



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**“DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN GENÉTICA CON POSIBILIDADES DE SER  
USADA EN UN SISTEMA BIOSENSOR A MERCURIO”**

**TESIS INDIVIDUAL**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Licenciado en Biología

**Presenta:**

Oswaldo Alvarado Villanueva

**Dirigido por:**

Dr. Juan Campos Guillén

**SINODALES**

Dr. Juan Campos Guillén  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Rolando T. Bárcenas Luna  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Teresa García Gasca  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Biol. Jaime Ángeles Ángeles  
Director de la Facultad

\_\_\_\_\_  
Dr. Luis Gerardo  
Hernández Sandoval  
Director de Investigación y  
Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Mayo, 2010  
México

## RESUMEN

De manera tradicional la detección de metales se basa en métodos sensibles y específicos de química analítica, que no distinguen los inertes de aquellos que son disponibles a sistemas vivos. Los biosensores complementan métodos químicos analíticos, ya que detectan los metales disponibles a sistemas vivos. Las bacterias presentes en suelos contaminados con metales utilizan una variedad de mecanismos de resistencia, los cuales en éste trabajo fueron aprovechados para la construcción genética de un plásmido que contiene elementos de un biosensor a mercurio. La construcción genética llevada a cabo en este trabajo está basada en la expresión del gen reportero *gfp*. Su expresión está bajo la regulación de un nuevo promotor que se identificó en *Bacillus subtilis* y además es funcional en *Escherichia coli*. Al promotor se le adicionó una región reguladora para que fuera reconocida por la proteína activadora MerR de la transcripción en presencia de mercurio y tener control de la expresión del gen *gfp*, sin embargo no se observó ninguna respuesta diferencial de la expresión de *gfp*, medida en unidades relativas de fluorescencia cuando se creció la bacteria con y sin mercurio, esto se debe probablemente a que el promotor es muy fuerte. Estas características del promotor lo hacen interesante para ser empleado en sistemas de expresión de proteínas blanco.

**(Palabras clave:** Biosensor, metales pesados, mercurio, *merR*, GFP)

## SUMMARY

Metal detection is traditionally based on sensitive and specific methods of analytic chemistry, that does not distinguish the inert ones of those that are available to living systems, the biosensors complement chemical analytic methods, since they detect the available metals to living systems; the bacteria that growth in soils contaminated with metals use a variety of resistance mechanisms, which in this particular work were used to genetic construction of a mercury biosensor. The genetic construction made in this work is based in the expression of reporter gene *gfp*. Its expression is under the regulation of a new promoter identified in *Bacillus subtilis*, and also it is functional in *Escherichia coli*. A regulatory region was added to the promoter to be recognized by MerR, an activator protein of transcription in presence of mercury, Nevertheless, we not observed any response of the expression of *gfp*, measured as relative units of fluorescence when the bacteria growth in presence or absence of mercury, this is due probably to the fact that the promoter is very strong. These characteristics of the promoter make it interesting to be used in systems of expression of target proteins.

**(Keywords:** Biosensor, Heavy metals, mercury, detection, merR, GFP)

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis Padres, por la confianza, la educación, el apoyo brindado, y por ser los pilares de mi vida. A mis Hermanos y mi familia, por el apoyo en todo momento, la ayuda y las críticas en los momentos más necesarios.

Al Dr. Juan Campos Guillén, por su ayuda y apoyo en todo momento necesario, por su paciencia, confianza y amistad. Por aceptarme como estudiante en su laboratorio y corregir mis errores.

Al Doctor Rolando T. Bárcenas, por corregir y hacerme ver mis errores.

Al Doctor Juan Joel Mosqueda, por las correcciones, el apoyo y la confianza brindada.

A la Dra. Teresa García Gasca, por las correcciones, la paciencia, el tiempo y la confianza brindada.

Al M. en C. José castillo Tovar, por la formación brindada como estudiante, persona, y profesionista, por enseñarme como ser biólogo. A todos mis maestros, por enseñarme el mundo de la biología, por cambiarme la forma de ver el mundo.

A mis amigos biólogos Adolfo, Christopher, Campaña, Andrés, Alejandro, Nicanor, Daniela, Marycruz, Diana, Abril, Isabel, Janet; por su ayuda, apoyo, y críticas a mi trabajo, por estar en los momentos más necesarios, por levantarme a lo largo de mi carrera por la biología.

A mis compañeros de Laboratorio Xochitl, Abril, Julio, Laura y Claudia, por su ayuda prestada, el apoyo y la amistad.

A Raiza, por el apoyo brindado durante la elaboración de mi hipótesis, por la ayuda prestada en todo momento, por las duras críticas, por ser mi agenda, por su risa que mejora el humor siempre, por caminar a mi lado por la vida.

A Kanguro, Moisés, Rodrigo, Noé, Adriana, Alexis y Érika, por ser mis amigos incondicionales, por ser parte de mi formación de vida, por la ayuda brindada.

A la Dra. Anaid Antaramián S. y a la M en C. Adriana González G. del laboratorio de proteogenómica del INB, UNAM Campus Juriquilla, por proporcionarme la células competentes usadas a lo largo de mi tesis.

Al laboratorio A-15 de Neuroendocrinología del Desarrollo del INB, UNAM Campus Juriquilla, por las enzimas proporcionadas para la realización de algunos experimentos.

A la beca otorgada FOMIX QRO. 2008 CO2-102052.

# INDICE

	<b>Página</b>
Resumen	i
Summary	ii
Agradecimientos	iii
Índice	iv
Índice de cuadros	vi
Índice de figuras	vii
Abreviaturas	viii
I.INTRODUCCION	1
II.REVISIÓN DE LITERATURA	3
Importancia de los Biosensores	3
Efectos de los metales pesados en sistemas vivos	4
Descripción del funcionamiento del operón mer	7
Función reguladora de MerR	9
GFP como componente reportero	11
Uso de promotores en la inducción de la expresión de genes reporteros	12
III. HIPÓTESIS	13
IV. OBJETIVOS	13
V. METODOLOGÍA	14
Cepas bacterianas	14
Plásmidos	15
Oligonucleótidos	16
Preparación de células competentes de <i>E. Coli</i>	17
Transformación en <i>E. coli</i>	18
Técnicas de biología molecular	19
Amplificación mediante Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	19
Análisis en gel de los productos de reacción	21
Purificación de DNA plasmídico y productos de PCR.	21
Ligación de fragmentos de PCR a los vectores pJET y pUCP20	21

Extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina con SDS	22
Uso de enzimas de restricción	23
Secuenciación de DNA	23
Medición de la expresión de <i>gfp</i>	23
VI. RESULTADOS	25
Identificación del promotor en <i>Bacillus subtilis</i>	25
Modificación del promotor	26
Construcción genética	27
Inducción de la expresión de <i>gfp</i>	29
VII. DISCUSIÓN	31
Perspectivas para concluir el sistema como posible biosensor a mercurio	33
VIII. COMCLUSIONES	34
LITERATURA CITADA	35
APÉNDICES	39
Apéndice I	39
Apéndice II	42

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Listado de plásmidos usados en este trabajo	15
2	Secuencias de los oligonucleótidos usados en este trabajo	17
3	Enzimas usadas en este trabajo	23
4	Factores $\sigma$ y promotores de unión en <i>Bacillus subtilis</i> .	26

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Secuencia de la región distal del operón <i>trnD</i> .	25
2	Promotor modificado.	27
3	Construcción genética <i>gfp-merR</i> en PUCP20.	28
4	Posición de los oligonucleótidos para amplificar MerR.	28
5	Fluorescencia relativa a través del tiempo.	30
6	Construcción del plásmido pOS15-merR-GFP.	33

## ABREVIATURAS

°C	Grado centígrado
BrEt	Bromuro de Etidio
crf	Fuerza centrífuga relativa
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético.
LB	Medio Luria-Bertani
LBCB	Medio Luria-Bertani con Carbenicilina (100 µg/mL)
µg	Microgramo
µL	Microlitro
M	Molar
min	Minuto
mM	Milimolar
N	Normal
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucléico
RNAP	RNA polimerasa
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundo
UV	Ultravioleta
Volt	Voltio

## I. INTRODUCCIÓN

Las nuevas tecnologías han creado varios problemas ambientales y de salud pública. Objetivos importantes en investigación dirigidos a estos problemas son el descubrimiento y la eliminación de contaminantes, incluidos varios hidrocarburos, sustancias aromáticas, polímeros, y metales tóxicos (Selifonova *et al.*, 1993).

La detección de metales tradicionalmente se basa en métodos sensibles y específicos de química analítica. Sin embargo, tales métodos no pueden distinguir contaminantes que están disponibles a sistemas biológicos de aquellos que existen en el ambiente en formas inertes, no disponibles. Esta es una preocupación particular con respecto a metales tóxicos (Selifonova *et al.*, 1993). La biodisponibilidad es una cuestión crítica en la determinación de la toxicidad en metales (Campbell *et al.*, 1988 *in* Selifonova *et al.*, 1993).

Los biosensores pueden complementar métodos químicos analíticos mediante la detección de metales biológicamente disponibles en muestras ambientales. Un biosensor efectivo para la determinación de metales biológicamente disponibles (y otros polutantes) debe contener un receptor sensible y un componente reportero. Los genes reguladores responsables de la inducción de sistemas microbianos especializados pueden ser considerados como receptores sensibles, específicamente respondiendo a un compuesto blanco presente en concentraciones fisiológicamente significativas (Selifonova *et al.*, 1993).

El uso de bacterias resistentes a metales puede ayudar a remover los metales de ambientes contaminados. El entendimiento de la regulación de la resistencia a metales pesados podría ser útil en el tratamiento de desechos biológicos y en la estimación del impacto que la actividad industrial puede tener en ecosistemas naturales (Permina *et al.*, 2006).

A pesar de que hay diversos métodos para la detección del mercurio en el medio ambiente (Selifonova *et al.*, 1993), muchos de estos no consiguen distinguir aquellos contaminantes que están disponibles biológicamente, de aquellos que están inertes. El diseño de sensores incluidos en sistemas biológicos permite una aproximación en el conocimiento de los contaminantes biológicamente disponibles. Aunque ya existen diseños que permiten obtener aproximaciones a esta información, es necesario el diseño de nuevos biosensores que presenten diferentes reporteros y modificaciones en la sensibilidad para así cuantificar la información de maneras diversas. De este modo, el diseño de una bacteria biosensora permitirá una mejor cuantificación de mercurio, y una mejor comprensión en la ingeniería genética para obtener construcciones de diversa índole.

