

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO**

**ESCUELA DE QUIMICOFARMACOBIOLOGÍA**

**GENERACIÓN DE UNA FUSIÓN TRANSCRIPCIONAL PARA LA  
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP)  
EN *Staphylococcus aureus***

**TESIS QUE PRESENTA:  
JULIO CÉSAR DOMÍNGUEZ MURILLO**

**ASESORES DE TESIS:  
DR. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA  
DR. PEDRO DAMIÁN LOEZA LARA**

**Morelia, Michoacán, México Noviembre 2006**

**El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología - Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, bajo la asesoría del Dr. Joel Edmundo López Meza y la coasesoría del Dr. Pedro Damián Loeza Lara. Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del proyecto 14.5 CIC/UMSNH, “Análisis molecular de determinantes de resistencia a antimicrobianos en aislados de *Staphylococcus* spp. asociados a mastitis bovina”.**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco de una forma especial al Dr. Joel Edmundo López Meza, a la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa, por dedicarme su tiempo y ayudarme a realizar mi tesis, orientándome en el transcurso de ésta, además de brindarme su amistad y su confianza.

Al Dr. Pedro Damián Loeza Lara, por ser mi preceptor, dedicarme su tiempo y tenerme paciencia, por transmitirme sus conocimientos y sus experiencias, por brindarme su amistad y preocuparse de una manera muy especial por el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. José Luis Anaya López, por su buen humor y apoyo incondicional, por alentarme y por su amistad.

A mis padres, Abelardo Domínguez, y Gloria Murillo, por apoyarme en todo momento, y enseñarme el valor de las cosas “gracias”.

A mis hermanos, Eduardo, Irving y Diana, por ser mis amigos, y por brindarme su apoyo incondicional.

A Adriana, por ser la alentadora de mis sueños “gracias”.

A todos los compañeros y amigos del M3, por hacer más agradable mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos, del IMSS, del CECYPE, y del laboratorio Pasteur, por su amistad, comprensión y acompañarme en todo momento.

Y a todas las personas que hicieron posible este paso, “Gracias”.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	3
2.1 Función de los plásmidos bacterianos	3
2.2 Los plásmidos bacterianos en la Biotecnología	5
2.3 Importancia de los genes reporteros	6
2.4 Función de las regiones promotoras	6
2.5 Aplicaciones básicas y biotecnológicas de las fusiones transcripcionales	8
2.6 Herramientas biotecnológicas en los estudios de patogénesis	9
2.7 Características generales de <i>Staphylococcus aureus</i>	9
III JUSTIFICACIÓN	11
IV HIPÓTESIS	12
V OBJETIVOS	12
5.1 OBJETIVO GENERAL	12
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
VI ESTRATEGIA METODOLÓGICA	13
6.1 Diagrama general del trabajo de investigación	13
VII MATERIALES Y MÉTODOS	14
7.1 Características del vector pBluescript II KS + de <i>Escherichia coli</i>	14
7.2 Características del vector pTracer-EF/V5-His B (Invitrogen)	14

7.3	Obtención de ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i>	15
7.4	Limpieza de ADN con bromuro de etidio-fenol	16
7.5	Purificación de ADN a partir de agarosa (Gene-Clean)	17
7.6	Diseño de oligonucleótidos	18
7.7	Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	18
7.8	Ligación de fragmentos de ADN	19
7.9	Desionización de ADN mediante diálisis	20
7.10	Preparación de células para electroporación de <i>Escherichia coli</i>	20
7.11	Electroporación de células de <i>Escherichia coli</i>	21
7.12	Minipreparación de plásmidos de <i>Escherichia coli</i>	21
7.13	Maxipreparación de plásmidos de <i>Escherichia coli</i>	22
7.14	Digestión de ADN con enzimas de restricción	22
7.15	Reacciones de secuenciación	23
7.16	Limpieza de las reacciones de secuenciación	24
7.17	Estrategias para la construcción de la fusión transcripcional pBlues-pBlaz-gfp	24
VIII	RESULTADOS	29
8.1	Diseño de los oligonucleótidos específicos para <i>pBlaz</i> y <i>gfp</i>	29
8.2	Obtención de ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> y de los vectores pTracer -EF/V5HisB y pBluescript II KS +	29
8.3	Amplificación del promotor <i>pBlaz</i> y de la región codificante de <i>gfp</i> mediante PCR	31
8.4	Clonación de los fragmentos <i>pBlaz</i> y <i>gfp</i> en el vector pGEMT	32
8.5	Análisis de las clonas pGEMT - <i>gfp</i> y pGEMT - <i>pBlaz</i> mediante doble digestión, PCR y secuenciación	33

8.6	Subclonación del fragmento <i>gfp</i> en el vector pBluescript II KS+ y generación de la construcción pBlues- <i>gfp</i>	35
8.7	Subclonación del promotor <i>pBlaz</i> en la construcción pBlues- <i>gfp</i> y generación de la fusión transcripcional pBlues- <i>pBlaz-gfp</i>	37
IX	DISCUSIÓN	40
X	CONCLUSIÓN	43
XI	BIBLIOGRAFÍA	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Esquema general de un plásmido	4
Figura 2	Estructura terciaria de la proteína verde fluorescente y su asociación en dímeros	7
Figura 3	Organización genética del vector de clonación pBluescript II KS +	14
Figura 4	Organización genética del vector de clonación pTracer-EF/V5-His B	15
Figura 5	Estrategia para la construcción de pGEMT- <i>gfp</i>	26
Figura 6	Estrategia para la construcción de pGEMT- <i>pBlaz</i>	27
Figura 7	Construcción de la fusión transcripcional pBlues- <i>pBlaz-gfp</i>	28
Figura 8	Obtención del ADN genómico de aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i>	30
Figura 9	ADN plasmídico de los vectores pTracer-EF/V5HisB y pBluescript II KS+.	30
Figura 10	Amplificación por PCR de <i>pBlaz</i> y <i>gfp</i>	31
Figura 11	Minipreparación de ADN de las clonas recombinantes pGEMT- <i>gfp</i>	32
Figura 12	Minipreparaciones de ADN de las clonas pGEMT- <i>pBlaz</i>	33
Figura 13	Digestión y amplificación de <i>gfp</i>	34
Figura 14	Digestión y amplificación de <i>pBlaz</i>	35
Figura 15	Minipreparación de ADN de clonas pBlues- <i>gfp</i>	36
Figura 16	Digestiones <i>EcoRI</i> , y <i>ClaI</i> de algunas clonas pBlues- <i>gfp</i>	37
Figura 17	Doble digestión ( <i>EcoRI</i> y <i>SpeI</i> ) del ADN de clonas pBlues- <i>gfp</i>	38

Figura 18	Minipreparaciones de ADN de las clonas pBlues- <i>pBlaz-gfp</i>	38
Figura 19	Digestión y amplificación de pBlues- <i>pBlaz-gfp</i>	39



## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Ejemplos de algunos plásmidos utilizados como vectores	5
Tabla 2	Condiciones de la PCR	19
Tabla 3	Condiciones de las reacciones de secuenciación	24
Tabla 4	Oligonucleótidos diseñados para amplificar <i>pBlaz</i> y <i>gfp</i>	29

## I. INTRODUCCIÓN

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos de ADN de cadena doble, circulares cerrados covalentemente y superenrollados (aunque en *Borrelia* y algunos Actinomicetos existen plásmidos lineales). Los plásmidos ocasionalmente contienen genes que codifican productos esenciales para el crecimiento de la bacteria; sin embargo, generalmente producen moléculas que dan a las bacterias que los poseen una ventaja adaptativa que les sirve para enfrentar condiciones ambientales especiales (Loeza-Lara *et al.*, 2004). Existen muchos ejemplos de genes presentes en plásmidos, cuyos productos incluyen desde la resistencia a antibióticos, la degradación de compuestos complejos, hasta la producción de colicinas, enterotoxinas y enzimas de restricción (Herveg y Macay, 2004).

Los plásmidos han sido utilizados como herramientas moleculares (vectores) importantes en la Biología Molecular y la Ingeniería Genética por la facilidad con la que se manipulan. Una característica importante de los vectores es que poseen genes reporteros, cuya expresión genera una proteína que emite una señal fácilmente detectable la cual indica si una célula ha sido transformada. Tanto los vectores como los genes reporteros han sido importantes en la generación de fusiones transcripcionales y traduccionales, las primeras han permitido la realización de estudios de expresión de proteínas de interés bajo la influencia de algún promotor específico y las segundas han permitido la detección intracelular de algunas proteínas de interés. Algunos de los genes reporteros más utilizados son el gen *lacZ* de *Escherichia coli*, que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa bacteriana; el gen *luc* de la luciferasa de las luciérnagas y los genes *bfp* y *gfp* que codifican la proteína azul fluorescente y la proteína verde fluorescente, respectivamente (Ovidio y Portelles, 1997).

En este sentido, los estudios sobre los mecanismos moleculares que operan durante la

patogénesis bacteriana en humanos y en animales de granja, han cobrado fuerza en los últimos años debido a los daños que causan las enfermedades de los patógenos. Parte del conocimiento que se ha adquirido sobre las relaciones hospedero patógeno, se ha logrado gracias a la utilización de herramientas genéticas (ej. sistemas eficiente de expresión de genes). En el caso de bacterias Gram positivas, la patogénesis causada por *Staphylococcus aureus* no ha sido la excepción, ya que se han construido vectores bifuncionales que han facilitado la realización de numerosos estudios de expresión de genes involucrados en la patogénesis (Charpentier *et al.*, 2004). No obstante, a pesar de que estas herramientas han sido importantes, se considera que son insuficientes para estudiar las diferentes interacciones del patógeno con el hospedero.

*S. aureus* es una bacteria Gram positiva que causa enfermedades en los humanos y en animales de granja y es el principal patógeno responsable de la mastitis en vacas lactantes, el cual es aislado frecuentemente de la leche. La presencia de esta bacteria en la leche cruda representa un riesgo para la salud de los humanos y causa pérdidas importantes en la ganadería lechera en todo el mundo (Sutra y Poutrel, 1994). La prevalencia de la mastitis ha ocasionado que numerosos investigadores estén interesados en estudiar la interacción, a nivel molecular, de la bacteria patógena *S. aureus* y las células del epitelio mamario de bovinos; sin embargo, aún se requiere de nuevas herramientas para evaluar la internalización de *S. aureus*.

Para llevar a cabo estudios efectivos sobre la invasión de *S. aureus* en las células del epitelio mamario de bovinos, se requiere de la disponibilidad de herramientas biotecnológicas que permitan evaluar su internalización (ej. vectores, genes reporteros y promotores específicos). En este trabajo de investigación se generó una fusión

transcripcional denominada pBlues-*pBlaz-gfp*, la cual se construyó fusionando el promotor constitutivo *pBlaz* y el gen reportero *gfp*, en el vector pBluescript II KS +. Esta servirá de base para generar una herramienta que permitirá la expresión de la proteína GFP en células de *S. aureus* y estudiar su internalización en células del tejido mamario de bovinos.

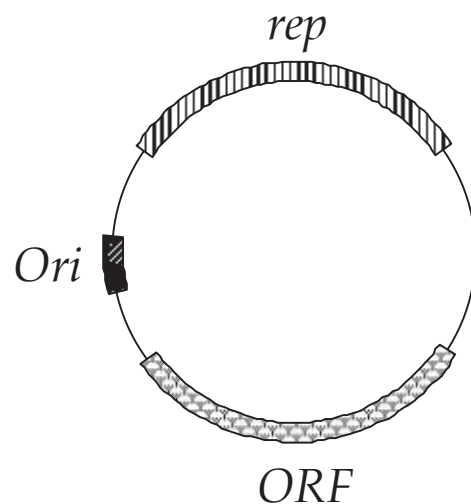
## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Función de los plásmidos bacterianos

Los plásmidos representan material genético accesorio para las bacterias que los poseen. Estos se replican independientemente de los cromosomas y la información genética que contienen puede conferir a la célula que los alberga resistencia a antibióticos, capacidad para la degradación de compuestos aromáticos, fermentación de azúcares, etc. El número de plásmidos presentes en una célula bacteriana es variable, mientras que algunas células no contienen ningún plásmido, otras pueden contener varias moléculas (Romero y Palacios, 1997).

Los plásmidos poseen una estructura particular que se encuentra en la mayor parte de las moléculas que han sido caracterizadas. Estos contienen regiones esenciales para la replicación del plásmido y regiones no esenciales. Dentro de las regiones esenciales, importantes para la generación de vectores, se encuentra: un origen de la replicación, denominado *ori*; un gen que codifica la proteína que participa en el inicio de la replicación denominada Rep (aunque esta no se presenta en todos los plásmidos); y los genes que participan en el control de la replicación. Dentro de las regiones no esenciales se encuentran genes que le confieren una ventaja adaptativa a la bacteria, por ejemplo, un gen *mob* que le permite movilizarse entre bacterias (Figura 1) (Del Solar *et al.*, 1998).

