

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Construcción de un vector para clonar
productos de PCR”**

Tesis que presenta

Marcela Cecilia Briones Martín del Campo

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava

San Luis Potosí, S.L.P., agosto 2008



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Construcción de un vector para clonar productos de PCR**" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Marcela Cecilia Briones Martín del Campo** y aprobada el **15 de agosto de 2008** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

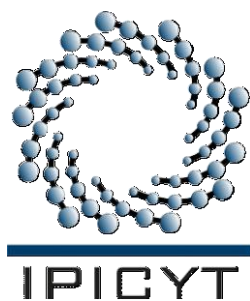
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava
(Director de la tesis)

Dr. Angel Gabriel Alpuche Solís
(Asesor de la tesis)

Dr. Rubén López Revilla
(Asesor de la tesis)

Dr. Emilio Medina Rivero
(Asesor de la tesis)

Dr. Omar Elind Arroyo Helguera
(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Alejandro De Las Peñas Nava, apoyada por el proyecto SEP-CB-2005-48279 de CONACYT.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con No. de registro 204071.

Para Cecilia M. del C.,

Daniela Briones,

Salvador Briones y

Eduardo Guerrero

“Gracias por ser, estar y simplemente por existir...”

Edukvo



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 055 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 15 días del mes de agosto del año 2008, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava	Secretario	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Sinodal	IPICYT
Dr. Emilio Medina Rivero	Sinodal externo	Probiomed
Dr. Omar Elind Arroyo Helguera	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Marcela Cecilia Briones Martín del Campo

sobre la Tesis intitulada:

Construcción de un Vector para Clonar Productos de PCR

que se desarrolló bajo la dirección de

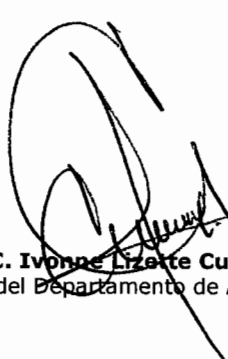
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava

El Jurado, después de deliberar, determinó

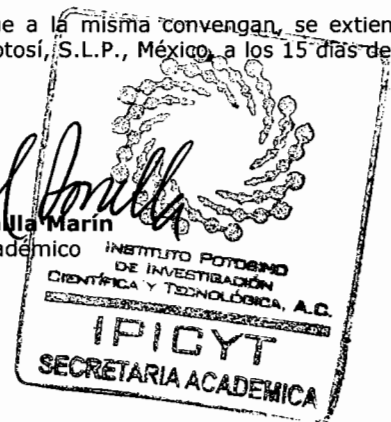
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 14:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 15 días del mes de agosto de 2008.


L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Agradecimientos

Toda mi gratitud para el Dr. Alejandro De Las Peñas Nava y la Dra. Irene Castaño Navarro por su paciencia, confianza, e invaluable enseñanza.

A la Dra. Lina Riego Ruiz y al Dr. Sergio Casas Flores por sus acertadas opiniones.

Al Dr. Rubén López Revilla y al Dr. Luis Salazar Olivo por permitirme hacer gran parte de este trabajo en su laboratorio.

Al Dr. Omar Arroyo por su apoyo en el laboratorio.

Al Dr. Emilio Medina R. por su participación en mi examen y sus excelentes críticas.

Al Dr. Ángel G. Alpuche Solís por sus importantes observaciones.

A todos mis compañeros de laboratorio y amigos en general.

Contenido

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	ii
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	iii
ACTA DE EXAMEN	iv
DEDICATORIAS	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
ANEXOS	xi
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv

CAPÍTULO 1: “CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR PARA CLONAR PRODUCTOS DE PCR”

I. INTRODUCCIÓN	1
Características de los plásmidos bacterianos	1
Plásmidos para clonar productos de PCR	2
Estrategia T/A para clonar productos de PCR	2
Vectores- T para clonar productos de PCR	4
Formas de aumentar la eficiencia de clonación T/A	5
Sistemas de contraselección en vectores de clonación	6
Características del marcador de contraselección: <i>sacB</i>	6
II. MATERIALES Y MÉTODOS	9
Cepas de <i>E. coli</i>	9
Plásmidos	9
Oligonucleótidos	9
Medios de cultivo	12
Kits comerciales	12
Protocolos de biología molecular	13
III. RESULTADOS	18
Estrategia de clonación del vector-T pMB11	18
Construcción del vector-T pMB11	19
Características, ventajas y usos del vector-T pMB11	27
Protocolos para el uso del vector pMB11	28
A. Protocolo para preparar el vector-T pMB11	28
B. Protocolo para clonar un producto de PCR generado por la <i>Taq</i>	29
Experimentos funcionales del vector-T pMB11	29
A. Frecuencia de reversión de la cepa DH10B pMB11	29
B. Etapas intermedias en la preparación del vector-T pMB11	30
1) Eficiencia de transformación de pMB11 superenrollado en DH10B	30
2) Recuperación de transformantes con el vector-T pMB11	31

3) Eficiencia de transformación y frecuencia de reversión de pMB11 lineal y religado	31
4) Análisis de vectores pMB11/ <i>Stu</i> I/religados Sac ^R	32
5) Efecto de diferentes variables en la disminución del pMB11/ <i>Stu</i> I/religado Sac ^R	34
6) Eficiencia de adición de residuos de timidina en pMB11/ <i>Stu</i> I	38
C. Eficiencia de clonación del vector-T pMB11	38
IV. CONCLUSIONES	40
V. DISCUSIÓN	41
Ori p15A, ventajas de usar un número intermedio de copias	41
Crecimiento lento de pMB7 en DH10B en medio sin sacarosa	42
Eficiencia de adición de extremos de timidina en el pMB11/ <i>Stu</i> I	42
Análisis de vectores pMB11/ <i>Stu</i> I/religados Sac ^R	43
VI. PERSPECTIVAS	45
VII. REFERENCIAS	47

CAPÍTULO 2: “HIGH RESISTANCE TO OXIDATIVE STRESS IN THE FUNGAL PATHOGEN *CANDIDA GLABRATA* IS MEDIATED BY A SINGLE CATALASE, Cta1p AND IS CONTROLLED BY THE TRANSCRIPTION FACTORS Yap1p, Skn7p, Msn2p, AND Msn4p”

ANEXOS

51

Lista de tablas

Tabla 1. Diferentes replicones usados en los plásmidos	1
Tabla 2. Marcadores de selección más usados en plásmidos	2
Tabla 3. ADN polimerasas termoestables	4
Tabla 4. Cepas de <i>E. coli</i> usadas en este trabajo	9
Tabla 5. Plásmidos usados en este trabajo	10
Tabla 6. Oligonucleótidos usados en este trabajo	11
Tabla 7. Cuenta viable y revertantes de la cepa DH10B pMB11	30
Tabla 8. Eficiencia de transformación y reversión del pMB11 superenrollado en DH10B	30
Tabla 9. Efecto que tiene el tiempo de recuperación después de la electroporación en la eficiencia de transformación de la cepa STBL2 con pMB11	31
Tabla 10. Diferentes T4 ADN ligasas y buffers de ligación y sus efectos en la presencia de transformantes pMB11/ <i>Stu I</i> religado Sac ^R	36
Tabla 11. Efecto de los diferentes métodos de purificación de ADN en la presencia de transformantes pMB11/ <i>Stu I</i> religado Sac ^R	37
Tabla 12. Eficiencia de clonación de productos de PCR en el vector-T pMB11 en DH10B	39

Lista de figuras

Figura 1. Estrategia de clonación T/A	3
Figura 2. Digestión con <i>Xcm</i> I para dejar dos timinas en los extremos 3´ salientes	3
Figura 3. Reacciones catalizadas por la levansacarasa (<i>sacB</i>)	7
Figura 4. Estrategia de clonación del vector-T pMB11	19
Figura 5. Estrategia para eliminar el sitio de reconocimiento de la metilasa Dcm	20
Figura 6. Introducción del fragmento <i>Stu</i> I* - <i>Bam</i> H I resistente a metilación en el ORF de <i>sacB</i>	22
Figura 7. Esquema general de construcción del vector pMB11	23
Figura 8. DH10 <i>pcnB</i> ⁻ pMB4 presenta un crecimiento lento en medio LBCbSac5% (<i>Sac</i> ^{+/-})	24
Figura 9. Escrutinio de una mutante sacarosa sensible	25
Figura 10. Hipótesis establecida para la mutante sacarosa sensible en pMB11	26
Figura 11. Vector pMB11	27
Figura 12. Fenotipo del vector pMB11	28
Figura 13 PCR diagnostico para los cinco plásmidos <i>Sac</i> ^R	33
Figura 14. Digestión <i>Bam</i> H I y <i>Stu</i> I de los cinco plásmidos <i>Sac</i> ^R	34
Figura 15. La eficiencia de adición de timidinas al pMB11/ <i>Stu</i> I	38

Anexos

Figura 16. Producto de PCR de 498pb amplificado con los oligonucleótidos #91/ #92 usando como molde el pAP636	52
Figura 17. Ligación del producto de PCR #91/ #92 en pGEM	52
Figura 18. Diagnóstico por PCR de colonia de la clonación del producto de PCR #91/#92 en un vector derivado de pUC	52
Figura 19. Digestión del vector pMB1 con <i>Stu</i> I	53
Figura 20. Fragmento <i>Stu</i> I/ <i>Bam</i> H I de 498pb del vector pMB1, purificado de gel	53
Figura 21. Digestión <i>Sac</i> I/ <i>Pst</i> I de los vectores pAP636 y pBluescript SK	53
Figura 22. Fragmentos <i>Sac</i> I/ <i>Pst</i> I del pAP633 (1.5kb) y del pBluescript SK (3.0kb)	54
Figura 23. Digestión <i>Stu</i> I/ <i>Bam</i> H I del vector pMB3	54
Figura 24. Digestión <i>Sac</i> I/ <i>Pst</i> I de los vectores pMB7 y pSU18	55
Figura 25. Fragmentos del pSU18 y del pMB7 purificados de gel	55
Figura 26. Secuenciación de dos pMB11 y su alineamiento	55
Figura 27. Comparación de las UFC de DH10B pMB11/ <i>Stu</i> I/ religado y DH10B pMB11/ <i>Sna</i> B I/ religado	56
Tabla 13. Eficiencia de transformación y reversión del pMB11/ <i>Stu</i> I en DH10B	56
Tabla 14. Comparación de las frecuencias de reversión de pMB11 superenrollado y de pMB11/ <i>Stu</i> I/religado	56
Tabla 15. Costo de los reactivos usados por los plásmidos pMB11, pGEM [®] y pCRII [®] -TOPO [®]	57

Abreviaturas

3´A	adenosina en el extremo 3´ de una molécula de ADN.
3´T	timidina en el extremo 3´ de una molécula de ADN.
BSA	albúmina sérica bovina
Cb	carbenicilina
Cm	cloranfenicol
Cm^R	cloranfenicol-resistente
dNTPs	desoxinucleótidos-trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
dTTPs	timidina 5´-trifosfato
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactósido
LB	Medio de Luria-Bertani
LBCmSac5%:	Medio de Luria-Bertani sin NaCl-Cloranfenicol 20µg/ml-Sacarosa 5%
NEB	New England Biolabs
OD	densidad óptica
ORF	marco abierto de lectura
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>Pfu</i>:	ADN polimerasa de <i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>Pwo</i>	ADN polimerasa de <i>Pyrococcus woesei</i>
Sac^S	sacarosa-sensible
Sac^R	sacarosa-resistente
T´s	timidinas
<i>Taq</i>	ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
<i>Tfl</i>	ADN polimerasa de <i>Thermus flavus</i>
<i>Tgo</i>	ADN polimerasa de <i>Thermococcus gorgonarius</i>
<i>Tli</i>	ADN polimerasa de <i>Thermococcus litoralis</i>
<i>Tth</i>	ADN polimerasa de <i>Thermus thermophilus</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

Resumen

Construcción de un vector para clonar productos de PCR

Los vectores-T se usan para clonar productos de PCR. Estos contienen extremos 3'T en donde se clonan directamente los productos de PCR debido a que la *Taq* polimerasa añade con preferencia residuos A en los extremos 3' de estos productos de PCR.

Todos los plásmidos deben contener al menos un marcador de selección para identificar las clonas. Algunos tienen marcadores de contraselección que, bajo condiciones apropiadas de crecimiento, promueven la lisis de los microorganismos que los contienen. Uno de los marcadores de contraselección más usados es el gen que confiere sensibilidad a sacarosa: *sacB* de *Bacillus subtilis*. La expresión de *sacB* en *E. coli* es letal, en presencia de sacarosa. Sin embargo, si *sacB* es interrumpido por la inserción de un producto de PCR, las transformantes son viables. El uso de *sacB* como marcador de selección es una mejora sobre la estrategia convencional de clonación T/A porque elimina la necesidad del escrutinio de color azul/blanco basado en la complementación alfa.

En este trabajo desarrollamos un vector-T (pMB11) para clonar productos de PCR en forma eficiente y se basa en la selección de clonas positivas, de fácil y rápido manejo y reduciendo considerablemente los costos. Proponemos el uso de este vector como una alternativa de clonación de productos de PCR para no depender de los vectores comerciales.

pMB11 contiene a *sacB* como marcador de contraselección para clonas positivas, confiere resistencia a cloranfenicol (*cat*) y su origen de replicación es de un número intermedio de copias.

Demostremos que la adición de extremos 3'T en el pMB11 fue eficiente y que el plásmido puede clonar productos de PCR también con una alta eficiencia.

Además caracterizamos la respuesta al estrés oxidativo de *Candida glabrata* para entender mejor su virulencia. *C. glabrata* resiste concentraciones más altas de H₂O₂ que *Saccharomyces cerevisiae* y que *Candida albicans*. En fase estacionaria es extremadamente resistente a H₂O₂ y su resistencia depende de Yap1p, Skn7p, y Msn4p. Las células en crecimiento de *C. glabrata* se adaptan a niveles altos de H₂O₂ y su respuesta adaptativa depende de Yap1p y Skn7p principalmente. *C. glabrata* tiene un solo gen de catalasa, *CTA1*, que es absolutamente necesario para la resistencia a H₂O₂ *in vitro*. Sin embargo, en un modelo de infección sistémica en ratón, la cepa carente de *CTA1* no mostró efectos en virulencia.

PALABRAS CLAVE: *sacB*, clonación T/A, contraselección, cloranfenicol

Abstract

Construction of a vector to clone PCR products

T-vectors are used to clone efficiently PCR fragments generated by *Taq* polymerase which preferentially adds an A residue to the 3' end of the PCR products. These vectors contain 3'T overhangs and PCR products can be cloned directly.

Almost all T-vectors use the white/blue screen based on *lacZ* alpha-complementation to identify positive clones. Alternatively, some vectors use a counterselectable marker to select the positive clones. This counterselectable marker under appropriate growth conditions, prevents the cells from growing. One of the most widely used counterselectable markers is *Bacillus subtilis sacB* gene which confers sucrose sensitivity. *E. coli* cells expressing *sacB* cannot grow in the presence of sucrose. However, if *sacB* is interrupted by an insertion of a PCR product, then *E. coli* cells can grow in the presence of sucrose. The important difference between conventional T/A cloning and counterselection is selection versus screening of the positive clones. The use of *sacB* eliminates the white/blue screen.

In the present study, we designed a T-vector (pMB11) to clone efficiently PCR products, based on sucrose counterselection of positive clones. Plasmid preparation and cloning is easy and fast and is less expensive than the commercial T-vectors currently available from biotech companies.

pMB11 contains the *sacB* gene as the counterselectable marker, *cat* gene for chloramphenicol resistance and the p15A origin of replication of intermediate copy number.

We showed that the addition of 3'T in pMB11 is efficient and that the plasmid can be used to efficiently clone PCR products. We propose the use of this vector as an alternative to the commercially available T/A vectors.

We characterized the oxidative stress response of *Candida glabrata* to better understand its virulence. *C. glabrata* could withstand higher concentrations of H₂O₂ than *Saccharomyces cerevisiae* and even *Candida albicans*. Stationary-phase cells were extremely resistant to H₂O₂, and this resistance was dependent on the concerted roles of stress-related transcription factors Yap1p, Skn7p, and Msn4p. We showed that growing cells of *C. glabrata* were able to adapt to high levels of H₂O₂ and that this adaptive response was dependent on Yap1p and Skn7p and partially on the general stress transcription factors Msn2p and Msn4p. *C. glabrata* has a single catalase gene, *CTA1*, which was absolutely required for resistance to H₂O₂ in vitro. However, in a mouse model of systemic infection, a strain lacking *CTA1* showed no effect on virulence.

KEY WORDS: *sacB*, T/A cloning, counterselection, chloramphenicol

CAPÍTULO 1: “CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR PARA CLONAR PRODUCTOS DE PCR”

I. INTRODUCCIÓN

Características de los plásmidos bacterianos

Los plásmidos bacterianos son moléculas circulares de ADN de doble cadena capaces de autorreplicarse. Pueden ser de tamaño pequeño desde 2.0kb hasta cerca de 100kb. Requieren de un origen de replicación y pueden tener uno o varios marcadores de resistencia a antibióticos. También pueden poseer sitios de restricción para clonar fragmentos de ADN (Sambrook & Rusell, 2001).

El número de copias de un plásmido está determinado por el origen de replicación (ori) (Tabla 1) (Sambrook & Rusell, 2001).

Tabla 1. Diferentes replicones usados en los plásmidos.

Replicón	Plásmido prototipo	# de copias
ColE1	pBR322	Medio; 15-20
Derivado de pMB1	pUC	Alto; 300-700
Derivado de pMB1	pGEM	Alto; 300-700
p15A	pACYC184	Medio; ~15
pSC101	pSC101	Bajo; ~5

Modificado de (Sambrook *et al.*, 1989)

Los plásmidos tienen marcadores genéticos que confieren ventajas al huésped que los contiene. En biología molecular estos marcadores genéticos se usan para mantener la presencia del plásmido en la célula. Los genes más usados son los que dan resistencia a antibióticos como la ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina o kanamicina (Tabla 2) (Sambrook & Rusell, 2001).

Las aplicaciones de los plásmidos en biología molecular son diversas: clonación, expresión de genes, clonación de promotores, fusiones, mutagénesis y movilización.

Tabla 2. Marcadores de selección más usados en plásmidos

Antibiótico	Modo de Acción	Modo de resistencia
Ampicilina	Inhíbe la síntesis de la pared celular.	β -lactamasa hidroliza la ampicilina en el periplasma antes de que entre a la célula.
Tetraciclina	Inhíbe síntesis de proteínas, previene la unión del aminoacil tRNA al sitio A ribosomal.	Bomba de resistencia a multidroga, expulsa la tetraciclina al exterior de la célula.
Kanamicina	Inhíbe síntesis de proteínas.	Aminoglicósido fosfotransferasa, inactiva a kanamicina.
Cloranfenicol	Inhíbe síntesis de proteínas, interactúa con la subunidad ribosomal 50S.	Cloranfenicolacetiltransferasa, inactiva al cloranfenicol.

Modificado de (Ausubel *et al.*, 2001).

Plásmidos para clonar productos de PCR

Con el desarrollo de la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), han surgido plásmidos diseñados para clonar fácilmente los productos de PCR. Deben tener un buen sistema de selección y/o escrutinio para identificar los plásmidos con inserto mediante un protocolo rápido y fácil.

Hay al menos tres estrategias para clonar productos de PCR: i) Introducir sitios de restricción a cada oligonucleótido. El producto de PCR amplificado y el vector de clonación son digeridos con las enzimas de restricción elegidas. Así se generan extremos complementarios del inserto y vector que después son ligados; ii) En un vector con extremos romos se le clona un producto de PCR generado por una ADN polimerasa con actividad de autocorrección (actividad de exonucleasa 3'→5'), como la *Pfu* que deja extremos romos; iii) Y la estrategia T/A (que se describe a continuación).

Estrategia T/A para clonar productos de PCR

La estrategia T/A es fácil de llevar a cabo y muy eficiente. El vector necesita sólo extremos cohesivos 3' de una sola base (un residuo de timidina). Estos plásmidos llamados vectores-T pueden clonar directamente fragmentos de PCR. Los productos de PCR deben ser generados por una polimerasa sin actividad de exonucleasa 3'→5', como la *Taq*, que agrega residuos de adenosina en los extremos 3' de los productos amplificados (Tabla 3) (Fig. 1) (Clark, 1988).