## II. REVISION DE LITERATURA

### Importancia de los Biosensores

La contaminación por mercurio se considera un problema ambiental y de salud pública, por este motivo se han desarrollado biosensores microbianos dirigidos a la biodisponibilidad de Hg(II) para complementar análisis físicos o químicos. Las técnicas de detección químicas convencionales tales como la espectroscopía de emisión atómica (AES) y la espectroscopía de fluorescencia atómica con vapor frío (CVAFS) son altamente sensibles, pueden medir la concentración total de la contaminación por un metal pesado, pero son muy costosos en términos de equipo y mantenimiento, y su manejo es complejo. Los microorganismos que detectan cuantitativamente toxinas en el medio ambiente ofrecen una alternativa menos costosa que los métodos químicos y tienen la ventaja de detectar la fracción biológicamente disponible del metal pesado (Lyngberg *et al.*, 1999).

Uno de los objetivos principales en las medidas para definir metales es que proporcionen información cuantitativa en la biodisponibilidad del metal. La biodisponibilidad como concepto ha sido descrito de maneras diversas, pero se asume comúnmente que significa la capacidad de un metal para ser tomado por un organismo y cruzar una membrana biológica (Batley *et al.*, 2004).

Los biosensores complementan métodos químicos analíticos mediante la detección de metales biológicamente disponibles en muestras ambientales. Un biosensor eficaz para la determinación de metales disponibles biológicamente (y otros contaminantes) debe contener un receptor sensible y un componente reportero (Selifonova *et al.*, 1993).

Una cuestión en la interpretación de biosensores que no se ha estudiado a fondo es el papel de las funciones reguladoras y genes que especifican el transporte y el metabolismo del compuesto blanco. Estos factores determinan las concentraciones intracelulares de las sustancias blanco y pueden cambiar el comportamiento del biosensor, en particular su sensibilidad al blanco (Selifonova *et al.*, 1993).

### Efectos de los metales pesados en sistemas vivos

Algunos metales, incluido el hierro, zinc, cobre, manganeso, etc. son usados como micronutrientes en los procesos redox, regulación de la presión osmótica, y también como componentes enzimáticos, otros metales no son esenciales; sin embargo, algunos como el zinc y el cobre son tóxicos en altas concentraciones (Permina *et al.*, 2006).

Las amenazas de salud, ambientales y humanas en todo el mundo son planteadas por la contaminación de metales de transición. Los metales pueden ser introducidos en el ambiente tanto por rutas naturales como por antropogénicas (Smalla *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2008).

Muchos estudios han registrado efectos tóxicos y carcinógenos inducidos cuando humanos y animales son expuestos a ciertos metales (Valko *et al.*, 2005). El entendimiento del consumo y la distribución de los metales tóxicos es crucial en el diagnóstico y la identificación de la contaminación y enfermedades inducidas por metales pesados. Muchos de esos metales son riesgosos al ser absorbidos, incluso en concentraciones de minuto, causando severos efectos neuronales y enfermedades cardiovasculares y digestivas. El Mercurio es el metal pesado más común y más ampliamente distribuido, y en particular es un potente inhibidor de muchas funciones proteicas, y puede ser rápidamente absorbido en los pulmones, a través de la piel, o por ingestión. Muchas de las enfermedades inducidas por la

absorción de compuestos de mercurio son causadas por una exposición crónica de bajo nivel al metal, o por una exposición temporal de alto nivel debido a negligencia humana y contaminación (Chapleau *et al.*, 2008).

Los compuestos organomercuriales hidrofóbicos cruzan también la barrera hematoencefálica, permitiendo su acumulación en el cerebro. El Cloruro de mercurio puede ser convertido en compuestos organomercuriales, tales como el metil-mercurio, que es tóxico debido a las fuertes interacciones con su medio ambiente hidrofóbico de proteínas y membranas (Chapleau *et al.*, 2008).

Los efectos de una alta concentración de metales resultan en daño en el DNA y en la membrana así como pérdida de funciones enzimáticas (Nies, 1999 *in* Permina *et al.*, 2006). Aunque los metales pesados estén presentes naturalmente en algunos ecosistemas, su uso industrial conduce a problemas ambientales serios (Permina *et al.*, 2006). La exposición a metales es también asociada con altos niveles de daño intracelular oxidativo, desnaturalización de proteínas, y rompimiento en la cadena de DNA; el incremento por estrés oxidativo puede ser causado por reacciones redox catalizadas por metales, disminución de las reservas de glutatión, o inhibición de las enzimas que remueven las especies de oxígeno reactivo (Jin *et al.*, 2008).

Los metales de transición también pueden alterar la función de las proteínas mediante unión directa a grupos sulfhidrilo, o por sustitución de metales que actúan como cofactores. Además del daño celular, la exposición a metales está asociada con la activación de una variedad de vías de transducción de señales intracelulares, incluidas aquellas reguladas por proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), NF- $\kappa$ B, y cinasas dependientes de calcio. La inapropiada activación de esas vías puede contribuir en la etiología del cáncer inducido por metales (Valko *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2008).

Para defenderse contra la toxicidad de los metales se han desarrollado sofisticados mecanismos de defensa, estos incluyen regulación intracelular de la concentración de metales vía quelación y bombas de iones, remoción o reactivación de especies de oxígeno, y reparación de daño inducido por metales (Jin *et al.*, 2008).

La exposición a mercurio incrementa la incidencia de resistencia a mercurio en poblaciones de bacterias de suelo y agua, así como en la microbiota oral e intestinal de primates (Summers, 1992).

Hay dos clases de resistencia al mercurio: de espectro estrecho y espectro amplio, la resistencia de espectro estrecho especifica resistencia a mercurio inorgánico y a algunos pocos organomercuriales, tales como la merbromina, que no es modificada por la bacteria resistente. La resistencia de amplio espectro especifica resistencia adicional a un amplio rango de complejos organomercuriales, como el acetato de fenilmercurio, que es modificado por la bacteria resistente (Gambill y Summers, 1985).

La resistencia a compuestos de mercurio inorgánico Hg(II) (*mer*) es ampliamente encontrada en eubacteria. El locus *mer* puede encontrarse en plásmidos bacterianos o en DNA cromosómico, en elementos genéticos móviles (MGE) (Smalla *et al.*, 2006) y conferir resistencia vía transporte y reducción (Ross *et al.*, 1989).

Los microorganismos muestran una variación extraordinaria en sus propiedades metabólicas, estructura celular y estilos de vida. Varios mecanismos fueron propuestos como responsables de las diferencias observadas entre especies de bacteria y archaea, y se considera una de las más importantes la conjugación bacteriana como mecanismo de transferencia horizontal de genes (Peterka *et al.*, 2000).

La habilidad de las bacterias de explotar nuevos ambientes y de responder a nuevas presiones selectivas durante la evolución bacteriana se explica por la adquisición de nuevos genes mediante transferencia horizontal. La extensión genética de los genes responsables de la resistencia a contaminadores tóxicos, incluidos metales pesados, podría facilitar la supervivencia microbiana y actividades en el ambiente contaminado (Tóthová *et al.*, 2006).

Para protegerse de concentraciones de metales tóxicas, las bacterias utilizan una variedad de mecanismos de resistencia que implican barreras de permeabilidad, secuestro intracelular y extracelular, bombas de flujo, desintoxicación enzimática y reducción (Nies, 1999 *in* Permina *et al.*, 2006).

Este es un proceso ideal para organismos unicelulares como las bacterias, pero no así para organismos multicelulares, la mayoría de cuyas células son eliminadas de la superficie del organismo. Así, los organismos multicelulares usan secuestro intracelular de metales mediante proteínas ricas en tioles y polipéptidos incluyendo metalotioneínas (en plantas y animales) y fitoquelatinas (en plantas) (Qin *et al.*, 2006).

Una cuestión importante es que mientras que la resistencia a mercurio para muchas cepas resistentes, plásmidos y transposones ha sido estudiada en gran detalle a nivel molecular, los estudios sobre su ecología y que proporcionan datos en su abundancia y diversidad según la contaminación ambiental de Hg son relativamente raros (Smalla *et al.*, 2006).

#### Descripción del funcionamiento del operón *mer*

Actualmente, uno de los loci de resistencia a metales mejor estudiados, es el que confiere resistencia a compuestos de mercurio (*mer*) (Silver y Misra, 1988 *in* Huerta *et al.*, 2006). Este locus es de especial interés, ya que el mecanismo de

resistencia resulta en la transformación de compuestos de mercurio desde su forma tóxica (tanto iónica como orgánica) a su forma elemental menos tóxica, Hg(0) (Walsh *et al.*, 1988; Misra, 1992) que es extremadamente volátil y deja la célula por difusión a través de la membrana celular (Ravel *et al.*, 2000).

Este operón de resistencia a mercurio, localizado en el transposón *Tn21* de *Shigella flexneri*, contiene 5 genes estructurales, *merTPCAD*, que constituyen un sistema destoxicante que transporta Hg(II) en las células (vía MerT, MerC y MerP), donde los iones de Hg(II) solubles son reducidos a mercurio volátil Hg(0) por MerA que es una proteína mercurio reductasa, flavin oxidoreductasa dependiente de NADPH, toma los iones Hg(II) y cataliza una reducción de dos electrones para obtener Hg(0). Si las funciones de transporte son expresadas en ausencia de reductasa, las células se vuelven hipersensibles a los compuestos de mercurio. Este sistema está bajo control transcripcional positivo y negativo por la respuesta a Hg(II) de la proteína metaloregulatoria MerR (Heltzel *et al.*, 1987; Walsh *et al.*, 1988; Griffin *et al.*, 1989; Barkay *et al.*, 2003 *in* Song *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2006).

El quinto gen, *merD*, codifica una proteína pequeña y de baja abundancia, que presenta homologías con *merR*, se encuentra cercanamente yuxtapuesta al extremo carboxy-terminal (3') de *merA* y ha sido propuesta recientemente como un interruptor de la transcripción de los genes estructurales una vez que el Hg(II) ha sido reducido por la mercurio reductasa, MerA. Bacterias mutantes que carecen de *merD* muestran un incremento en la expresión del operón *mer*, por lo que se sugiere que tiene una función reguladora, sin embargo, las mutantes carentes de *merD* tienen solamente un ligero efecto en la resistencia de Hg(II) en plásmidos multicopia (Lee *et al.*, 1989; Condee y Summers, 1992; Hamlett *et al.*, 1992; Summers, 1992).