Existen otras funciones atribuidas a los plásmidos bacterianos, por ejemplo, algunos codifican factores de virulencia importantes en la capacidad de invasión de algunas especies bacterianas (ej. los plásmidos *ivn* de *Escherichia coli* enteroagregativas, le confieren invasividad intestinal a la bacteria, por otro lado los plásmidos *ent* de *E. coli* enteropatógenas, codifican enterotoxinas); mientras que algunos codifican factores de resistencia a antibióticos, (ej. los plásmidos pT181, pC194 y pBMSa1), que le confieren resistencia a *S. aureus* contra tetraciclina, cloranfenicol y lincomicina, respectivamente (Khan y Novick, 1983; Loeza-Lara *et al.*, 2004; Novick, 1989); algunos otros plásmidos le confieren a la bacteria resistencia a metales pesados, por ejemplo, el plásmido pOX6 de *S. aureus* le confiere resistencia al cadmio, lo que le permite a la bacteria sobrevivir en ambientes contaminados con este metal (Novick, 1989).



**Figura 1.** Esquema general de un plásmido en donde se muestran dos elementos esenciales para la replicación del plásmido. *rep* = gen que codifica la proteína Rep, iniciadora de la replicación. *Ori* = origen de replicación del plásmido. *ORF* = marco de lectura abierto.

## 2.2 Los plásmidos bacterianos en la Biotecnología

Las diferentes características de los plásmidos han estimulado a los investigadores a abordar el estudio de estas moléculas para conocer su organización estructural, genética y su posible función. Adicionalmente, estas moléculas han servido como herramientas importantes en estudios de Biología Molecular y Biotecnología. Desde el punto de vista biotecnológico, es importante resaltar diferentes cualidades de los plásmidos debido a su importancia en el diseño de vectores de clonación (los vectores de clonación son elementos genéticos que se replican en forma independiente al cromosoma y permiten la integración de diferentes fragmentos de ADN). Características tales como su tamaño pequeño; su facilidad de aislamiento; su manipulación relativamente sencilla; su naturaleza circular, que lo que hace más estable durante el aislamiento químico; su replicación independiente del cromosoma, entre otras características, han hecho posible la utilización de algunos plásmidos en el diseño de vectores (Loeza-Lara *et al.*, 2004). La Tabla 1 muestra algunos ejemplos de plásmidos que han sido utilizados en el diseño de vectores de clonación o de expresión.

**Tabla 1. Ejemplos de algunos plásmidos utilizados como vectores.**

Plásmido	Hospedero	Vector	Referencia
pPP8-1	<i>Pseudomonas putida</i>	pPP8-1	Holtwick <i>et al.</i> , 2001
pMB02	<i>Lactococcus lactis</i>	p22/25	Sánchez y Mayo, 2004
pMB02	<i>L. lactis</i>	p720	Sánchez y Mayo, 2004
pMB02	<i>L. lactis</i>	pβrec	Sánchez y Mayo, 2004
ColE1	<i>E. coli</i>	pBluescript	Stratagene

### **2.3 Importancia de los genes reporteros**

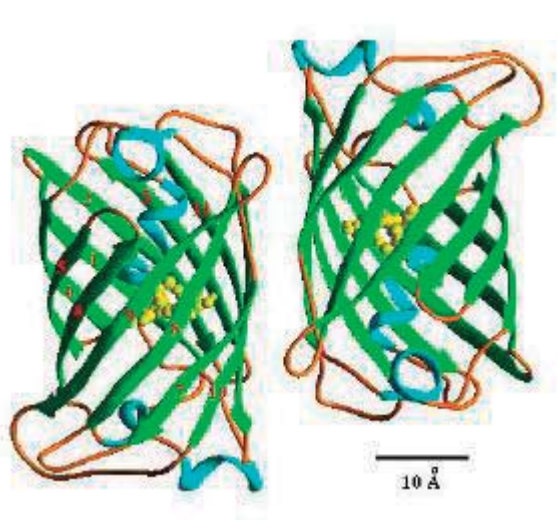
La función que los genes reporteros realizan es importante ya que producen una proteína que es fácilmente detectable y que actúa como molécula reportera que indica cuándo una célula ha sido transformada (Forsberg *et al.*, 1994). Uno de los primeros sistemas de fusión de un gen reportero utilizado para expresar proteínas recombinantes fue el de la  $\beta$ -galactosidasa, la cual se utiliza también para medir la actividad transcripcional. El gen *lacZ* codifica esta enzima, cuya expresión es inducida por sustratos naturales como la lactosa o por análogos de lactosa como el isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Otros genes reporteros son el gen *luc* de la luciferasa de las luciérnagas y el gen *bfp* que codifican la proteína azul fluorescente (Ovidio y Portelles, 1997).

En la actualidad, uno de los genes reporteros más utilizados es el gen *gfp* que codifica la proteína verde fluorescente (GFP). La GFP es una proteína que tiene un peso molecular de 27 kDa (238 aminoácidos) y es responsable de la intensa fluorescencia verde de la medusa *Aequorea victoria* (phylum Cnidaria). La fluorescencia de la GFP es debido a la naturaleza de un cromóforo, el cual está compuesto de aminoácidos modificados dentro del polipéptido (Figura 2). Una de las principales características de la GFP es que la formación del cromóforo fluorescente no requiere de factores adicionales, por lo que el producto del gen *gfp* es fácilmente detectable por su intensa fluorescencia. La GFP ha sido utilizada en varios sistemas experimentales, por ejemplo, en células de animales, plantas y en *Drosophila* (Prasher, 1995).

### **2.4 Función de las regiones promotoras**

El proceso de la transcripción involucra la síntesis de ARN a partir de ADN, el cual

es catalizado por la enzima ARN polimerasa, que reconoce y se une a una región llamada “región promotora” o “promotor” que se localiza hacia el extremo 5’ del gen que se va a transcribir (Lewin, 2000). Los promotores tienen una doble función, permiten que la ARN polimerasa se posicione de manera precisa con relación a la primera base de la secuencia de ADN por transcribir y determinan la cadena que se copiará. La mayoría de los promotores bacterianos contienen dos secuencias consenso que suelen ser esenciales para el posicionamiento de la ARN polimerasa. La primera es la caja TATA, la cual se localiza aproximadamente 10 nucleótidos hacia el extremo 5’ a partir del sitio de inicio de la transcripción. Debido a esto se conoce como la secuencia -10 y tiene la secuencia consenso 5'TATAAT3'. La segunda se localiza aproximadamente a 35 nucleótidos hacia el extremo 5’ a partir del sitio de inicio de la transcripción, por lo que se conoce como la secuencia -35 y tiene la secuencia consenso 5'TTGACA3' (Timothy *et al.*, 1998).



**Figura 2.** Estructura terciaria de la proteína verde fluorescente y su asociación en dímeros. Se presentan en verde las 11 láminas beta que conforman las paredes del cilindro. Los aminoácidos que conforman el cromóforo se localizan en el centro del cilindro.



Los promotores usados en Biotecnología pueden ser de dos tipos según la manera en que regulan la expresión del gen. Los promotores constitutivos regulan la transcripción continua de un gen (ej. aquellos genes que son esenciales para el funcionamiento de la célula). Los promotores inducibles realizan la transcripción de un gen solamente cuando reciben una señal externa (ej. genes que responden a factores ambientales, como aquellos involucrados en mecanismos de defensa) (Timothy *et al.*, 1998). El promotor *pBlaz* es un promotor constitutivo que ha sido utilizado en sistemas de expresión de genes en *S. aureus*, el cual dirige la síntesis de la proteína  $\beta$ -lactamasa. Este promotor ha sido utilizado exitosamente en fusiones transcripcionales en *S. aureus* y tiene un tamaño de 145 pb (Charpentier *et al.*, 2004).

## **2.5 Aplicaciones básicas y biotecnológicas de las fusiones transcripcionales**

Las fusiones transcripcionales se utilizan frecuentemente en diversos estudios que involucran la expresión de genes de interés, así como en estudios de funcionalidad de alguna región promotora. Asimismo, las fusiones transcripcionales son útiles en estudios de expresión de proteínas reporteras en bacterias o tejidos específicos, bajo la influencia de algún promotor específico cuya funcionalidad ha sido demostrada. De esta manera, las fusiones transcripcionales se construyen mediante la introducción de una región promotora en la región 5' del gen o los genes de interés, lo cual se realiza en un vector de clonación (plásmido), cuya función es transportar e introducir la fusión al interior de la célula que expresará el gen de interés (Forsberg *et al.*, 1994).

Una aplicación importante de las fusiones transcripcionales se da en estudios bioquímicos o estructurales de proteínas. En algunos casos existe la necesidad de realizar

estudios sobre alguna proteína de interés, sin embargo, esta es sintetizada en cantidades pequeñas y dentro de un organismo del cual es difícil purificarla. Para la obtención de grandes cantidades de la proteína, se han construido fusiones transcripcionales mediante el uso del gen de interés bajo el control de un promotor fuerte. De esta manera se han podido sintetizar cantidades mayores de la proteína (Snyder *et al.*, 2003).

El gen *gfp* se ha utilizado en la generación, tanto de fusiones traduccionales como de fusiones transcripcionales. En el último caso, la secuencia del gen se clona enseguida de un promotor de interés y se introduce en las células. Esto permite realizar diferentes estudios sobre la funcionalidad de las regiones promotoras o la expresión de la proteína en células y tejidos específicos (Ovidio y Portelles, 1997). Otro ejemplo del uso de una fusión transcripcional se presenta en el plásmido pMV158 de *Streptococcus pneumoniae*, el cual posee el gen *gfp* bajo control del promotor P<sub>M</sub> que es inducible por maltosa, esto permite la expresión de GFP en bacterias que utilicen maltosa como única fuente de carbono (Nieto y Espinosa, 2003).

## **2.6 Herramientas biotecnológicas en los estudios de patogénesis**

Los estudios sobre los mecanismos moleculares que operan durante la patogénesis bacteriana en humanos y en animales de granja, han cobrado fuerza en los últimos años debido a los daños que causan los patógenos. Parte del conocimiento adquirido sobre las relaciones hospedero-patógeno, se ha logrado mediante el uso de herramientas genéticas que permiten la expresión de genes. Dentro de las bacterias Gram positivas, la patogénesis causada por *S. aureus* no ha sido la excepción, ya que se ha trabajado con vectores bifuncionales que han facilitado la expresión de genes involucrados en la patogénesis

(Charpentier *et al.*, 2004). Estas herramientas han sido importantes para estudiar algunos aspectos de la patogénesis; sin embargo, existen aún limitantes para estudiar otras interacciones del patógeno con el hospedero, por ejemplo, su capacidad para ser endocitado y vivir intracelularmente en las células del hospedero (internalización).

## **2.7 Características generales de *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* es una bacteria Gram positiva no esporulada; generalmente sin cápsula; es esférico (0.5-1.5  $\mu\text{m}$ ); se agrupa en racimos, aunque pueden observarse en pares, cadenas cortas o aislados; es anaerobio facultativo; móvil y posee un metabolismo fermentativo; produce pigmentos blanco-amarillo, dorado, naranja y oscuro; causa procesos supurativos (piógenos) y con frecuencia desarrolla resistencia a antibióticos, cuyos determinantes de resistencia se encuentran generalmente en plásmidos (Brock y Madigan, 1991).

El género *Staphylococcus* comprende 32 especies y 10 subespecies, los estafilococos más virulentos pueden coagular el plasma (coagulasa positivo), los menos virulentos son incapaces de hacerlo (coagulasa negativo), fermentan lentamente muchos azúcares, producen ácido láctico y no producen gas, poseen actividad proteolítica, son resistentes a desecación (4 meses a 4 °C), resisten 50 °C por 30 min, son halófitos (soportan hasta 10% de NaCl) y son responsables de diversas enfermedades tanto en humanos como en animales domésticos. Dentro de las patologías que ocasionan destacan la mastitis del ganado bovino lechero que se caracteriza por la inflamación aguda de la glándula mamaria. Debido a que *S. aureus* es aislado frecuentemente de los derivados de la leche, la presencia de esta bacteria en la leche cruda representa un riesgo para la salud de los humanos y causa pérdidas económicas a los productores de leche en todo el mundo (Sutra y Poutrel, 1994).

