitirá comprender mejor su función y propiedades.
- Realizar ensayos para evaluar la capacidad de moléculas inhibitoras de interactuar con el sector F1 de la ATP sintasa de *S. aureus*, con el objetivo de identificar posibles compuestos con potencial actividad antimicrobiana.

## 9. REFERENCIAS

1. von Ballmoos C, Wiedenmann A, Dimroth P. Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. *Annu Rev Biochem.* [Internet]. 2009 [Consultado 24 Agosto 2021];78: 649-72. Disponible en: 10.1146/annurev.biochem.78.081307.104803. PMID: 19489730
2. Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamento de bioquímica: la vida a nivel molecular.* 4ª ed. Buenos Aires: Médica panamericana; 2016.p. 448-9
3. Salcedo G. Purificación y caracterización termodinámica de la subunidad  $\alpha$  y el núcleo catalítico del sector F1-ATPasa de la ATP sintasa del termófilo *Geobacillus kaustophilus* [Tesis doctoral]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2018. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2018/septiembre/0780234/Index.html>
4. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. *Harper bioquímica ilustrada.* 29ª ed. México: Mc Graw Hill; 2013.p.112
5. Domínguez-Ramírez L, Tuena de Gómez-Puyou M. La F1F0 ATP sintasa: un complejo proteico con gran versatilidad estructural y funcional. *TIP Rev Esp Cienc Quim Biol* [Internet]. 2005 [Consultado 24 Agosto 2021]; 8 (1): 18-27. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43200803>
6. Ahmad Z, Winjobi M, Kabir MA. Significance of  $\alpha$ Thr-349 in the catalytic sites of *Escherichia coli* ATP synthase. *Biochemistry* [Internet]. 2014;53(47):7376–85. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/bi5013063>
7. Zúniga LE. ATP sintasa: asombrosa maquinaria molecular en la dinámica energética de los seres vivos. *Innovare* [Internet]. 30 de agosto de 2021 [citado 30 de agosto de 2022];10(2):84. Disponible en: <https://lamjol.info/index.php/INNOVARE/article/view/12267>
8. Cano-Estrada A, González-Halphen D. F1F0 ATP sintasa y sus diferencias estructurales. *Rev Educ Bioquímica.* [Internet]. 2005 [Consultado 24 Agosto 2021]; 30(3): 98-108. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=36128>
9. Wong DWS. *The ABCs of gene cloning.* 3ª ed. Albany: Springer; 2018.p. 3-7,67-72,131
10. Salazar Montes AM, Sandoval Rodríguez AS, Armendáriz Borunda JS. *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud.* México: McGraw-Hill Interamericana; 2013.p. 25,127-137
11. González Á. *Biología molecular: principios y aplicaciones.* Medellín: ECOE Ediciones LTDA; 2019. p. 13-16
12. Karp G. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos.* 6a. ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2011.p.746-750



13. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losik R, et al. *Biología molecular del gen*. 7a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2016. p. 79,80
14. McLennan A, Bates A, Turner P. *Bios. Notas instantáneas de biología molecular*. 4ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2014.
15. New England Biolabs. BamHI [Internet]. Neb.com. [citado el 16 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://international.neb.com/products/r0136-bamhi>
16. New England Biolabs. NcoI [Internet]. Neb.com. [citado el 16 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://international.neb.com/products/r0193-ncoi>
17. New England Biolabs. SmaI [Internet]. Neb.com. [citado el 16 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://international.neb.com/products/r0141-smai>
18. New England Biolabs. SspI [Internet]. Neb.com. [citado el 16 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://international.neb.com/products/r0132-ssp>
19. Ibarra SS. *Clonación y subclonación del vector del vector de expresión pUE08 de un fragmento del gen hsp75 de Sporotrix schenkii*. [Durango]: Universidad Juárez del Estado de Durango; 2018
20. Llc GB. PET-28c (+) [Internet]. SnapGene. [citado el 23 de marzo de 2023]. Disponible en: [https://www.snapgene.com/plasmids/pet\\_and\\_duet\\_vectors\\_\(novagen\)/pET-28c\(%2B\)](https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pET-28c(%2B))
21. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* [Internet]. 2014;5:172. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
22. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 1999;10(5):411–21. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0958-1669\(99\)00003-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0958-1669(99)00003-8)
23. New England Biolabs. PCR [Internet]. Neb.com. [citado el 6 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/pcr>
24. Techne TC-512 Thermal Cycler [Internet]. Keison.co.uk. [citado el 16 de noviembre de 2022]. Disponible en: [https://www.keison.co.uk/techne\\_tc512thermalcycler.shtml](https://www.keison.co.uk/techne_tc512thermalcycler.shtml)
25. Tamay DL, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. 2013;2(2):70-78.
26. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* [Internet]. 1988;239(4839):487–91. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.2448875>
27. New England Biolabs. PCR Protocol for Taq DNA Polymerase [Internet]. Neb.com. [citado el 11 de noviembre de 2022]. Disponible en:

- <https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/taq-dna-polymerase-with-standard-taq-buffer-m0273>
28. González Á. Biología molecular: Principios y aplicaciones. Medellín: ECOE Ediciones LTDA; 2019. pp. 333
  29. Morales NG. *Staphylococcus aureus*: caracterización fenotípica y detección molecular por pcr de producción de coagulasa (coa), DE BIOFILM(icaA) y resistencia a antibióticos (mecA) en cepas aisladas de pacientes con infección nosocomial. [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2013/octubre/0702215/Index.html>
  30. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock. Biología de los microorganismos. 12ª ed. Madrid: Pearson Educación SA; 2009. p.1094-96
  31. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS. Jawetz, Melnick y Adelberg: microbiología médica. 26ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2014. p.199-205
  32. Macfaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2003. p. 73-88.
  33. Myles IA, Datta SK. *Staphylococcus aureus*: an introduction. Semin Immunopathol [Internet]. 2012;34(2):181–4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-011-0301-9>
  34. Orenstein A. The Discovery and Naming of *Staphylococcus aureus*. 2006 [citado el 19 de noviembre de 2022]; Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/20b774960eff5caa566bf4134cfaee0606670bb>
  35. Velázquez-Meza M.E, Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. Salud Pública de México [Internet]. 2005;47(5):381-387. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10647509>
  36. Turgimbayeva A, Zein U, Zharkov DO, Ramankulov Y, Saparbaev M, Abeldenov S. Cloning and characterization of the major AP endonuclease from *Staphylococcus aureus*. DNA Repair (Amst) [Internet]. 2022;119(103390):103390. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2022.103390>
  37. Shanson DC. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect. 1981; 2(1):11-36.
  38. Appelbaum PC. Microbiology of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. CID [Internet]. 2007 [consultado el 30 de agosto de 2021]; 45(3): 165-70. Disponible en: <https://doi.org/10.1086/519474>
  39. Miranda NMG. Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. Bol Med Hosp Infant Mex. 2011;68(4):262-270.
  40. Chang S, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. N Engl J Med. 2003, 348(14): 1342- 7.

41. New England Biolabs. NdeI [Internet]. Neb.com. [citado el 2 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://international.neb.com/products/r0111-ndei>
42. New England Biolabs. XbaI [Internet]. Neb.com. [citado el 2 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://international.neb.com/products/r0145-xbai>
43. New England Biolabs. EcoRI [Internet]. Neb.com. [citado el 2 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://international.neb.com/products/r0101-ecori>
44. New England Biolabs. NotI-HF® [Internet]. Neb.com. [citado el 2 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://international.neb.com/products/r3189-noti-hf>
45. New England Biolabs. SalI-HF® [Internet]. Neb.com. [citado el 2 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://international.neb.com/products/r3138-sali-hf>
46. Zypzy Plasmid Miniprep Kit [Internet]. Zymo Research International. [citado el 2 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://zymoresearch.eu/products/zyppy-plasmid-miniprep-kit>
47. Zymoclean Gel DNA Recovery Kit [Internet]. Zymo Research International. [citado el 2 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://zymoresearch.eu/products/zymoclean-gel-dna-recovery-kit>
48. DNA Clean & Concentrator-5 [Internet]. Zymo Research International. [citado el 2 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://zymoresearch.eu/products/dna-clean-concentrator-5>
49. NanoDrop™ one/oneC microvolume UV-Vis Spectrophotometer [Internet]. Thermofisher.com. [citado el 2 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/mx/es/ND-ONE-W>
50. New England Biolabs. Transformation protocol [Internet]. Neb.com. [citado el 3 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://international.neb.com/protocols/2012/05/21/transformation-protocol>
51. Competent E. Coli DH5a [Internet]. Mclab.com. [citado el 21 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.mclab.com/Dh5-Alpha-Competent-E.-Coli.html>
52. New England Biolabs. Q5® high-fidelity 2X Master Mix [Internet]. Neb.com. [citado el 3 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://international.neb.com/products/m0492-q5-high-fidelity-2x-master-mix>
53. Traditional cloning basics - US. [citado el 3 de septiembre de 2023]; Disponible en: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/cloning/traditional-cloning-basics.html>