En *Tn21* y *Tn501* la regulación transcripcional positiva y negativa del operón *mer* está mediada por MerR expresada desde el promotor divergente

*merR*. La proteína MerR Dimérica se une a un ion simple de Hg(II) en un puente tri coordinado, de metal tiolado entre las subunidades de MerR (Condee y Summers, 1992).

### Función reguladora de MerR

El estudio de la resistencia de mercurio comenzó con la investigación en el aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* (Moore, 1960 *in* Permina *et al.*, 2006). Entonces se descubrió la primera enzima de desintoxicación de mercurio y después de secuenciar el locus de la resistencia al mercurio, se propuso que *merR* podría actuar como un regulador (Brown *et al.*, 1986 *in* Permina *et al.*, 2006; Summers y Sugarman, 1974 *in* Permina *et al.*, 2006).

El arquetipo de la familia MerR de activadores transcripcionales, es el regulador de los operones de la resistencia al mercurio en las bacterias Gram negativas, encontrados en los elementos genéticos móviles Tn21 y Tn501 (Brown *et al.*, 1983 *in* Brown *et al.*, 2003).

En bacterias, los sistemas de resistencia a metales son regulados por factores de transcripción de las familia MerR (COG0789), ArsR/SmtB, CusRS, SilRS y PcoRS (Permina *et al.*, 2006). La familia COG0789 consiste de reguladores duales que pueden tanto reprimir y activar la transcripción de genes que forman los sistemas de resistencia a metales, aunque la efectividad de represión o activación puede diferenciarse entre reguladores (Permina *et al.*, 2006).

La proteína arquetipo MerR controla su propia transcripción desde el promotor *merR* (Pr) y la transcripción desde el operón *mer* (promotor Pt). El promotor Pt controla la transcripción de los genes *mer* necesarios para la desintoxicación del mercurio. En las bacterias Gram negativas esos dos

promotores están directamente adyacentes en direcciones divergentes. MerR se une en medio y en contacto con ambos promotores. La activación de la transcripción desde el promotor Pt ocurre en presencia de mercurio el cual se une a la proteína MerR. En ausencia de mercurio, la transcripción desde Pt está reprimida. El interruptor entre la activación y represión no incluye la disociación de la proteína de su sitio de unión (Ravel *et al.*, 2000; Permina *et al.*, 2006).

En *E. coli*, la RNA polimerasa está compuesta de un núcleo compuesto por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ , y  $\omega$  y uno de una variedad de factores  $\sigma$ , siendo el primario de éstos el factor  $\sigma^{70}$ , que es esencial en la transcripción general para el crecimiento exponencial de las células. El modelo canónico del promotor  $\sigma^{70}$  está definido como un simple par de hexámeros posicionados a las -35 y -10 pares de bases desde el inicio de la transcripción (+1), con sus respectivas secuencias consenso TTGACA y TATAAT, y separadas por un espaciador de 15 a 21 pares de bases (Huerta *et al.*, 2006).

Todos los reguladores conocidos de COG0789 (reguladores sensibles a metales, así como SoxR y BmrR) se unen a secuencias palindrómicas localizadas entre las secuencias -35 y -10 del promotor del operón de resistencia. El promotor en sí mismo tiene una estructura inusual, ya que el espaciador entre las cajas de promotor es de 19 o 20 pares de bases (pb). Tales promotores normalmente son débiles (Brown *et al.*, 2003 in Permina *et al.*, 2006).

La región reguladora *mer* está compuesta de los promotores divergentes y sobrelapados  $P_{TPCAD}$ , y  $P_R$ , y el sitio de unión a MerR. El sitio de unión a MerR contiene un palíndromo de dos brazos de 7 pb separados por 4 pb y es inusual al estar localizado entre los hexámeros de reconocimiento a la RNA polimerasa (RNAP) del promotor  $P_{TPCAD}$ . La apoproteína MerR unida a esta estructura de díada simétrica reprime la transcripción de los genes estructurales en ausencia de Hg(II), (Hobman, 2007) aunque también permite la unión de la RNAP a  $P_{TPCAD}$  en

ausencia de Hg(II) (Condee y Summers, 1992). La región del promotor merTPCAD tiene además una considerable homología con los dos hexámeros consenso -35 y -10 para promotores de E $\sigma^{70}$  (Ross *et al.*, 1989).

De este modo este regulador fue propuesto como activador de los genes mer en presencia de sales de Hg(II), y un represor débil en ausencia de Hg(II) (Lund *et al.*, 1986 in Brown *et al.*, 2003).

La proteína MerR de Tn21 demuestra una alta afinidad y especificidad por Hg(II) durante ensayos de transcripción *in vivo* e *in vitro*, respondiendo a Hg(II) a concentraciones tan bajas como 10<sup>-9</sup> M en presencia de ligandos de tiol compitiendo en concentraciones de 1 a 5 mM. Cd(II) y Zn(II) no activan la transcripción mer *in vivo*, pero la activan *in vitro* a concentraciones 100 y 1000 veces más altas respectivamente, que Hg(II) (Song *et al.*, 2003).

La secuencia predicha de MerR ha conducido a la especulación de que algunos o todos los cuatro residuos de cisteína en la mitad carboxy-terminal de la proteína desempeñan un papel en su función, por lo que estos residuos son candidatos probables para la interacción con Hg(II) (Ross *et al.*, 1989).

### GFP como componente reportero

La proteína GFP tiene una forma simétrica de barril formada por 11 láminas  $\beta$ , y un cromóforo en su centro. El cromóforo se forma de manera autocatalítica mediante la formación de una columna de anillos hidrocarbonados implicando a los residuos S65, Y66, y G67 (Chapleau *et al.*, 2008).

El factor de transcripción MerR de unión a mercurio ha sido empleado exitosamente para inducir la expresión de proteínas elegidas como reporteros, tales como lux,  $\beta$ -galactosidasa y GFP. La expresión de tales biosensores en

varios organismos puede ser usada específicamente para detectar mercurio en ambientes contaminados (Chapleau *et al.*, 2008).

### Uso de promotores en la inducción de la expresión de genes reporteros

La regulación de la expresión de genes en las bacterias sucede de manera primaria a nivel de transcripción. Aunque las proteínas de unión al DNA (represores y activadores) pueden afectar la eficiencia de la transcripción de manera significativa, la especificidad de la reacción de transcripción radica en las interacciones entre la enzima de transcripción (RNA polimerasa [RNAP]) y los sitios del DNA (promotores) con los que hace contacto. Las RNAPs bacterianas se aíslan generalmente de dos formas distintas: El núcleo de la RNAP que cataliza la polimerización de los ribonucleótidos en el RNA complementario a partir de una secuencia de templado de DNA, y la holoenzima RNAP, que contiene las subunidades de la molécula núcleo ( $\beta$ ,  $\beta'$ , y  $\alpha_2$ ) y una proteína adicional (el factor  $\sigma$ ) que permite a la holoenzima reconocer los elementos del promotor e iniciar la transcripción a partir de esos sitios. Mucho de lo que se conoce de la interacción entre  $\sigma$ , el núcleo de la RNAP, y los promotores, vino originalmente de experimentos hechos con RNAP de *E. coli*. Estos estudios mostraron que la especificidad de la holoenzima RNAP por sus promotores ancestrales y que la asociación de  $\sigma$  con el núcleo RNAP sea pasajera. La holoenzima inicia la transcripción; sin embargo poco después de esta iniciación, la subunidad  $\sigma$  se desprende dejando el núcleo de la enzima adelantado para elongar el transcrito iniciado (Haldenwang, 1995).

### III. HIPÓTESIS

La región 3' cercana al terminador del operón *trnD* en *Bacillus subtilis* contiene regiones promotoras de la transcripción que unidas a una región operadora de la proteína merR pueden regular la transcripción de merR en presencia de compuestos de mercurio.

### IV. OBJETIVOS

#### Objetivo general

Identificar un promotor localizado en la parte distal del operon *trnD* en *Bacillus subtilis* y determinar su potencial en sistemas de expresión.

#### Objetivos particulares

- 1.- Identificar regiones promotoras en la parte distal del operon *trnD*
- 2.- Hacer una construcción genética empleando un promotor nuevo y modificado para regular la expresión del gen *gfp*.

## V. METODOLOGÍA

### Cepas bacterianas

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo fueron:

**XL1-Blue MRF'**  $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^{\text{r}}\text{)]}$ , que se usó como hospedador en todas las manipulaciones genéticas.

**Top 10** ( $\text{mrr-hsdRMSmcrBC})\Phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15 } \Delta\text{lacX74 deoR recA1 araD139 } \Delta(\text{araAleu})7697 \text{ galU galK rpsL endA1 nupG}$ ), Transformada con el plásmido pMUTIN-GFP, que se usó para obtener el gen GFP mediante amplificación por PCR.

**HMS174** [F-  $\text{recAI rpoB331 hsdRI9 X- IN}(\text{rmD-rrnE})$ ], transformada con el plásmido pUCD615 (Rogowsky *et al.*, 1987) con el fragmento clonado pOS15 (Selifonova *et al.*, 1993) que se usó para obtener éste vector.

Además se usó una cepa aislada de la localidad de San Joaquín, Querétaro, identificada como ***Pseudomonas sp.*** que presentó características como: resistencia a mercurio y presencia del operón *mer*.

Las cepas XL1-Blue MRF' transformada, Top 10 y HMS174 se crecieron en medio Luria Bertani (LB) con carbenicilina (100  $\mu\text{g/mL}$ ); la cepa XL1-Blue transformada con la construcción final se creció en medio LB con carbenicilina (100  $\mu\text{g/mL}$ ) y  $\text{HgCl}_2$  (50 $\mu\text{g/ml}$ ); la cepa XL1-Blue a usarse en la preparación de células competentes se creció en medio LB; La cepa de *Pseudomonas sp.* se creció en medio LB con carbenicilina (200  $\mu\text{g/mL}$ ).

## Plásmidos

Los plásmidos usados en el presente trabajo se enlistan en la tabla 1.

Los detalles referentes a los plásmidos usados aparecen en el apéndice II.