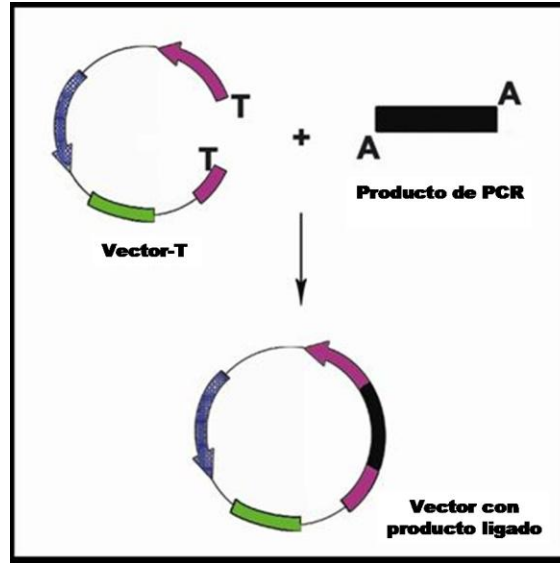


Figura 1. Estrategia de clonación T/A.

Hay dos formas de generar un vector con extremos 3' de timidina:

1) Digerir el vector con una enzima de restricción que reconozca dos sitios para que produzca extremos cohesivos de una sola base (p.e., *Xcm* I, *Eam* 1105I o *Ahd* I) y asegurar que la base sea timina (Fig. 2) (Chen *et al.*, 2006; Ido & Hayami, 1997; Kim *et al.*, 2004; Reisinger *et al.*, 2007; Testori *et al.*, 1994).

2) Digerir el plásmido con una enzima que deje extremos romos (*Sma* I, *Stu* I o *Pvu* II) y después adicionar al 3' la timina mediante una reacción con *Taq* polimerasa sin actividad de exonucleasa 3'→5', solo en presencia de dTTPs (Sambrook *et al.*, 1989; Sambrook & Rusell, 2001).

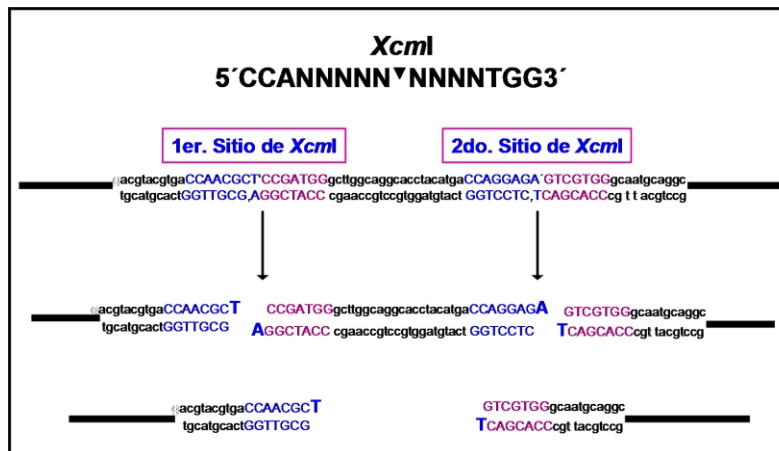


Figura 2. Digestión con *Xcm* I para dejar dos timinas en los extremos 3' salientes.

Tabla 3. ADN polimerasas termoestables

DNA polimerasas termoestables que dejan extremos cohesivos 3'A (sin actividad de exonucleasa 3'→5')
<i>Taq</i> polimerasa
<i>Tfi</i> polimerasa
<i>Tth</i> polimerasa
DNA polimerasas termoestables que dejan extremos romos (con actividad de exonucleasa 3'→5')
<i>Pfu</i> polimerasa
<i>Tfi</i> (Vent [®]) polimerasa
<i>Pwo</i> polimerasa
<i>Tgo</i> polimerasa
DNA polimerasas termoestables que dejan una mezcla de extremos romos y cohesivos 3'A
DNA polimerasa Long Expand[®] (<i>Taq</i> + <i>Tgo</i>)

Modificada de: (Clark, 1988; Promega, 2005).

Vectores- T para clonar productos de PCR

En biología molecular, el desarrollo de vectores-T ha sido extenso. Existen al menos 2 vectores-T muy utilizados: el pGEM[®] de la compañía PROMEGA y el vector pCRII[®]-TOPO[®] de INVITROGEN.

El pGEM[®] y pCRII[®]-TOPO[®] son vectores-T lineales derivados de pUC que contienen el ori pMB1, de alto número de copias debido a una mutación puntual en el ARN regulatorio del origen de replicación (Chambers *et al.*, 1988). pGEM[®] es de 3kb mientras que pCRII[®]-TOPO[®] es de 3.9 kb. Los dos contienen resistencia a ampicilina, y pCRII[®]-TOPO[®] tiene además resistencia a kanamicina. Cuentan con un sitio múltiple de clonación (MCS) que está dentro del ORF de *lacZ*, que codifica sólo para el péptido alfa de β galactosidasa. El promotor de *lacZ* se desreprime por IPTG (análogo de lactosa) ya que se une al represor LacI inactivándolo.

En presencia de la mutación *lacZ* Δ M15 en el cromosoma de *E. coli*, el péptido alfa permite la formación de β -galactosidasa activa que resulta en la formación de colonias azules en medio con X-gal. Al clonar un fragmento de ADN dentro del MCS se interrumpe el ORF *lacZ* (péptido alfa) por lo que las colonias son blancas en medio con X-gal (Ausubel *et al.*, 2001; Promega, 2005).

El pCRII[®]-TOPO[®] está unido covalentemente a una Topoisomerasa I que se encarga de hacer los enlaces fosfodiéster entre el vector y el producto de PCR y el escrutinio de colonias blancas/azules es igual que pGEM[®].

Los dos vectores-T ofrecen protocolos rápidos para clonar productos de PCR pero tienen desventajas: 1) producen un alto número de copias que puede ser perjudicial para *E. coli* en caso de que se exprese un péptido que afecte la viabilidad de la bacteria. 2) Los reactivos que utilizan IPTG, X-gal y carbenicilina, son de precios elevados. 3) En México no se tiene acceso rápido a estos vectores debido a las políticas aduanales y los servicios de las compañías distribuidoras. 4) Los plásmidos son mucho más caros en comparación con los precios de venta en E.U.A.

Formas de aumentar la eficiencia de clonación T/A

Uno de los problemas más comunes en las clonaciones es obtener transformantes que no tengan inserto, es decir, que contenga el vector religado. Este problema también se observa en la clonación de productos de PCR y vector con extremos romos en donde la eficiencia de clonación no es óptima. Existen varias estrategias que se pueden llevar a cabo para disminuir este problema y aumentar la eficiencia. Una de ellas es desfosforilar el plásmido para disminuir la frecuencia de vector religado. Sin embargo, se ha reportado que esto puede disminuir la frecuencia de clonación. También se puede incluir un buffer de ligación que contenga polietilenglicol para incrementar la interacción vector-inserto y/o aumentar las concentraciones de T4 ADN ligasa y de inserto (Sambrook *et al.*, 1989).

Otra manera es recrear nuevamente la reacción de adición de residuos A al incubar el fragmento de PCR con la *Taq* ADN polimerasa, de esta forma se asegura que la mayoría del inserto tenga extremos cohesivos A para poder ligarse al vector-T (Kobs, 1997; Promega, 2005). Otra alternativa es aumentar el porcentaje de moléculas del vector que tengan residuos T en sus extremos 3'. Cualquiera de estos pasos extras de clonación, aumenta la manipulación del vector e inserto, el trabajo y el tiempo estimado de clonación.

Sistemas de contraselección en vectores de clonación

En genética, la contraselección se define como la presencia de un gen que impide que el microorganismo pueda crecer. Su ausencia permite el crecimiento.

Marcadores de contraselección se conocen desde hace mucho tiempo. Unos de los más conocidos son: *sacB* que da sensibilidad a sacarosa, *rpsL(strA)* sensibilidad a estreptomicina y *tetAR* sensibilidad al ácido fusárico. Se les ha utilizado en diversos escenarios como construir y seleccionar mutantes bacterianas, aislar elementos móviles, identificar regiones regulatorias positivas y seleccionar vectores recombinantes (Reyrat *et al.*, 1998). El uso de este tipo de genes puede tener un papel importante para hacer más eficiente la clonación.

Si un fragmento de ADN es insertado dentro del gen de contraselección interrumpiéndolo, entonces las transformantes que contengan el inserto serán viables para crecer en la condición selectiva. En cambio si el vector se religa la transformante no será viable. Esta es una manera muy eficiente de eliminar las bacterias que contienen vectores religados. De esta forma se aumenta la eficiencia de clonación al **seleccionar** positivamente las transformantes recombinantes.

Características del marcador de contraselección: *sacB*

El gen *sacB* de *Bacillus subtilis* (bacteria gram positiva) codifica para una enzima llamada levansacarasa (2,6- β -D-fructosiltransferasa, EC 2.4.1.10). Esta enzima cataliza la hidrólisis de sacarosa y la síntesis de polímeros de fructosas llamados levanos (Fig. 3) (Dedonder, 1966).

Se ha observado que la expresión de la levansacarasa en bacilos gram negativos es tóxica en presencia de sacarosa (Copass *et al.*, 1997; Gay *et al.*, 1985). En *E. coli* la enzima se secreta al espacio periplásmico entre la membrana interna y la externa (Steinmetz *et al.*, 1985). Se sabe poco acerca de las bases moleculares de esta toxicidad en bacilos gram negativos pero hay dos explicaciones no excluyentes, que son aceptadas: (i) la acumulación de levanos de alto peso molecular [alrededor de 60,000 moléculas de D-fructosa (LeBrun & van Rapenbusch, 1980)] en el periplasma y/o (ii) una transferencia de residuos de

fructosa a moléculas aceptoras inapropiadas que podría tener efecto tóxicos para la célula.

Las bacterias de *E. coli* que expresan *sacB* en presencia de sacarosa se lisan.

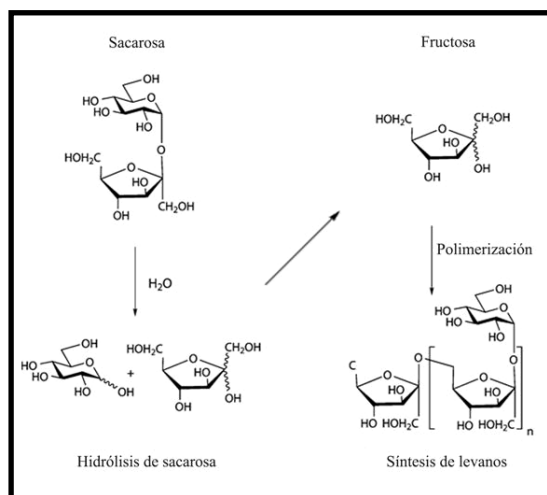


Figura 3. Reacciones catalizadas por la levansacarasa (*sacB*).

La expresión de *sacB* en bacterias gram positivas no debería ser tóxica por que la enzima es secretada al exterior. Sin embargo, en el caso de *Corynebacterium glutamicum*, *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium bovis* (bacilos gram positivos) la expresión de *sacB* es tóxica en presencia de sacarosa (Jäger *et al.*, 1992; Pelicic *et al.*, 1996). Esto es probable debido a que estos organismos tienen una capa que asemeja a una segunda membrana y que no permite la secreción de levansacarasa.

Otro ejemplo de sensibilidad a *sacB* en gram positivos, es una mutación en *sacB* de *Bacillus amyloliquefaciens* (A29W) que interfiere con el procesamiento del péptido señal de la levansacarasa. Con esta mutación, *sacB* se acumula en el citoplasma y *B. subtilis* es sensible a sacarosa (Borchert & Nagarajan, 1991). Esta mutante se ha utilizado para construir un vector que utiliza un sistema de selección positiva para clonar fragmentos de ADN en *B. subtilis* (Bramucci & Nagarajan, 1996).

Otros vectores que utilizan a *sacB* para seleccionar clones positivas son el cósmido pAd10-*sacBII* y pYL7AC7 que pueden clonar fragmentos de ADN de hasta 95kb, y el plásmido pUCD800 (Gay *et al.*, 1985; Liu *et al.*, 1999; Pierce *et al.*, 1992).

Debido a la gran necesidad de clonar productos de PCR en forma eficiente, sin tener que depender de vectores comerciales y de los proveedores: decidimos diseñar y construir un vector de clonación que cumpla con las siguientes características: alta eficiencia de clonación, fácil selección o escrutinio de clonas positivas, fácil y rápido manejo y que sea económico.

Este vector lo denominamos pMB11, y contiene el gen *sacB* como marcador para contra-seleccionar clonas positivas, el gen cloranfenicol acetil transferasa (*cat*) que confiere resistencia a cloranfenicol y el origen de replicación *p15A* de intermedio número de copias. Está diseñado para clonar productos de PCR con la estrategia T/A, o ligar fragmentos con extremos romos. También está diseñado para usarse en la generación de librerías genómicas digeridas parcialmente con *Sau3A I* (sitio *BamH I*) o *Tsp 501* (sitio *EcoR I*).

El uso de *sacB* es una ventaja importante sobre las estrategias de clonación que utilizan la complementación alfa, ya que elimina la presencia de vectores sin inserto y el uso de reactivos adicionales para el escrutinio como el color azul/blanco y el IPTG para desreprimir el promotor *lacZ*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *E. coli*

Las cepas utilizadas en este trabajo están descritas en la Tabla 4.

Plásmidos

Todos los plásmidos usados en este trabajo están descritos en la Tabla 5.

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos usados en este trabajo están descritos en la Tabla 6.

Tabla 4. Cepas de *E. coli* usadas en este trabajo

Cepa	Genotipo o descripción	Referencia o fuente
DH10B	<i>F mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80dlacZ M15 lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 (ara,leu)7697 galU galK rpsL nupG</i>	(Calvin & Hanawalt, 1988)
DH10 <i>pcnB</i>	<i>F mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80dlacZ M15 lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 (ara,leu)7697 galU galK rpsL nupG pcnB</i>	(Lopilato et al., 1986)
STBL2	<i>F- mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1lon gyrA96 thl supE44 relA1 λ- Δ(lac-proAB)</i>	INVITROGEN
ER2925	<i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hlsG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10)TetS endA1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA-5 mtl-1 thl-1 mcrB1 hsdR2</i>	(Woodcock et al., 1989)

Tabla 5. Plásmidos usados en este trabajo

Plásmido	Características relevantes	Referencia o fuente
pAP636	<i>sacB</i> modificado en pUCD, Cm ^R , Sac ^S	Colección del laboratorio
pBluescript SK	Vector de clonación, ori ColE1, Amp ^R 2961pb	(Short <i>et al.</i> , 1988)
pACYC184	Vector de clonación, ori p15A, Cm ^R , Tc ^R , 4245pb	(Chang & Cohen, 1978)
pGEM-T	Vector de clonación, ori pUC, Amp ^R , 3000pb	PROMEGA
pSU18	ori P15A, Cm ^R , 2340pb	(Borja <i>et al.</i> , 1991)
pMB1	Producto de PCR (oligos #91/#92) de 498pb (molde: pAP636, gen <i>sacB</i>) clonado en pGEM Amp ^R	Este trabajo
pMB3	Fragmento <i>Sac I/Pst I</i> de pAP636 (1480pb) clonado pBSSK(+), Amp ^R	Este trabajo
pMB4	Fragmento <i>Stu I/BamH I</i> de pMB1 (sitio de corte <i>Stu I</i> resistente a metilación) de 498pb clonado en pMB3, Amp ^R , <i>sacB</i> ⁺ , Sac ^{+/-}	Este trabajo
pMB7	Derivado del escrutinio de fenotipo Sac ^S del pMB4 en <i>E. coli</i> DH10 <i>pcnB</i> ⁻ . Amp ^R , <i>sacB</i> ⁺	Este trabajo
pMB11	Fragmento <i>Sac I/Pst I</i> de pMB7 de 1500pb clonado en pSU18, Cm ^R , <i>sacB</i> ⁺ , Sac ^S	Este trabajo

Tabla 6. Oligonucleótidos usados en este trabajo

# oligo	Secuencia 5' a 3'	Notas	Sitios
13	gttgtaaacgacggccagtg	pUC Fw	
14	tatgttttaagttggtaacgccaggg	pUC Rv	
17	ggaaacagctatgaccatg	pUC Rv	
91	gcaaa aggcct agacgtttggg	sacB@235pbstulf w	Stu I
92	gtg ggatcc ctcagcgtatgg	sacB@431bamhir ev	BamH I
100	cgg gtacc tctaacctccttccaagaac	EPA22@-6003	Kpn I
101	ccca agctt gaacaacaactcaattacggctcc	EPA22@-4553	Hind III
125	cccaa cgctaggcct tttgc	sacB@247sturev met-	Stu I
130	gcg gatcc taatgtctaaaggtgaagaattattc	GFP@1bpbamhif w	BamH I
131	cg gaattc tatttgtacaattcatccataccatgg	GFP@717ecorirev	EcoR I
144	cc gtacctgtgcag catattatagtgctttgctg	EMG1@-374MTL3	Kpn I, Bsg I
145	cc ctcgag tatataatggcccatgctcc	EMG1@231 MTL3	Xho I
150	cc gtacctgtgcag gttagtggtggcacctaaatg	EPA20@2801MTL 2	Kpn I, Bsg I
151	ccaagctccgggacaatcaaaccttac	a2@5 MTL2	Hind III
251	tgactaaggagacatcaacgatgtctaaaggtgaagaattattcac	GFP@stopSDATG Fw	
271	cact cgctagc gccaatagc	NhelsacBFw	Nhe I
272	cct gagctc aaattcgtaatcatgtcgtagctgttaatgtgtgaaatt	sacB-SDatgRI	Sac I

Medios de cultivo

- **Luria-Bertani (LB) sin NaCl**

Extracto de levadura 5g/L y triptona 10g/L. Para medio sólido añadir agar 15g/L. Esterilizar a 15 lb/in² por 15 minutos.

- **Luria-Bertani-Carbenicilina (LBCb) y Luria-Bertani-Cloranfenicol (LBCm)**

Para cajas de LBCb y LBCm agregar 100µg/ml de carbenicilina y 20µg/ml de cloranfenicol, respectivamente.

- **Luria-Bertani- Carbenicilina-Sacarosa (LBCbSac5%) y Luria-Bertani-Cloranfenicol-Sacarosa (LBCmSac5%)**

Esterilizar medio LB a 15lb/in² por 15 minutos. Para LBCbSac5% y LBCmSac5% adicionar carbenicilina 100µg/ml y cloranfenicol 20µg/ml, respectivamente. Añadir sacarosa esterilizada por filtración a una concentración final de 5%. Para medio sólido añadir agar 15g/L.

- **SOC**

Extracto de levadura 5g/L, triptona 20g/L, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgSO₄ 10mM y MgCl₂ 10mM. Esterilizar a 15lb/in² por 15 minutos. Adicionar glucosa a una concentración final de 0.4%.

- **M9 5x**

Na₂HPO₄ 30g/L, KH₂PO₄ 15g/L, NH₄Cl 5g/L y NaCl 5g/L. Esterilizar a 15lb/in² por 15 minutos.

Kits comerciales

- Para aislar el ADN plasmídico de cultivos bacterianos, se usó el kit Miniprep QIAgen[®].
- Para extraer ADN de geles de agarosa, se usó el kit Gel Extraction QIAquick[®].
- Para aislar ADN plasmídico de volúmenes grandes, se usó el kit Wizard ADN purification[®] (Promega).

- Para purificar productos de PCR, se usó el kit PCR Purification QIAquick®.

Protocolos de biología molecular

- **Digestión con *Stu* I**

a. Reacción:

ADN plasmídico	~500 ng
BSA (100µg/ml)	3 µl
Buffer de digestión #2 [NEB] 10X	3 µl
Enzima de restricción <i>Stu</i> I [NEB] (10U/µl)	1 µl
Agua miliQ a un volumen final de	30 µl

b. Incubar a 37°C durante 15 minutos.

c. Inactivar la enzima a 65°C por 20 minutos o purificar la reacción por el método de a) Extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y precipitación con etanol o b) PCR Purification QIAquick®.