### III. JUSTIFICACIÓN

La mastitis es una enfermedad que se define como la inflamación de la glándula mamaria. *Staphylococcus aureus* es uno de los principales agentes causantes de esta enfermedad, lo que ha despertado el interés en el estudio de las interacciones de *S. aureus* con las células del tejido mamario de bovinos, así como de los factores moleculares que participan activamente durante la interacción del patógeno con el hospedero. Actualmente, en el laboratorio se realizan estudios de internalización de esta bacteria en células epiteliales de la glándula mamaria de bovinos; sin embargo, no se cuenta con un método efectivo para evaluar la internalización de *S. aureus*. Para llevar a cabo este tipo de estudios se requiere de la disponibilidad de diferentes herramientas biotecnológicas que permitan verificar dicha internalización. Debido a lo anterior, este trabajo de investigación tuvo como objetivo principal realizar la construcción de una fusión transcripcional para la expresión de la proteína GFP en células de *S. aureus*, bajo el control del promotor constitutivo *pBlaz*. Esta fusión servirá de base para la generación de un vector que permitirá la expresión de la proteína GFP en células de *S. aureus*. La expresión de la GFP permitirá la realización de estudios de internalización de *S. aureus* en células del tejido mamario bovinos.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La construcción de una fusión transcripcional con el promotor *pBlaz* y la región codificante de *gfp*, permite la expresión de la proteína verde fluorescente en células de *Staphylococcus aureus*.

#### **V. OBJETIVOS**

##### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

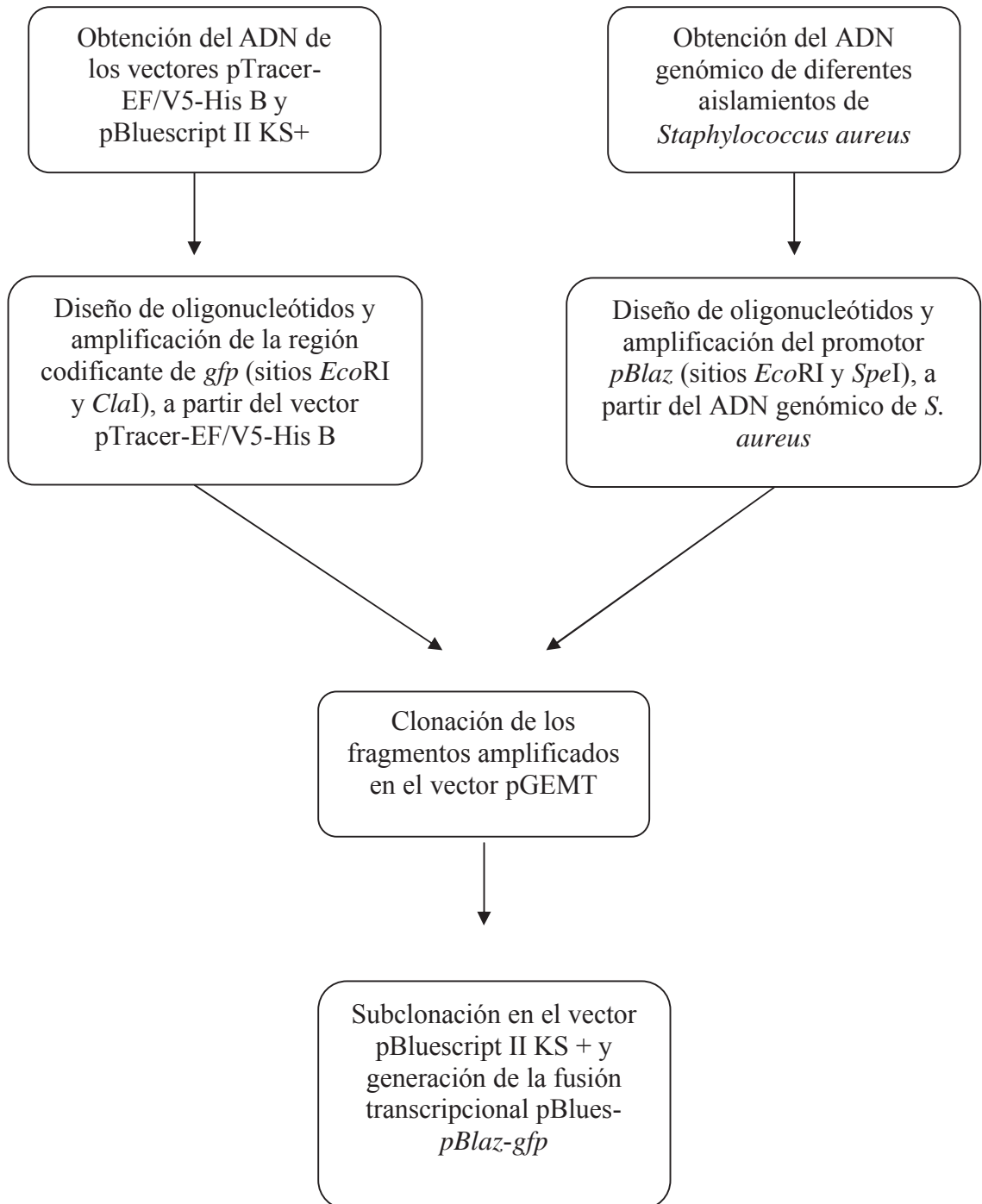
Construir una fusión transcripcional, utilizando el promotor *pBlaz* y la región codificante de *gfp*, que permita la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en células de *Staphylococcus aureus*.

##### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Diseñar oligonucleótidos específicos para amplificar el promotor *pBlaz* y la región codificante de *gfp*.
2. Clonar los fragmentos amplificados del promotor *pBlaz* y de la región codificante de *gfp* en un vector de clonación para productos de PCR.
3. Construir la fusión transcripcional *pBlaz-gfp* en el vector pBluescript II KS+.

## VI. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

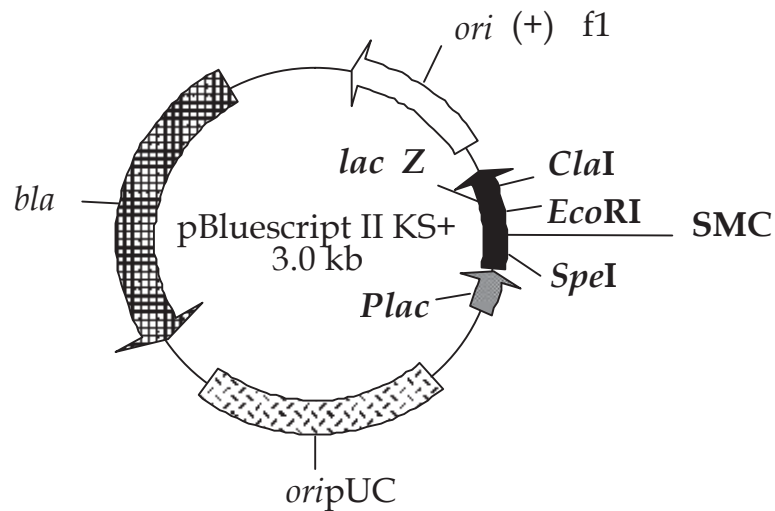
### 6.1 Diagrama general de la estrategia metodológica realizada en este trabajo de investigación



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Características del plásmido pBluescript II KS + para *Escherichia coli*

El plásmido pBluescript II KS + (Stratagene) es un vector de clonación para *E. coli* que permite seleccionar las clonas recombinantes por resistencia a ampicilina, además, posee el gen de la  $\beta$ -galactosidasa, que permite la  $\alpha$  complementación y la selección por color. Además posee un sitio múltiple de clonación que facilita la inserción de fragmentos de ADN (Figura 3). Este vector se utilizó para realizar las manipulaciones genéticas para generar la fusión transcripcional.

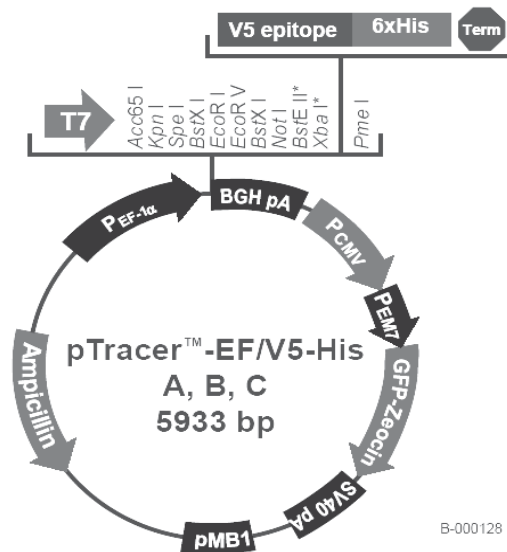


**Figura 3.** Organización genética del vector de clonación pBluescript II KS +. Las flechas indican la orientación de los marcos de lectura. Se muestran los sitios de restricción de las enzimas *ClaI*, *EcoRI* y *KpnI*; el origen del fago *f1*, *ori (+) f1*; el gen de la  $\beta$ -galactosidasa, *lacZ*; el promotor del gen *lacZ*, *Plac*; el sitio múltiple de clonación, SMC; el origen de la replicación en *E. coli*, *ori pUC*; y el gen de resistencia a ampicilina, *bla* (Stratagene).

### 7.2 Características del vector pTracer-EF/V5-His B

El plásmido pTracer-EF/V5-His B (Invitrogen) es un vector de clonación para células de mamífero que posee la secuencia codificante para *gfp* fusionada al gen que

codifica el antibiótico zeocina. Este vector permite la detección de las células que han sido transformadas o transfectadas mediante microscopía de fluorescencia, además de la selección de las clonas resistentes al antibiótico zeocina, entre otras características (Figura 4). Se utilizó como ADN molde para la obtención de la región codificante de GFP.



**Figura 4.** Organización genética del vector de clonación pTracer-EF/V5-His B. Las flechas indican la orientación de los marcos de lectura. Se muestran los sitios de restricción de diferentes enzimas; así como la secuencia codificante *gfp-zeocina*, que permite la detección visual de la célula transfectada y la selección de las clonas recombinantes (Invitrogen).

### 7.3 Obtención de ADN genómico de *Staphylococcus aureus*

El ADN genómico de *S. aureus* se obtuvo de aislamientos colectados a partir de las glándulas mamarias de vacas lactantes con mastitis. Las células de *S. aureus* se cultivaron en 200 ml de medio LB (triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, y cloruro de sodio 5 g, H<sub>2</sub>O cbp 1000 ml) durante toda la noche a 28–30 °C. Las células se colectaron por centrifugación a 12,000 rpm durante 3 min y se resuspendieron en 5 ml de buffer SET (NaCl 75 mM,



EDTA 25 mM, Tris 20 mM, pH 7.5). Se adicionó lisozima para una concentración final de 1mg/ml y se incubó por 1 h a 37 °C. Se agregó 0.5 ml de SDS al 10% y se incubó a 55 °C con agitación ocasional durante 2 h. Posteriormente se agregó 1.75 ml de NaCl 5 M y 7.25 ml de cloroformo. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con agitación frecuente. Los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min, para luego transferir la fase acuosa a tubos nuevos. El ADN se precipitó con 7.5 ml de isopropanol colocándose por 5 min en hielo. El ADN se colectó por centrifugación a 12,000 rpm durante 10 min, la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se secó a temperatura ambiente. El ADN fue resuspendido en 200 µl de amortiguador TE o agua desionizada estéril y se colocó por 30 min a 55 °C (Pospiech y Neumann, 1995). Posteriormente, se revisó la integridad del ADN mediante una electroforesis en geles de agarosa al 0.6%.

#### **7.4 Limpieza de ADN con bromuro de etidio-fenol**

El ADN se limpió mediante el método de bromuro de etidio-fenol (Stemmer, 1991). Para realizar la limpieza, el ADN se resuspendió en 200 µl de agua desionizada estéril en un tubo Eppendorf. A esta muestra se le agregaron 5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y 140 µl de acetato de amonio 7.5 M y se mezcló suavemente. Posteriormente, se agregaron 350 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó hasta obtener una mezcla homogénea. Luego, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min, con lo cual se formaron dos fases. La fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo (cuidando de no traerse restos de fenol-cloroformo y bromuro de etidio). Después, se agregó un volumen de etanol absoluto frío y se dejó reposar en hielo por 5 min, esto permitió la precipitación del ADN. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min para luego descartar el sobrenadante, cuidando que no

se desprendiera la pastilla. A ésta se le agregaron 200 µl de etanol al 70% para eliminar los restos del etanol absoluto. Por último, las pastillas fueron mantenidas a 65 °C por 6 min para evaporar el etanol al 70% y se resuspendieron en un volumen adecuado de agua desionizada estéril o amortiguador TE.

