

## **CAPÍTULO III. METODOLOGÍA**

Se seguirá la metodología descrita en el artículo de Saab-Rincón et.a I (2004) llamado "Generation of variability by in vivo recombination of halves of a ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barrel protein" utilizando una fosforribosil antranillato isomerasa consenso e incluyendo dos nuevas variantes (quimeras con PRAI silvestre).

### **3.1 MATERIAL**

#### *a) Cultivos Celulares*

E.Coli XL1blue –MRF'

E.Coli Cre+JL03

E. Coli JM101 TrpF-F'

#### *b) Medios de Cultivo*

Medio LB (con y sin AMP+ 1x)

Medio mínimo (con y sin trp)

2xYT

YENB

SOC

#### *c) Vectores*

PRAI-cat donado por el Biólogo José Arcadio Farías Rico del Instituto de Biotecnología de la UNAM

PDAN5 Cre/LoxP, que contiene las cadenas variables Pesada y Ligera de un anticuerpo unido al sitio LoxP511 y un sitio de resistencia a ampicilina.

PDAN5 Cre/LoxP "Medias Naranjas" en el que se sustituyeron las cadenas de anticuerpos por las dos mitades de una PRAI silvestre, donado por la Dra, Gloria Saab

#### d) Enzimas

Hind III, Sal I, Nhe I, Xho I. Las 4 enzimas de New England Biolabs

T4 DNA ligasa de Roche

Taq y Pfu Polimerasas purificadas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM por el biólogo Filiberto Sanchez perteneciente al grupo del Dr. Xavier Soberón.

Correspondientes buffers

### 3.2 DISEÑO DE OLIGOS

#### 1ª Mitad

**Fw** 5' CCGTCG **AAGCTT** **CAGGAGGGGTGTTG** ATGCTGGAGAATAAG 3'

Hind III

ShD

Se le incluye un sitio de unión a ribosoma

**Rv** 5' CCGTG **GTCGAC** CCTCCTGCTGGCAGAGCTTTACG 3'

Sal I

GTCGACCCTCCTGC: Linker flexible antes del loop codificado por el sitio LoxP511

#### 2ª mitad

**Fw** 5' GGCAC **CTCGAG** CGGTGAAGCATATCGCCATCTGGAAA 3'

Xho I

GTGGCGAGCTCC : Linker Flexible que permanecerá entre el loop codificada por el sitio

LoxP11 y la his99

**Rv** 5' CAGCC **GCTAGC** CA TTA GTATGCGCGGCGCAGCTT 3'

Nhe I

Codon Stop

A los oligos se les incluyeron sitios de restricción para ser clonados posteriormente en el vector pDAN5. Dichos primers fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### 3.3. METODOS

#### 3.3.1 Construcciones

##### 3.3.1.1. Amplificación de PRAIc

Utilizando un termociclador modelo icycler de Biorad, se amplificó la PRAIc en su totalidad así como por mitades separadas (entre la prolina 97 y la lisina 98) a partir del plásmido PT4 donado por el Lab. del Dr. Lorenzo Segovia. La primera mitad se amplificó usando los oligonucleótidos m1Fw y m1Rv; lo mismo se hizo con la segunda mitad usando los oligonucleótidos m2Fw y m2Rv (para ver protocolo APENDICE I). Las temperaturas de desnaturalización se establecieron utilizando el programa de la Northwestern University para cálculo de propiedades de oligos, exceptuando las de la segunda mitad que se determinaron mediante un gradiente (50°C – 68°C), escogiéndose 53°C.

A cada mitad se les incluyeron los sitios de restricción HINDIII/SALI y XHOI/NHEI para la primera y segunda mitad respectivamente como se muestra en la figura:

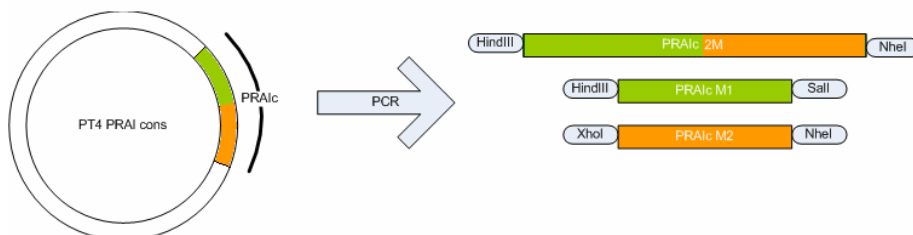


Fig.12 : Amplificación de PRAI

Los productos de PCR se purificaron por banda utilizando el kit de purificación para productos de PCR de Roche siguiendo las recomendaciones del fabricante. A dichos productos se les digirió con sus correspondientes enzimas para obtener extremos cohesivos que permitieran la clonación en el plásmido PDAN5 en sus respectivos sitios (Protocolo en APENDICE I).