- **Adición de dTTPs**

a. Reacción:

ADN plasmídico linearizado con <i>Stu</i> I (extremos romos)	30µl (~17ng/µl)
dTTPs 1mM (50µM final)	3 µl
Buffer de reacción 10X	6 µl
MgCl ₂ 20X	3 µl
ADN <i>Taq</i> polimerasa [Amplificasa®, UNAM, México] (5U/µl)	1.4 µl
Agua miliQ a un volumen final de	60µl

b. Incubar a 72°C durante 30 minutos.

c. Purificar la reacción por el método de a) Extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y precipitación con etanol b) PCR Purification QIAquick®.

d. Resuspender o eluir el ADN en Tris-HCl 10mM pH 8.

○ **Ligación de ADN**

a. Reacción de ligación:

	Vector + inserto	Control (-)
Vector de clonación (pMB11)	~50ng	~50ng
Inserto (proporción 3:1, inserto:vector)	X µl	-----
Buffer de ligación 10X [NEB, E.U.A]	1µl	1µl
T4 ADN Ligasa (400U/µl) [NEB, E.U.A]	1µl	1µl
Agua miliQ a un volumen final de	10µl	10µl

b. Incubar a 4°C durante 12-16hrs.

c. Purificar el ADN por el método de Extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y precipitación con etanol.

d. Resuspender el ADN en 10µl de Tris-HCl 10mM pH 8.

○ **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

a. Reacción:

	Concentración final
ADN plasmídico, dilución 1/10	~20ng
dNTPs 100X	20µM
Buffer de reacción 10X	2.5µl
MgCl ₂ 20X	1.25µl
Oligonucleotido forward	0.5µM
Oligonucleotido reverse	0.5µM
ADN Taq polimerasa [Amplificasa®, UNAM, México]	2.5U
Agua miliQ a un volumen final de	25µl

Control (+) añadir templado conocido, Control (-) sin ADN.

b. Programa:

Paso		°C	Tiempo
1	Desnaturalización del ADN molde	93	2min15s
2		93	45s
3	Alineamiento	X	30s
4	Extensión	72	Y
5	25 ciclos (regresar al paso 2 por 25 veces)		
6		72	7min
7		25	5min

c. Verificar la amplificación del producto de PCR por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

d. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una colonia bacteriana

Se sigue el mismo procedimiento para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional aunque en vez de agregar ADN como templado, se agrega una fracción de una colonia bacteriana a la reacción usando una punta estéril de micropipeta.

o Cuantificación de ADN

- a. Para calibrar, añadir 5µl de la solución, en que se diluyó el ADN a la celda de cuarzo TRAY CELL [HELLMA®]. Calibrar a cero de absorbancia a una longitud de onda de 260nm (autozero) en el espectrofotómetro UV-1700 PharmaSpec [SHIMADZU®].
- b. Limpiar celda con etanol y secar con papel Lens (PL®).
- c. Colocar 5µl de la muestra de ADN en la celda.
- d. Leer absorbancia a 260nm
- e. Calcular la concentración de ADN en µg/ml (ver anexos).

o Purificación del ADN por extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y precipitación con etanol

Fenol -cloroformo-alcohol isoamílico 24:24:1 (v/v)

Tris-HCl 10 mM pH 8.0

Acetato de amonio 9M

Glicógeno

Alcohol Etílico 100% y 70% grado reactivo

Procedimiento:

- a. Llevar la mezcla de ADN un volumen final de 100µl con agua miliQ.
- b. Añadir acetato de amonio a una concentración final de 2.5M (28µl).
- c. Añadir 128µl de la solución Fenol-Cloroformo-Isoamílico, Vortex.
- d. Centrifugar a 13200rpm por 3minutos.
- e. Transferir la fase acuosa a un tubo.
- f. Agregar 1µl de glicógeno a la fase acuosa.

- g. Añadir 2.5 volúmenes de etanol al 100% (320µl).
 - h. Incubar a -20°C por 30 minutos.
 - i. Centrifugar a 13200rpm por 10 minutos.
 - j. Descartar el sobrenadante.
 - k. Lavar la pastilla con 1ml de etanol al 70%.
 - l. Centrifugar a 13200rpm por 5 minutos.
 - m. Descartar el sobrenadante.
 - n. Secar la pastilla incubando a 50°C.
 - o. Resuspender la pastilla en 20µl o 40µl de Tris-HCl 10mM pH 8.
- **Preparación de células electrocompetentes de *E. coli* DH10B y DH10 *pcnB*⁻**
- a. Inocular las cepas DH10B y DH10 *pcnB*⁻ en medio LB.
 - b. Incubar 12h en agitación constante a 37°C.
 - c. Tomar 1ml e inocular 500ml de LB en un matraz Erlenmeyer de 2L.
 - d. Incubar a 30°C en agitación constante hasta que el cultivo llegue a una OD_{600nm} de 0.8.
 - e. Colocar el cultivo en hielo durante 10 minutos.
 - f. Centrifugar a 4000rpm por 15 minutos a 4°C.
 - g. Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla con agua estéril a 4°C.
 - h. Centrifugar a 4000rpm por 15 minutos a 4°C.
 - i. Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla con agua estéril.
 - j. Repetir pasos f y g dos veces.
 - k. Resuspender la pastilla con 50ml de glicerol al 10%.
 - l. Centrifugar a 4000rpm por 15 minutos a 4°C.
 - m. Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 2ml de glicerol al 10%.
 - n. Hacer alícuotas de 110µl, congelar en hielo seco con etanol y guardar a -80°C.

○ **Transformación de *E. coli* por electroporación con ADN plasmídico**

Recipiente con hielo

Células electrocompetentes

Cajas de medio LB con el antibiótico de selección

Medio SOC

Celdas de electroporación de 1mm.

ADN plasmídico a transformar

Electroporador: Gene Pulser Xcell Electroporation System [BIORAD]

Procedimiento:

- a. A 30µl de células electrocompetentes, agregar de 20ng a 50ng de ADN plasmídico.
- b. Pasar esta mezcla de células y ADN a la celda de electroporación.
- c. Electroporar en las condiciones establecidas, 1800V, 200mA y 50µs.
- d. Adicionar 1ml de medio SOC a 4°C a la celda electroporada.
- e. Pasar la transformación a un tubo estéril.
- f. Incubar a 30°C durante 1 hora en agitación constante (roller).
- g. Plaquear la transformación en cajas de LB con el antibiótico de selección.
- h. Incubar a 30°C por 12-24 h.

○ **Extracción de ADN plasmídico**

- a. Inocular 3ml de medio LB con antibiótico de selección, con la cepa que lleva el plásmido de interés.
- b. Incubar toda la noche a 30°C con agitación constante (roller).
- c. Aislar el plásmido con el kit Miniprep QIAgen[®] siguiendo las recomendaciones del proveedor.
- d. Eluir el ADN con 35 µl de Tris 10mM pH 8 a 50°C.

III. RESULTADOS

Los resultados están organizados de la siguiente manera: primero se expone la estrategia de clonación de productos de PCR que usa el vector-T desarrollado en este trabajo, segundo se describe la construcción del vector-T y por último se prueba la funcionalidad del plásmido pMB11.

Estrategia de clonación del vector-T pMB11

pMB11 es un vector derivado del plásmido pSU18 (Fig. 7), contiene el gen *sacB* bajo el control de un promotor derivado del promotor de *lacZ*. El producto de *sacB* (la levansacarasa) es letal para bacterias gram negativas en presencia de sacarosa. Sin embargo, si *sacB* es interrumpido mediante la inserción de un producto de PCR, la levansacarasa no es producida y las transformantes recombinantes son viables. Es decir sólo las transformantes de *E. coli* que tengan el inserto de PCR y que interrumpa el gen *sacB*, podrán crecer en medio con sacarosa. Este sistema es la base para la estrategia de clonación de productos de PCR que diseñamos (Fig. 4).

Protocolo de clonación de productos de PCR en pMB11:

- 1) PREPARAR EL VECTOR-T pMB11
 - a) Digerir el vector pMB11 con *Stu I* para dejar extremos romos.
 - b) Agregar un residuo de timidina en cada extremo 3' (reacción de adición de dTTPs).
- 2) CLONAR EL PRODUCTO DE PCR GENERADO POR LA *Taq* polimerasa EN EL VECTOR-T
 - a) Realizar una ligación entre el vector-T y el producto de PCR.
 - b) Transformar la ligación en DH10B.
 - c) Plaquear la transformación en LBCmSac5%.
 - d) Las transformantes deben contener el producto de PCR ligado al vector.

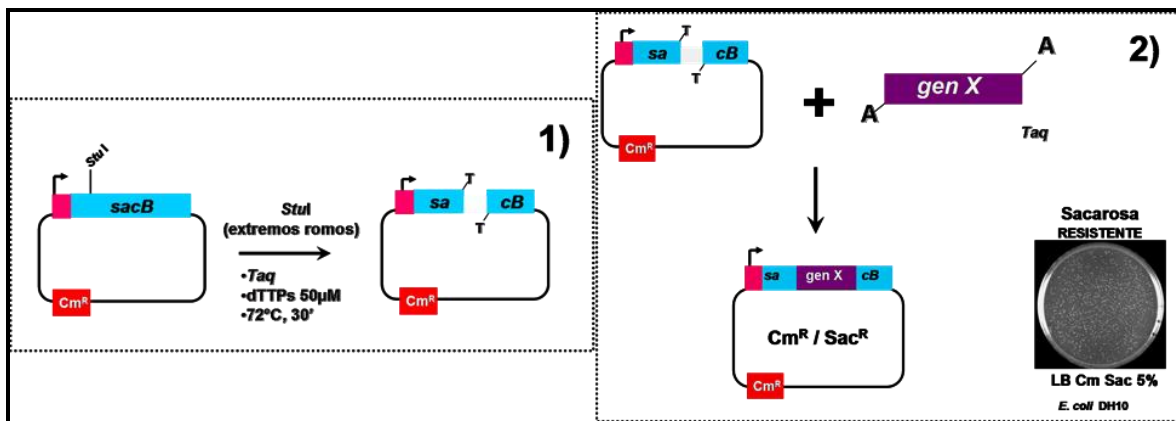


Figura 4. Estrategia de clonación del vector-T pMB11. 1) Preparación del vector-T pMB11. 2) Clonación del producto de PCR en el vector-T.

Construcción del vector-T pMB11

El vector pMB11 se construyó de la forma descrita en la Figura 7. Los principales cambios que originaron al vector-T pMB11 son: (i) Eliminar el sitio de metilación que impide que el sitio *Stu* I sea reconocido por la enzima *Stu* I, mediante la introducción de una mutación puntual silenciosa, (ii) utilización del plásmido pSU18 que contiene el ori p15A con un moderado número de copias, (iii) uso del marcador de resistencia a cloranfenicol (*cat*), (iv) modificación del promotor de *lacZ* para expresar el gen *sacB* (Fig. 7).

Se obtuvo el gen *sacB* del vector pAP636. Este plásmido impide el crecimiento de *E. coli* DH10B en LBCmSac5%. Este fenotipo se define como sacarosa sensible (*Sac*^S).

○ Eliminación del sitio de reconocimiento de la metiltransferasa Dcm que se sobrelapa con el sitio de reconocimiento de *Stu* I

A 239pb del ATG de *sacB* está el sitio único *Stu* I. Este sitio se sobrelapaba con un sitio de reconocimiento de la metiltransferasa Dcm. Cuando la metiltransferasa reconoce su sitio metila la primer citosina de la secuencia y como consecuencia, *Stu* I no puede unirse a su sitio de reconocimiento.

Para poder utilizar el sitio de *Stu* I como sitio de clonación para los productos de PCR en el pMB11, fue necesario eliminar el sitio de reconocimiento

de la metilasa. Esto permitirá digerir el vector extraído de cepas de *E. coli* *dcm*⁺, como la DH10 o DH5α, que son las cepas más frecuentemente usadas.

Para eliminar el sitio de reconocimiento de la metilasa Dcm se introdujo una mutación puntual en un oligonucleótido (Fig. 5b):

- a. Primero se diseñó el oligonucleótido (#91, Tabla 6) que contenía la mutación puntual silenciosa (A por G) en el sitio de reconocimiento de la metilasa, pero sin modificar el sitio de *Stu* I (Fig. 5a).
- b. Este oligonucleótido se usó para hacer una PCR que amplificó el fragmento *Stu* I–*Bam*H I de *sacB*. Este producto de PCR contiene un sitio de reconocimiento *Stu* I resistente a la metilación por Dcm (*Stu* I*, Fig. 5b).
- c. El producto de PCR *Stu* I–*Bam*H I de 498pb se clonó (Fig. 16) en el vector pGEM[®] (Promega, 2005) (Figs. 17 y 18). Este plásmido resultante es el pMB1 (Fig. 7).

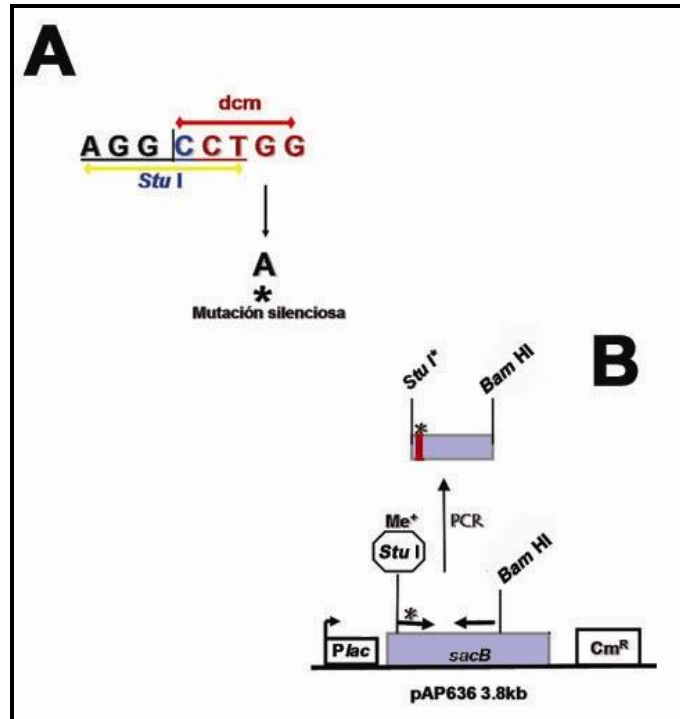


Figura 5. Estrategia para eliminar el sitio de reconocimiento de la metilasa Dcm. a) Sobrelape de los sitios de reconocimiento de *Stu* I y Dcm. b) Estrategia para introducir la mutación puntual en *sacB*.

- **Subclonación de *sacB* del pAP636 al vector pBluescript SK**

Se subclonó el fragmento *Sac I-Pst I* de pAP636, que contiene *sacB*, en el vector comercial pBluescript SK (Short *et al.*, 1988) (Figs. 21 y 22).

El nuevo plásmido, pMB3, se transformó por electroporación en la cepa ER2925 (*dam⁻, dcm⁻*). El pMB3 contiene *sacB* y es resistente a carbenicilina. El pMB3 extraído de la cepa ER2925 (*dam⁻, dcm⁻*) no se metila ya que esta cepa no tiene las metilasas Dam y Dcm. Esta subclonación en pBluescript SK se llevó a cabo por que el pAP636 es Cm^R y la cepa ER2925 en donde sería transformado también era Cm^R

- **Reemplazo del sitio *Stu I* sensible a metilación por el sitio *Stu I** resistente a metilación de *sacB***

Para obtener *sacB* con el sitio *Stu I** (sin sitio de metilación) fue necesario intercambiar el fragmento *Stu I-BamH I* del vector pMB1 (que lleva el fragmento de PCR *Stu I*/BamH I*) por el fragmento *Stu I-BamH I* original de *sacB* de pMB3 (Fig. 7).

Primero, el plásmido pMB1 se digirió con las enzimas *Stu I* y *BamH I* (Figs. 19 y 20) y el fragmento resultante de 498pb se aisló de gel por el kit Gel Extraction QIAquick[®] (ver Material y Métodos). El vector pMB3 aislado de la cepa *dam⁻, dcm⁻* (Fig. 23) se digirió con *Stu I* y *BamH I* para liberar el fragmento original de *sacB* que contiene el sitio *Stu I* sensible a metilación y se aisló el vector por el kit Gel Extraction QIAquick[®].

El vector pMB3 *Stu I/BamH I* (3.0kb) y el fragmento *Stu I*/BamH I* de pMB1 (498pb) se ligaron. La ligación se transformó por electroporación en DH10B. La construcción obtenida, pMB4 Cb^R, confiere el fenotipo Sac^S (Figs. 6, 7) y se puede cortar el DNA aislado de DH10B (*dam⁺, dcm⁺*) con la enzima *Stu I*.

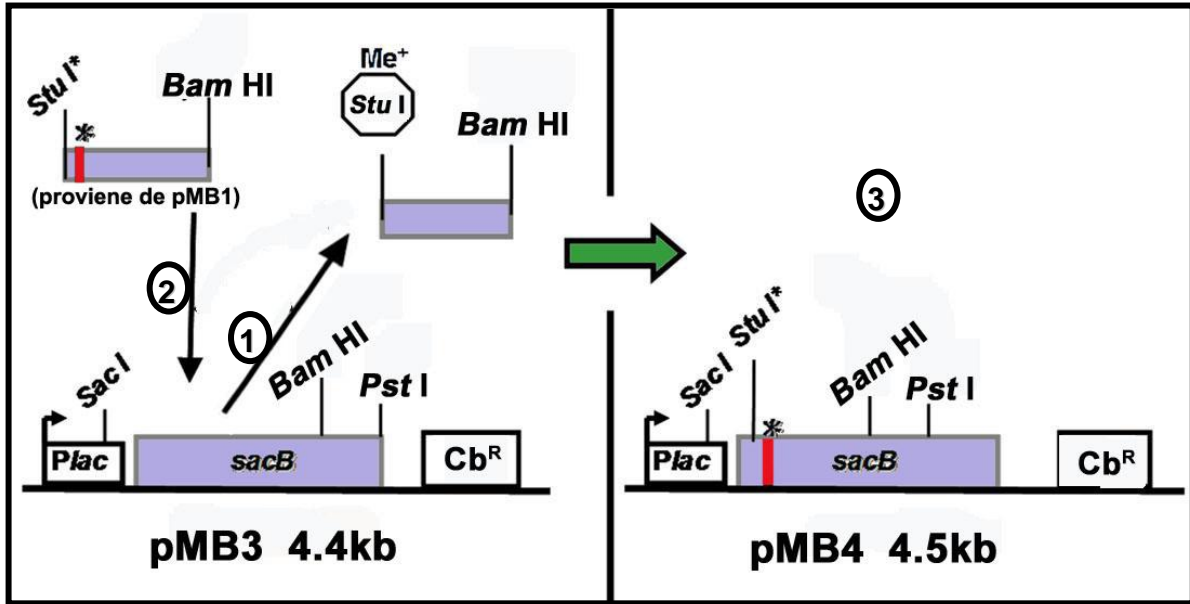


Figura 6. Introducción del fragmento *Stu*I**-Bam*HI resistente a metilación en el ORF de *sacB*.