Tabla 1. Listado de plásmidos usados en este trabajo

Plásmido	Características	Fuente (Referencia)
pJET 1.2	Vector para clonación de productos de PCR, Sitio múltiple de clonación en Eco47IR, selección positiva mediante inactivación de Eco47IR, alto número de copias en <i>E. coli</i> , PMB1 replicón <i>rep</i> , <i>amp<sup>r</sup></i> , <i>lac</i> + proteína de unión, promotor PlacUV5, ori ColE1	Fermentas
pMUTIN-GFP+	Vector de integración a <i>Bacillus subtilis</i> , GFP <sup>+</sup> , promotor Pspac, <i>lac</i> , <i>Erm<sup>r</sup></i> , <i>Amp<sup>r</sup></i> , ori ColE1, <i>trpAt</i> , T1T1, T0.	Kaltwasser <i>et al.</i> , 2002
pOS15	<i>Km<sup>r</sup></i> , <i>Ap<sup>r</sup></i> , ori Sa, construcción de fusión, genes <i>lux</i> CDABE, genes <i>mer</i> Ro/pTPCAD.	Selifonova <i>et al.</i> , 1993
pUCP20	Vector para clonación de productos de PCR, vector de secuenciación, sitio múltiple de clonación, ori ColE1, ori <i>P. aeruginosa</i> , <i>LacZα</i> , <i>Amp<sup>r</sup></i> .	West <i>et al.</i> , 1994

## Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos cebadores utilizados en este trabajo se diseñaron a partir de las secuencias de los genes «blanco» obtenidas de genbank, la secuencia de cada uno de ellos se muestra en la tabla 2.

Los oligonucleótidos 5702 y 992 se usaron para amplificar el gen merR, de aproximadamente 440 pb, a partir de una colonia de *Pseudomonas sp.*; Para adicionar el promotor y terminador de la transcripción al gen mer R se emplearon los oligonucleótidos 6142 y 1553 y los oligonucleótidos 1875 y 1878. El oligonucleótido 1875 tiene el sitio de restricción KpnI, mientras que el oligonucleótido 1878 tiene el sitio de restricción BamHI. Estos sitios de restricción fueron usados para efectuar la clonación del fragmento de amplificación en el plásmido pUCP20 (Figura 1).

Los oligonucleótidos 1877 y 1878 se utilizaron para amplificar el gen GFP, de aproximadamente 844 pares de bases, a partir del plásmido pMUTIN-GFP+ extraído de una cepa de *E. coli* Top10. Ambos oligonucleótidos tienen el sitio de restricción KpnI, que fue usado para efectuar la clonación del fragmento en el plásmido pUCP20 (Figura 1).

Los oligonucleótidos 380 y 381 se utilizaron para amplificar el fragmento completo merR + GFP clonado en el plásmido pUCP20, de aproximadamente 1250 pb. Ambos oligonucleótidos tienen los sitios BamHI y XbaI. Todos los sitios de restricción están indicados en la tabla 2.

Los oligonucleótidos 991 y 993 son oligonucleótidos intermedios «reverse» específicos para merR de *E. coli* y *Pseudomonas* respectivamente, éstos se usaron para comprobar la existencia del gen a partir de las cepas de donde se obtiene el templado.

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos usados en este trabajo

Oligonucleótido	Secuencia	Proveedor
5702	5' GGAAGGAGATATACATATGGAAAACAATTTGGAGAACC 3'	IBT-UNAM
1553	5' CCCGCTCATTAGGCGGGCTGCCTACACCGCGTCCGC 3'	IBT-UNAM
6142	5' TACTCATGTACGGAGAGGAGATATACAT 3'	IBT-UNAM
992	5' CTACACCGCGTCCGCACTGC 3'	IBT-UNAM
1875	5' AAAATTggatccTAAGTTGAATTGGTGTGTTTGTGTTTTATCATTATA ACTAATACTCATGTACGGAG 3'	SIGMA
1877	5' ACTCAAG <b>GTACCC</b> CGCTTGAATCCGTACATGAGTACGGAAGTAT AACTAATCATCGGCCGGAAGG 3'	SIGMA
1878	5' ACAACT <b>GGTACCC</b> GAAAAAAGCCCGCTCATTAGGCGG 3'	SIGMA
380	5' AAAATT <i>TCTAG</i> AggatccTAAGTTGAATTGGTGTGTTTGTG 3'	IBT-UNAM
381	5' ACTCAA <i>TCTAG</i> AggatccCGCTTGAATCCGTACATGAGTACGG 3'	IBT-UNAM
991	5' CTAAGGCATAGCCGAACCTGCC 3'	IBT-UNAM
993	5' GGTGCCATCCTCCAGCCG 3'	IBT-UNAM

#### Sitios de restricción

Sitio BamHI            **minúsculas negritas**

5'-G<sup>^</sup>GATC C-3'

3'-C CTAG<sup>^</sup>G-5'

Sitio KpnI            **NEGRITAS SUBRAYADO**

5'-G GTAC<sup>^</sup>C-3'

3'-C<sup>^</sup>CATG G-5'

Sitio XbaI            ***NEGRITAS CURSIVAS***

5'-T<sup>^</sup>CTAG A-3'

3'-A GATC<sup>^</sup>T-5'

#### Preparación de células competentes de *E. Coli* (Inohue *et al.*, 1990)

Se tomó una asada de bacterias de una caja petri con la cepa XL1-Blue, se inoculó en un matraz con 20 mL de caldo LB y se incubó por 16 horas a 37 °C en agitación (120 rpm), posteriormente se tomó 1 mL del cultivo de 16 horas y se inoculó en otro matraz con 20 mL de caldo LB, que también se incubó en agitación

a 37 °C, a este inóculo se le tomaron periódicamente lecturas de densidad óptica con un espectrofotómetro (Thermo) con el haz de luz ajustado a una longitud de onda de 600 nm, para observar el crecimiento de las bacterias, cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.385 unidades se alicuotaron depositando 1 mL de las células en tubos de 1.5 mL y se incubaron en hielo durante 10 minutos, después se centrifugaron a 2700 crf durante 10 minutos en una microcentrífuga Eppendorf® 5418 para obtener el paquete celular y se eliminó todo el sobrenadante, la pastilla de bacterias se resuspendió en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M a 4 °C, en seguida se centrifugó usando los valores descritos anteriormente y se decantó todo el sobrenadante, la pastilla celular se resuspendió en 100 µL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M a 4 °C y se usó en las transformaciones necesarias.

#### Transformación en *E. coli* (Hanahan, 1983)

Se tomaron alícuotas de 100 µL de células competentes (XL1-Blue) contenidas en tubos Eppendorf de 1.5 mL, y se les agregó 5 µL de reacción de ligación a 0 °C, se incubaron en hielo durante 20 minutos, y posteriormente las células fueron sometidas a choque térmico a 42 °C durante 2 minutos, se colocaron inmediatamente en hielo durante 2 minutos, y se les agregó 0.5 mL de caldo LB; las células se incubaron a 37 °C en agitación durante 30 minutos, posteriormente se centrifugaron a 13 000 rpm durante 2 minutos, la pastilla de bacterias se resuspendió en 100 µL del mismo medio de cultivo y se sembraron por extensión en medio de cultivo LB sólido usando una varilla de vidrio. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 18 horas.

## Técnicas de biología molecular

### Amplificación mediante Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación de los genes de interés se llevó a cabo a partir de DNA plasmídico extraído de una cepa de *Pseudomonas sp.* para amplificar *merR*, a partir de una cepa de *Escherichia coli* con pMUTIN-GFP para amplificar GFP, y de la transformación conseguida con estos productos de PCR (clonados en pUCP20 e insertados en *E. coli*) para amplificar *merR-GFP*.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con las siguientes combinaciones de oligonucleótidos:

PCR	Oligonucleótidos utilizados	Blanco
1	5702-991	<i>merR E. coli</i>
2	5702-992	<i>merR Pseudomonas sp.</i>
3	6142-992	<i>merR + 5702-992</i>
4	1875-1878	<i>merR + 6142-992</i>
5	1877-1878	<i>gfp</i>
6	380-381	<i>merR-gfp</i>

Las cantidades utilizadas de cada uno de los reactivos para la PCR fueron las siguientes:

Mezcla de reacción (Supermix, Invitrogen)	27 $\mu$ L
Oligonucleótido forward (80-100 ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Oligonucleótido reverse (80-100 ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
DNA plasmídico (>100 ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L

El programa utilizado para las reacciones de PCR 1, 2, 3 y 4 fue:

- I. 94 °C / 2 min.
- II. 94 °C / 1 min.  
45 °C / 40 seg.  
72 °C / 40 seg.  
x30
- III. 72 °C / 5 min.
- IV. 4 °C

El programa utilizado para la reacción de PCR 5 fue:

- I. 94 °C / 2 min.
- II. 94 °C / 1 min.  
45 °C / 40 seg.  
72 °C / 1 min.  
x30
- III. 72 °C / 5 min.
- IV. 4 °C

El programa utilizado para la reacción de PCR 6 fue:

- I. 94 °C / 3 min.
- II. 94 °C / 1 min.  
45 °C / 40 seg.  
72 °C / 1.5 min.  
x30
- III. 72 °C / 5 min.
- IV. 4 °C

### Análisis en gel de los productos de reacción (Sambrook y Russel, 2001)

Para comprobar la amplificación de la PCR, extracción de plásmido o digestión, se llevó a cabo un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1%. Se colocó el gel en el interior de la cámara de electroforesis y se cubrió en su totalidad con solución amortiguadora TAE 1X. El DNA se mezcló en relación 1:3 con solución de carga 6x Naranja G, y se depositó en cada uno de los pozos del gel de agarosa. Se aplicó una corriente de 74 volts durante 45 min. Una vez completada la electroforesis, se retiró el gel y se sumergió en una solución de bromuro de etidio (BrEt). El resultado se observó con la ayuda de un fotodocumentador con luz UV (*BioRad*).

### Purificación de DNA plasmídico y productos de PCR.

Se purificó el DNA extraído o el producto de PCR utilizando el kit Clean & Concentrator de la marca Zymo, siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante.

### Ligación de fragmentos de PCR a los vectores pJET y pUCP20

Los productos de PCR se digirieron con las enzimas correspondientes usando las instrucciones provistas por el fabricante, y se digirieron de acuerdo a los sitios de restricción presentes en los oligonucleótidos cebadores, del mismo modo que el plásmido en el que se realizó la clonación; posteriormente se mezclaron en una reacción los productos digeridos en una proporción 3:1 molar del producto de PCR con respecto al plásmido, y se ligaron usando T4 DNA Ligasa (Fermentas) siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante (Fig. 1).

## Extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina con SDS (Birnboim & Dolly, 1979).

### Preparación de células

Se inoculó una colonia transformante en 5 mL de caldo LB con carbenicilina (100 µg/mL), el cultivo se incubó a 37 °C durante 18 horas en agitación vigorosa (120 rpm), concluido este tiempo se tomaron 1.5 mL del cultivo y se vertieron en tubos tipo Eppendorf, se centrifugaron (microcentrífuga Eppendorf® 5418) a 13000 rpm durante 2 minutos para obtener una pastillas de bacterias. El sobrenadante se extrajo con ayuda de una micropipeta para dejar la pastilla lo más seca posible.

### Lisis de células

El paquete celular se resuspendió en 150 µL de Solución I con ayuda de un agitador vortex, posteriormente se agregaron 300 µL de solución II, el contenido se mezcló gentilmente por inversión y se dejó actuar por 1 minuto; se agregaron 200 µL de cloroformo, se mezcló gentilmente por inversión y se dejó actuar por 1 minuto; Se agregaron 200 µL de solución 3, se agitó vigorosamente en vórtex durante 3 segundos y se incubó en hielo durante 3 minutos; se centrifugó durante 2 minutos a 12000 rpm, de este producto se recuperó la fase acuosa (el sobrenadante) a un tubo Eppendorf nuevo, evitando transferir cualquier traza de la fase sólida e inferior; se agregó un volumen igual de isopropanol (750 µL), se mezcló brevemente con ayuda de un agitador vortex, y se centrifugó durante 15 minutos a 12000 rpm; posteriormente se eliminó el isopropanol, se agregó 1 mL de etanol al 70% para lavar la pastilla y se centrifugó por 2 minutos a 12000 rpm; se decantó el etanol cuidadosamente para evitar perder la pastilla de DNA; se secó a 65 °C durante 10 minutos, una vez seca la pastilla, se resuspendió en 30 µL de agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC).

### Uso de enzimas de restricción

Se usaron enzimas de restricción de las marcas Fermentas e Invitrogen, Las digestiones se llevaron a cabo en reacciones por separado usando las instrucciones proporcionadas por el fabricante, Las enzimas se enlistan en la tabla 3. Las enzimas BamHI, KpnI y XbaI se utilizaron para generar extremos cohesivos en los productos de PCR correspondientes y en los vectores de clonación.

Tabla 3. Enzimas usadas en este trabajo. Se muestra el sitio blanco respectivo en la cadena de DNA, y el proveedor de las mismas.

Enzima	Sitio Blanco	Marca
BamHI	5'-G <sup>^</sup> GATC C-3' 3'-C CTAG <sup>^</sup> G-5'	Fermentas
KpnI	5'-G GTAC <sup>^</sup> C-3' 3'-C <sup>^</sup> CATG G-5'	Invitrogen

### Secuenciación de DNA

Las secuencias de los productos obtenidos por PCR se comprobó mediante secuenciación, esta se llevó a cabo en los laboratorios del CINVESTAV-IPN campus Irapuato, mediante la técnica de Sanger. El análisis bioinformático de las secuencias se efectuó usando el programa ClustalW.

### Medición de la expresión de *gfp* (Kaltwasser *et al.*, 2002)

La cepa pUCP20-merR-gfp se cultivó en 25 mL de medio LB a 37 °C hasta obtener una densidad óptica de 0.5 (250 unidades Klett), se recuperaron 2 mL de cada muestra y se obtuvo el paquete celular mediante centrifugación (2 min, 13000 rpm), la pastilla se lavó con amortiguador de fosfato (0.1 M fosfato de sodio, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0), se resuspendió y se colocó en hielo, de cada muestra se tomaron 50 µL y se diluyeron en 1950 µL de solución de fosfatos sin mercurio y con mercurio a concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, y 1 µg/mL, se colocaron dentro de cubetas de medición de fluorescencia, que se llevó a cabo mediante el uso de un fluorómetro (*Bio-Rad*). Los filtros de excitación y de emisión usados fueron de 490 nm y 510 nm respectivamente.

## VI. RESULTADOS

### Identificación del promotor en *Bacillus subtilis*

En un trabajo previo (Arvizú-Gómez, 2005) se llevó a cabo una estrategia de mutación del extremo 3' del tRNA<sup>Cys</sup> en *Bacillus subtilis*. El gen del tRNA<sup>Cys</sup> es copia única en *Bacillus subtilis* y esta localizado en la parte final o distal del operón *trrnD*, ocho nucleótidos río arriba del gen del tRNA<sup>Leu</sup>. 59 residuos río abajo del tRNA<sup>Leu</sup> se encuentra el terminador de la transcripción, y consiste de una estructura de tallo-asa seguido por 4 residuos de timina, típico de un terminador independiente de rho. Una clona que contenía el plásmido pMutin-GFP y un fragmento río arriba del gen *gfp* de aproximadamente 200 pb incluía parte del gen del tRNA<sup>Cys</sup>, el tRNA<sup>Leu</sup> completo y los 59 residuos río abajo mostraba expresión de GFP en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. En este trabajo (Arvizú-Gómez, 2005) no se analizó a detalle esta expresión, pero resultó de interés que este fragmento permitiera la expresión de GFP en ambas bacterias.

El análisis de la secuencia de este fragmento de aproximadamente 200 pb nos llevó a determinar que en los 59 residuos río abajo del tRNA<sup>Leu</sup> se encontraba la secuencia de un promotor típico para  $\sigma^A$  y separado por 20 pb (Figura 1)

-35 -10

5'ATTTTACTTACATGGTAAG**TTGAAT**TGGTGTTTGTGTTTTATCATT**TATAACTA**  
ATCATATTA**AATGATCTACATAAGTAGATCATTTTTTT** 3'

Figura 1. Secuencia de la región distal del operon *trrnD*. Subrayado y en negritas se muestra el promotor, región -10 y -35 (típicas de un promotor), separado por 20 pb, mientras que subrayado se muestra la secuencia del terminador.

Las secuencias -10 y -35 encontradas en esta región se comparan con las secuencias consenso registradas para los factores sigma presentes en *Bacillus subtilis* (tabla 4).

Tabla 4. Factores  $\sigma$  y promotores de unión en *Bacillus subtilis*.

Factor sigma	-35	Espaciador (pb)	-10	Referencia
$\sigma^A$ ( $\sigma^{43}$ , $\sigma^{55}$ )	TTGACA	17	TATAAT	Moran <i>et al.</i> , 1982.
$\sigma^B$ ( $\sigma^{37}$ )	RGGXTTRA	14	GGGTAT	Boylan <i>et al.</i> , 1991.
$\sigma^C$ ( $\sigma^{32}$ )	AAATC	15	TAXTGYTTZTA	Johnson <i>et al.</i> , 1983.
$\sigma^D$ ( $\sigma^{28}$ )	TAAA	15	GCCGATAT	Helmann, 1991.
$\sigma^H$ ( $\sigma^{30}$ )	RWAGGAXXT	14	HGAAT	Predich <i>et al.</i> , 1992.
$\sigma^L$	TGGCAC	5	TTGCANNN	Débarbouillé <i>et al.</i> , 1991.
$\sigma^E$ ( $\sigma^{29}$ )	ZHATAXX	14	CATACAHT	Roels <i>et al.</i> , 1992.
$\sigma^F$ ( $\sigma^{\text{spolIAC}}$ )	GCATR	15	GGHRARHTX	Sun <i>et al.</i> , 1991
$\sigma^G$	GHATR	18	CATXHTA	Nicholson <i>et al.</i> , 1989.
$\sigma^K$ ( $\sigma^{27}$ )	AC	17	CATANNNTA	Zheng <i>et al.</i> , 1992
Desconocido	TAAGTT	30	TAATAC	Este trabajo

La designación de las letras para las bases es como sigue, H: A o C; N: A, G, C, o T; R: A o G; W: A, G, o C; X: A o T; Y: C o T; Z: T o G

### Modificación del promotor

Aunque no se sabe cual es la posible función del promotor en esta región o qué podría estar regulando, resultó de interés modificarlo para obtener un promotor regulable y ser potencialmente usado en sistemas de expresión. En el grupo de trabajo de microbiología de la UAQ se han aislado rizobacterias que presentan resistencia a mercurio. Estas bacterias contienen elementos genéticos

que le permiten a la bacteria resistir altas concentraciones de mercurio. La proteína MerR es un regulador de la transcripción del operon *mer*, esta proteína se une en una región palindrómica del promotor y permite expresar genes de resistencia a mercurio en la bacteria.

Lo anterior permitió el diseño de un promotor que lleva esta región palindrómica. Para esto, se diseñó un oligonucleótido (1877) que contiene la región -10 y -35 del promotor identificado anteriormente y además las 20 pb originales fueron sustituidas por la secuencia palindrómica (Figura 2).

5'...**TTGAAT***ccgtacatgagtacggaag***TATAAC**TAATCATCGGCCGGAAGGAGATAT  
ACATATGGCTAGCAA**AGGAGA**AAGAACTTTT...3'

Figura 2. Promotor modificado. En negritas y subrayado se muestra la secuencia -10 y -35, dentro de esta región se muestra la región palindrómica que es reconocida por la proteína MerR. En negritas se muestra la secuencia Shine – Dalgarno para la traducción.

### Construcción genética

Con el oligonucleótido 1877 y 1878 se amplificó por PCR el gen *gfp* de la clona que contenía el plásmido pMutin-GFP y el fragmento de la parte distal del operon *trnD*. El fragmento que contenía el promotor modificado y el terminador fue insertado en el plásmido pUCP20 en el sitio de restricción *KpnI* (Figura 3).