### **7.5 Purificación de ADN a partir de agarosa (Gene clean)**

Después de realizar la electroforesis se recortó la banda o bandas de interés y se colocó en un tubo Eppendorf. Se agregaron 3 volúmenes de yoduro de potasio 6.2 M y el tubo fue incubado a 55 °C hasta fundir la agarosa. Posteriormente, se adicionaron 20 µl de vidrio en polvo y se mezcló vigorosamente para evitar la formación de grumos (el ADN se une a las partículas de vidrio por la atracción de cargas). Luego se colocó el tubo en hielo por 20 min agitando constantemente. Enseguida se centrifugó por 20 s a 13,000 rpm para empastillar el vidrio con el ADN y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió en 1 ml de solución de lavado de New Wash (0.2 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl, 0.002 M EDTA, etanol 50%), se centrifugó por 20 s y se descartó el sobrenadante (ésto para eliminar los restos de sales de yoduro de potasio). El lavado se repitió 2 veces más. Después del último lavado se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en 10 µl de agua destilada desionizada estéril y se incubó por 3 min a 45 °C. La muestra se centrifugó por 3 min a 13,000 rpm y se recuperó el sobrenadante en un tubo Eppendorf nuevo. Esta operación se repitió dos veces más. Por último, la integridad del ADN fue verificada mediante una electroforesis en un gel de agarosa y el ADN fue cuantificado (Sambrook y Rusell, 2001).

## 7.6 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñó un par de oligonucleótidos mediante el programa Oligo 4.1 para amplificar la región codificante de *gfp* fusionada al gen *zeocina*, a partir del vector pTracer-EF/V5-His B. Asimismo, se diseñó un par de oligonucleótidos para amplificar el promotor *pBlaz* a partir de ADN genómico de cepas de *S. aureus* (Wang *et al.*, 1991). En cada uno de los oligonucleótidos se incorporaron sitios únicos de corte enzimáticos para facilitar la subclonación en el vector de clonación pBluescript II KS +. Los sitios de restricción para *gfp* fueron: el sitio *EcoRI* (GAATTC) al 5' y *ClaI* (ATCGAT) al 3', mientras que para el promotor *pBlaz* fueron: el sitio *SpeI* (ACTAGT) al 5' y *EcoRI* (GAATTC) al 3'. Los productos de amplificación se clonaron en el vector pGEMT (Promega), este es un vector de clonación para productos de PCR, que posee un gen de resistencia a ampicilina y el gen reportero *lacZ*.

## 7.7 Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Las reacciones de PCR se prepararon de la siguiente manera: para un volumen de reacción de 20  $\mu$ l se adicionó una cantidad variable de ADN (desde 20 ng hasta 500 ng), se agregó 1  $\mu$ l de los oligonucleótidos (10 pmol/ $\mu$ l), enseguida se agregó 2  $\mu$ l del amortiguador para PCR (10X) para estabilizar la reacción, posteriormente se adicionó 2  $\mu$ l de los dNTP's (2.5 mM), a continuación se agregó 0.6  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (50 mM) para una concentración final de 1.5 mM (aunque este volumen varió dependiendo de las condiciones de la PCR) y, finalmente se agregó 1 U de la enzima *Taq* Polimerasa (Invitrogen). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador "GeneAmp PCR System 2700" bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 2. Una vez terminada la reacción de la PCR, las

amplificaciones se verificaron en un gel de agarosa al 2%.

**Tabla 2. Condiciones de la PCR**

Condiciones de la reacción		
1 Ciclo		
95 °C	5 min	Desnaturalización del ADN
25 Ciclos		
94 °C	1 min	Desnaturalización del ADN
50 °C	30 s	Alineamiento
72 °C	2 min	Extensión
1 Ciclo		
72 °C	10 min	Extensión final

### 7.8 Ligación de fragmentos de ADN

Las reacciones de ligación de ADN se realizaron de acuerdo con el siguiente protocolo. El ADN a ligar se purificó por Gene Clean. En un tubo Eppendorf sobre hielo se colocaron diferentes concentraciones de ADN del inserto y el vector bajo las siguientes fórmulas recomendadas por el fabricante:

$$\left( \frac{50 \text{ ng vector} \times \text{kb inserto}}{\text{kb vector}} \right) \left( \frac{1}{1} \right) = \text{ng de inserto}$$

$$\left( \frac{50 \text{ ng vector} \times \text{kb inserto}}{\text{kb vector}} \right) \left( \frac{3}{1} \right) = \text{ng de inserto}$$

Una vez realizada la mezcla del ADN inserto:vector, se adicionó amortiguador (10X con ATP); agua desionizada c.b.p. 10 µl y 3 U de ADN ligasa T<sub>4</sub>. La mezcla se incubó por 1

h a temperatura ambiente y luego la mezcla se desionizó por 15 min sobre una membrana de 0.025  $\mu\text{m}$  (Millipore). Con esta mezcla de ligación se electroporaron células de *E. coli* XL1-Blue.

### **7.9 Desionización de ADN mediante diálisis**

Para desionizar el ADN se colocó agua destilada desionizada estéril en una caja Petri. Posteriormente, se colocó una membrana de 0.025  $\mu\text{m}$  (Millipore) estéril y sobre esta se colocó el ADN a desionizar. La muestra se mantuvo durante 15 min y transcurrido este tiempo el ADN fue recuperado y almacenado a 4 °C hasta su uso.

### **7.10 Preparación de células para electroporación de *Escherichia coli***

Las células de *E. coli* se utilizaron para realizar las manipulaciones de ADN. Las células para electroporación de *E. coli* se prepararon de la siguiente manera: se inocularon 2 ml de medio LB con la cepa a preparar, en este caso la XL1-Blue, y se crecieron toda la noche a 37 °C. Este cultivo sirvió para inocular 250 ml de medio LB, en el cual se dejaron crecer las células hasta una  $\text{DO}_{600}$  de 0.5-1. Posteriormente, se colectaron las células por centrifugación (6,000 rpm, 10 min, 4 °C). La pastilla se lavó con 250 ml de agua desionizada estéril (4 °C) y se precipitó por centrifugación. Enseguida se lavó nuevamente con 125 ml de agua desionizada estéril a 4 °C. La pastilla se resuspendió en 5 ml de glicerol al 10% y se centrifugó. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 1 ml de glicerol al 10% frío. Las células se distribuyeron en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  y se almacenaron a -80 °C hasta su uso (Sambrook y Rusell, 2001).

### **7.11 Electroporación de células de *Escherichia coli***

Las células de *E. coli* se descongelaron en hielo. Dentro de la campana de flujo laminar, se colocaron en un tubo Eppendorf frío de 30 a 50  $\mu$ l de células con 5  $\mu$ l de la mezcla de ligación y se mezclaron con las células. La mezcla se colocó en la celda de electroporación (0.2 cm) (Invitrogen) y se le aplicó un pulso en el electroporador (*E. coli* pulser de Bio-Rad) a 25  $\mu$ F, 200 Ohms y 2.5 kV. Posteriormente, se añadió 1 ml de medio LB y las células se transfirieron a un tubo Falcón y se incubó por 1 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, las células se distribuyeron en cajas de LBA+amp+X-Gal+IPTG (ampicilina, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopironósido, isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) adicionando los siguientes volúmenes del cultivo 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l y 200  $\mu$ l por caja Petri y se incubaron de 12 a 16 h a 37 °C. Las colonias transformadas se analizaron mediante minipreparaciones de ADN plasmídico (Sambrook y Russell, 2001).

### **7.12 Minipreparación de plásmidos de *Escherichia coli***

Para las minipreparaciones de plásmidos en *E. coli* se inocularon 2 ml de medio LB con el antibiótico ampicilina 100  $\mu$ g/ml. Los tubos se incubaron toda la noche a 37 °C. Posteriormente se colocaron 1.5 ml del cultivo en un tubo Eppendorf y se centrifugó por 1 min a 12,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100  $\mu$ l de la solución I (glucosa 0.1 M, EDTA 0.01 M, Tris 0.05 M pH 8), posteriormente se le adicionaron 200  $\mu$ l de la solución II (0.2 M NaOH, 1% SDS), se agitó brevemente y se incubaron 5 min en hielo. Después se agregaron 150  $\mu$ l de la solución III (acetato de sodio 3 M, pH 4.8), agitándose levemente y se incubó por 10 min en hielo. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4 °C y el sobrenadante se colectó en un tubo nuevo. Los ácidos nucleicos se

precipitaron con un volumen de isopropanol frío, incubándose por 5 min a temperatura ambiente y se colectaron por centrifugación. Finalmente, la pastilla de ADN se resuspendió en 30  $\mu$ l de agua desionizada estéril o amortiguador TE (Birboim y Doly, 1979). Posteriormente, el ADN se revisó en un gel de agarosa al 0.6% y se confirmó la clonación de los fragmentos mediante digestión y PCR.

### **7.13 Maxipreparación de plásmidos de *Escherichia coli***

Para realizar las maxipreparaciones, se incubaron 200 ml de medio LB con una colonia de *E. coli* la cual contenía el plásmido de interés, y se creció toda la noche a 37 °C. El cultivo se centrifugó por 10 min a 4,000 rpm a 4 °C, descartando el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 5 ml de solución I (glucosa 0.1 M, EDTA 0.01 M, Tris 0.05 M pH 8, lisozima 0.2%) y se colocó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 10 ml de la solución II (0.2 M NaOH, 1% SDS) agitándose brevemente, después se dejó a 4 °C por 10 min. Transcurrido este tiempo, se agregaron 7.5 ml de solución III (acetato de sodio 3 M, pH 4.8) y se agitó brevemente para después colocarse por 30 min a 4 °C. La suspensión se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min y se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo. Se adicionó un volumen de isopropanol frío, se agitó y se colocó a -20 °C por 40 min. Finalmente, se centrifugó por 20 min a 10,000 rpm para precipitar los ácidos nucleicos (Sambrook y Russell, 2001). El ADN plasmídico se limpió por el método de bromuro de etidio-fenol-acetato de amonio (Stemmer, 1991).

### **7.14 Digestión de ADN con enzimas de restricción**

Las digestiones enzimáticas se realizaron utilizando las recomendaciones del

proveedor. En un tubo Eppendorf sobre hielo se adicionaron los siguientes reactivos: ADN (500 ng – 2 µg); amortiguador (10X); agua desionizada c. b. p. 20 µl; enzima, 10 U. La mezcla de reacción se colocó a 37 °C, por un tiempo mínimo de 2 h. Para algunos casos fue necesario realizar dobles digestiones, respecto a esto se realizó lo siguiente: Se llevó a cabo la primera digestión y la muestra se llevó a 200 µl con agua desionizada estéril. Se adicionó 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1. Se agitó levemente para posteriormente centrifugar a 14,000 rpm por 5 min, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se adicionó 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1. Se agitó y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min. De nueva cuenta se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se precipitó el ADN con acetato de sodio (140 µl) 3 M, pH 5.2 y 600 µl de isopropanol frío. Se colocó 5 min en hielo y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min. Finalmente, se lavó con 200 µl de etanol al 70% frío y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min. La pastilla se secó con calor (65 °C) y el ADN se resuspendió en 10 µl de agua destilada desionizada estéril. Finalizado este proceso, se realizó la segunda digestión y se inactivó la enzima. En caso de que la enzima no se inactivara por calor se procedió a limpiar por el método de bromuro de etidio-fenol.

### **7.15 Reacciones de secuenciación**

La secuenciación se realizó de manera automática en un secuenciador ABI PRISM 310. Se utilizó el kit Big Dye Terminator v3.1 de Applied Biosystems. Las reacciones se realizaron en un termociclador bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 3. Al finalizar la reacción de extensión, el ADN fue precipitado y sometido a limpieza.