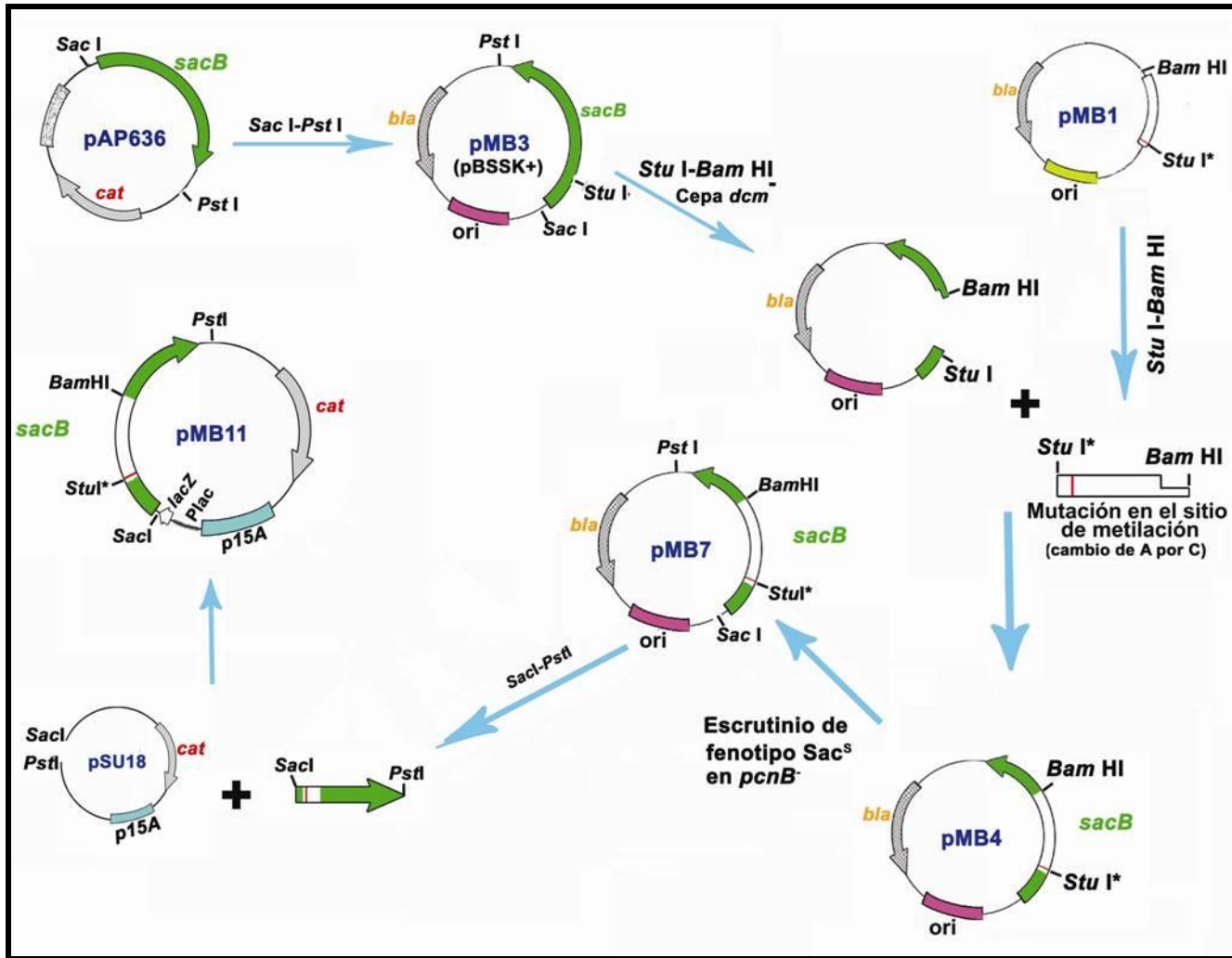


Figura 7. Esquema general de construcción del vector pMB11

Algunos productos de PCR pueden afectar la viabilidad de las bacterias cuando se clonan en plásmidos con un alto número de copias. Para evitar esto nosotros utilizamos la cepa DH10B *pcnB*⁻. Esta cepa disminuye diez veces el número de copias de los plásmidos (Lopilato *et al.*, 1986). La ventaja de usar esta cepa es que se puede disminuir la toxicidad de los productos de PCR clonados en nuestro vector.

Decidimos transformar el vector pMB4 en esa cepa y verificar si se mantenía el fenotipo Sac^S. Observamos un fenotipo intermedio Sac^{+/-} (Fig.8). Esto se debe a la reducción en el número de copias del plásmido, menor cantidad de SacB y por lo tanto menor sensibilidad a sacarosa.

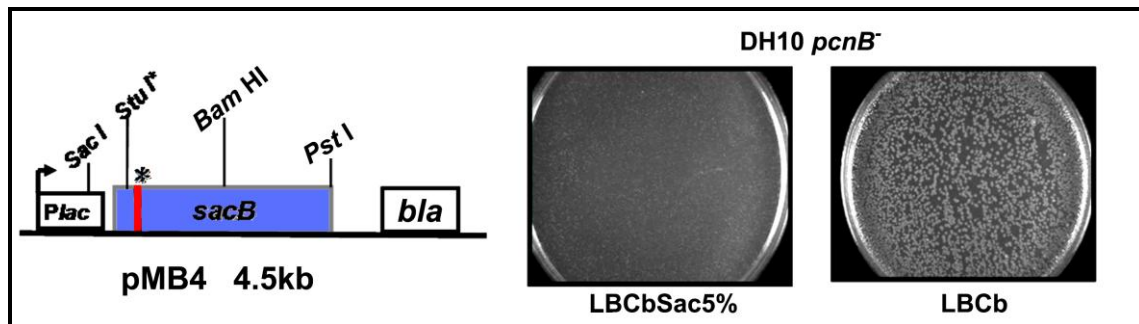


Figura 8. DH10 *pcnB*⁻ pMB4 presenta un crecimiento lento en medio LBCbSac5% (Sac^{+/-}).

○ Escrutinio de Sac^S en DH10 *pcnB*⁻

El vector pMB4 presenta un fenotipo Sac^{+/-} en DH10 *pcnB*⁻. Para que el vector-T funcione en este tipo de cepa es necesario que tenga un fenotipo Sac^S. Decidimos buscar mutantes espontáneas que fueran Sac^S.

Se hizo un escrutinio de 200 colonias al azar de DH10 *pcnB*⁻ pMB4 en cajas de LBCbSac5%. Sólo 1 colonia de 200 fue Sac^S (Fig. 9). El plásmido resultante, pMB7, confiere el fenotipo Sac^S en DH10 *pcnB*⁻. Además, provoca un crecimiento lento cuando se transforma en DH10B (Fig. 7) (Fig. 9). Esto sugiere que al aumentar el número de copias de pMB7, hay una mayor acumulación de SacB en la célula.

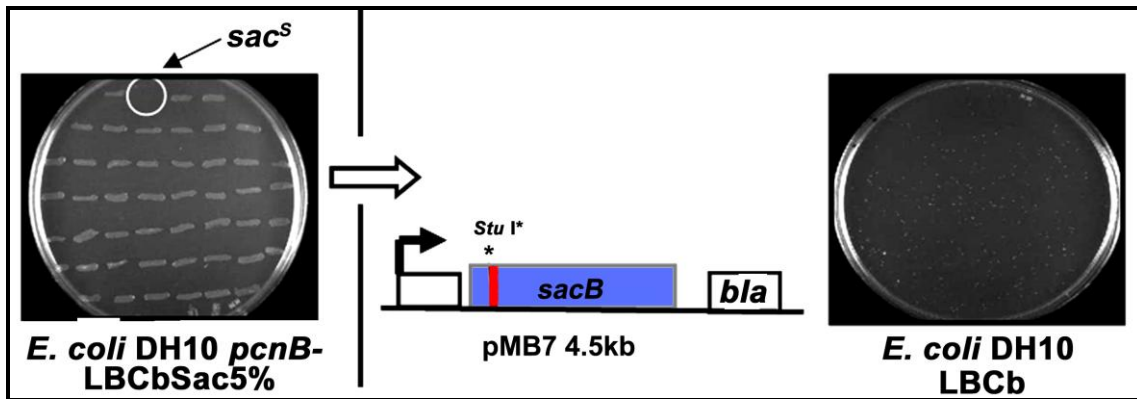


Figura 9. Escrutinio de una mutante sacarosa sensible. La cepa DH10B pMB7 tiene un crecimiento lento en LBCb.

- **Cambio de marcador de selección: de β -lactamasa (*bla*) a cloranfenicol acetil transferasa (*cat*)**

Hubo tres principales razones para cambiar de marcador de resistencia: i) el cloranfenicol es más barato que la carbenicilina, ii) no produce colonias satélite, y iii) para usar el vector pSU18 derivado de pACYC184 (ori: p15A y resistencia a Cm) con menor número de copias y compatibilidad con ColE1 (Borja *et al.*, 1991).

El vector pMB7, con un tamaño aproximado de 4.5kb, se digirió con *Sac* I y *Pst* I. Se obtuvieron dos fragmentos de 3.0kb y de 1.5kb. Este último contiene el cassette de *sacB*. El fragmento *Sac* I-*Pst* I de 1.5kb se purificó de gel con el kit Gel Extraction QIAquick[®] (ver Materiales y Métodos) (Figs. 24 y 25) y se clonó en el vector pSU18. De esta transformación se eligieron colonias al azar y se confirmó su fenotipo *Sac*^S en cajas LBCmSac5%. De ahí se escogió una colonia Cm^R, *Sac*^S. Este nuevo plásmido es el pMB11: *Sac*^S, Cm^R y ori p15A.

- **Análisis de la secuencia de pMB11**

Debido a que el pMB7 debe llevar una mutación espontánea que le confiere el fenotipo *Sac*^S, y esta mutación se transfirió al construir pMB11, decidimos secuenciar el pMB11 para buscar la mutación y entender el fenotipo *Sac*^S de pMB11. Secuenciamos el pMB11 utilizando los oligonucleótidos #17 y #125 (Tabla 6) que incluyen ~300pb del comienzo del ORF de *sacB* y ~50pb del 5'.

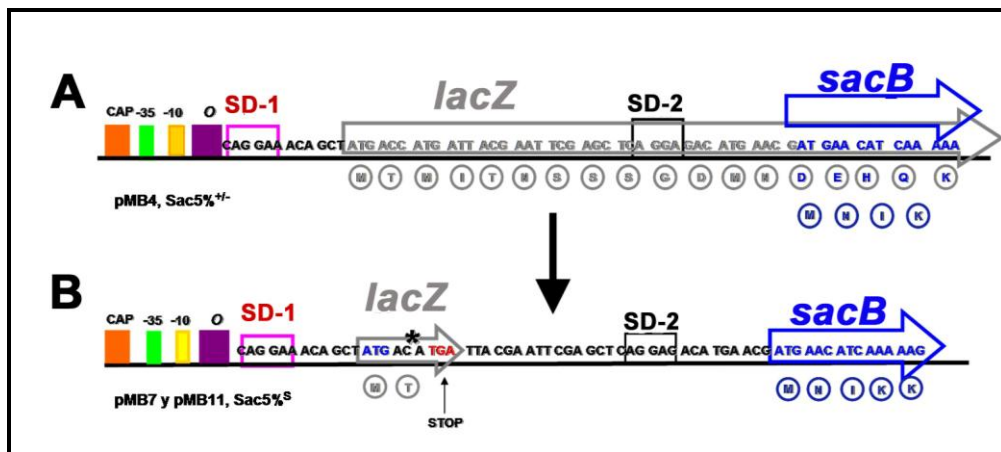


Figura 10. Hipótesis establecida para la mutante sacarosa sensible en pMB11.

Analizamos las secuencias obtenidas e hicimos un alineamiento con la secuencia del plásmido pSU18 del cual deriva pMB11 y *sacB* (Fig. 26). Con el alineamiento se identificó una mutación puntual por deleción de una citosina dentro del ORF de *lacZ* (Fig. 26). Esta mutación provoca un cambio en la fase de lectura y la aparición inmediata de un codón de paro (Fig. 10).

¿Cómo se puede explicar que esta mutación sea responsable de que el plásmido recuperara el fenotipo Sac^S (Fig. 10)? Una posible explicación es que en el ARNm, los ribosomas se unen al Shine-Dalgarno-1 (SD-1) al 5' de *lacZ* y comienzan a traducirlo. Se produce una proteína que utiliza el marco de lectura de *lacZ* y de *sacB* pero en fase con *lacZ* (Fig. 10A).

Cuando los ribosomas traducen *lacZ* ocultan el SD-2 que pone en fase a *sacB*. La frecuencia con la que se traduce *sacB* es entonces menor a la frecuencia con la que se traduce *lacZ* (Fig. 10A).

La mutación permitió que los ribosomas se unieran al SD-1 de *lacZ* y lo tradujeran en un dipéptido (debido a la aparición del codón de paro). Los ribosomas se liberan del ARNm y vuelven a unirse al SD-2 de *sacB*. Esto implica un incremento en la traducción de la levansacarasa comparado con la expresión sin la mutación (Fig. 10B).

Esto explicaría la reversión del fenotipo sacarosa resistente de pMB4 a Sac^S.

Características, ventajas y usos del vector-T pMB11

Características

- Vector de clonación de productos de PCR
- Tamaño aproximado de 3.8kb.
- Origen de replicación p15A de bajo número de copias.
- Marcador de contraselección en presencia de sacarosa: *sacB*
- Marcador de resistencia a cloranfenicol, *cat*.
- Sacarosa sensible (Sac^S) (Fig. 12).
- sacB* contiene el sitio de restricción *Stu I** resistente a metilación.
- sacB* está bajo un promotor derivado de *lacZ*.

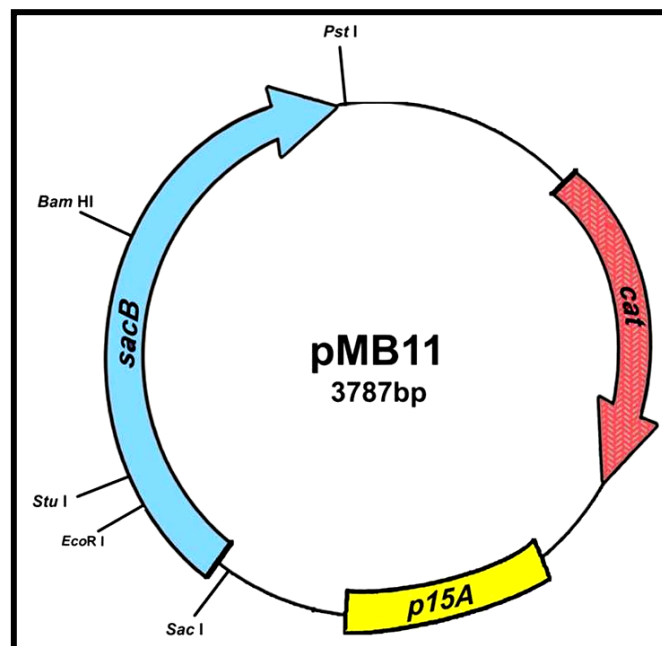


Figura 11. Vector pMB11.

Usos

- Diseñado para clonar productos de PCR con la estrategia T/A.
- Ligar fragmentos con extremos romos.
- Puede usarse para construcción de librerías genómicas digeridas parcialmente con *Sau3 AI* (sitio *BamH I*) o *Tsp 501* (sitio *EcoR I*).

Ventajas

- Utiliza contraselección para identificar clones que contengan inserto por lo que se elimina la presencia de vector sin inserto recircularizado.

- b. No utiliza la complementación alfa con el escrutinio de color azul y blanco.
- c. No requiere cepas con la mutación *lacZ*ΔM15 en el cromosoma.
- d. Tiene alrededor de 15 copias por célula.
- e. Utiliza un protocolo de uso fácil y rápido.
- f. No requiere reactivos adicionales como IPTG y/o Xgal.
- g. En cambio, utiliza sacarosa y cloranfenicol que son accesibles y muy económicos.

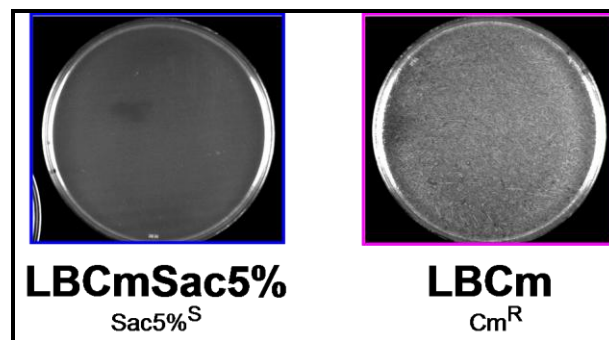


Figura 12. Fenotipo del vector pMB11.

Protocolos para el uso del vector pMB11

A. Protocolo para preparar el vector-T pMB11

- 1) El vector pMB11 se digiere con *Stu* I para dejar extremos romos:
 - a. Obtener ADN del vector pMB11 (ver Materiales y métodos).
 - b. Digerir 0.5-1µg de pMB11 con 1µl (10U) de la enzima *Stu* I [NEB, USA] (ver Materiales y Métodos).
 - c. Inactivar la enzima a 65°C por 20 minutos.
- 2) Agregar un residuo de timidina en cada extremo 3' del pMB11 digerido con *Stu* I (reacción de adición de dTTPs):
 - a. En el mismo tubo de la digestión pMB11-*Stu* I hacer la reacción de adición de dTTPs (ver Materiales y Métodos).
 - b. Purificar el vector-T por el método de Extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y precipitación con etanol (ver Materiales y Métodos).

- c. Los dTTPs en la reacción de adición de residuos de timidina siempre están en exceso para evitar que fuese un factor limitante en la reacción.

B. Protocolo para clonar un producto de PCR generado por la *Taq* polimerasa en el vector-T pMB11

- a. Realizar una ligación entre el vector-T y el producto de PCR y purificar el ADN de la reacción por el método de Extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y precipitación con etanol (ver Materiales y Métodos).
- b. Electroporar la ligación en DH10B (ver Materiales y Métodos).
- c. Platear la transformación en medio LBCmSac5%.
- d. Recuperar las colonias que hayan crecido en este medio. Estas colonias deben contener el producto de PCR.
- e. Hacer PCR de colonia a 10 transformantes al azar para identificar las colonias positivas (ver Materiales y Métodos).

Experimentos funcionales del vector-T pMB11

A. Frecuencia de reversión de la cepa DH10B pMB11

Para conocer la frecuencia de reversión espontánea del fenotipo Sac^S a Sac^R de la cepa DH10B pMB11, diseñamos el siguiente experimento:

El pMB11 se electroporó en DH10B y se seleccionó una colonia Cm^R, Sac^S. Se preparó un cultivo líquido de esta colonia en LBCm y se incubó hasta saturación ($\sim 1 \times 10^9$ bacterias por ml de medio). Se hicieron diluciones exponenciales seriadas en medio M9 y se platearon en cajas de LBCm y LBCmSac5%. Las cajas se incubaron a 30°C toda la noche y se cuantificaron las colonias Cm^R y Sac^R.

El número de colonias Cm^R por mililitro fue de $\sim 1.5 \times 10^9$ de las cuales 4×10^3 eran Sac^R (Tabla 7). Estos datos indican que: i) el total de las bacterias en el cultivo saturado fueron Cm^R lo que demuestra que el plásmido que confiere resistencia a Cm prácticamente no se pierde en el cultivo sin importar el número intermedio de copias, ii) la frecuencia de reversión para pMB11 en DH10B es de 4×10^{-6} , es decir, en un millón de células Sac^S, 4 serán Sac^R (Tabla 4).

Tabla 7. Cuenta viable y revertantes de la cepa DH10B pMB11.

	Cm^R	Sac^R Cm^R	Rev (Sac^R / Cm^R)
1	3.1×10^9	4×10^3	1.3×10^{-6}
2	2.3×10^8	2.2×10^3	9.6×10^{-6}
3	1.2×10^9	2.2×10^3	1.8×10^{-6}
\bar{X}	1.5×10^9	2.8×10^3	1.87×10^{-6}

Tres experimentos independientes. Cm^R , #UFC Cm^R /ml cultivo. Sac^R , #UFC Sac^R /ml cultivo. Rev, frecuencia de reversión. \bar{X} , Promedio de los tres experimentos.

B. Etapas intermedias en la preparación del vector-T pMB11

1) Eficiencia de transformación de pMB11 superenrollado en DH10B

Con el propósito de conocer la frecuencia de transformación de pMB11 en DH10B, diseñamos el siguiente experimento:

Células electrocompetentes de DH10B utilizadas en este trabajo fueron preparadas en el laboratorio (ver Materiales y Métodos). Como referencia, estas células tienen una eficiencia de transformación de 1×10^8 UFC/ μ g de pUC.

El pMB11 superenrollado se transformó en DH10B por electroporación (ver Materiales y Métodos), se hicieron diluciones exponenciales seriadas en medio M9 y se platearon en cajas de LBCm y LBCmSac5%. Las cajas se incubaron a 30°C toda la noche y se cuantificaron las colonias Cm^R y Sac^R .

La eficiencia de transformación para pMB11 superenrollado en DH10B fue de entre $1-20 \times 10^7$ UFC Cm^R / μ g ADN y la frecuencia de reversión fue de $\sim 3.5 \times 10^{-5}$ (Tabla 8).

Tabla 8. Eficiencia de transformación y reversión del pMB11 superenrollado en DH10B.