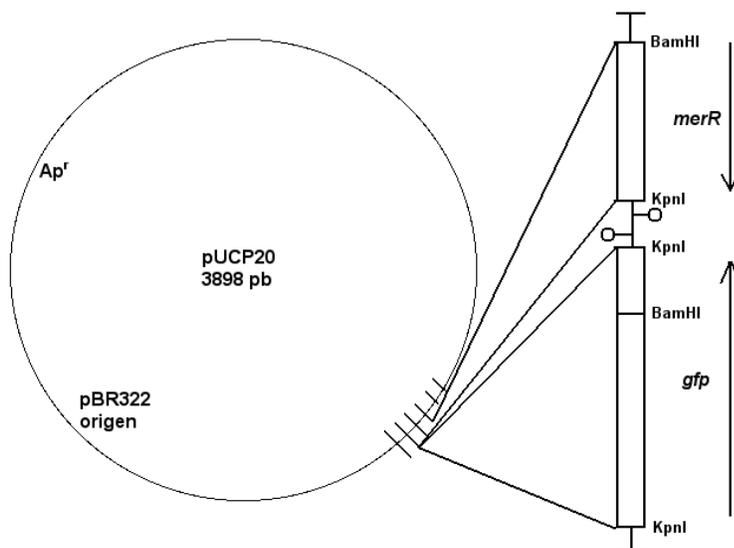


Fig. 3. Construcción genética *gfp-merR* en PUCP20. Las flechas indican la orientación de los genes, se muestran los sitios de restricción empleados.

Para obtener una completa inhibición de la expresión de GFP, se amplificó por PCR el gen *merR* a partir del DNA plasmídico obtenido de una cepa de *Pseudomonas sp.* resistente a mercurio. A través del diseño de oligonucleótidos, al gen *merR* se le adicionó el promotor identificado anteriormente y un terminador de la transcripción (Figura 4). El fragmento amplificado por PCR final y secuenciado para estar completamente seguros de tener lo esperado se insertó en pUCP20-*gfp* en el sitio de restricción *BamHI* y *KpnI*. (ver apéndice)



Figura 4. Posición de los oligonucleótidos para amplificar *merR*. Los cebadores se encuentran ubicados con respecto a su sitio de alineamiento.

### Inducción de la expresión de *gfp*

La construcción genética *merR-gfp* se amplificó por PCR y se intentó insertar en el plásmido pOS15 que contiene todo el operon *mer*. La idea era tener una bacteria que llevara el plásmido pOS15-*merR-gfp* y de esta manera la bacteria tendría la capacidad de resistir a mercurio, pero además nos permitiría monitorear la presencia del mercurio en el medio a través de la expresión de GFP. Sin embargo, no se logró obtener esta construcción genética empleando los recursos presentes en el laboratorio de microbiología.

De esta manera, la expresión de GFP fue monitoreada solamente en la construcción genética pUCP20-*merR-gfp* y empleando concentraciones muy bajas de HgCl<sub>2</sub>: 0.01, 0.05, 0.1, y 1 µg/mL en solución tampón de fosfatos.

Los datos presentados son valores observados durante 21 intervalos de 10 minutos con y sin HgCl<sub>2</sub> para mostrar la fluorescencia de GFP a lo largo del tiempo (Figura 5). No se observó aumento en la emisión de fluorescencia para ninguna concentración de mercurio; en la concentración más alta (1 µg/mL) se observó un ligero decremento en la fluorescencia, causado por una concentración tóxica de mercurio, que provoca la muerte de las células y la degradación de la proteína GFP (Jin *et al.*, 2008). El grupo control presenta un ligero incremento, no inducido por mercurio.

La ausencia de un sistema de desintoxicación de mercurio también se considera un factor por el que no se observa la inducción de *gfp*, ya que al someterse las células a diferentes concentraciones de HgCl<sub>2</sub>, por no tener un sistema desintoxicante, la concentración de células vivas y de proteína GFP funcional disminuye con el paso del tiempo, lo que se observa al comparar las lecturas de todas las concentraciones contra el grupo control, que no presenta HgCl<sub>2</sub> (fig. 5).

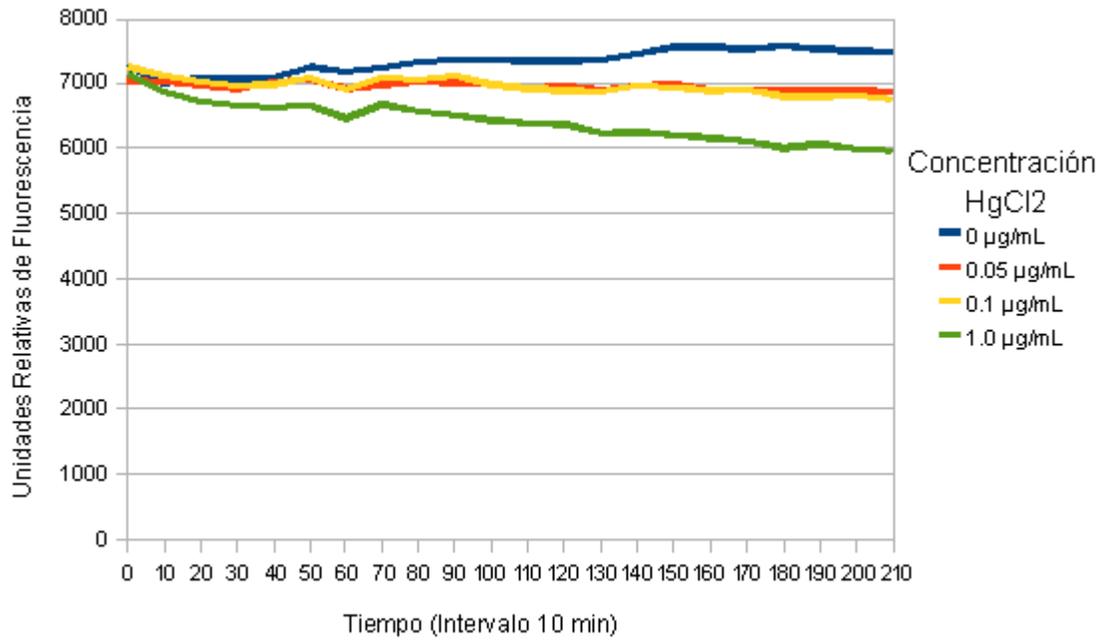


Figura 5. Fluorescencia relativa a través del tiempo. La emisión se mide en unidades relativas de fluorescencia, la medición desde el momento de la inducción con HgCl<sub>2</sub> se hizo en un tiempo total de 210 minutos. Se muestran las concentraciones empleadas del HgCl<sub>2</sub>

## VII. DISCUSIÓN

Las estrategias para el diseño de biosensores exitosos hasta la fecha son variadas, y cada vez se genera nuevo conocimiento para el diseño de nuevas estrategias, para cambiar así la sensibilidad de los sensores o su practicidad; una estrategia generalizada ha sido el uso del operador-promotor *mer* silvestre de un plásmido o secuencia bien caracterizada, entre ellos los plásmidos Tn21 y Tn501, seguido de un grupo de genes reporteros carentes de promotor, (pudiendo ser estos genes *lux*, *gal*, o GFP) precedidos o no por genes *mer* de resistencia a mercurio, por lo que quedan así regulados por el operador-promotor *mer*, la respuesta de los genes reporteros es por lo tanto análoga a la regulación de los genes de resistencia a mercurio, ya sea para análisis en laboratorio (Condee *et al.*, 1992; Selifonova *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 2000) o para análisis en muestras fijadas para su uso en campo (Lyngberg *et al.*, 1999).

Otra estrategia ha sido la modificación de la proteína GFP haciendo mutaciones selectivas alrededor del cromóforo para colocar un sitio de unión a un metal, de este modo, dependiendo de la concentración de mercurio al que esté expuesta la proteína se mostrarán cambios en la fluorescencia de GFP, este biosensor por lo tanto no depende de promotores que regulen la expresión de la proteína, sino de una modificación para que el transcrito genere una proteína distinta (Chapleau *et al.*, 2007).

Es necesario mencionar que en ninguno de los trabajos se hicieron modificaciones al promotor *mer* para modificar la regulación de los genes reporteros, esto es un punto de particular interés, ya que en la construcción llevada a cabo en el presente trabajo se modificaron las regiones -10 y -35, y no se encontraron cambios sensibles en la expresión del gen reportero usado, *gfp*, es posible que la estrategia de modificación del operador-promotor *mer* haya afectado su sensibilidad como biosensor.

Al no presentarse un cambio en la expresión de GFP se considera que la presencia del promotor fuerte permite la transcripción constante, y que el operador, (el espaciador de 30 pb) es un represor débil, por lo que la expresión basal de GFP podría ser muy cercana a la expresión inducida por HgCl<sub>2</sub>. Otra probable explicación y que es motivo de otro trabajo es que es necesario detectar por Western-blot la expresión de la proteína MerR y por ensayos de retardo en gel, empleando el promotor modificado, para determinar la unión de MerR a esta región.

Wawrousek (1984) reportó la existencia del operón *trnD*, donde describe la secuencia y organización de los 16 genes de tRNA presentes en el mismo; en la secuencia publicada aparece también el fragmento de aproximadamente 200 pb usados en el trabajo de Arvizú-Gómez (2005) que incluyen los 59 residuos río abajo del tRNA<sup>Leu</sup> donde se encontró la secuencia del promotor típico para  $\sigma^A$ , sin embargo, esta publicación no reporta esta secuencia como un promotor o región -10 y -35, solo la incluye en la secuencia total.

## Perspectivas para concluir el sistema como posible biosensor a mercurio

Para observar mejor la expresión de *gfp* usando el mismo sistema represor, evitando que decaiga la fluorescencia a lo largo del tiempo, se necesita un sistema que presente resistencia a mercurio; tal es el caso del operón *merRTPCAD*, clonado en el vector pOS15. El fragmento *merR-gfp* se puede clonar en pOS15 usando la enzima de restricción PstI y los cebadores 380 y 381. Este sistema se propone como un posible sensor a mercurio, ya que presentaría resistencia a mercurio y dos copias del gen *merR*, lo que probablemente aumentaría la represión de *gfp* (fig. 6).