**Tabla 3. Condiciones de las reacciones de secuenciación**

1 Ciclo			
95 °C	5 min		Desnaturalización del ADN
25 Ciclos			
96 °C	30 s		Desnaturalización del ADN
50 °C	30 s		Alineamiento
60 °C	4 min		Extensión

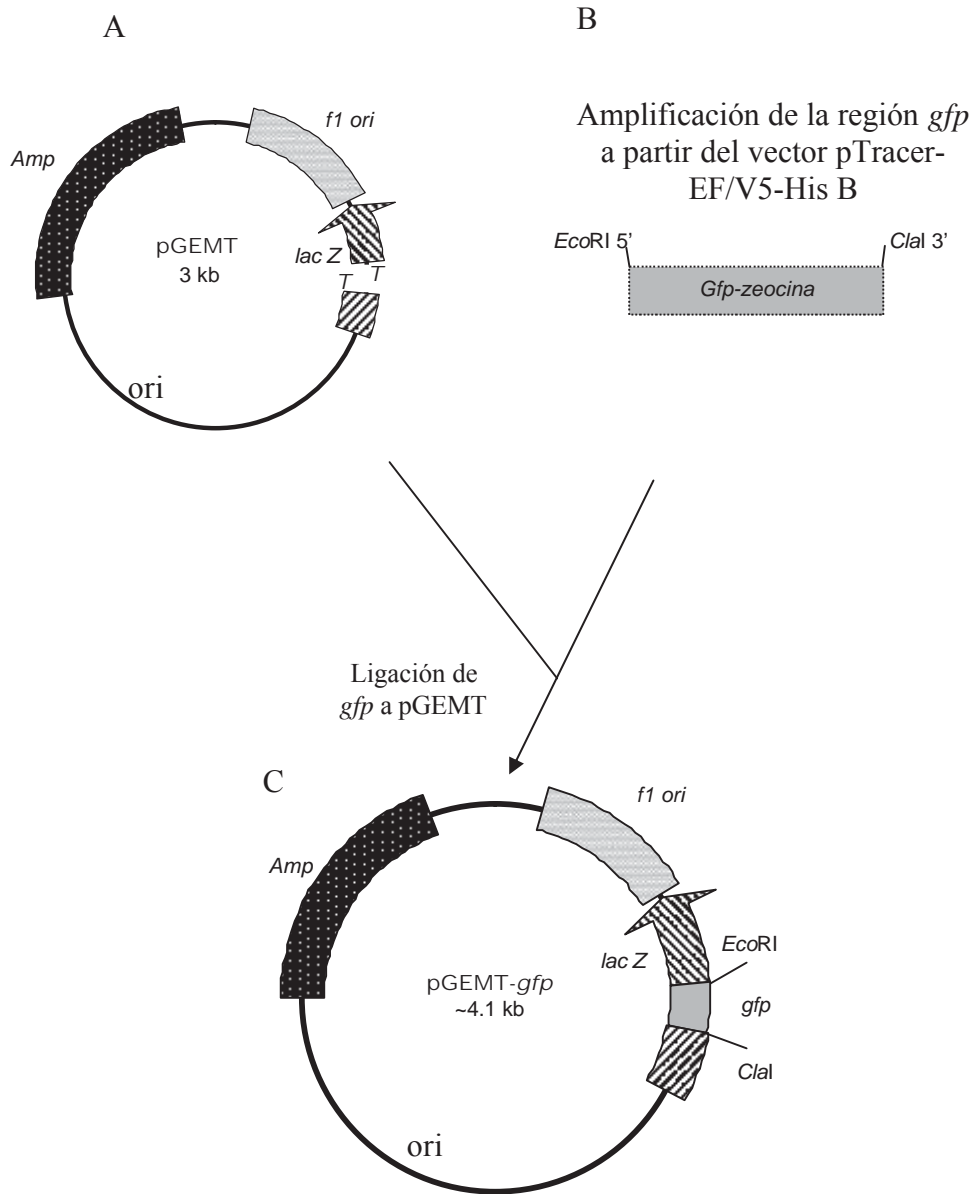
### 7.16 Limpieza de las reacciones de secuenciación

A cada muestra de ADN se le colocó 2 µl de EDTA (125 mM, pH 8), 2 µl de acetato de sodio 3 M pH 4.8 y 50 µl de etanol absoluto. Las muestras se mezclaron en el vórtex (homogenizador) y se dejaron a temperatura ambiente por 30 min, posteriormente, se centrifugó por 20 min a 13,000 rpm marcando la orientación de las muestras. Se retiró el sobrenadante con una micropipeta y se adicionaron 250 µl de etanol al 70% y se agitó levemente en el vórtex. Las muestras se centrifugaron nuevamente por 10 min, y se retiró el sobrenadante con una micropipeta, para posteriormente secarlas en el concentrador (65 °C). Las muestras fueron resuspendidas en 25 µl de amortiguador TSR (Applied Biosystems) o formamida para después mezclarse en el vórtex por un tiempo de 2 a 3 min, y se incubaron a 95 °C durante 2 min, inmediatamente después los tubos se colocaron en hielo por 5 min, y las muestras se pasaron a tubos de secuenciación colocándose a -20 °C hasta su análisis en el secuenciador de ADN. Las reacciones de secuenciación se realizaron para confirmar la identidad de los fragmentos clonados.

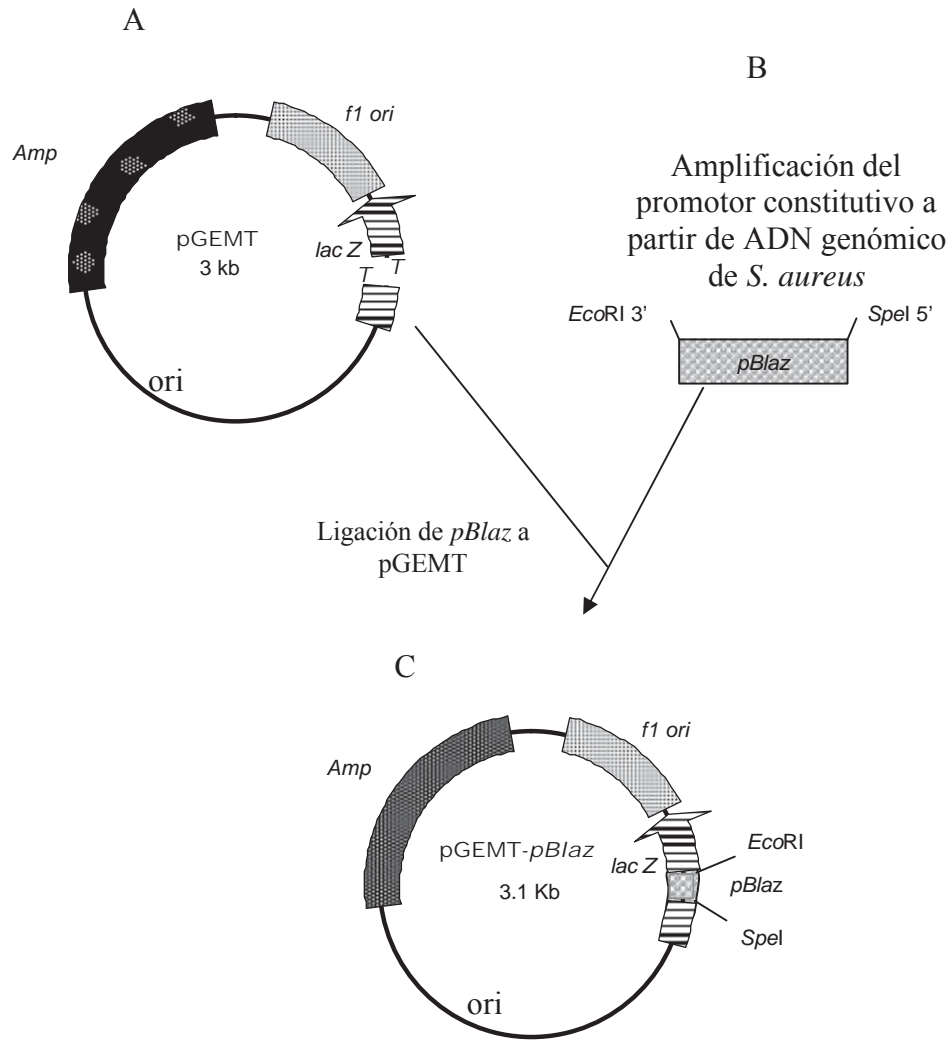
### 7.17 Estrategias para la construcción de la fusión transcripcional pBlues-*pBlaz-gfp*

Con el fin de obtener la fusión transcripcional pBlues-*pBlaz-gfp*, inicialmente se realizó la amplificación del fragmento *gfp* (~1.1 kb), el cual se clonó en el vector pGEMT

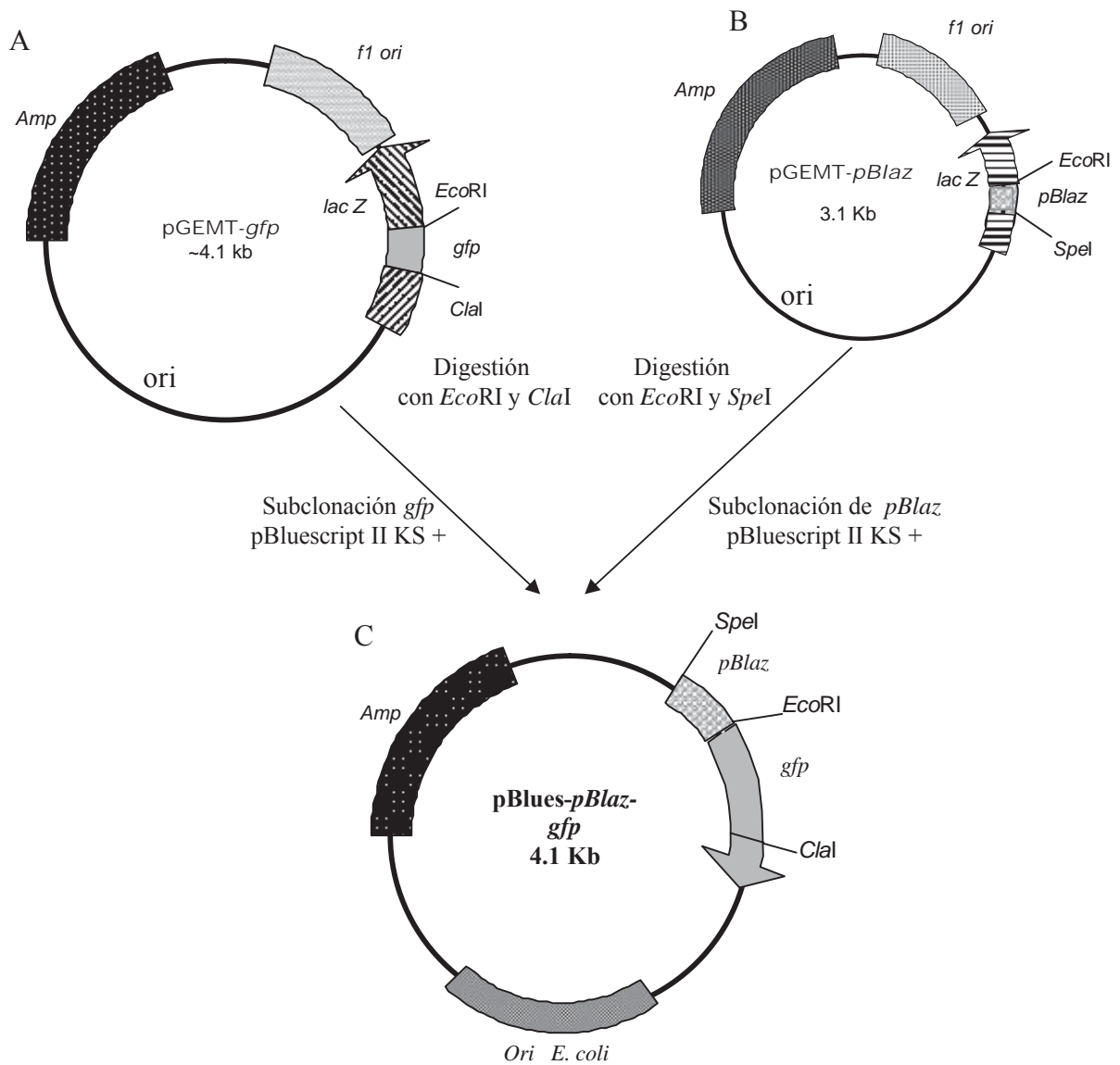
(Figura 5A) y se obtuvo la construcción pGEMT-*gfp* (4.1 kb) (Figura 5C). Al mismo tiempo se realizó la amplificación del promotor *pBlaz* (~ 100 pb), el cual se clonó en el vector pGEMT (Figura 6A) y se obtuvo la construcción pGEMT-*pBlaz* (~3.1 kb) (Figura 6C). Posteriormente, y con el fin de obtener la fusión transcripcional pBlues-*pBlaz-gfp*, los fragmentos *gfp* y *pBlaz* fueron liberados por doble digestión, con las enzimas adecuadas, del vector pGEMT (Figura 7A y 7B) y se subclonaron en el vector pBluescript II KS +. A esta construcción se le denominó pBlues-*pBlaz-gfp* (Figura 7C).



**Figura 5.** Estrategia para la construcción de pGEMT-*gfp*. A) Vector pGEMT funcional para *E. coli*. B) Amplificación del fragmento *gfp-zeocina* del vector pTracer-EF/V5-His. B. C) Construcción de pGEMT-*gfp*.



**Figura 6.** Estrategia para la construcción de pGEMT-*pBlaz*. A) Vector pGEMT funcional para *E. coli*. B) Amplificación del fragmento *pBlaz*. C) Construcción de pGEMT-*pBlaz*.



**Figura 7.** Construcción de la fusión transcripcional pBlues-pBlaz-gfp. A) Construcción pGEMT-gfp. B) Construcción pGEMT-pBlaz. C) Construcción pBlues-pBlaz-gfp (4.1 kb) con los sitios de corte *SpeI*, *EcoRI* y *ClaI*. La flecha indica la dirección de la transcripción.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Diseño de los oligonucleótidos específicos para *pBlaz* y *gfp*

El diseño de los oligonucleótidos para amplificar *gfp* se realizó a partir de la secuencia del vector de expresión para células de mamífero pTracer-EF/V5HisB, el cual contiene el gen *gfp* fusionado a la *zeocina*, mientras que el promotor *pBlaz* se diseñó a partir de secuencias reportadas en el GenBank (Wang *et al.*, 1991). Como se observa en cada uno de los oligonucleótidos se incorporaron sitios de corte enzimáticos únicos para facilitar el manejo posterior y la subclonación de los mismos en el vector pBluescript II KS + (Tabla 4).

**Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para amplificar *pBlaz* y *gfp***

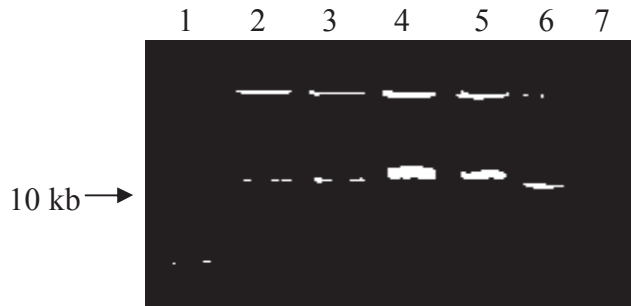
Oligonucleótido	Secuencia
5'GFPEcoRI	5' CACCGAATTCGTGGAGGAACTAAACCATGGCTAGC 3'
3'GFPClaI	5' CACCATCGATTCAGTCCTGCT CTCG 3'
5' <i>pBlaz</i> SpeI	5' TACGTTACTAGTAGCTTACTATGCCATTAT 3'
3' <i>pBlaz</i> EcoRI	5' ATTCGTGAATTC AATAAACCTCCGATATT 3'

En negritas se muestran los sitios de corte enzimáticos introducidos

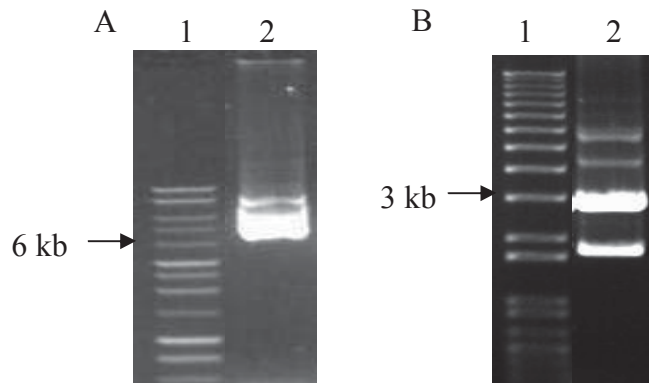
### 8.2 Obtención de ADN genómico de *Staphylococcus aureus* y de los vectores pTracer-EF/V5HisB y pBluescript II KS +

*pBlaz* es un promotor estafilococal y se ha reportado su presencia en diferentes cepas de *S. aureus*. De esta manera para realizar la búsqueda de *pBlaz*, mediante PCR, se realizó la extracción del ADN genómico de diferentes aislamientos de *S. aureus* obtenidos de la glándula mamaria de vacas lactantes con mastitis. En la figura 8 se muestran los resultados de la extracción del ADN genómico de algunos de estos aislamientos. De los carriles 2 a 6 se muestra el ADN obtenido de los aislamientos SA 2-1, SA 2-11, SA 2-2, SA 2-21, SA 2-

1AM y SA 2-2AM, respectivamente. Como puede observarse el ADN se obtuvo en una buena cantidad e integro. La amplificación de *gfp* se realizó a partir del vector pTracer-EF/V5HisB (6 kb), obtenido a partir de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* transformada con este vector. Por otra parte, para la subclonación de la región *gfp*, así como para la región promotora *pBlaz*, se requería de la obtención del vector pBluescript II KS+? En la figura 9B se muestra el ADN de este plásmido (3 kb), el cual fue obtenido a partir de la cepa XL-1 Blue de *E. coli*.



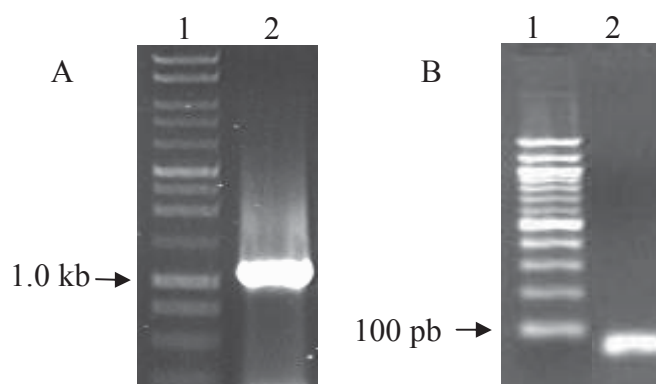
**Figura 8.** Obtención del ADN genómico de aislamientos de *Staphylococcus aureus*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb ladder (Promega). Carriles 2-7) Aislamientos SA 2-1, SA 2-11, SA 2-2, SA 2-21, SA 2-1AM y SA 2-2AM, respectivamente.



**Figura 9.** ADN plasmídico de los vectores pTracer-EF/V5HisB y pBluescript II KS+. A). Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb ladder (Promega). Carril 2) ADN del vector pTracer-EF/V5HisB. B). Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb plus ladder (Invitrogen). Carril 2) ADN del vector pBluescript II KS +.

### 8.3 Amplificación del promotor *pBlaz* y de la región codificante de *gfp* mediante PCR

Una vez diseñados los oligonucleótidos específicos y luego de la obtención del ADN molde, requerido para amplificar el promotor *pBlaz* y el fragmento *gfp*, se procedió a realizar la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, bajo las condiciones mostradas en Materiales y Métodos. En la figura 10A, carril 2, se muestra la amplificación del fragmento *gfp* de ~1.1 kb, la cual corresponde al tamaño esperado tomando en cuenta que *gfp* se encuentra fusionado a *zeocina*. Por otro lado, en la figura 10B carril 2, se observa una banda de ~100 pb, el cual podría contener al promotor *pBlaz*. Cabe mencionar que este fragmento se amplificó en cinco aislamientos de *S. aureus*, sin embargo, solo se trabajó con una de las bandas. Con estos resultados se decidió realizar la clonación por separado de los fragmentos *pBlaz* y *gfp* en el vector pGEMT, el cual es un vector específico para la clonación de fragmentos obtenidos por PCR.

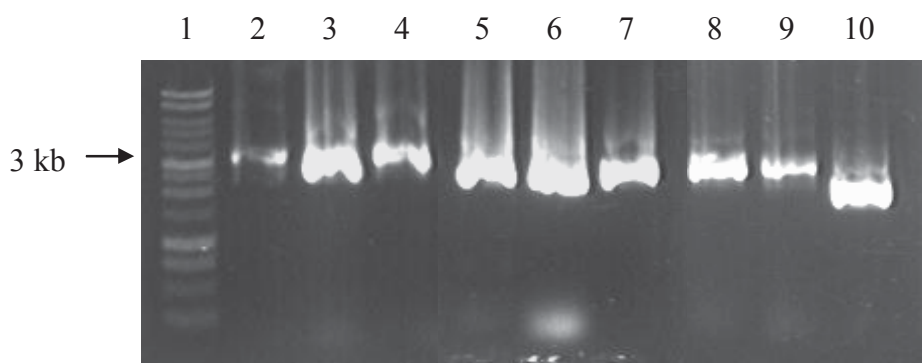


**Figura 10.** Amplificación por PCR de *pBlaz* y *gfp*. A) Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb ladder (Promega). Carril 2) Amplificación del fragmento *gfp* (~1.1 kb). B) Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 100 pb (NE Biolabs). Carril 2) Amplificación de *pBlaz* (~100 pb).



#### 8.4 Clonación de los fragmentos *pBlaz* y *gfp* en el vector pGEMT

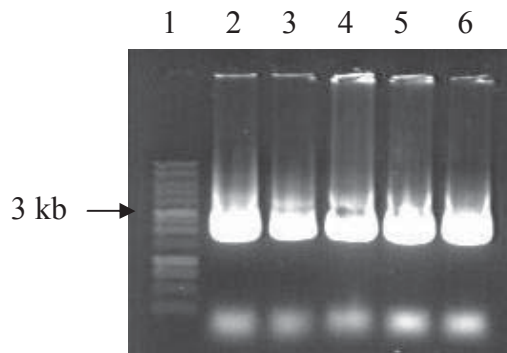
Se realizó la ligación de los fragmentos amplificados *gfp* y *pBlaz* en el vector pGEMT. Posteriormente, se transformaron por electroporación células electrocompetentes (ver Materiales y Métodos) de *E. coli* y se realizó la selección de las posibles transformantes, las cuales fueron analizadas mediante minipreparaciones. El ADN obtenido de algunas de las clonas pGEMT-*gfp* se muestra en la figura 11 (carriles 2 a 10), en donde se observa que algunas de las clonas (a las que se les denominó C<sub>3-3</sub>, C<sub>3-2</sub>, C<sub>2-1</sub>, C<sub>Z-3</sub>, C<sub>B-3</sub>, C<sub>2-3</sub>, C<sub>3-1</sub>, C<sub>1-3</sub>), mostraron un retraso en la movilidad electroforética, lo cual es un indicio de la probable inserción de algún fragmento de ADN. El ADN de estas clonas se limpió y se analizó mediante doble digestión (*EcoRI* y *ClaI*) y PCR, posteriormente se eligió una de las clonas que liberó el fragmento para secuenciarla y verificar la clonación del fragmento *gfp*.



**Figura 11.** Minipreparación de ADN de las clonas recombinantes pGEMT-*gfp*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb DNA ladder (Promega). Carril 2) Clona C<sub>3-3</sub>. Carril 3) Clona C<sub>3-1</sub>. Carril 4) Clona C<sub>2-1</sub>. Carril 5) Clona C<sub>Z-3</sub>. Carril 6) Clona C<sub>B-3</sub>. Carril 7) Clona C<sub>1-3</sub>. Carril 8) Clona C<sub>3-2</sub>. Carril 9) Clona C<sub>2-3</sub>. Carril 10) Clona control (vector pGEMT).

Por otra parte, el ADN obtenido de las transformantes pGEMT-*pBlaz* que fueron seleccionadas se muestra en la figura 12. Sin embargo, no fue posible detectar cambios en la movilidad electroforética en el ADN de estas clonas (denominadas C<sub>3-1</sub>, C<sub>3-2</sub>, C<sub>3-3</sub>, C<sub>3-4</sub> y

C<sub>3-5</sub>) debido, probablemente a que el fragmento clonado es pequeño. Por esta razón, se analizó el ADN de numerosas clonas mediante doble digestión (*EcoRI* y *SpeI*) y PCR. Posteriormente, una de las clonas que liberó el fragmento esperado se secuenció con el fin de confirmar la identidad del fragmento.



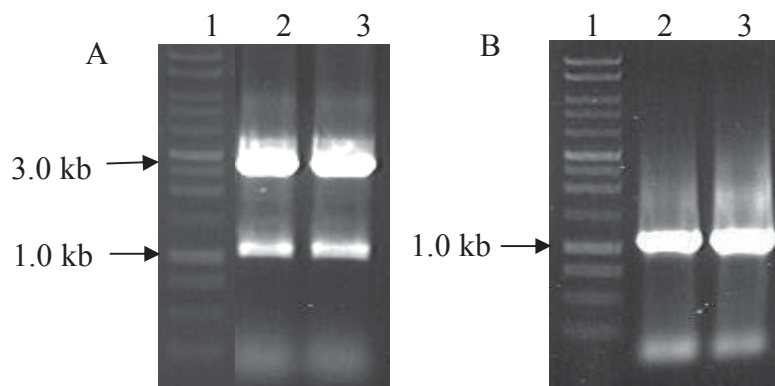
**Figura 12.** Minipreparaciones de ADN de las clonas pGEMT-*pBlaz*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb ladder (Promega). Carril 2) Clona C<sub>3-1</sub>. Carril 3) Clona C<sub>3-2</sub>. Carril 4) Clona C<sub>3-3</sub>. Carril 5) Clona C<sub>3-4</sub>. Carril 6) Clona C<sub>3-5</sub>.

### 8.5 Análisis de las clonas pGEMT-*gfp* y pGEMT-*pBlaz* mediante doble digestión, PCR y secuenciación

Para confirmar la clonación de los fragmentos *gfp* y *pBlaz* en el vector de clonación pGEMT, se realizó un análisis de diferentes clonas obtenidas a partir de las minipreparaciones. El análisis consistió en realizar en primer lugar una doble digestión con las enzimas de restricción apropiadas (*EcoRI* y *ClaI* para las clonas pGEMT-*gfp* y *EcoRI* y *SpeI* para las clonas pGEMT-*pBlaz*), así como un PCR y secuenciación. Para verificar la clonación de *gfp* se eligieron las clonas C<sub>3-2</sub> y C<sub>2-3</sub> (Figura 11, carriles 8 y 9, respectivamente), mientras que para *pBlaz* se eligieron las clonas C<sub>3-1</sub> y C<sub>3-5</sub> (Figura 12, carriles 2 y 6, respectivamente).