Efic (Cm^R)	Sac^R Cm^R	Rev (Sac^R / Cm^R)
1.8×10^8	0.95×10^4	5.3×10^{-5}
3.7×10^7	0.698×10^3	1.9×10^{-5}

Dos experimentos independientes. Cm^R , #UFC/ μ g ADN por ml de transformación. Efic, eficiencia de transformación. Sac^R , #UFC/ μ g ADN por ml de transformación. Rev, frecuencia de reversión. Las células DH10B fueron electrocompetentes a 1×10^8 / μ g pUC.

A partir de los datos anteriores y comparándolos con los datos de frecuencia de reversión de la cepa DH10B pMB11 podemos concluir:

- i) La frecuencia de reversión de la cepa DH10B pMB11 (de Sac^S a Sac^R) es menor que la reversión del pMB11 superenrollado electroporado en DH10B; ii) los eventos mutagénicos (de Sac^S a Sac^R) aumentan cuando utilizamos el

protocolo de electroporación para transformar pMB11 superenrollado en DH10B.

2) Recuperación de transformantes con el vector-T pMB11

El protocolo de transformación que se usó para los experimentos de este trabajo (ver Materiales y Métodos) requiere recuperar a las bacterias, después de la electroporación durante una hora a 30°C en un ml de medio SOC con agitación (roller). Decidimos probar dos y tres horas de recuperación para tratar de aumentar la eficiencia de transformación de pMB11 superenrollado en la cepa STBL2 (Steele *et al.*, 1994).

La eficiencia de transformación aumentó entre 2.5 y 5 veces con el aumento al tiempo de recuperación (Tabla 9). Cabe mencionar que la OD_{600nm} permaneció igual. Esto indica que el aumento del número de transformantes se debe a un incremento de la expresión de *cat* y no a la división de las células.

Tabla 9. Efecto que tiene el tiempo de recuperación después de la electroporación en la eficiencia de transformación de la cepa STBL2 con pMB11.

Tiempo de recuperación	Efic (Cm ^R)
1 hora	4 x10 ⁷
2 horas	1 x10 ⁸
3 horas	2 x10 ⁸

El experimento fue hecho en la cepa STBL2[®]. Cm^R, #UFC/μg ADN por ml de transformación. Efic, eficiencia de transformación. Las células STBL2 fueron electro-competentes a 1x10⁷/μg pUC.

3) Eficiencia de transformación y frecuencia de reversión de pMB11 lineal y religado

¿Podría la restricción de pMB11 con *Stu* I afectar el fenotipo Sac^S? Para contestar la pregunta diseñamos el siguiente experimento:

pMB11 se digirió con *Stu* I (pMB11/*Stu* I). El ADN de la digestión se purificó por el método de Extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y precipitación con etanol. Una parte de esta digestión se transformó en DH10 (pMB11/*Stu* I lineal) y a la otra parte se le hizo una reacción de ligación (pMB11/*Stu* I/religado) y también se transformó. De las dos transformaciones, se hicieron diluciones exponenciales seriadas en medio M9 y se platearon en cajas de LBCm y LBCmSac5%. Las cajas se incubaron a 30°C toda la noche y se cuantificaron las colonias Cm^R y Sac^R.

En la transformación del pMB11 lineal se obtuvieron $\sim 2-3 \times 10^5$ colonias Cm^{R} y cero colonias Sac^{R} (Tabla 13).

El ADN lineal transformado en *E. coli* es degradado por la célula y no produce colonias en el medio de selección (Ausubel *et al.*, 2001). Por tanto las colonias Cm^{R} de la transformación pMB11 lineal corresponden a plásmido sin digerir. Estas colonias de DH10B pMB11 sin digerir son Cm^{R} y Sac^{S} .

El pMB11 superenrollado da colonias Sac^{R} a una frecuencia muy baja (1×10^{-5}) y el pMB11/*Stu I*/lineal no las origina, por tanto, tampoco se esperan falsos positivos en la clonación de productos de PCR.

Las frecuencias de reversión (colonias Sac^{R}) del pMB11/*Stu I*/religado son mayores que las del pMB11 superenrollado (Tabla 14). Esto indica que la levansacarasa no se produce o lo hace a niveles bajos. Esto no permite la contraselección en LBCmSac5%.

El pMB11 religado podría provocar falsos positivos en la clonación del producto de PCR. Sin embargo, este fenómeno también sucede en los plásmidos que usan el escrutinio azul/blanco, en donde hay una población de plásmidos recircularizados que originan colonias blancas pero sin inserto (Promega, 2005; Rhodes, 1998).

4) Análisis de vectores pMB11/*Stu I*/religados Sac^{R}

¿Cuáles son las causas de que el pMB11/*Stu I*/religado en DH10B presente una población Sac^{R} ? Para entender la naturaleza de estas colonias Sac^{R} , decidimos analizar estos plásmidos.

Se escogió al azar cinco colonias con fenotipo Cm^{R} y Sac^{R} de la transformación pMB11/*Stu I*/religado en DH10B. Las colonias se cultivaron en LBCm hasta saturación. Se aisló ADN plasmídico de los cinco cultivos con el kit Miniprep QIAgen[®] (plásmidos del #1 al 5) (ver Materiales y Métodos).

Se hizo una PCR utilizando como molde estos cinco distintos plásmidos (ver Materiales y Métodos). Con los oligonucleótidos pUCFw y pUCRv que amplifican un producto de PCR de 1627pb que incluye el ORF de *sacB* (Tabla 6) (Fig. 13).

Se obtuvieron productos de PCR de diferentes tamaños, todos menores a 1627pb (Fig. 13). En uno de los casos inclusive no hubo amplificación (Fig. 13) lo que indica que alguno de los oligos (o los dos) no encontró la secuencia

complementaria a la cual alinearse. Los datos sugieren que estos plásmidos Sac^R , de menor tamaño que el pMB11, perdieron parte de la secuencia del gen *sacB* y son plásmidos rearrreglados.

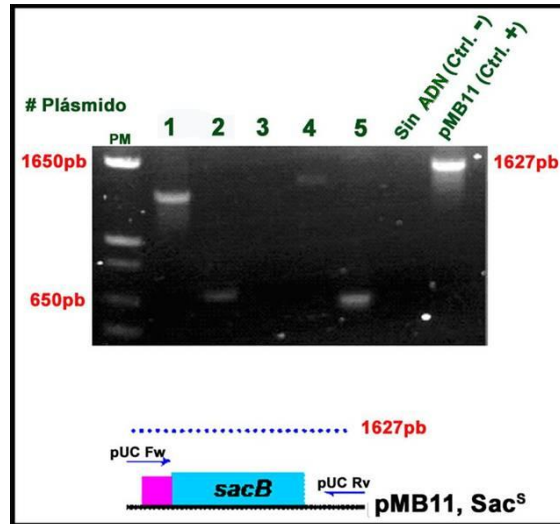


Figura 13 Diagnóstico por PCR para los cinco plásmidos Sac^R .

Para saber si los cinco plásmidos Sac^R tenían los sitios de restricción *Stu I* y *BamH I* se digirieron con estas enzimas. Se compararon las bandas de digestión con los patrones de digestión del pMB11 (Fig. 14). Sólo el plásmido #1 contiene el sitio de reconocimiento para *BamH I*. El ADN del plásmido #2 contiene el sitio de reconocimiento para *Stu I*. Ninguno de los cinco plásmidos tiene el mismo tamaño que pMB11, ni tampoco los dos sitios de reconocimiento *Stu I* y *BamH I* (Fig. 14).

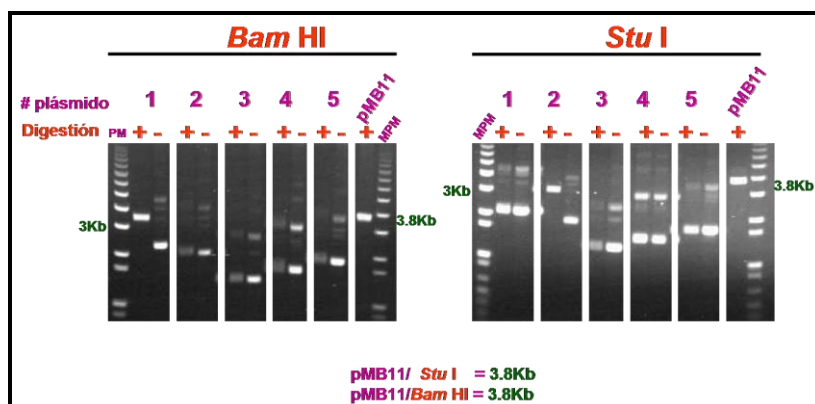


Figura 14. Digestión *BamH I* y *Stu I* de los cinco plásmidos Sac^R .

A partir de estos datos concluimos que los pMB11/*Stu* I/religados Sac^R tienen incompleto el ORF de *sacB*, la levansacarasa no se produce y por tanto el sistema de contraselección no funciona.

Tenemos dos hipótesis para explicar este fenómeno:

1) En algún punto, durante la digestión con *Stu* I o posterior a ella, actúa alguna exonucleasa que cambia el marco de lectura de *sacB* en estos plásmidos.

2) Estos plásmidos Sac^R son producto de rearrreglos dentro de la célula. Dos o más plásmidos se ligan en la reacción. Estas construcciones son de gran tamaño y contienen varios orígenes de replicación lo que los hace inestables. Producen rearrreglos en los genes que conforman a los plásmidos.

5) Efecto de diferentes variables en la disminución del pMB11/*Stu* I/religado Sac^R

Si existe la presencia de una exonucleasa, nos propusimos disminuirla o eliminarla para reducir el número de colonias Sac^R producto de recircularizaciones. Analizamos distintas variables.

a. Probar otra marca de la enzima *Stu* I

Una posibilidad es que la enzima de restricción que usamos para digerir a pMB11 (*Stu* I de NEB, E.U.A) tenga actividad de exonucleasa y decidimos probar otra marca (*Stu* I de Roche, USA). Los resultados fueron los mismos: el pMB11/*Stu* I de Roche/religado y transformado en DH10B presentó la población con fenotipo Sac^R.

b. Digestión con *Stu* I a diferentes tiempos de incubación

Si la enzima *Stu* I tiene actividad de exonucleasa. Decidimos probar si a menor tiempo de incubación la población pMB11/*Stu* I/religado Sac^R desaparecía o disminuía considerablemente.

El menor tiempo de incubación en donde 500ng de pMB11 superenrollado se digería casi completamente fue a los 15 minutos. Entonces se digirió esta cantidad de pMB11 con *Stu* I y se incubó a ese tiempo, como control se hizo una digestión de una hora. De aquí en adelante las dos digestiones se trataron igual: los plásmidos lineales de las dos condiciones se

religaron y se transformaron en DH10B. Se hicieron diluciones exponenciales seriadas en medio M9 y se platearon en cajas de LBCm y LBCmSac5%. Las cajas se incubaron a 30°C toda la noche y se cuantificaron las colonias Cm^R y Sac^R. No hubo diferencias considerables en las dos condiciones. Los 15 minutos de incubación con *Stu* I no eliminó las colonias Sac^R.

A partir de estos datos, decidimos dejar establecido el tiempo de incubación de 15 minutos dentro del protocolo de digestión de pMB11 con *Stu* I ya que disminuye el tiempo de preparación del vector-T.

c. Digestión de pMB11 con otra enzima de restricción: *Sna*B I

Para determinar si la actividad de exonucleasa se debía a la enzima *Stu* I decidimos digerir el pMB11 con otra enzima de restricción. Escogimos a *Sna*B I porque también deja extremos romos al igual que *Stu* I y su sitio de corte está dentro del ORF de *sacB*.

Después de digerir el vector durante 40 minutos con *Sna*B I, se hizo la reacción de ligación y se transformó el pMB11/*Sna*B I/religado en DH10B. Se plateó en LBCmSac5%. Al mismo tiempo se usó como control una digestión de *Stu* I en las mismas condiciones.

La digestión con *Sna*B I no eliminó las colonias Sac^R del pMB11/religado (Fig. 27). Esto significa que probablemente no sea la presencia de una actividad de exonucleasa en la enzima *Stu* I la responsable del pMB11 recircularizado Sac^R.

d. Probar diferentes T4 ADN ligasas y buffers de ligación

Otra posibilidad es que la actividad de exonucleasa provenga de la ligasa y/o del buffer de ligación que se estaba usando. Así que se comparó las enzimas T4 ADN ligasa de ROCHE y la de NEB y los buffers de ligación de PROMEGA y NEB.

El pMB11 linearizado con *Stu* I se religó en las distintas condiciones y se transformó en DH10B. Se hicieron diluciones exponenciales seriadas en medio M9 y se platearon en cajas de LBCm y LBCmSac5%. Las cajas se incubaron a 30°C toda la noche y se cuantificaron las colonias Cm^R y Sac^R.

La ligación en cualquiera de las cuatro condiciones dió colonias Sac^R (Tabla 10). La condición de T4 ADN ligasa [NEB] y buffer de ligación [NEB]

mostró menor número de colonias Sac^R y menor frecuencia de reversión (Tabla 10).

Tabla 10. Diferentes T4 ADN ligasas y buffers de ligación y sus efectos en la presencia de transformantes pMB11/*Stu* I/religado Sac^R.

pMB11/ <i>Stu</i> I/religado (Condición)	Cm ^R	Sac ^R Cm ^R	Rev (Sac ^R / Cm ^R)
LIG. [Roche], BUF. (Promega)	5.8 x10 ⁷	1.6 x10 ⁵	2.8 x10 ⁻³
LIG. [Roche], BUF. [NEB]	2.0x10 ⁷	2.1 x10 ⁴	1.0 x10 ⁻³
LIG. [NEB], BUF. (Promega)	7.0 x10 ⁷	8.5 x10 ⁴	1.2 x10 ⁻³
LIG. [NEB], BUF. [NEB]	7.0 x10 ⁶	2.4 x10 ³	3 x10 ⁻⁴

Las células fueron electrocompetentes a 1x10⁸/μg pUC (DH10B). Cm^R, #UFC/μg ADN por ml de transformación. Sac^R, #UFC/μg ADN por ml de transformación. Rev, frecuencia de reversión. LIG., T4 ADN ligasa. BUF., buffer de ligación. [Roche], de la marca[®] Roche, EUA. (Promega), de la marca[®] Promega, EUA. [NEB], de la marca[®] NEB, EUA.

e. Distintos métodos de purificación de ADN

El pMB11 digerido con *Stu* I puede ser tratado de distintas formas para inactivar la enzima y purificar el ADN. Algunas opciones son: inactivar la enzima con calor, utilizar kits comerciales de purificación de ADN, purificar de gel por el kit Gel Extraction QIAquick[®] o hacer una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y precipitación con etanol.

Probamos si estas formas de tratamiento del ADN tenían algún efecto en la población pMB11/*Stu* I/religado Sac^R (Tabla 11).

Se dividió en partes iguales las digestiones de pMB11/*Stu* I (misma cantidad de ADN y 15 minutos de incubación), tratadas con cuatro formas distintas de purificación arriba mencionadas. El pMB11 linearizado se religó y transformó en DH10B. Se hicieron diluciones exponenciales seriadas en medio M9 y se platearon en cajas de LBCm y LBCmSac5%. Las cajas se incubaron a 30°C toda la noche y se cuantificaron las colonias Cm^R y Sac^R.

La cantidad inicial de ADN en las distintas condiciones fue la misma y la transformación en DH10 fue con volúmenes iguales. Por tanto, se esperaba que el número de colonias Cm^R fuera semejante para las cuatro condiciones. Sin embargo el número de colonias Cm^R fue mayor para la condición sin purificación y menor para el método Gel Extraction QIAquick (Tabla 11).

Sin embargo esta diferencia en el número de transformantes Cm^R se debe a una pérdida de ADN provocada por los distintos métodos de purificación

probados. Está documentado que existen diferencias en la eficiencia de recuperación del ADN en los distintos kits comerciales para purificar ADN.

Para el método de purificación PCR Purification QIAquick® la recuperación del ADN está entre el 90 y 95%, lo que significa que la pérdida de ADN es mínima. En cambio el kit Gel Extraction QIAquick® puede recuperar tan solo entre el 70 y 80% del ADN inicial (datos del fabricante, QIAGEN).

Aún y con estas diferencias en el número de transformantes Cm^R para las cuatro condiciones, las frecuencias de reversión fueron iguales (Tabla 11).

Esto indica en primer lugar que el uso de cualquiera de estos métodos de purificación no elimina la presencia de colonias DH10B pMB11/*Stu* I/religado Sac^R y segundo, no existe algún método que sea mejor que otro para disminuir el número de revertantes Sac^R.

Tabla 11. Efecto de los diferentes métodos de purificación de ADN en la presencia de transformantes pMB11/*Stu* I/religado Sac^R.

pMB11/ <i>Stu</i> I/religado (Condición)	Cm ^R	Sac ^R Cm ^R	Rev (Sac ^R /Cm ^R)
Sin purificación (Inactivación a 68°C)	1.02 x10 ⁷ 1.50 x10 ⁷	1.86 x10 ⁴ 3.00 x10 ⁴	1.8 x10 ⁻³ 2.0 x10 ⁻³
Extracción con fenol-cloroformo- alcohol isoamílico y precipitación con etanol	5.90 x10 ⁶ 1.38 x10 ⁸	1.50 x10 ⁴ 2.70 x10 ⁵	2.5 x10 ⁻³ 2.0 x10 ⁻³
PCR Purification QIAquick®	1.02 x10 ⁶ 2.76 x10 ⁷	3.00 x10 ³ 5.10 x10 ⁴	2.9 x10 ⁻³ 1.8 x10 ⁻³
Gel Extraction QIAquick®	4.80 x10 ⁵ 2.31 x10 ⁶	1.20 x10 ³ 4.20 x10 ³	2.5 x10 ⁻³ 1.8 x10 ⁻³

Cada condición se hizo por duplicado (experimento uno en negro, experimento dos en gris). Para consultar los protocolos de purificación ver Materiales y Métodos. Las células fueron electrocompetentes a 1x10⁸/µg pUC (DH10B). Cm^R, #UFC/µg ADN por ml de transformación. Sac^R, #UFC/µg ADN por ml de transformación. Rev, Revertantes.

Una posible conclusión es que las colonias Sac^{R} del pMB11 recircularizado provengan de la ligación de varios plásmidos y que hayan derivado en rearreglos intermoleculares inestables en DH10B.

6) Eficiencia de adición de residuos de timidina en pMB11/*Stu* I

Para poder clonar productos de PCR en pMB11 se necesita convertir el plásmido en un vector-T. Esto se lleva a cabo agregando residuos de timidina en los extremos romos 3' del vector cortado con *Stu* I (pMB11/*Stu* I/dTTPs).

Para conocer la eficiencia de adición de extremos 3'T en el pMB11/*Stu* I, comparamos el número de colonias Cm^{R} del pMB11/*Stu* I/religado contra el pMB11/*Stu* I/dTTPs/religado:

El número de transformantes Cm^{R} disminuye considerablemente al adicionar los residuos de timidinas (Fig. 15). Esto se debe a que, al insertar una timina en cada extremo 3' del pMB11/*Stu* I, el número de moléculas lineales que se pueden religar es menor.

La adición de extremos 3'T es muy eficiente puesto que sólo 1 plásmido pMB11/*Stu* I/dTTPs/religado de cada 1000 produce una colonia Cm^{R} (pMB11 donde la inserción de 3'T no ocurrió y se pudo religar).

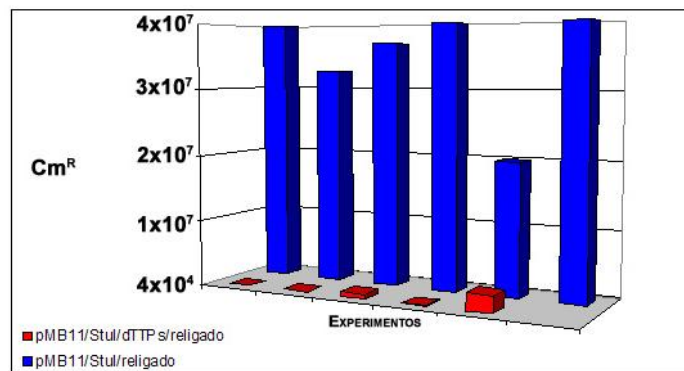


Figura 15. Eficiencia de adición de timidinas al pMB11/*Stu* I y la reducción de UFC Cm^{R} . Experimentos independientes. Cm^{R} , #UFC/ μg ADN por ml de transformación. Las células DH10B fueron electro-competentes a 1×10^8 / μg pUC.