### 3.3.1.2. Obtención y digestión de plásmidos PDAN5 y PDAN5 PRAI

Se transformaron viales de 25  $\mu$ l de células XL1Blue + 25  $\mu$ l de glicerol con 1  $\mu$ l de plásmido PDANS y PDAN5PRAI. Se dejaron recuperar en medio Soc (980  $\mu$ l) y glucosa (20  $\mu$ l) por una hora y media; posteriormente se plaquearon 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l y 200  $\mu$ l en cajas de LB ampicilina. Se transfirieron colonias en medio líquido LB con ampicilina y se dejaron crecer *overnight* a 30°C.

El plásmido se extrajo con el kit de Purificación de Plásmido de ROCHE según lo indicado por el fabricante (para protocolo ver APENDICE II).

Ambos plásmidos se digirieron con las enzimas HINDIII/SALI, XHOI/NHEI y HINDIII/NHEI para clonar los fragmentos también digeridos como se muestra en la figura:

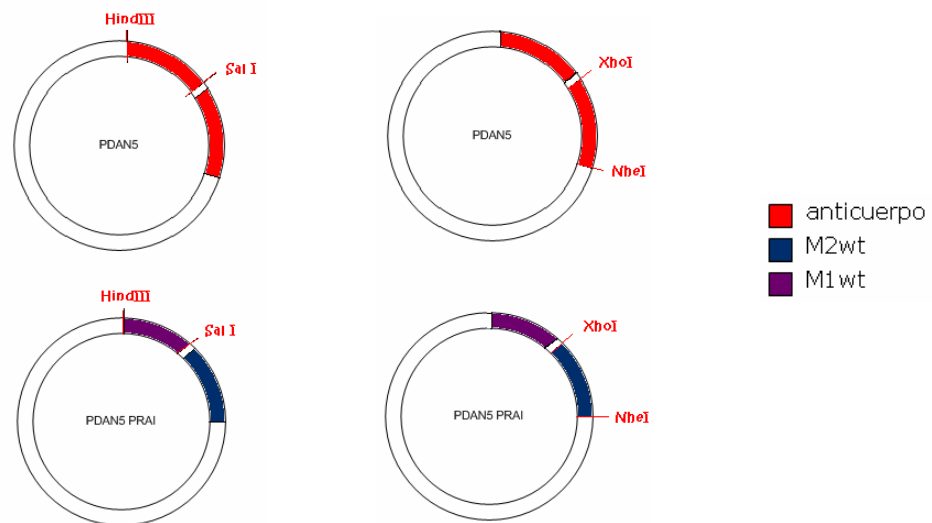


Fig 13: Digestión de los vectores

### **3.3.1.3. Ligaciones**

Se ligó cada plásmido con su correspondiente fragmento a una relación 1:1.6, dejando reaccionar a la ligasa durante la noche a 16°C

Para realizar la construcción PDANM1LoxM2; el plásmido PDAN M2 se digirió con las enzimas HINDIII y SALI para posteriormente clonarle la M1c

Como control también se incluyó plásmido sólo para descartar falsos positivos por religación.

Las ligaciones se purificaron y se transformaron viales de 50 µl de células XL1Blue electrocompetentes y viales de 50 µl de células JM101TrpF-F' electrocompetentes. Se dejaron recuperar en medio Soc (980 µl) y glucosa (20 µl) por una hora y media y posteriormente se plaquearon 50 µl, 100 µl y 200 µl en cajas de LB ampicilina. Se transfirieron colonias en medio líquido LB con ampicilina y se dejaron crecer durante la noche (*overnight*) a 30°C.

El plásmido se extrajo con el kit de Purificación de Plásmido de ROCHE siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Con el fin de constatar la correcta clonación, se realizaron digestiones, PCR's utilizando las construcciones como templado y finalmente se mandaron secuenciar.

### **3.3.2. Complementación *in vivo* de PRAI**

Las construcciones obtenidas se electroporaron en células competentes en la cepa la cepa JM101TrpF-F' que es auxótrofa para Triptofano con el fin de evaluar la funcionalidad de la enzima. En el primer ensayo se transformaron, como controles, PDAN5 y PDANPRAI para comparar su comportamiento con las transformantes 2 y 5 (ver tabla 2). Las células se trataron según el protocolo descrito en el Apéndice II. Se ajustaron a una densidad óptica de 0.9 nm para asegurar el plateo del mismo número de células y a partir de estos cultivos se hicieron diluciones hasta  $1 \times 10^{-6}$ .

Estas células fueron plateadas en medio LB y en un medio mínimo VB con y sin triptofano, a los cuales se les agregó ampicilina para después incubarlas a 30°C Las placas a y b (medio LB y MM con trp) se mantuvieron en la incubadora 12 horas aproximadamente mientras que la placa c (MM sin trp) se incubó por 6 días.