En la figura 13A se muestran los resultados de la doble digestión (*EcoRI*, *ClaI*) de las dos clonas pGEMT-*gfp* (C<sub>3-2</sub> y C<sub>2-3</sub>). En los carriles 2 y 3 se observa la liberación de un

fragmento de 1.1 kb que corresponde al tamaño esperado de *gfp*, así como un fragmento de 3 kb que corresponde al tamaño del vector pGEMT linearizado. Posteriormente, las clonas C<sub>3-2</sub> y C<sub>2-3</sub> fueron sometidas a PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para amplificar la región *gfp*. Los resultados se muestran en la figura 13B, en donde se observa la amplificación de un fragmento de 1.1 kb que corresponde al tamaño esperado para *gfp*. Finalmente, se confirmó la identidad del fragmento clonado mediante secuenciación (no mostrado). Una vez que se confirmó la clonación del fragmento *gfp*, se decidió subclonarlo en el vector pBluescript II KS+.

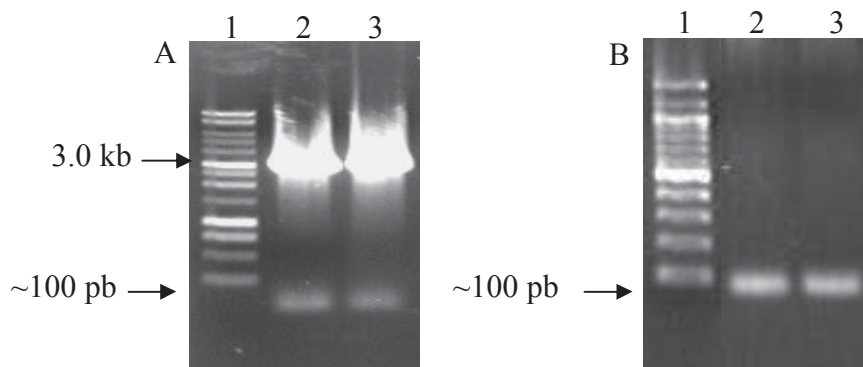


**Figura 13.** Digestión y amplificación de *gfp*. A) Doble digestión de las clonas pGEMT-*gfp*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb ladder (Promega). Carril 2) Digestión (*EcoRI*, *ClaI*) de la clona C<sub>3-2</sub>. Carril 3) Digestión (*EcoRI*, *ClaI*) de la clona C<sub>2-3</sub>. B) Amplificación por PCR de *gfp*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb ladder (Promega). Carril 2) amplificación de *gfp* a partir de la clona C<sub>3-2</sub>. Carril 3) amplificación de *gfp* a partir de la clona C<sub>2-3</sub>.

El ADN de las clonas C<sub>3-1</sub> y C<sub>3-5</sub>, (que potencialmente contendrían la construcción pGEMT-*pBlaz*), se limpió y se analizó mediante doble digestión (*EcoRI* y *SpeI*), PCR y secuenciación. En la figura 14A se muestran los resultados de la doble digestión de las clonas C<sub>3-1</sub> y C<sub>3-5</sub>. En los carriles 2 y 3 se muestra la liberación de un fragmento de

aproximadamente 100 pb que corresponde al tamaño del promotor *pBlaz*, así como un fragmento de 3 kb que corresponde al tamaño del vector pGEMT linearizado.

Posteriormente, estas clonas fueron sometidas a un análisis de PCR para amplificar la región de *pBlaz*. Como puede observarse, se obtuvo la amplificación de un fragmento de aproximadamente 100 pb cuyo tamaño corresponde al de *pBlaz* (Figura 14B, carriles 2 y 3). Finalmente, se confirmó mediante secuenciación la identidad del promotor *pBlaz*. Con este resultado, se procedió a subclonarlo en el vector pBluescript II KS+.

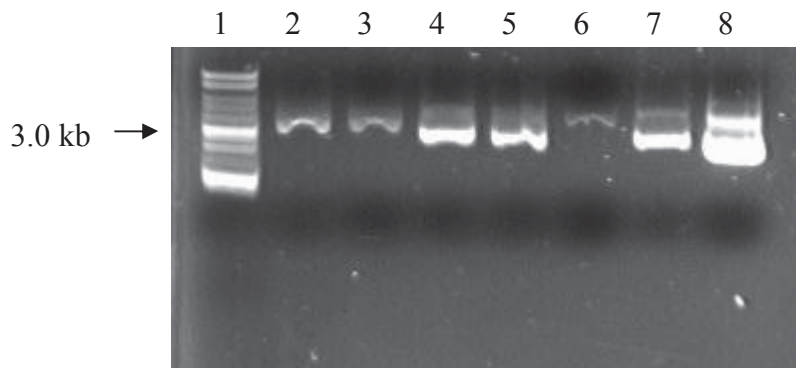


**Figura 14.** Digestión y amplificación de *pBlaz*. A) Doble digestión de las clonas pGEMT-*pBlaz*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb ladder (Promega). Carril 2) Digestión (*EcoRI*, *SpeI*) de la clona C<sub>3-1</sub>. Carril 3) Digestión (*EcoRI*, *SpeI*) de la clona C<sub>3-5</sub>. B) Amplificación por PCR de *pBlaz*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb ladder (Promega). Carril 2) amplificación de *pBlaz* a partir de la clona C<sub>3-1</sub>. Carril 3) amplificación de *pBlaz* a partir de clona C<sub>3-5</sub>.

## 8.6 Subclonación del fragmento *gfp* en el vector pBluescript II KS+ y generación de la construcción pBlues-*gfp*

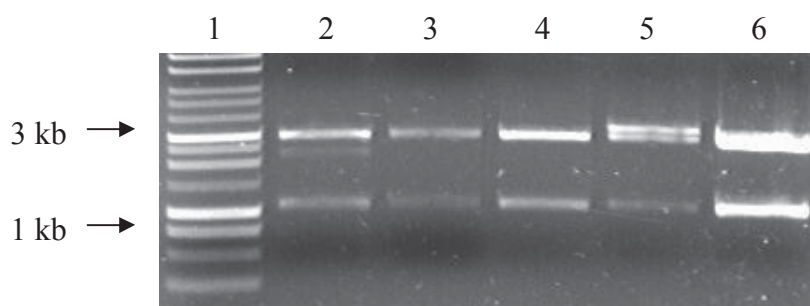
Para realizar la subclonación del fragmento *gfp* en el vector pBluescript II KS+ este fue liberado del vector pGEMT por digestión con las enzimas *EcoRI* y *ClaI*, para posteriormente ser purificado por Gene Clean. Después de la purificación, el fragmento *gfp* fue ligado al vector pBluescript II KS+ (el cual previamente fue digerido con las enzimas

*EcoRI* y *ClaI*). Una vez realizada la ligación dirigida de *gfp* en el vector de clonación, se realizó la transformación por electroporación de células electrocompetentes de *E. coli* y se llevó a cabo la doble selección de las transformantes, las cuales posteriormente fueron analizadas mediante minipreparaciones. El ADN obtenido de algunas de las clonas pBlues-*gfp* se muestra en la figura 15 (carriles 2 a 8), en donde se observa que las clonas P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>5</sub>, P<sub>7</sub>, P<sub>14</sub>, mostraron un retraso en la movilidad electroforética. El ADN de algunas de estas clonas se limpió y se analizó mediante doble digestión para verificar la clonación del fragmento *gfp*.



**Figura 15.** Minipreparación de ADN de clonas pBlues-*gfp*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb ladder (Promega). Carril 2) Clona P<sub>1</sub>. Carril 3) Clona P<sub>2</sub>. Carril 4) Clona P<sub>4</sub>. Carril 5) Clona P<sub>5</sub>. Carril 6) Clona P<sub>7</sub>. Carril 7) Clona P<sub>14</sub>. Carril 8) Clona P<sub>15</sub>.

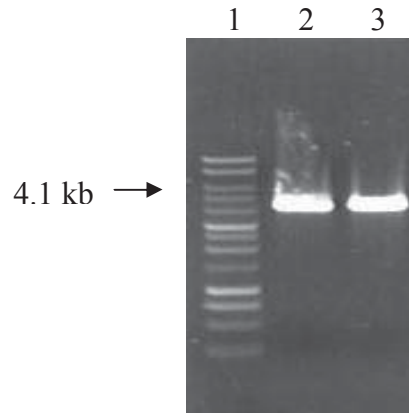
Se realizó la selección de las clonas P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>7</sub>, y P<sub>14</sub>, con base en su movilidad electroforética, para ser analizadas mediante digestión con las enzimas *EcoRI* y *ClaI*. Luego de la digestión del ADN de las diferentes clonas, se observó la liberación de un fragmento de 1.1 kb en todas las transformantes, que corresponde al tamaño esperado para el fragmento *gfp* (Figura 16, carriles 2 a 6). Adicionalmente, se confirmó mediante PCR y secuenciación (no mostrado).



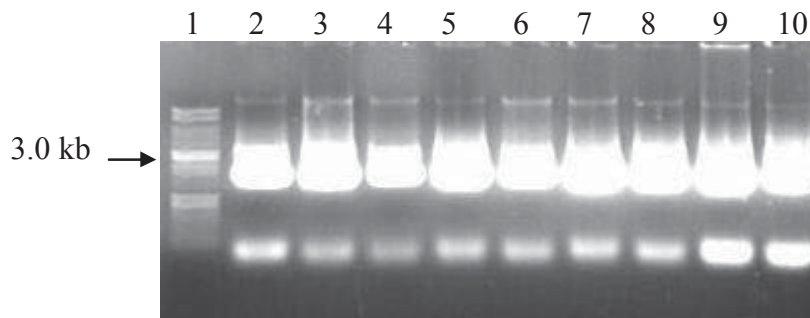
**Figura 16.** Digestiones *EcoRI* y *ClaI* de algunas clonas pBlues-*gfp*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb ladder (Promega). Carril 2) Digestión de la clona P<sub>4</sub>. Carril 3) Digestión de la clona P<sub>7</sub>. Carril 4) Digestión de la clona P<sub>14</sub>. Carril 5) Digestión de la clona P<sub>1</sub>. Carril 6) Digestión de la clona P<sub>2</sub>.

### 8.7 Subclonación del promotor *pBlaz* en la construcción pBlues-*gfp* y generación de la fusión transcripcional pBlues-*pBlaz-gfp*

Con el fin de llevar a cabo la subclonación dirigida del promotor *pBlaz* en la construcción pBlues-*gfp*, se realizó la purificación (por Gene Clean) del promotor *pBlaz*, el cual fue liberado a partir de la construcción pGEMT-*pBlaz* mediante una doble digestión (*EcoRI*, *SpeI*). Adicionalmente se linearizó la construcción pBlues-*gfp* con las enzimas *EcoRI* y *SpeI* para subclonar el promotor *pBlaz* (Figura 17). Esta construcción (pBlues-*gfp*) linearizada se purificó mediante Gene Clean y se le ligó el promotor *pBlaz*. Posteriormente, se llevó a cabo la transformación de las células de *E. coli* y la selección de algunas transformantes para ser analizadas mediante minipreparaciones. El ADN obtenido de algunas de las transformantes correspondientes a pBlues-*pBlaz-gfp*, se muestra en la figura 18 (carriles 2 a 10).



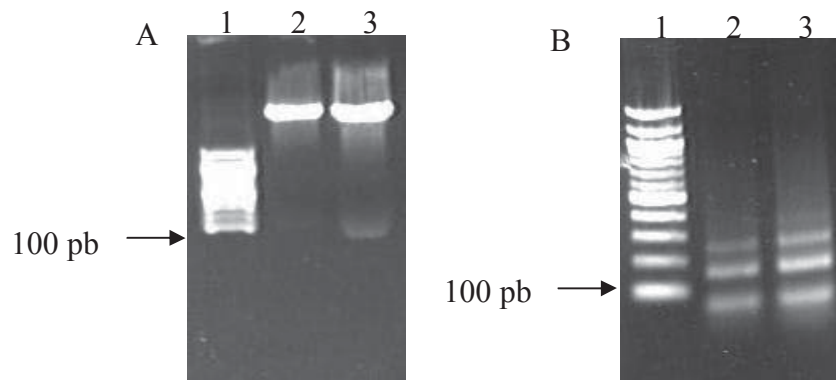
**Figura 17.** Doble digestión (*EcoRI* y *SpeI*) del ADN de clonas pBlues-*gfp*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb ladder (Promega). Carril 2) Digestión de la clona P<sub>2</sub>. Carril 3) Digestión de la clona P<sub>14</sub> pBlues-*gfp*.