C. Eficiencia de clonación del vector-T pMB11

Para conocer la eficiencia de clonación del vector-T pMB11 diseñado y construido en este trabajo, se clonaron productos de PCR de distintos tamaños y distintas secuencias. Estos productos fueron generados con diferentes oligos (Tabla 6) y amplificados como se indica en Materiales y Métodos.

Las frecuencias de clonación obtenidas en experimentos independientes variaron entre el 60 y 90% (Tabla 12). Con el pMB11 se pudo clonar productos de PCR de 470pb y hasta de 1389pb.

Las transformantes que se escogieron para hacer PCR de colonia diagnostico provenían de cajas LBCmSac5%.

Tabla 12. Eficiencia de clonación de productos de PCR en el vector-T pMB11 en DH10B.

Par de oligos	Tamaño (pb)	Eficiencia de Clonación (%)	No. de transformantes
150/151	472	90	1508
150/151	472	70	10667
100/101	1389	75	7
130/131	700	75	5
144/145	629	60	370

Los moldes de ADN usados para amplificar los distintos productos de PCR provienen del genoma de *Candida glabrata*. La eficiencia de clonación se calculó como el # de colonias con inserto/número total colonias x 100 (ver anexos). El número de transformantes son las colonias Sac^R por mL de transformación. Las células DH10B fueron electrocompetentes a $1 \times 10^8 / \mu\text{g}$ pUC.

IV. CONCLUSIONES

- D. pMB11, derivado de pSU18 (pACYC184), es Cm^R y Sac^S en DH10B y en DH10 *pcnB*. La expresión de *sacB* se lleva a cabo a partir de un promotor derivado de *lacZ*.
- El pMB11/*Stu* I/religado produce transformantes Sac^R en DH10B. La presencia de esta población, **NO** se debe a:
 - Actividad exonucleasa específica de la enzima *Stu* I, marcas comerciales o tiempos de incubación con el pMB11.
 - Actividad exonucleasa en la T4 ADN ligasa [ROCHE, NEB] o en los buffers de ligación [PROMEGA, NEB].
 - Métodos de purificación del ADN de la digestión pMB11/*Stu* I.
 - Una posible explicación de la presencia de estas colonias Sac^R de pMB11 recircularizado es que sean dos o más plásmidos ligados y productos de rearrreglos inestables dentro de la célula.
 - La adición de extremos 3'T al pMB11 es eficiente.
 - pMB11-T es capaz de clonar productos de PCR entre ~470pb y ~1400pb.
 - La eficiencia de transformación del pMB11 en STBL2 se incrementa cinco veces al aumentar el tiempo de recuperación de las células electroporadas de 1 a 3 horas.

V. DISCUSIÓN

La característica esencial del vector-T pMB11 es que permite seleccionar colonias que tienen el producto de PCR interrumpiendo el gen *sacB*. No utiliza la complementación alfa ni el escrutinio de color azul y blanco, por lo tanto tampoco requiere IPTG, X-gal o cepas con la mutación *lacZ*ΔM15 en el cromosoma. Sólo necesita sacarosa en el medio para seleccionar los productos de PCR.

Numerosos vectores de clonación T/A han sido desarrollados; algunos utilizan los genes *pheS* o *parE* como marcadores de selección para los productos de PCR (Kast, 1994; Kim *et al.*, 2004) y otros usan a *sacB* como sistema de contraselección. Entre ellos está el pAd10*sacB*II que fue diseñado para clonar insertos de hasta 95kb utilizando el sistema del bacteriófago P1 (Pierce *et al.*, 1992) o el pUCD800 que sirve para aislar secuencias de inserción (IS) (Gay *et al.*, 1985).

El costo del sistema de clonación de este trabajo está por debajo de los costos de los sistemas comerciales de clonación que utilizan la complementación alfa de *lacZ* y el escrutinio de color azul y blanco (Tabla 15).

Ori p15A, ventajas de usar un número intermedio de copias

La mayoría de los vectores de clonación son derivados de pUC que tienen un ori derivado de ColE1. Los plásmidos con este origen de replicación se caracterizan por tener un muy alto número de copias. Se cree que tener muchas copias del plásmido y el inserto clonado es una ventaja. Sin embargo, se ha comprobado que en los vectores pUC el promotor *lac* está sin regular, aun en presencia de la mutación *lacI*^q, debido a su alto número de copias por célula. En estos casos al insertar un ADN foráneo es posible su expresión en estos plásmidos y esto puede ser dañino para la bacteria (Stark, 1987; Stewart *et al.*, 1986).

Este problema puede arreglarse de dos formas, se puede colocar el gen *lac I*^q dentro del mismo plásmido. Sin embargo, tampoco es muy eficiente

(Stark, 1987). O se puede bajar el número de copias (Koop *et al.*, 1987; Stewart *et al.*, 1986).

El ori p15A es usado en plásmidos como pACYC184 y sus derivados como el pSU18 (Borja *et al.*, 1991; Chang & Cohen, 1978). Este origen de replicación determina un número intermedio de copias (15-20/célula) y es compatible con otros orígenes de replicación muy usados como el ColE1 (Cozzarelli *et al.*, 1968).

Por lo anterior decidimos utilizar el ori p15A para el vector-T pMB11 y así aprovechar las ventajas que tiene a comparación de los vectores de alto número de copias. Este bajo número de copias se compensa preparando plásmido con el sistema de midiprep: Wizard ADN purification[®] (Promega).

Crecimiento lento de pMB7 en DH10B en medio sin sacarosa

El plásmido pMB7 tiene un fenotipo Sac^S en la cepa DH10 *pcnB*⁻ y su crecimiento en medio sin sacarosa es normal. Nosotros observamos en DH10B que la bacteria crece lento en medio sin sacarosa (Fig. 9). ¿Por qué si DH10B pMB7 con *sacB* no puede crecer en el medio sin marcador de contraselección? Existe mayor cantidad de SacB en DH10B que en DH10 *pcnB*⁻ [El locus *pcnB* codifica para la polimerasa poly(A) que controla el número de copias de los plásmidos (Lopilato *et al.*, 1986)]. Es probable que el aumento en el número de copias y en la cantidad de SacB afecte el crecimiento bacteriano.

La levansacarasa en *E. coli* es secretada al periplasma (Steinmetz *et al.*, 1985). Sin embargo, la enzima en exceso podría saturar el mecanismo de secreción de la bacteria (complejo Sec) el cual es vital para el crecimiento normal de *E. coli* (Papanikou *et al.*, 2007). Se ha descrito que sobreexpresión de OMPs (proteínas de la membrana externa) que usan el sistema Sec puede restringir o inhibir el crecimiento bacteriano.

Eficiencia de adición de extremos de timidina en el pMB11/*Stu* I

Los vectores de clonación T/A mas usados son comercializados como vectores, lineales con extremos 3'T (residuo de timidina en el 3' del vector) por lo que su uso es inmediato. En cambio, la forma original del vector pMB11 es circular y es necesario convertirlo en vector-T. La ventaja radica en que

cualquier usuario del pMB11 puede tener un stock del vector circular y prepararlo cuantas veces se necesite, en contraste con los vectores comerciales que se tienen que comprar cada vez.

La preparación del vector-T pMB11 es muy importante, pues tiene repercusión en la eficiencia de clonación. El protocolo de preparación del pMB11 se divide en dos pasos: cortar el vector en el sitio de clonación (*Stu* I) y añadir un residuo T a cada extremo como 3'. Mientras más moléculas del vector con extremos 3'T, mejor la clonación del producto de PCR.

Un excelente control para conocer qué tan eficiente fue la adición de extremos 3'T al vector es comparar transformaciones de vectores-T religados (sin inserto) y vectores digerido pero sin 3' T's y también religado.

En los experimentos realizados en este trabajo observamos que la eficiencia de adición de los extremos 3'T en el pMB11/*Stu* I fue de 1 a 1000. Es decir sólo una molécula de pMB11 no tenía extremos 3'T de 1000 plásmidos que si los tenía.

El número de clonas del vector-T religado (pMB11/*Stu* I/dTTPs/religado) fue mucho menor que el número de clonas del vector sin 3'T religado (pMB11/*Stu* I/religado) (Fig. 15).

La estabilidad de los extremos 3'T en el vector es importante. Se ha reportado que la causa de vector-T religado se debe a la pérdida de una o de las dos T's en los extremos (Chen *et al.*, 2006). Aunque esto también puede representar vector sin T's en la preparación original.

Análisis de vectores pMB11/*Stu* I/religados Sac^R

Cuando el pMB11 es cortado en el sitio de clonación *Stu* I y después ligado, existen clonas sin inserto que tienen fenotipo de clonas con inserto. Analizamos estas clonas Sac^R y demostramos que la mayoría contenían deleciones de distintos tamaños en el vector que incluían el sitio *Stu* I y la secuencia de *sacB* adyacente (Figs. 13 y 14).

Las deleciones de vectores lineales y la pérdida de T's se deben generalmente a una actividad de exonucleasa de las enzimas de restricción o ligasas usadas (Mead *et al.*, 1991). Nosotros creemos que para el caso del pMB11/*Stu* I/religado Sac^R una actividad exonucleasa no explica las deleciones en el vector.

Demostramos que la población de vector religado Sac^R no se elimina al cambiar de enzima de restricción o de marca comercial, ni al utilizar distintas T4 ADN ligasas o buffers de ligación (Fig. 27, Tabla 10).

Se sabe que los métodos de purificación que se usan para los vectores-T tienen un efecto negativo en la estabilidad de los extremos 3'T (Chen *et al.*, 2006). Sin embargo, en nuestro caso, los métodos de purificación probados tampoco mostraron diferencias contundentes en la prevaencia de vectores religados y de fenotipo Sac^R (Tabla 11).

Lo que creemos que sucede es que estos plásmidos Sac^R son producto de ligaciones intervectores. Estos vectores duplicados, o triplicados son muy inestables en *E. coli* y lo resultante son rearrreglos de estos plásmidos. Debido a que nuestro sistema es una selección, podemos identificar estos rearrreglos.

VI. PERSPECTIVAS

- **Diseñar y construir un vector derivado del pMB11 que utilice los sitios *Xcm I* y/o *Ahd I* para generar extremos 3´ de timidina**

Los extremos 3´T en el pMB11 son esenciales para clonar productos de PCR por la estrategia T/A. Estos extremos los generamos a partir del vector digerido con *Stu I* (extremos romos) y una reacción de adición de timidinas con la *Taq* polimerasa.

Otra forma de generar residuos de timidina en los extremos 3´ del vector es utilizando una enzima de restricción que produzca extremos cohesivos de una sola base y que esta sea una timidina. Las endonucleasas que pensamos probar son la *Xcm I* y la *Ahd I*.

Este método de generación de extremos 3´T en el pMB11 disminuirá el tiempo de preparación del vector y aumentar la eficiencia de adición de los extremos 3´T.

El pMB11 no tiene sitios de restricción para *Xcm I* y *Ahd I*. Tenemos el plan de introducir dos de estos sitios de reconocimiento en el vector, dentro del gen *sacB* y cerca del sitio de restricción de *Stu I*. La secuencia de aminoácidos del producto de *sacB* no se verá afectada, es decir serán mutaciones silenciosas. Los oligonucleótidos ya fueron diseñados, uno contiene dos sitios de reconocimiento para *Xcm I* y el otro dos sitios para *Ahd I*.

Se construirán dos nuevos vectores, uno de ellos tendrá los sitios de restricción para *Xcm I* y el otro tendrá los sitios para *Ahd I*.

La forma de generar los extremos 3´T se ejemplifica en la Figura 2 en antecedentes y será un protocolo mucho más sencillo y rápido que el método utilizado por pMB11. Los vectores derivados de pMB11 y digeridos con *Xcm I* o *Ahd I* se convertirán en vectores-T para clonar productos de PCR.

- **Vectores derivados de pMB11 con resistencia a kanamicina y ampicilina**

El pSU18, del cual deriva el pMB11, es parte de una familia de al menos trece plásmidos los cuales utilizan un origen de replicación p15A compatible

con ColE1 (vectores pUC y derivados), que tiene un número intermedio de copias. Cada plásmido contiene distintos marcadores de resistencia o diferentes sitios de restricción en el sitio múltiple de clonación.

Decidimos utilizar la versatilidad de esta serie de vectores para construir dos plásmidos derivados de pMB11 que contengan resistencia a kanamicina y ampicilina. Tener vectores con distintos marcadores de resistencia nos permite utilizarlos a conveniencia en las estrategias de clonación.

VII. REFERENCIAS

- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J., Smith, J. & Struhl, K. (2001). Current Protocols in Molecular Biology.
- Borchert, T. & Nagarajan, V. (1991). Effect of signal sequence alterations on export of levansucrase in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **173**, 276-282.
- Borja, B., Jubete, Y., Martinez, E. & De la Cruz, F. (1991). Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. *Gene* **102**, 75-78.
- Bramucci, M. & Nagarajan, V. (1996). Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3948-3953.
- Calvin, N. & Hanawalt, P. (1988). High-efficiency transformation of 779 bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* **170**, 2796-2801.
- Chambers, S. P., Prior, S. E., Barstow, D. A. & Minton, N. P. (1988). The pMTL nic- cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing. *Gene* **68**, 139-149.
- Chang, A. & Cohen, S. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**, 1141-1156.
- Chen, Q., Zhou, H., Chen, J. & Wang, X. (2006). Using a modified TA cloning method to create entry clones. *Anal Biochem* **358**, 120-125.
- Clark, J. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **16**, 9677-9686.
- Copass, M., Grandi, G. & Rappuoli, R. (1997). Introduction of unmarked mutations in the *Helicobacter pylori vacA* gene with a sucrose sensitivity marker. *Infect Immun* **65**, 1949-1952.
- Cozzarelli, N., Kelly, R. & Kornberg, A. (1968). A minute circular DNA from *Escherichia coli* 15. *Proc Natl Acad Sci U S A* **60**, 992-999.
- Dedonder, R. (1966). Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol* **8**, 500-505.
- Gay, P., Le Coq, D. & Steinmetz, T. (1985). Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **164**, 918-921.
- Ido, E. & Hayami, M. (1997). Construction of T-tailed vectors derived from a pUC plasmid: a rapid system for direct cloning of unmodified PCR products. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**, 1766-1767.

Jäger, W., Schafer, A., Puhler, A., Labes, G. & Wohlleben, W. (1992). Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **174**, 5462-5465.

Kast, P. (1994). pKSS-a second-generation general purpose cloning vector for efficient positive selection of recombinant clones. *Gene* **138**, 109-114.

Kim, H., Kim, H., Hwang, H., Chung, S., Lee, J. & Chung, D. (2004). Construction of a pTOC-T vector using GST-ParE toxin for direct cloning and selection of PCR products. *Biotechnol Lett* **26**, 1659-1663.

Kobs, G. (1997). Cloning Blunt-End DNA Fragments Into the pGEM®-T Vector Systems. In *Promega Notes*, pp. 15.

Koop, A., ME, H. & Bourgeois, S. (1987). A low-copy-number vector utilizing beta-galactosidase for the analysis of gene control elements. *Gene* **52**, 245-256.

LeBrun, E. & van Rapenbusch, R. (1980). The structure of *Bacillus subtilis* levansucrase at 3.8 Å resolution. *J Biol Chem* **255**, 12034-12036.

Liu, Y., Shirano, Y., Fukaki, H., Yanai, Y., Tasaka, M., Tabata, S. & Shibata, D. (1999). Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6535-6540.

Lopilato, J., Bortner, S. & Beckwith, J. (1986). Mutations in a new chromosomal gene of *Escherichia coli* K-12, pcnB, reduce plasmid copy number of pBR322 and its derivatives. *Mol Gen Genet* **205**.

Mead, D., Pey, K., Herrnsstadt, C., Marcil, R. & Smith, L. (1991). Universal method for direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Biotechniques* **9**, 657-663.

Papanikou, E., Karamanou, S. & Economou, A. (2007). Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol* **5**, 839-851.

Pelicic, V., Reyrat, J. & Gicquel, B. (1996). Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol* **178**, 1197-1199.

Pierce, J., Sauer, B. & Sternberg, N. (1992). A positive selection vector for cloning high molecular weight DNA by the bacteriophage P1 system: improved cloning efficacy. *Proc Natl Acad Sci* **89**, 2056-2060.

Promega (2005). pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual. In #TM042, Promega Corporation.

Reisinger, C., Kern, A., Fesko, K. & Schwab, H. (2007). An efficient plasmid vector for expression cloning of large numbers of PCR fragments in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**, 241-244.

Reyrat, J., Pelicic, V., Gicquel, B. & Rappuoli, R. (1998). Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect Immun* **66**, 4011-4017.

Rhodes, R. (1998). Stability of pGEM-T vectors. *Promega Notes*, 25.

Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sambrook, J. & Rusell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. New York, NY:: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A. & Huse, W. D. (1988). Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res* **16**, 7583-7600.

Stark, M. (1987). Expression vectors carrying the lac repressor gene for regulated high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Gene* **51**, 255-267.

Steele, C., Zhang, S. & Shillitoe, E. (1994). Effect of different antibiotics on efficiency of transformation of bacteria by electroporation. *Biotechniques* **17**, 360-365.

Steinmetz, M., Le Coq, D., Aymerich, S., Gonzy-Tréboul, G. & Gay, P. (1985). The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol Gen Genet* **200**, 220-228.

Stewart, G. S., Lubinsky-Mink, S. & Kuhn, J. (1986). pHG276: a multiple cloning site pBR322 copy number vector expressing a functional lac alpha peptide from the bacteriophage lambda PR promoter. *Plasmid* **15**, 182-190.

Testori, A., Listowsky, I. & Sollitti, P. (1994). Direct cloning of unmodified PCR products by exploiting an engineered restriction site. *Gene* **143**, 151-152.

Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. & Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**, 3469-3478.

CAPÍTULO 2: “HIGH RESISTANCE TO OXIDATIVE STRESS IN THE FUNGAL PATHOGEN *CANDIDA GLABRATA* IS MEDIATED BY A SINGLE CATALASE, Cta1p AND IS CONTROLLED BY THE TRANSCRIPTION FACTORS Yap1p, Skn7p, Msn2p, AND Msn4p”

High Resistance to Oxidative Stress in the Fungal Pathogen *Candida glabrata* Is Mediated by a Single Catalase, Cta1p, and Is Controlled by the Transcription Factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p[∇]

Mayra Cuéllar-Cruz,[†] Marcela Briones-Martin-del-Campo,[†] Israel Cañas-Villamar,
Javier Montalvo-Arredondo, Lina Riego-Ruiz,
Irene Castaño, and Alejandro De Las Peñas*

División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica,
San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, México

Received 7 January 2008/Accepted 18 March 2008

We characterized the oxidative stress response of *Candida glabrata* to better understand the virulence of this fungal pathogen. *C. glabrata* could withstand higher concentrations of H₂O₂ than *Saccharomyces cerevisiae* and even *Candida albicans*. Stationary-phase cells were extremely resistant to oxidative stress, and this resistance was dependent on the concerted roles of stress-related transcription factors Yap1p, Skn7p, and Msn4p. We showed that growing cells of *C. glabrata* were able to adapt to high levels of H₂O₂ and that this adaptive response was dependent on Yap1p and Skn7p and partially on the general stress transcription factors Msn2p and Msn4p. *C. glabrata* has a single catalase gene, *CTA1*, which was absolutely required for resistance to H₂O₂ in vitro. However, in a mouse model of systemic infection, a strain lacking *CTA1* showed no effect on virulence.

Recent surveys show that *Candida* species are responsible for about 8% of all hospital-acquired bloodstream infections, and among these species, the two most frequently isolated are *Candida albicans* and *Candida glabrata* (60, 73). *C. glabrata* is an opportunistic fungal pathogen that is a commensal in human gastrointestinal and genitourinary tracts but that also causes severe invasive infections. Phylogenetically, *C. glabrata* is quite distinct from *C. albicans* but is closely related to *Saccharomyces cerevisiae*. The virulence attributes that allow *C. glabrata* to colonize human tissues and cause disseminated infections have recently started to be identified (reviewed in reference 40).