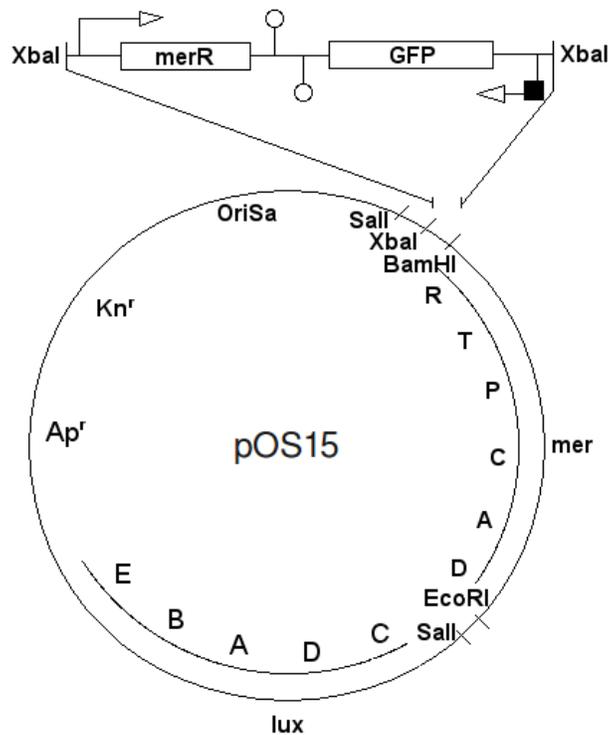


Fig 6. Construcción del plásmido pOS15-merR-GFP. El fragmento merR-GFP se clonaría en el sitio de restricción XbaI; el punto negro indica el promotor regulado por la proteína merR, que cambia su configuración estructural cuando se une a una molécula de Hg(II). El operón *mer* le permitiría al sistema resistir altas concentraciones de mercurio.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Se identificó un promotor en la parte distal del operon *trrnD* en *Bacillus subtilis*. En la construcción genética realizada se presenta una expresión muy fuerte de *gfp*, este promotor se considera como un buen candidato para inducir sobreexpresión de genes en *B. subtilis* y *E. coli*.
2. No se observaron cambios en las pruebas de fluorescencia bajo las 4 concentraciones de  $\text{HgCl}_2$  de *E. coli* con la construcción *pUCP20-merR-gfp* llevadas a cabo a través del tiempo, lo cual indica que no se logró una represión de MerR hacia el promotor.
- 3.- La ingeniería genética permitió desarrollar un sistema de expresión basado en los mecanismos de resistencia a mercurio que presentan algunas bacterias. Sin embargo es necesario más esfuerzo para obtener un sistema como posible biosensor.

## LITERATURA CITADA

- Arvizú-Gómez, J. E. 2005. Estrategias para el análisis *in vivo* en mutaciones en tRNA en *Bacillus subtilis*. Universidad Autónoma de Nayarit. Tesis de licenciatura.
- Batley, G. E., S. C. Apte, and J. L. Stauber. 2004. Speciation and Bioavailability of Trace Metals in Water: Progress Since 1982. *Aust. J. Chem.* 57: 903–919.
- Birnboim, H. C., and Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.* 7(6): 1513-23.
- Boylan, S. A., M. D. Thomas, and C. W. Price. 1991. Genetic method to identify regulons controlled by nonessential elements: isolation of a gene dependent on alternate transcription factor sB of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 173:7856–7866.
- Brown, N. L., J. V. Stoyanov, S. P. Kidd, and J. L. Hobman. 2003. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 145–163.
- Chapleau, R. R., R. Blomberg, P. C. Ford, and M. Sagermann. 2008. Design of a highly specific and noninvasive biosensor suitable for real-time *in vivo* imaging of mercury (II) uptake. *Protein Science.* 17: 614–622.
- Condee, C. W., and A. O. Summers. A mer-lu-x Transcriptional Fusion for Real Time Examination of *In Vivo* Gene Expression Kinetics and Promoter Response to Altered Superhelicity . *J. Bacteriol.* 174(24): 8094-8101.
- Débarbouillé, M., I. Martin-Verstraete, A. Klier, and G. Rapaport. 1991. The transcriptional regulator LevR of *Bacillus subtilis* has domains homologous to both s54 and phosphotransferase system-dependent regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2212–2216.
- Gambill, B. D., and A. O. Summers. 1985. Versatile mercury-resistant cloning and expression vectors. *Gene.* 39: 293-297.
- Griffin, H. G., T. J. Foster, S. Silver, and T. K. Misra. 1987. Cloning and DNA sequence of the mercuric- and organomercurial-resistance determinants of plasmid pDU1358. *Biochemistry.* 84: 3112-3116.
- Haldenwang, W. G. 1995. The Sigma Factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 59: 1-30.
- Hamlett, N. V., E. C. Landale, B. H. Davis, and A. O. Summers. 1992. Roles of the Tn21 merT, merP, and merC gene products in mercury resistance and mercury binding. *J. Bacteriol.* 174: 6377-6385.

- Hanahan, D. 1983. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hansen, L. H. and S. J. Sørensen. 2000. Versatile biosensor vectors for detection and quantification of mercury. *FEMS Microbiol Lett.* 193: 123-127.
- Helmann, J. D. 1991. Alternate sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. *Mol. Microbiol.* 5:2875–2882.
- Heltzel, A., D. Gambill, W. J. Jackson, P. A. Totis, and A. O. Summers. 1987. Overexpression and DNA-Binding Properties of the mer-Encoded Regulatory Protein from Plasmid NR1 (Tn2I). *J. Bacteriol.* 169: 3379-3384.
- Hobman, J. L. 2007. MerR family transcription activators: similar designs, different specificities. *Mol Microbiol.* 63(5): 1275–1278.
- Huerta, A. M, M. P. Francino, E. Morett, and J. Collado-Vides. 2006. Selection for unequal densities of  $\sigma_{70}$  promoter-like signals in different regions of large bacterial genomes. *PLoS Genet.* 2(11): e185. doi:10.1371/journal.pgen.0020185.
- Inohue, H., H. Nojima, H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 96: 23-28.
- Jin, Y.H., P. E. Dunlap, S. J. McBride, H. Al-Refai, P. R. Bushel, and J. H. Freedman. 2008. Global Transcriptome and Deletome Profiles of Yeast Exposed to Transition Metals. *PLoS Genet.* 4(4): e1000053. doi:10.1371/journal.pgen.1000053
- Johnson, W. C., C. P. Moran, Jr., and R. Losick. 1983. Two RNA polymerase sigma factors from *Bacillus subtilis* discriminate between overlapping promoters for a developmentally regulated gene. *Nature (London).* 302:800–804.
- Kaltwasser, M., T. Wiegert, and W. Schumann. 2002. Construction and Application of Epitope- and Green Fluorescent Protein-Tagging Integration Vectors for *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(5): 2624–2628.
- Lee, I. W., B. D. Gambill, and A. O. Summers. 1989. Translation of merD in Tn2I. *J. Bacteriol.* 171: 2222-2225.
- Lyngberg, O. K., D. J. Stemke, J. L. Schottel, and M. C. Flickinger. 1999. A single-use luciferase-based mercury biosensor using *Escherichia coli* HB101 immobilized in a latex copolymer film. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23: 668-676.

- Misra, T. K. 1992. Bacterial resistance to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid*. 27: 4-16.
- Moran, C. P., Jr., N. Lang, S. F. J. LeGrice, G. Lee, M. Stevens, A. L. Sonenshein, J. Pero, and R. Losick. 1982. Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 186:339–346.
- Nicholson, W. L., D. X. Sun, B. Setlow, and P. Setlow. 1989. Promoter specificity of sigma G-containing RNA polymerase from sporulating cells of *Bacillus subtilis*: identification of a group of forespore-specific promoters. *J. Bacteriol.* 171:2708–2718.
- Permina, E. A., A. E. Kazakov, O. V. Kalinina, and M. S. Gelfand. 2006. Comparative genomics of regulation of heavy metal resistance in eubacteria. *BMC Microbiol.* 6: 49.
- Peterka, M., T Accetto, and G. Avguštin. 2000. Horizontal gene transfer in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Folia Microbiol.* 42: 339–345.
- Predich, M., G. Nair, and I. Smith. 1992. *Bacillus subtilis* early sporulation genes *kinA*, *spo0F*, and *spo0A* are transcribed by the RNA polymerase containing  $\sigma^H$ . *J. Bacteriol.* 174:2771–2778.
- Qin, J., L. Song, H. Brim, M. J. Daly, and A. O. Summers. 2006. Hg(II) sequestration and protection by the MerR metal-binding domain (MBD). *Microbiology.* 152: 709-719.
- Ravel, J., J. Diruggiero, F. T. Robb, and R. T. Hill. 2000. Cloning and sequence analysis of the mercury resistance operon of *Streptomyces sp.* strain CHR28 reveals a novel putative second regulatory gene. *J. Bacteriol.* 182: 2345-2349.
- Roels, S., A. Driks, and R. Losick. 1992. Characterization of *spoIVA*, a sporulation gene involved in coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174:575–585.
- Rogowsky, P. M., T. J. Close, J. A. Chimera, J. J. Shaw, and C. I. Kado. 1987. Regulation of the *vir* Genes of *Agrobacterium tumefaciens* Plasmid pTiC58. *J. Bacteriol.* 169(11): 5101-5112 .
- Ross, W., S. J. Park, and A. O. Summers. 1989. Genetic Analysis of Transcriptional Activation and Repression in the Tn2I mer Operon. *J. Bacteriol.* 171: 4009-4018.
- Sambrook J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Selifonova, O., R. Burlage, and T. Barkay. 1993. Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment. *Appl Environ Microbiol.* 59: 3083–3090.
- Smalla, K., A. S. Haines, K. Jones, E. Krogerrecklenfort, H. Heuer, M. Schloter, and C. M. Thomas. 2006. Increased abundance of IncP-1 $\beta$  plasmids and mercury resistance genes in mercury-polluted river sediments: first discovery of IncP-1 $\beta$  plasmids with a complex *mer* transposon as the sole accessory element. *Appl Environ Microbiol.* 72: 7253-7259.
- Song, L., J. Caguiat, Z. Li, J. Shokes, R. A. Scott, L. Olliff, & A. O. Summers. 2004. Engineered single-chain, antiparallel, coiled coil mimics the MerR metal binding site. *J Bacteriol.* 186: 1861–1868.
- Summers, A. O. 1992. Untwist and Shout: a Heavy Metal-Responsive Transcriptional Regulator. *J. Bacteriol.* 174: 3097–3101.
- Sun, D., R. M. Cabrera-Martinez, and P. Setlow. 1991. Control of transcription of the *Bacillus subtilis* spoIIIG gene, which codes for the foresporespecific transcription factor sG. *J. Bacteriol.* 173:2977–2984.
- Tóthová, T., P. Pristaš, and P. Javorský. 2006. Mercuric Reductase Gene Transfer from Soil to Rumen Bacteria. *Folia Microbiol.* 51 (4), 317–319.
- Valko, M., H. Morris, and M. T. D. Cronin. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr. Med. Chem.* 12: 1161-1208.
- West, S. E., H. P. Schweizer, C. Dall, A. K. Sample, and L. J Runyen-Janecky. 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 128: 81–86.
- Walsh, C. T., M. D. Distefano, M. J. Moore, L. M. Shewchuk, and G. L. Verdine. 1988. Molecular basis of bacterial resistance to organomercurial and inorganic mercuric salts. *FASEB J.* 2:124–130.
- Wawrousek, E. F., N. Narasimhan, and J. N. Hansen. 1984. Two Large Clusters with Thirty-seven Transfer RNA Genes Adjacent to Ribosomal RNA Gene Sets in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 259 (6): 3694-3702.
- Zheng, L., R. Halberg, S. Roels, H. Ichikawa, L. Kroos, and R. Losick. 1992. Sporulation regulatory protein GerE from *Bacillus subtilis* binds to and can activate or repress transcription from promoters for mother-cell-specific genes. *J. Mol. Biol.* 226:1037–1050.