**Figura 18.** Minipreparaciones de ADN de las clonas pBlues-*pBlaz-gfp*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb (Promega). Carril 2) Clona LC<sub>1-1</sub>. Carril 3) Clona LC<sub>1-2</sub>. Carril 4) Clona LC<sub>2-2</sub>. Carril 5) Clona LC<sub>3-2</sub>. Carril 6) Clona LC<sub>3-4</sub>. Carril 7) Clona LC<sub>3-3</sub>. Carril 8) Clona LC<sub>3-4</sub>. Carril 9) Clona LC<sub>1-3</sub>. Carril 10) Clona LC<sub>3-1</sub>.

De estas clonas se seleccionaron únicamente las clonas LC<sub>1-2</sub> y LC<sub>2-2</sub> (carriles 3 y 4 respectivamente) para un análisis de doble digestión (*EcoRI*, *SpeI*) y PCR para confirmar la subclonación del promotor *pBlaz*. Los resultados se muestran en la figura 19A (carriles 2 y 3), en donde se observa que luego de la doble digestión del ADN de estas clonas, se libera un fragmento cuyo tamaño corresponde al del promotor *pBlaz* (~100 pb). Finalmente, se

realizó un PCR de las clonas LC<sub>1-2</sub> y LC<sub>2-2</sub> utilizando los oligonucleótidos específicos de *pBlaz*. El resultado se puede observar en la figura 19B, en donde se muestra la amplificación de distintos fragmentos, uno de estos corresponde al tamaño de *pBlaz*.



**Figura 19.** Digestión y amplificación de pBlues-*pBlaz-gfp*. A) Digestión de clonas pBlues-*pBlaz-gfp* con *EcoRI* y *SpeI*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 100 pb (NE Biolabs). Carril 2) Digestión de la clona LC<sub>1-2</sub>. Carril 3) Digestión de la clona LC<sub>2-2</sub>. B) Amplificación por PCR de *pBlaz*. Carril 1) Marcador de tamaño molecular, 1 kb (Promega). Carril 2) Amplificación de *pBlaz* a partir de la clona LC<sub>1-2</sub>. Carril 3) Amplificación de *pBlaz* a partir de la clona LC<sub>2-2</sub>.



## IX. DISCUSIÓN

La mastitis bovina es una de las enfermedades que causa grandes pérdidas económicas y afecta la salud de los animales en la industria lechera. A pesar de que se han llevado a cabo numerosos programas para reducir los problemas asociados a la mastitis bovina, *Staphylococcus aureus* continua siendo uno de los agentes etiológicos más comunes que causan esta enfermedad (Twomey *et al.*, 2000).

Esto ha despertado el interés de numerosos investigadores quienes han abordado diferentes temas de investigación relacionados con el estudio de la interacción molecular entre cepas patógenas de *S. aureus* y las células del hospedero. Uno de los temas de interés se concentra en la realización de estudios de internalización de cepas patógenas de *S. aureus* en las células epiteliales del tejido mamario de bovinos. Hasta este momento no se ha reportado la expresión de proteínas reporteras en *S. aureus* que permitan visualizar la internalización de esta bacteria en células epiteliales del tejido mamario de bovinos. Interesados en obtener una herramienta molecular que permita observar la internalización de *S. aureus* en células del tejido mamario de bovinos, en este trabajo de investigación se generó la fusión transcripcional de la región codificante de la proteína GFP bajo el control del promotor estafilococal *pBlaz* en el vector pBluescript II KS +.

Para la construcción de la fusión transcripcional se requería de la selección de aquellos elementos genéticos que permitieran la expresión de una proteína reportera dirigida por un promotor específico de *S. aureus*. Para esto, se seleccionó la región codificante de la proteína GFP, la cual es una proteína reportera que ha sido ampliamente utilizada en estudios de expresión de genes y funcionalidad de promotores (Ovidio y Portelles, 1997), así como el promotor estafilococal *pBlaz*, el cual ha sido utilizado en sistemas de expresión de

genes de *S. aureus* (Charpentier *et al.*, 2004).

Se diseñaron 2 pares de oligonucleótidos específicos para amplificar la región codificante de la GFP (a partir de vector pTracer-EF/V5HisB) y el promotor *pBlaz* (amplificado del ADN de aislamientos de *S. aureus*) utilizando las secuencias reportadas para los mismos, además se introdujeron diferentes sitios de restricción (Tabla 4) (Wang *et al.*, 1991). La introducción de estos sitios de restricción permitió realizar una subclonación dirigida de ambos fragmentos. Inicialmente, se realizó la amplificación y clonación por separado de los fragmentos en el vector pGEMT, confirmando la identidad de ambos fragmentos mediante doble digestión (Figuras 13A y 14A), amplificación por PCR (Figuras 13B y 14B) y secuenciación (no mostrado).

Con estos resultados se decidió subclonar los fragmentos correspondientes a *gfp* y *pBlaz* en el vector pBluescript II KS + en dos etapas. En la primera, la inserción de los sitios de restricción (*EcoRI* y *ClaI*) permitió realizar una ligación dirigida del fragmento *gfp* en los sitios del vector pBluescript II KS +. En la segunda etapa y para que la expresión de *gfp* fuera dirigida por el promotor *pBlaz*, se realizó la ligación dirigida del promotor hacia el extremo 5' de *gfp* utilizando los sitios *EcoRI* y *SpeI* (Figuras 7 y 19).

Para confirmar la presencia de los fragmentos correspondientes a *gfp* y *pBlaz* en la construcción denominada pBlues-*pBlaz-gfp*, se realizaron algunos experimentos. Para el caso de *gfp* se realizó una doble digestión (*EcoRI* y *ClaI*), observándose la liberación de un fragmento del tamaño esperado de 1.1 kb (Figura 16). Adicionalmente se realizó un PCR que muestra la amplificación de un fragmento del tamaño esperado, así como su secuenciación (no mostrado) con lo que se confirmó su identidad. Por otra parte, para el caso de *pBlaz*, se realizó una doble digestión (*EcoRI* y *SpeI*), observándose la liberación de un

fragmento de ~100 pb (Figura 19A). Además, se realizó un PCR cuyos resultados se muestran en la Figura 19B. Como puede observarse en esta figura, se amplificaron diferentes productos cuyos tamaños varían entre ~100, 150 y 250 pb, uno de estos fragmentos corresponde al tamaño de *pBlaz*. Este resultado muestra que los oligonucleótidos utilizados para amplificar *pBlaz* no solo amplificaron de manera específica la región del promotor, sino que además reconocieron algunas regiones presentes en el vector pBluescript II KS +. Adicionalmente, será necesario confirmar mediante secuenciación la identidad del promotor *pBlaz*. Finalmente, aunque se requiere la confirmación de la identidad del promotor *pBlaz*, esta construcción servirá de base para la generación de una herramienta que permita la expresión de la proteína GFP en células de *S. aureus*, lo que a su vez permitirá visualizar la internalización de estas bacterias en diferentes células del tejido mamario de bovinos.

Las perspectivas de este trabajo de investigación son: 1) Confirmar mediante secuenciación la identidad del promotor *pBlaz* presente en la fusión pBlues-*pBlaz-gfp*. 2) Realizar la ligación de la fusión pBlues-*pBlaz-gfp* con el plásmido pBMSa1 de *S. aureus*, el cual contiene los orígenes de la replicación (*dso* y *sso*) para esta bacteria, así como el gen de resistencia a lincomicina para su selección en Gram positivas. 3) Seleccionar la construcción que se obtenga en *E. coli*. 4) Establecer el sistema de transformación genética de cepas de *S. aureus* patógenas de bovinos, con el objetivo de transformarla con la fusión pBlues-*pBlaz-gfp*-pBMSa1. 5) Analizar la expresión de la GFP en las células de *S. aureus* transformadas. 6) Realizar ensayos de invasión de los aislamientos de *S. aureus* transformados sobre diferentes células del tejido mamario de bovinos.

## X. CONCLUSIÓN

Con base en el diseño de oligonucleótidos específicos, se amplificaron los elementos genéticos *pBlaz* y *gfp*, los cuales fueron clonados de manera separada en el vector pGEMT y posteriormente subclonados en la orientación adecuada en el vector pBluescript II KS +. Se generó la fusión transcripcional pBlues-*pBlaz-gfp*, la cual servirá de base para la construcción de una herramienta molecular que permita la expresión de la proteína GFP en células de *S. aureus*. Hasta este momento no existen reportes sobre la construcción de una fusión transcripcional para *S. aureus* con estas características.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Birnboim, H.C., y Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Brock, D.T., y Madigan, T.M. 1991. Macromoléculas y genética molecular. En Pérez, J. T., editor. *Microbiología* 6a Ed. México: Prentice Hall. p. 141-164.
- Charpentier, E., Anton, A.I., Barry, P., Alonso, B., Fang, Y., y Novick, R.P. 2004. Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6076-6085.
- Del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echeverría, M., Espinosa, M., y Diaz-Orejas, R. 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 434-464.
- Forsberg, A.J., Pavitt, G.D., y Higgins, C.F. 1994. Use of transcriptional fusions to monitor gene expression: a cautionary tale. *J. Bacteriol.* 176: 2128-2132.
- Herveg, J.P., y Macay, M.B. 2004. *Biología molecular. Plásmidos* 7. Cochabamba, Bolivia, Universidad Católica De Louvai  
<http://www.icampus.ucl.ac.be/SBIM2520/document/genemol/biomolespa/plasmidos/plasmidos-01.html>
- Holtwick, R., Wallbrunn, V.A., Keweloh, H., y Meinhardt, F. 2001. A novel rolling-circle replication plasmid from *Pseudomonas putida* P8. Molecular characterization and use as vector. *Microbiology.* 147: 337-344.
- Khan, S.A., y Novick, R.P. 1983. Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.* 10: 251-259.
- Lewin, B. 2000. Promoter recognition depends on consensus sequences. En Watson, J.,

- editor. Genes. Genetic Molecular. 7a Ed. New York: OXFORD. p. 244-226.
- Loeza-Lara, P.D., Valdez-Alarcón, J.J., Baizabal-Aguirre, V.M., López-Meza, J.E. 2004. Mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos. REB 23: 79-86.
- Manna, A.C., Bayer, M.G., y Cheung, A.L. 1998. Transcripcional analysis of different promoters in the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. 30: 3828-3836.
- Nieto, C., y Espinosa, M. 2003. Construction of the mobilizable plasmid pMV158GFP, a derivative of pMV158 that carries the gene encoding the green fluorescent protein. Plasmid. 49: 281-285.
- Novick, R.P. 1989. Staphylococcal plasmids and their replication. Microbiol. Annu. Rev. 43: 537-565.
- Orozco, E., y Gariglio, P. 2000. Sistema de fusión genética. En Gariglio, P., Orozco, E., Orozco, L., López, R., Madrid, V., Editor. Genética y biomedicina molecular 1ra Ed. México: Noriega Limusa. p. 68-69.
- Ovidio, C. F., y Portelles, Y. 1997. Transfección de ADN a células de mamíferos. Biotecnología aplicada. 14: 149-161.
- Pospiech, A., y Neumann, B. 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. Trends in Genetics. 11: 217-218.
- Prasher, D.C. 1995. Using GFP to see the light. Trends in Genetics. 11: 320-3.
- Romero, D., y Palacios, R. 1997. Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. Annu. Rev. Genet. 31: 91-111.
- Sánchez, C., y Mayo, B. 2004. General and specialized vectors derived from pBM02, a new rolling circle replicating plasmid of *Lactococcus lactis*. Plasmid. 51: 265-271.

- Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning. A laboratory Manual, third ed. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, NY. pp. 1.1-18.80.
- Snyder, L., y Champness, W. 2003. Genes. Replication and expression. En Brown, S., editor. Molecular genetics of bacteria 2<sup>a</sup> Ed. Washignton, D.C. ASM PRESS. p. 99-103.
- Stemmer, W.P.C. 1991. A 20-minute ethidium bromide/high salt extraction protocol for plasmid DNA. Biotechniques. 10: 726.
- Sutra, L., y Poutrel, B. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 40: 79-89.
- Timothy, M., y Sinclair, J. 1998. Control transcripcional de la expresión genética. En Alcocer, A., editor. Biología Molecular en Medicina 1ra Ed. España: Panamericana. p. 64-67.
- Twomey, D.P., Wheelock, A.I., Flynn, J., Meaney, W.J., Hill, C., y Rosst, R.P. 2000. Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a Bismuth-Based Teat Seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. J. Dairy Sci. 83: 1981-8.
- Wang, P.Z., Projan, S.J., y Novick, R.P. 1991. Nucleotide sequence of beta-lactamase regulatory genes from staphylococcal plasmid pI258. Nucleic Acids Res. 19: 4000-4002.