Phagocytic cells are the first line of defense against fungal infections (49). These cells generate reactive oxygen species (ROS), including superoxide, hydrogen peroxide (H₂O₂), and hydroxyl radicals, that can damage all biomolecules and destroy phagocytosed pathogens (27, 70). ROS are also by-products of normal aerobic metabolism, and all aerobic organisms possess mechanisms to maintain very low levels of these species. In particular, a variety of small antioxidant molecules, such as glutathione and thioredoxin, are synthesized to scavenge ROS, and even tyrosine has been proposed to have a protective role against oxidative stress (48). In addition, several well-characterized enzymes, such as the superoxide dismutases, catalases, peroxidases, and glutathione peroxidases, are produced to eliminate ROS. Pathogens have coopted these

well-conserved antioxidation mechanisms to evade phagocyte defenses (5, 27, 69, 70); thus, the production of these enzymes is directly related to virulence (35, 76).

When cells are under oxidative stress, transcriptional remodeling occurs to ensure the proper response. The enzymes and the regulation of the oxidative stress response (OSR) are well conserved among fungal species. Catalases are well-conserved detoxifying enzymes catalyzing the conversion of H₂O₂ to H₂O and molecular oxygen (reviewed in references 1 and 2). *S. cerevisiae* has two catalase genes, both of which are required for detoxifying H₂O₂ (13, 30, 65, 66, 72). Both *C. albicans* and *C. glabrata* carry only one catalase gene, and *C. albicans* catalase has been shown to play an important role in the virulence of *C. albicans* (56, 74, 76). The OSR in *S. cerevisiae* is in part under the control of the well-studied transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p (21, 43, 44, 46, 53, 64). *S. cerevisiae* Yap1p (ScYap1p) belongs to the family of basic leucine zipper domain transcription factors and controls the expression of at least 32 proteins of the H₂O₂ stimulon (46). Strains lacking Yap1p are hypersensitive to H₂O₂. The Yap1p orthologs in *C. albicans* (Cap1p) (3, 78), *Schizosaccharomyces pombe* (Pap1p) (71), and *Ustilago maydis* (Yap1p) (52) have been characterized previously, and they are involved in the OSR. The *C. glabrata* Yap1p ortholog is functionally involved not only in the OSR, but also in resistance to different drugs (11). ScSkn7p contains a receiver domain found in the family of two-component signal transduction systems of prokaryotes and a DNA-binding domain similar to that of heat shock factor Hsf1p (6, 54). The target genes of ScSkn7p overlap with those of ScYap1p, and a *skn7Δ* strain is hypersensitive to H₂O₂ (46, 53). The *C. albicans* Skn7p ortholog has been characterized previously, and cells lacking Skn7p are modestly attenuated in virulence (68). ScMsn2p and ScMsn4p are functionally nonre-

* Corresponding author. Mailing address: Camino a la Presa San José 2055, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, San Luis Potosí 78216, México. Phone: (52) 444 8342000. Fax: (52) 444 8342010. E-mail: cano@ipicyt.edu.mx.

[†] These authors contributed equally.

[∇] Published ahead of print on 28 March 2008.

TABLE 1. Strains used in this study

Strain	Parent	Genotype and/or description	Reference or source
<i>E. coli</i> strains			
DH10B		F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara,leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>rpsL nupG</i>	7
JM109		<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>relA1 supE44</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) [F' <i>traD36 proAB lacI</i> ^q Δ <i>M15</i>]	77
<i>S. cerevisiae</i> strains			
W303		<i>MATa ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 can1-100 ade2-1 ade3::hisG</i>	51
YJM128		Clinical isolate	12
YJM336		Clinical isolate	12
<i>C. albicans</i> strains			
CA14		<i>ura3Δ::imm434/ura3Δ::imm434</i>	25
CA5		Clinical isolate	Lab collection
CA7		Clinical isolate	Lab collection
<i>C. glabrata</i> strains			
MC7		Clinical isolate	Lab collection
MC22		Clinical isolate	Lab collection
BG2		Clinical isolate (strain B)	22
BG14	BG2	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^r ; wt Ura ⁻ strain used in this study	15
BG462	BG14	<i>URA3</i>	18
BG1739 (<i>msn2Δ</i> mutant)	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^r <i>msn2Δ</i> Hyg ^s Ura ⁻ pRD96/BcgI	R. Domergue and B. Cormack
BG1740 (<i>msn4Δ</i> mutant)	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^r <i>msn4Δ</i> Hyg ^s Ura ⁻ pRD97/BcgI	R. Domergue and B. Cormack
BG1742 (<i>msn2Δ msn4Δ</i> mutant)	BG1739	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^r <i>msn2Δ msn4Δ::hph</i> Hyg ^r	R. Domergue and B. Cormack
CGM295 (<i>cta1Δ</i> mutant)	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^r <i>cta1Δ::hph</i> Hyg ^r pCV15/BcgI	This work
CGM297 (<i>yap1Δ</i> mutant)	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^r <i>yap1Δ::hph</i> Hyg ^r pCV17/BcgI	This work
CGM306 (<i>skn7Δ</i> mutant)	BG14	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^r <i>skn7Δ::hph</i> Hyg ^r pCV21/BcgI	This work
CGM308 (<i>yap1Δ</i> mutant)	CGM297	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^r <i>yap1Δ</i> Hyg ^s Ura ⁻	This work
CGM310 (<i>yap1Δ skn7Δ</i> mutant)	CGM308	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^r <i>yap1Δ skn7Δ::hph</i> Hyg ^r	This work
CGM351 (<i>cta1Δ</i> mutant)	CGM295	<i>URA3 cta1Δ::hph</i> Hyg ^r	This work
CGM385 (<i>yap1Δ skn7Δ</i> mutant)	CGM310	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^r <i>yap1Δ skn7Δ</i> Hyg ^s Ura ⁻	This work
CGM386 (<i>yap1Δ skn7Δ msn2Δ</i> mutant)	CGM385	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^r <i>yap1Δ skn7Δ msn2Δ::hph</i> Hyg ^r	This work
CGM388 (<i>yap1Δ skn7Δ msn4Δ</i> mutant)	CGM385	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^r <i>yap1Δ skn7Δ msn4Δ::hph</i> Hyg ^r	This work
CGM480 (<i>yap1Δ skn7Δ msn4Δ</i> mutant)	CGM388	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^r <i>yap1Δ skn7Δ msn4Δ</i> Hyg ^s Ura ⁻	This work
CGM537 (<i>yap1Δ skn7Δ msn4Δ msn2Δ</i> mutant)	CGM480	<i>ura3Δ::Tn903</i> G418 ^r <i>yap1Δ skn7Δ msn4Δ msn2Δ::hph</i> Hyg ^r	This work

dundant Zn²⁺ finger transcription factors involved in the general stress response, including the response to oxidative stress (reviewed in references 20 and 55). They control the expression of about 27 gene products regulated in response to H₂O₂ (31). Msn2p and Msn4p play an important role in stationary-phase (SP) survival under oxidative stress. *S. cerevisiae* cells lacking Msn2p and Msn4p are sensitive to H₂O₂ (21, 31, 50, 55, 63). Interestingly, *C. albicans* Msn2p (CaMsn2p) and CaMsn4p play no obvious role in the stress response, including the response to oxidative stress (58).

The OSR of *C. glabrata* has not been analyzed previously. In this study, we showed that the growth of *C. glabrata* could withstand higher concentrations of H₂O₂ than that of *S. cerevisiae* and even that of *C. albicans* (see below) (5, 9). This phenotype could be seen in both log-phase (LP) and SP cells, but the phenotype was more profound in the latter case. SP resistance was dependent on the concerted roles of Yap1p,

Skn7p, and Msn4p. We also showed that *C. glabrata* was able to adapt to high levels of H₂O₂ and that this adaptive response was dependent on the stress-related transcription factors Yap1p and Skn7p and partially on the general stress transcription factors Msn2p and Msn4p. Lastly, we showed that the *C. glabrata* catalase gene *CTAI* was absolutely required for resistance to H₂O₂ in vitro. However, a strain lacking *CTAI* had no obvious phenotype in vivo in a mouse model of systemic infection.

MATERIALS AND METHODS

Strains. All strains used in this study are summarized in Table 1.

Plasmids. All plasmids used in this study are summarized in Table 2.

Primers. All primers used for cloning are summarized in Table 3.

Media. Yeast media were prepared as described previously (67), and 2% agar was added for plates. Yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium contained yeast extract at 10 g/liter and peptone at 20 g/liter and was supplemented with 2%

TABLE 2. Plasmids used in this study

Plasmid	Description and/or relevant genotype	Reference or source
Plasmids for cloning, construction, and marker removal		
pGEM-T	Cloning vector; Km ^r Ap ^r	Promega
pAP599	Cloning vector with 2 FRT direct repeats flanking the hygromycin marker [FRT-P _{PGK} :: <i>hph</i> ::(3' UTR of <i>HIS3</i>)-FRT] for construction of multiple mutants; <i>URA3</i> Hyg ^r Ap ^r	19
pMZ17	Replicative vector expressing <i>ScFLP1</i> (recombinase gene) for removing the hygromycin marker; P _{PGK} :: <i>FLP1</i> ::(3' UTR of <i>HIS3</i>) Cg <i>CEN ARS</i> Ap ^r	Cormack lab collection
pBC34.1	pUC19::Cg <i>URA3</i> ; 2.2-kb PstI fragment; Ap ^r	15
Plasmids for deletion		
pCV15 <i>cta1Δ</i>	A 0.906-kb SpeI/BamHI PCR fragment (corresponding to primers 57 and 58) carrying the promoter region of <i>CTA1</i> and a 0.682-kb HindIII/KpnI PCR fragment (corresponding to primers 60 and 61) carrying the 3' UTR of <i>CTA1</i> were cloned into pAP599 Ap ^r	This work
pCV17 <i>yap1Δ</i>	A 0.846-kb XhoI/HindIII PCR fragment (corresponding to primers 7 and 8) carrying the promoter region of <i>YAP1</i> and a 0.652-kb BamHI/SacI PCR fragment (corresponding to primers 11 and 12) carrying the 3' UTR of <i>YAP1</i> were cloned into pAP599 Ap ^r	This work
CV21 <i>skn7Δ</i>	A 0.875-kb KpnI/XhoI PCR fragment (corresponding to primers 4 and 5) carrying the promoter region of <i>SKN7</i> and a 0.929-kb BamHI/SacI PCR fragment (corresponding to primers 1 and 2) carrying the 3' UTR of <i>SKN7</i> were cloned into pAP599 Ap ^r	This work
pRD96 <i>msn2Δ</i>	A 0.691-kb KpnI/XhoI PCR fragment (corresponding to primers 2984 and 2985) carrying the promoter region of <i>MSN2</i> and a 0.520-kb BamHI/SacI PCR fragment (corresponding to primers 2986 and 2987) carrying the 3' UTR of <i>MSN2</i> were cloned into pAP599 Ap ^r	R. Domergue and B. Cormack
pRD97 <i>msn4Δ</i>	A 0.564-kb KpnI/XhoI PCR fragment (corresponding to primers 2990 and 2991) carrying the promoter region of <i>MSN4</i> and a 0.535-kb BamHI/SacI PCR fragment (corresponding to primers 2992 and 2993) carrying the 3' UTR of <i>MSN4</i> were cloned into pAP599 Ap ^r	R. Domergue and B. Cormack

glucose. Synthetic complete medium (SC) was a mixture of yeast nitrogen base, without NH₂SO₄, at 1.7 g/liter and NH₂SO₄ at 5 g/liter and was supplemented with 0.6% Casamino Acids, 2% glucose, and when needed, uracil at 25 mg/liter and 5-fluoroorotic acid (5-FOA) at 1.1 g/liter for 5-FOA plates. YPD plates were supplemented with either hygromycin (Invitrogen) at 200 μg/ml or penicillin (100

U/ml)-streptomycin (100 μg/ml) (GIBCO BRL). Bacterial medium was prepared as described previously (4), and 1.5% agar was used for plates. Luria-Bertani medium contained yeast extract at 5 g/liter, Bacto peptone at 10 g/liter, and NaCl at 10 g/liter and was supplemented where needed with either 30 μg of kanamycin (Invitrogen)/ml or 100 μg of carbenicillin (Invitrogen)/ml. Phosphate-buffered saline (PBS) was 8 g of NaCl/ml, 0.2 g of KCl/liter, 1.65 g of Na₂HPO₄ · 7H₂O/liter, and 0.2 g of KH₂PO₄/liter.

Transformation. Yeast transformations with linear or supercoiled plasmid DNA were done as described previously (8).

Sequence analysis. The amino acid sequence homology analysis was done by ClustalW alignment (33) with the MacVector program (Accelrys).

Construction of deletion strains. To construct deletion strains in this study, first we PCR amplified the promoter and 3' untranslated region (3' UTR) of each gene to be deleted (*CTA1*, *YAP1*, and *SKN7*) and cloned the amplified fragments into pGEM-T (Promega). Both fragments, the 5' and the 3' regions of each gene, were subcloned in the same direction, flanking the hygromycin cassette in pAP599 (Table 2). All plasmid constructs were introduced into *Escherichia coli* DH10 or JM109 by electroporation (4), and plasmids were purified by using Qiagen mini prep kits. The mutant clones were recombined in *C. glabrata* strains by a one-step replacement procedure. Plasmids were cut with a set of enzymes leaving homologous ends, and the linear fragments were gel purified and used to transform *C. glabrata*. Transformants were isolated by selecting for the Hyg^r phenotype on YPD plates with hygromycin at 200 μg/ml. Insertion at the correct locus was verified with locus-specific genomic primers external to the cloned fragments. To make double, triple, and quadruple mutants, *C. glabrata* mutant strains were transformed with pMZ17, and transformants were isolated by selection for the URA⁺ phenotype on SC-Ura plates. pMZ17 is a replicative vector expressing the product of *ScFLP1*, a recombinase that recognizes the two direct repeats, the FLP recognition target (FRT) sites, flanking the hygromycin marker in the plasmid constructs as follows: 5' region of the gene::FRT-P_{PGK}::*hph*::(3' UTR of *HIS3*)-FRT::3' region of the gene. After FLP1 recognizes the FRT sites, the hygromycin marker is deleted from the chromosome and lost by dilution through cell division. Transformants were purified and streaked onto SC-Ura plates. Single colonies were then grown on nonselective medium (YPD plates) and screened for Hyg^r on YPD plates with hygromycin at 200 μg/ml for

TABLE 3. Oligonucleotides used in this study

Primer	Sequence ^a	Description or restriction site(s)
13	GTTGTAAAACGACGGCCAGT	pUC forward
17	GGAAACAGCTATGACCAATG	pUC reverse
1	CGCGGATCCAAAGTATACTGCTATGAGCTAC	BamHI
2	CAAGGAGCTCTTGTGCAGCGTGTAAAGATGAATCAAGTGAT	SacI/BsgI
4	TCAGATCTCGAGTTGACCGTGACCGAAAC	XhoI
5	CCGGGTACCTTGTGCAGTCGAAGTTAGAGTGCCTATTTC	KpnI/BsgI
7	AATCTCGAGTTGTGCAGTGC CGGTAACAATTCCTCGGCG	XhoI/BsgI
8	CCCAGCTTTTACTTCTAGTCTTGTCTC	HindIII
11	CGCGGATCCGTCTATATATCTCGGTAGATC	BamHI
12	CAAGGAGCTCTTGTGCAGTCAACTCATAGATCACAACATTAACAC	SacI/BsgI
57	CGCGGATCCCAATTGTGGGAAGTTATCTAATAAGCC	BamHI
58	CACTACTAGTTAAACACTGTAGGAG	SpeI
60	CCCAGCTTTTGAACCACGTAAGGTGCTGT	HindIII
61	CCGGGTACCTTGTGCAGCTGTAAGGACTTCTAAACC	KpnI/BsgI
2984	GGTACCCGAGGGAGTTGCCTTCACTATGTCCGT TGAG	KpnI/BsgI
2985	CTCGAGCTGTTCCTTGTGATCTGTGTTTGGT	XhoI
2986	GGATTCGTGACAGTGTCTTATTTTATCTAG	BamHI
2987	GAGCTCCGACCGCGGTGCATCTGTTACCAGGTTAGCC	SacI/BsgI
2990	GGTACCCGACTCCTTGCCTTGTCTGATACCAGAGAAAC	KpnI/BsgI
2991	CTCGAGAACAGGAATGGACACTAATATATA	XhoI
2992	GGATCCCAATCTTTATTTTATTTTCTGCTA	BamHI
2993	GAGCTCCGAGGCATCTGCCTAATAATTTCCGTTTCAA	SacI/BsgI

^a Restriction sites are indicated in boldface.

the loss of the hygromycin cassette and for 5-FOA resistance on SC-5-FOA plates for the loss of the Ura⁺ plasmid pMZ17. URA⁺ cells die on SC-5-FOA. This protocol allows the construction of multiple mutants. Plasmids and primers used for this procedure are described in Tables 2 and 3. Strains constructed in this way are described in Table 1.

Mouse infections. Eight- to 9-week-old BALB/c mice (Taconic) were infected with 2.2×10^7 cells in a volume of 100 μ l by tail vein injection. The strains BG462 (wild type [wt] strain expressing *URA3*) and CGM351 (*cta1 Δ URA3*) were grown overnight in YPD, and the cells were washed with $1 \times$ PBS and resuspended in $1 \times$ PBS to a concentration of 2.2×10^8 cells/ml. The concentration of cells was determined by reading the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of the culture (the concentration of BG462 cells at an OD₆₀₀ of 1 is 4×10^7 /ml), counting the cells in a hemocytometer, and plating serial dilutions and confirming the number of cells the following day. Mice were kept in cages in groups of 10 until they were sacrificed at day 7 after infection. Kidneys, livers, and spleens were retrieved from the mice, and the organs were homogenized. Dilutions of the homogenates were plated onto YPD-penicillin-streptomycin plates. CFU were counted the following day; geometric means are reported.

H₂O₂ sensitivity assays. All the starting overnight cultures of *C. glabrata* were grown for 36 h in YPD to an OD₆₀₀ of 30.0 at 30°C. A 30% (wt/wt) H₂O₂ solution was obtained from Sigma-Aldrich. All liquid cultures and plates were incubated at 30°C. For H₂O₂ sensitivity assays of LP cells, overnight cultures were diluted in fresh rich medium (YPD) in such a way that all strains went through seven doublings to reach an OD₆₀₀ of 0.5. Once the cultures reached an OD₆₀₀ of 0.5 after seven doublings, the cultures were divided, exposed to different H₂O₂ concentrations, and incubated with shaking for 3 h. For the adaptation experiments, cells were pretreated for 1 h with a nonlethal H₂O₂ concentration and then challenged with a lethal concentration of H₂O₂ for 2 additional hours. After the treatment, H₂O₂ was removed by centrifugation, the cultures were resuspended in distilled H₂O, the OD was adjusted when needed to an OD₆₀₀ of 0.5, and the cultures were then serially diluted in 96-well plates. Each dilution was spotted onto YPD plates, and the plates were incubated at 30°C. All dilutions had the same amount of cells.

For SP experiments, cell cultures at an OD₆₀₀ of 30.0 were diluted to an OD₆₀₀ of 0.5 with distilled water or spent medium from the same strain. Cell cultures were divided into aliquots and treated with H₂O₂ at different concentrations for 3 h. After the treatment, the cultures remained at the same OD₆₀₀ of 0.5 and H₂O₂ was removed by centrifugation. Cells were resuspended in distilled water to an OD₆₀₀ of 0.5, and the suspensions were diluted in 96-well plates and spotted onto YPD plates.

All manipulations for these assays were performed in a 30°C temperature-controlled room to prevent abrupt changes in temperature. It has been reported previously that cold shock has an impact on H₂O₂ resistance in *S. cerevisiae*. Since there were small variations among the results of these experiments, experiments were repeated at least four times.