### 3.3.3 Recombinación *in vivo*

El esquema general de la recombinación *in vivo* se resume en el siguiente diagrama:

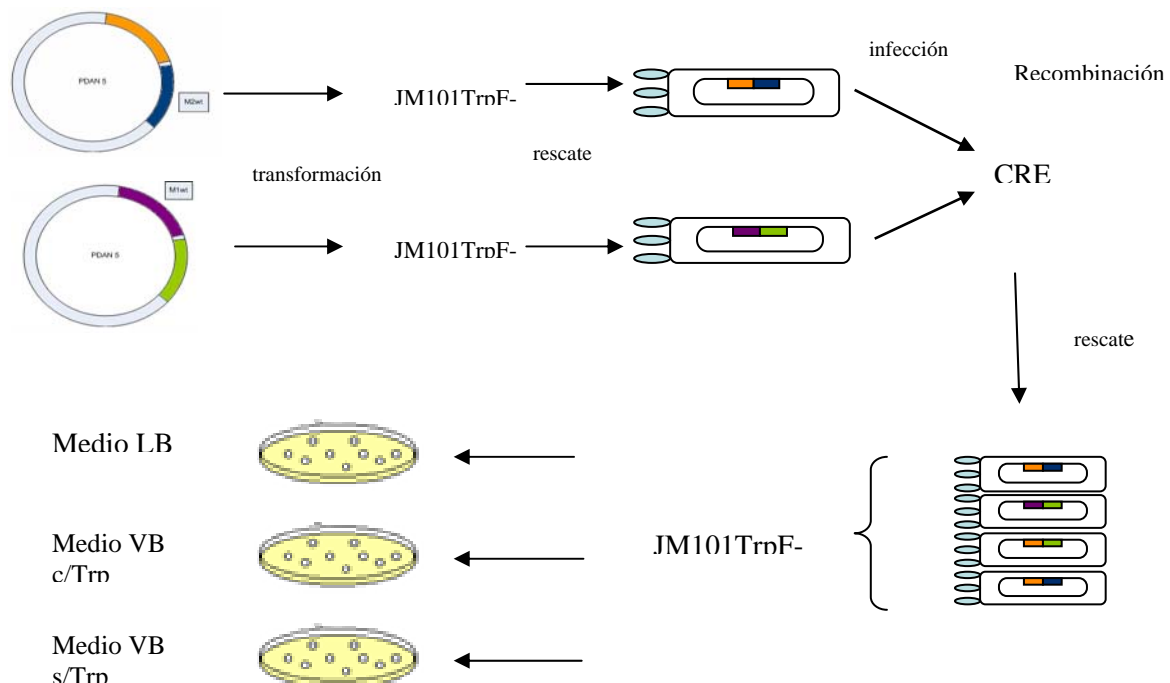


Fig. 14: Esquema general de la recombinación

Se transformaron viales de 50  $\mu$ l de células electrocompetentes JM101 TrpF- F' con los fagémidos 1, 2, 5 y 6 (ver tabla 2)., según el protocolo de electroporación descrito con anterioridad.

Se tomó una colonia de cada placa y con ella se hizo un preinóculo que se dejó incubar *overnight*. Por cada vector se realizó un cultivo de 50 ml de 2xYT precalentado conteniendo ampicilina al 1x (50  $\mu$ l) y 1% de glucosa (5.0 ml de glc al 20% para 100 ml de medio) Se incubó el cultivo a 37°C con agitación hasta llegar a una Densidad Óptica<sub>600</sub> de 0.4.

De dicho cultivo se tomó la mitad (25ml) y se adicionaron  $6.4 \times 10^{10}$  fagos *helper* R408 (1562.5  $\mu$ l de fagos) previamente titulados.

Para proceder a rescatar los fagémidos se sigue el protocolo especificado en el Apéndice II.

Dichos fagos se cuantificaron, obteniéndose un título de:  $1.2 \times 10^9$ ,  $2.1 \times 10^{10}$ ,  $.2 \times 10^9$  y  $3.1 \times 10^9$  para los fagémidos 1, 2, 5 y 6 respectivamente y se almacenaron en PBS con glicerol al 15% a  $-70^\circ\text{C}$  hasta hacer la recombinación.

Para la recombinación se infectó la cepa Cre+ a una proporción 2:1 en medio 2xYT + 1% glc siguiendo el protocolo para la recombinación in vivo descrito en el apéndice II según una combinación de vector 1con6 y 2con5. Los fagos resultantes de la recombinación se rescataron y titularon. Estos se utilizaron para infectar la cepa de selección JM101 TrpF- F' en una y se plaquearon en medio VB con y sin trp y en medio rico LB.