## APÉNDICES

### Apéndice I

Todos los reactivos, enzimas, equipos para extracción de plásmidos y DNA, así como material y medios de cultivo fueron adquiridos de Invitrogen, Fermentas, BioLabs, Eppendorf, Sigma, Amersham o Zymo.

#### Preparación de plásmidos por la técnica modificada de BirnBoim y Doly

##### **Solución I**

Reactivo	Volumen (mL)	Concentración final
Tris-HCl (pH 8.0) 1 M	1.25	25 mM
EDTA 0.25 M	2.00	10 mM
Glucosa 1 M	2.50	50 mM
Agua destilada	50.00	
RNAasa 10 µg/mL		

Guardar en refrigeración

##### **Solución II**

Reactivo	Volumen (mL)	Concentración final
NaOH 1 N	5.00	0.2 N
SDS al 10%	2.50	1.0 %

Guardar a temperatura ambiente por no más de 2 meses.

### **Solución III**

Reactivo	Volumen (mL)
Acetato de potasio 5 M	60.0
Ácido acético glacial	11.5
Agua destilada	28.5

Guardar en refrigeración no más de seis meses, el pH debe permanecer aproximadamente en 4.6, cerrar el frasco perfectamente para evitar que se eleve el pH.

### **Medio Luria-Bertani (LB)**

Por Litro:

Triptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Mezclar hasta disolver, ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5 N. Esterilizar. Si se desea preparar medio de cultivo sólido agregar 15,0 g de agar bacteriológico antes de esterilizar en autoclave.

### **Electroforesis de DNA**

Buffer de electroforesis

TAE 10x

Tris base	48.4 g
Ácido acético glacial	11.42 mL
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	7.44 g
DH <sub>2</sub> O	Cbp 1 L

Preparar en matraz aforado, para su uso hacer una dilución 1:10

#### Solución de carga para electroforesis

Glicerol	30%
EDTA (pH 8.0)	25.0 mM
Naranja G	0.025%

Guardar a 4 °C, usar una parte de esta solución por cada cuatro de solución de DNA problema.

#### Marcador de peso molecular

Se utilizó el marcador de 100 pb de la marca comercial Invitrogen, del cual se tomaron 5 µL y se diluyeron en 45 µL de colorante Naranja G, de éste se usan 2 µL para cada corrida electroforética.

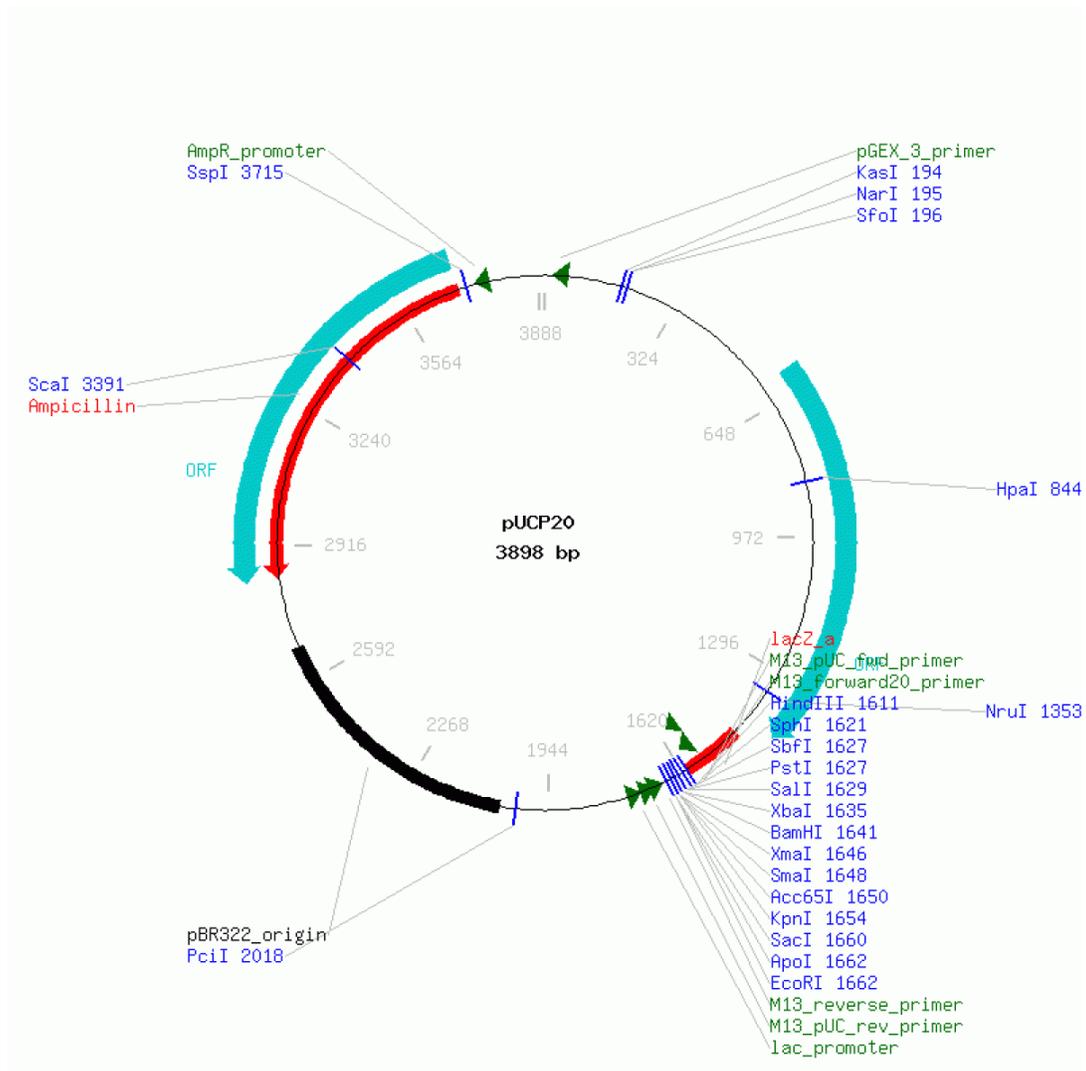
#### Solución de bromuro de etidio para tinción de geles de agarosa

Agregar 30 µL de solución preparada de bromuro de etidio (10 mg/mL) a 200 mL de agua destilada.

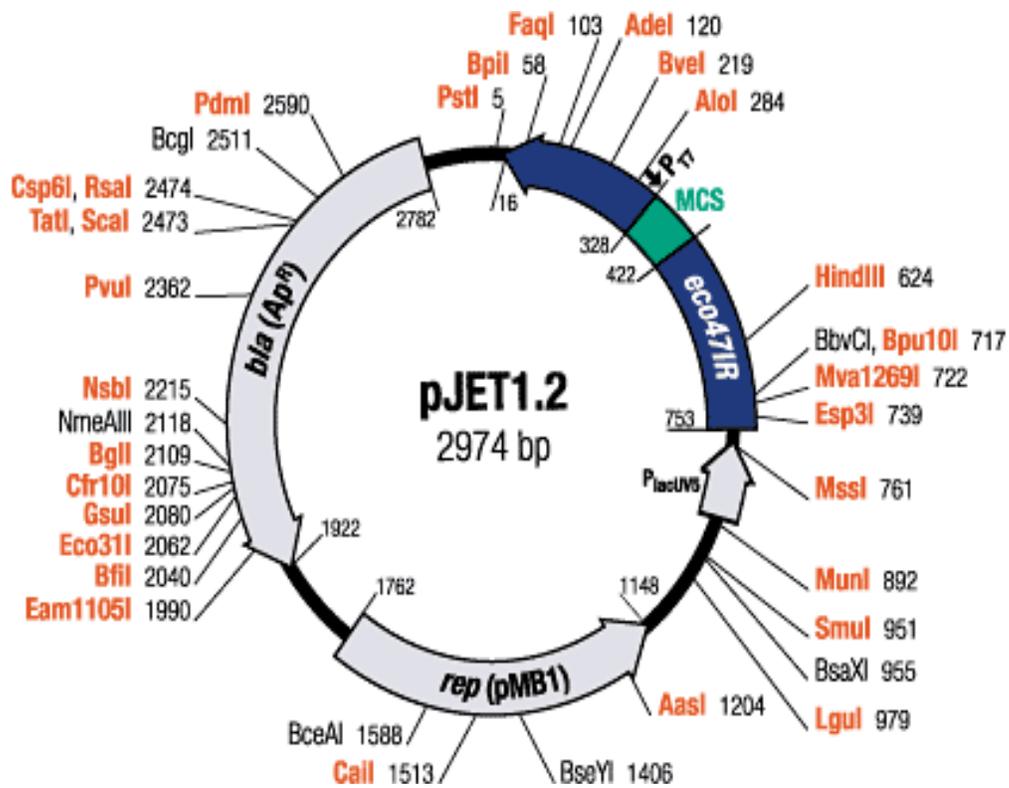
#### Geles de agarosa

Pesar 1 gramo de agarosa (invitrogen) y disolverlo mediante calor en 100 mL de TAE 1x.

## Apéndice II



pUCP20. Vector de clonación con origen de replicación en *E. coli* y *Pseudomonas* sp. Resistencia a ampicilina. Origen de replicación del plásmido pBR322.



Mapa del vector pJET 1. 2. Sistema conveniente para clonación de fragmentos para secuenciación. Resistencia a ampicilina. Gen letal separado por sitio de clonación múltiple.