RESULTS

C. glabrata is resistant to high levels of hydrogen peroxide.

In order to characterize the OSR in *C. glabrata*, we investigated the resistance of *C. glabrata* LP cells to H₂O₂. *C. glabrata* strains (BG14 [lab reference strain] and clinical isolates [CI] MC7 and MC22) were treated with H₂O₂ as described in the legend to Fig. 1 and Materials and Methods. As shown in Fig. 1A, *C. glabrata* BG14 was able to survive exposure to H₂O₂ at concentrations up to 40 mM. There was a severe loss of viability at 100 mM and a complete loss at 200 mM (data not shown), while CI MC7 and MC22 showed reduced resistance at 40 mM. We also performed an adaptation experiment by pretreating the LP cells with 10 mM H₂O₂ for 1 h and then treating them with 100 mM H₂O₂ for 2 additional hours. As shown in Fig. 1A (lane 10+100), the survival rate of BG14 cells pretreated with a low dose of H₂O₂ was much higher than that of cells without this treatment, and CI MC7 and MC22 showed reduced adaptation compared to that of BG14. Experiments similar to those described above were also performed with *C. albicans* strains (CAI4 [lab reference strain] and CI CA5 and CA7) and *S. cerevisiae* strains (W303 [lab reference strain] and

CI YJM128 and YJM336). *C. albicans* CAI4 was resistant to 40 mM H₂O₂ and showed complete sensitivity to 100 mM H₂O₂, while *C. albicans* CI showed reduced resistance compared to that of CAI4 (Fig. 1B). As shown in Fig. 1C, *S. cerevisiae* was resistant only to 6 mM H₂O₂ and completely sensitive to 8 mM H₂O₂. Interestingly, CI YJM128 and YJM336 were more resistant than the W303 lab reference strain. These experiments indicate that LP *C. glabrata* cells are modestly more resistant to H₂O₂ than LP *C. albicans* cells and significantly more resistant than LP *S. cerevisiae* cells. In addition, *C. glabrata* and *C. albicans* cells were able to adapt, though to different levels, suggesting that adaptation is a common trait for both pathogens (Fig. 1A and B). Similarly, *S. cerevisiae* has been shown previously to be able to adapt to higher concentrations of H₂O₂ when pretreated with a lower dose (14, 17, 37, 38).

It has been reported previously that SP cells of various bacterial and fungal pathogens are more resistant to oxidants than LP cells (16, 29). To determine if this is true also for *C. glabrata*, we treated *C. glabrata* strain BG14 and CI MC7 and MC22 as described in the legend to Fig. 2 and Materials and Methods. As shown in Fig. 2A, *C. glabrata* SP cells exhibited resistance to H₂O₂ at concentrations up to 1,000 mM, significantly higher than those to which LP cells showed resistance. The same experiments were performed with *C. albicans* strain CAI4 and CI CA5 and CA7 and *S. cerevisiae* strain W303 and CI YJM128 and YJM336. As shown in Fig. 2B, *C. albicans* CAI4 showed resistance to up to 300 mM H₂O₂ while CI showed resistance to up to 100 mM. *S. cerevisiae* W303 SP cells showed an increase in resistance compared to that of LP cells, exhibiting resistance to up to 100 mM H₂O₂ and complete sensitivity to 200 mM. Interestingly, *S. cerevisiae* CI were more resistant than the lab reference strain W303 (Fig. 2C). Overall, the SP levels of resistance were much higher than those in LP. These data are in agreement with previous findings that SP cells are more resistant to oxidative stress than LP cells. Moreover, our data confirm that *C. glabrata* in SP is intrinsically more resistant to H₂O₂ than *S. cerevisiae* and *C. albicans* in SP.

Role of the transcription factors Skn7p, Yap1p, Msn2p, and Msn4p in the OSR. The key regulators of the OSR in *S. cerevisiae*, such as Skn7p, Yap1p, Msn2p, and Msn4p, are well characterized. *C. glabrata* orthologs of *S. cerevisiae* genes encoding these transcription factors were identified in the *C. glabrata* genome database (<http://cbl.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL>), and an analysis of the amino acid sequence homology of *C. glabrata* and *S. cerevisiae* transcription factors was done by ClusalW alignment, with the following results: *C. glabrata* Skn7p (CgSkn7p; CAGL0F09097g), 48% identical and 15% similar to ScSkn7p; CgMsn2p (CAGL0F05995g), 25% identical and 16% similar to ScMsn2p; CgMsn4p (CAGL0M13189g), 22% identical and 13% similar to ScMsn4p; and CgYap1p (CAGL0H04631g), 36% identical and 12% similar to ScYap1p (11). We simply asked whether these transcription factors participate in the OSR in *C. glabrata*. We constructed *C. glabrata* mutant strains containing single (*yap1 Δ* or *skn7 Δ*), double (*yap1 Δ skn7 Δ*), triple (*yap1 Δ skn7 Δ msn2 Δ* or *yap1 Δ skn7 Δ msn4 Δ*), and quadruple (*yap1 Δ skn7 Δ msn2 Δ msn4 Δ*) deletions. Additional null strains including *msn2 Δ* , *msn4 Δ* , and *msn2 Δ msn4 Δ* strains were provided by R. Domergue and B. Cormack. We first characterized the sensitivities to H₂O₂ treatment of the LP cells of the various *C. glabrata* deletion strains

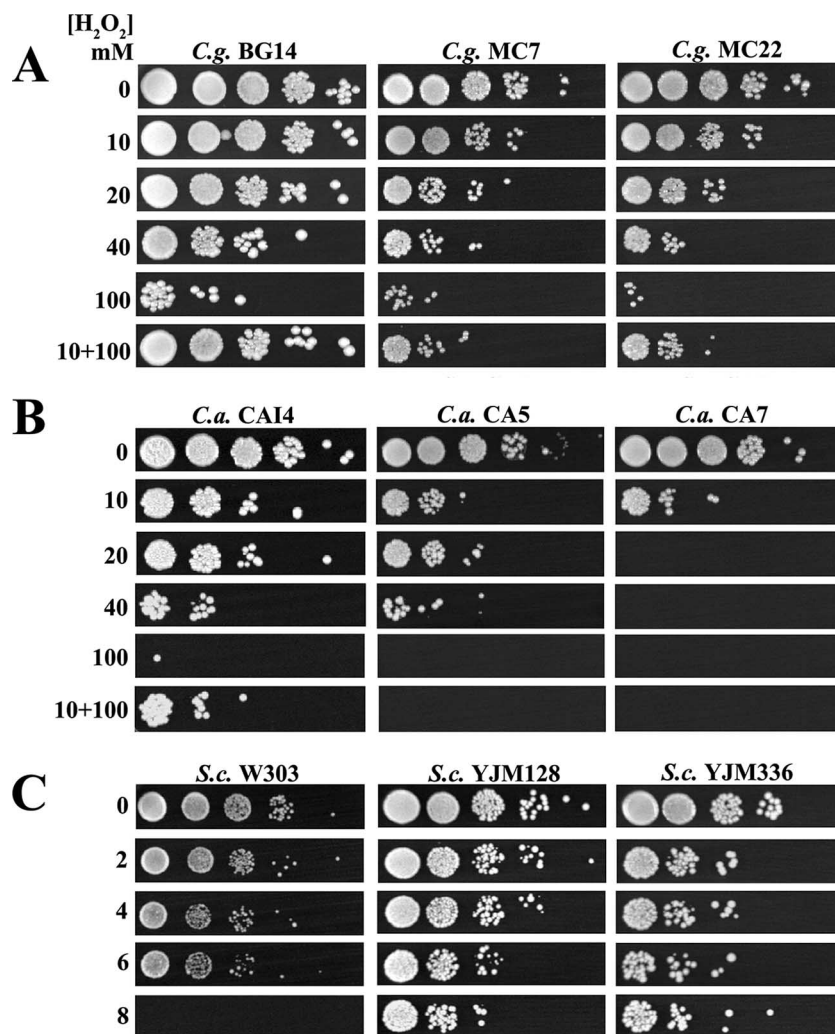


FIG. 1. *C. glabrata*, *C. albicans*, and *S. cerevisiae* LP resistance to H_2O_2 . Saturated cultures of *C. glabrata* (*C.g.*) strain BG14 and CI MC7 and MC22 (A), *C. albicans* (*C.a.*) strain CAI4 and CI CA5 and CA7 (B), and *S. cerevisiae* (*S.c.*) strain W303 and CI YJM128 and YJM336 (C) were diluted with fresh medium (YPD) so that all strains reached an OD_{600} of 0.5 after seven doublings at 30°C. *C. glabrata* and *C. albicans* strains were divided and exposed to 0, 10, 20, 30, 40, 50, and 100 mM H_2O_2 and *S. cerevisiae* strains were exposed to 2, 4, 6, and 8 mM H_2O_2 for 3 h. For adaptation experiments, *C. glabrata* and *C. albicans* cells were pretreated for 1 h with 10 mM H_2O_2 and then with 100 mM H_2O_2 for 2 additional hours. After the treatment, H_2O_2 was removed by centrifugation. The cultures were resuspended in distilled water, and the OD_{600} s were adjusted when needed to 0.5. Cultures were serially diluted, and each dilution was spotted onto YPD plates, ensuring that the same amounts of cells were plated. Plates were incubated at 30°C. See Materials and Methods.

described above. As shown in Fig. 3A, the *yap1* Δ and *skn7* Δ strains showed reduced resistance to 10 mM H_2O_2 compared to that of the parental wt strain. When treated with 100 mM H_2O_2 , both the *yap1* Δ and *skn7* Δ strains lost viability, in contrast with the parental strain. The same phenotype was seen in the adaptation experiment. As shown in the bottom panel of Fig. 3A, when pretreated with a low dose of H_2O_2 of 10 mM, the *yap1* Δ and *skn7* Δ strains could not adapt to the stress, in contrast with the parental strain. A *yap1* Δ *skn7* Δ strain showed the same phenotype as the strains carrying a single deletion of either gene, indicating that the corresponding transcription factors are needed for adaptation and resistance in LP and that they do not compensate for each other. Furthermore (Fig. 3A), since (i) the *yap1* Δ *skn7* Δ *msn2* Δ triple mutant had the same reduced resistance phenotype at 10 mM as the single and

double mutants (*yap1* Δ , *skn7* Δ , and *yap1* Δ *skn7* Δ strains), (ii) the *yap1* Δ *skn7* Δ *msn4* Δ triple mutant was more sensitive than the single and double mutants to 10 mM, and (iii) the quadruple mutant (*yap1* Δ *skn7* Δ *msn2* Δ *msn4* Δ) behaved the same as the *yap1* Δ *skn7* Δ *msn4* Δ triple mutant (see Fig. 6A), Skn7p, Yap1p, and Msn4p together, but not Msn2p, coordinate the overall resistance in LP cells. Msn2p and Msn4p may play a role in adaptation since the *msn2* Δ *msn4* Δ double mutant but not the corresponding single mutants showed a subtle but reproducible defect in adaptation (Fig. 3B). These results indicate, first, not only that *C. glabrata* has conserved the adaptive response to oxidative stress in LP cells but also that this adaptation is dependent mainly on Skn7p and Yap1p and partially on both Msn2p and Msn4p and, second, that Skn7p, Yap1p, and Msn4p coordinate the control of the OSR since

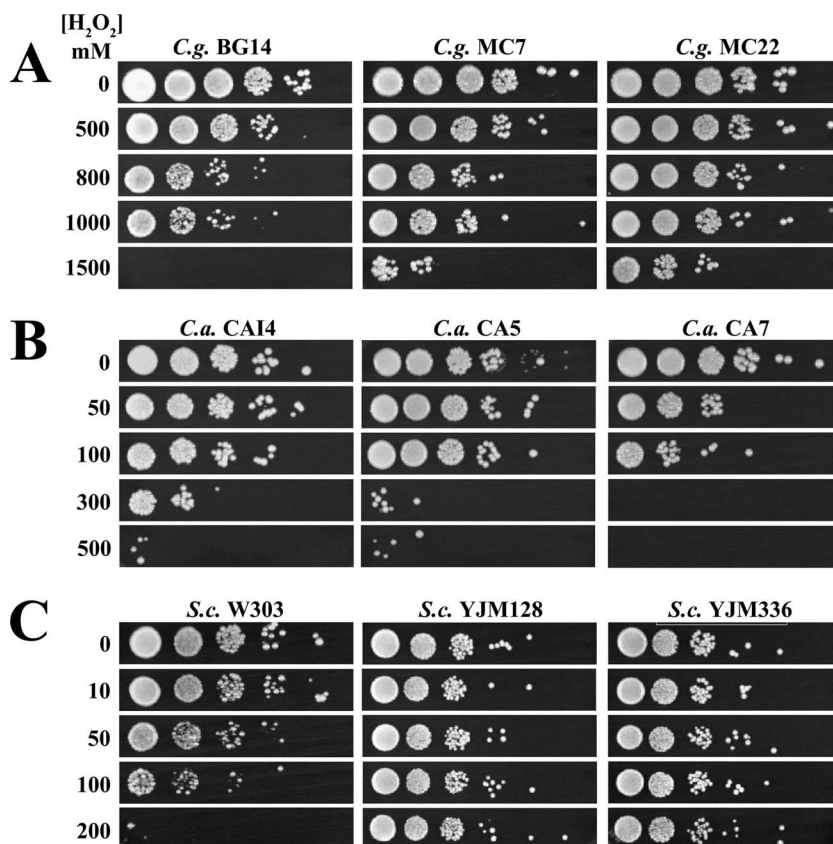


FIG. 2. *C. glabrata*, *C. albicans*, and *S. cerevisiae* SP resistance to H₂O₂. Saturated cultures of *C. glabrata* (C.g.) strain BG14 and CI MC7 and MC22 (A), *C. albicans* (C.a.) strain CA14 and CI CA5 and CA7 (B), and *S. cerevisiae* (S.c.) strain W303 and CI YJM128 and YJM336 (C) were diluted to an OD₆₀₀ of 0.5 with spent medium from the same cultures. The cells were divided into aliquots and treated for 3 h with H₂O₂ at different concentrations: for *C. glabrata*, 500, 800, 1,000, and 1,500 mM; for *C. albicans*, 0, 50, 100, 300, and 500 mM; and for *S. cerevisiae*, 0, 10, 50, 100, and 200 mM. After the treatment, the cultures remained at an OD₆₀₀ of 0.5, oxidant was removed by centrifugation, cells were resuspended in distilled water, and suspensions were diluted and spotted onto YPD plates. Plates were incubated at 30°C. See Materials and Methods.

the triple and quadruple mutants were almost as sensitive as the *cta1Δ* mutant in LP (see below and Fig. 6A).

We then tested the role of these transcription factors for resistance in SP. Saturated cultures (OD₆₀₀, 30.0) of the parental strain BG14 and single (*yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ*, and

msn4Δ), double (*yap1Δ skn7Δ* and *msn2Δ msn4Δ*), triple (*yap1Δ skn7Δ msn2Δ* and *yap1Δ skn7Δ msn4Δ*), and quadruple (*yap1Δ skn7Δ msn2Δ msn4Δ*) mutants were treated as described in the legend to Fig. 2. Figure 4A shows that the *yap1Δ* mutant behaved as the parental strain, that the *skn7Δ* mutant

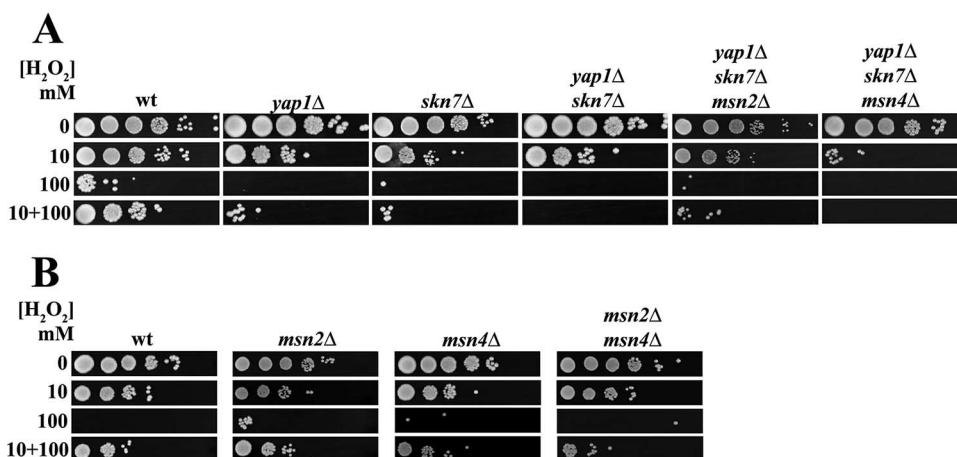


FIG. 3. Regulation of the OSR to H₂O₂ in LP. The wt (BG14) and single, double, and triple mutants with *yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ*, and *msn4Δ* mutations were grown and treated with H₂O₂ as described in the legend to Fig. 1. See Materials and Methods.

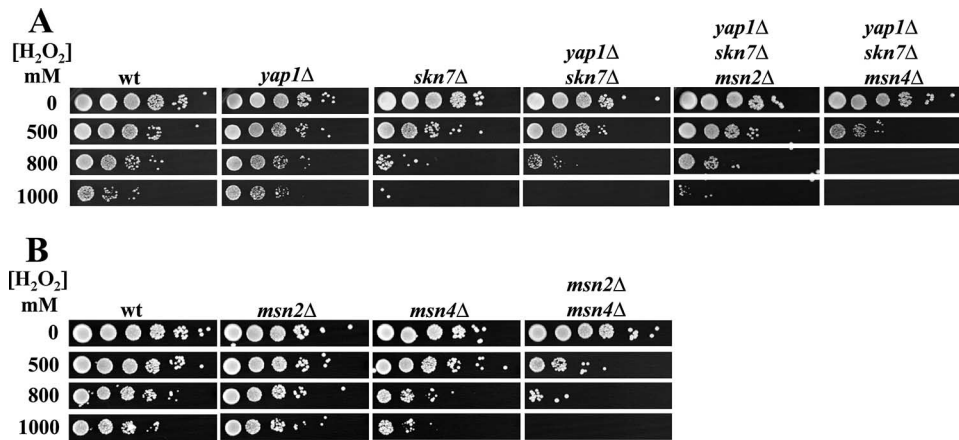


FIG. 4. Regulation of the OSR to H_2O_2 in SP. The wt (BG14) and single, double, and triple mutants with *yap1Δ*, *skn7Δ*, *msn2Δ*, and *msn4Δ* mutations were grown and treated with H_2O_2 as described in the legend to Fig. 2. See Materials and Methods.

was more sensitive to H_2O_2 than the wt, and that the *skn7Δ* mutation is epistatic to *yap1Δ* (compare the data for the *yap1Δ skn7Δ* double mutant and the single *yap1Δ* and *skn7Δ* mutants). This finding indicates that, surprisingly, Skn7p but not Yap1p is required in SP. As in LP cells, Msn4p was required for resistance in SP cells: an *msn4Δ* single mutant and a triple mutant with *msn4Δ* in combination with *skn7Δ* showed reduced resistance to H_2O_2 (Fig. 4). Interestingly, Msn2p has a role in SP since the *msn2Δ msn4Δ* double mutant was more sensitive than the *msn2Δ* and *msn4Δ* single mutants (Fig. 4B). These data suggest that Msn2p and Msn4p are both important and act independently of each other. The analysis of the triple and quadruple mutants (*skn7Δ yap1Δ msn2Δ, skn7Δ yap1Δ msn4Δ*, and *skn7Δ yap1Δ msn2Δ msn4Δ* strains) confirms the roles in SP of both Skn7p and Msn4p (Fig. 4A; also see Fig. 6B).

***CTAI* is absolutely required for resistance to H_2O_2 in vitro.**

Catalase plays a central role in the cell response against oxidative stress. We characterized the function of *C. glabrata* catalase Cta1p in the resistance to H_2O_2 treatment. *S. cerevisiae* has two catalases, cytoplasmic (Ctt1p) and peroxisomal (Cta1p) (13, 30, 65, 66, 72), and *C. albicans* has only one catalase (Ctt1p) (76). Interestingly, the single *C. glabrata* catalase gene, *CTAI* (CAGL0K10868g), is the ortholog of *S. cerevisiae* *CTAI*, the gene for the peroxisomal catalase. CgCta1p and ScCta1p are 85% similar (78% identical and 7% similar) over the entire lengths of the proteins, and CgCta1p has two putative internal peroxisomal targeting signals (SKF) (59) (Fig. 5). It is not known whether CgCta1p is targeted to the peroxisome, the mitochondria, or the cytoplasm.

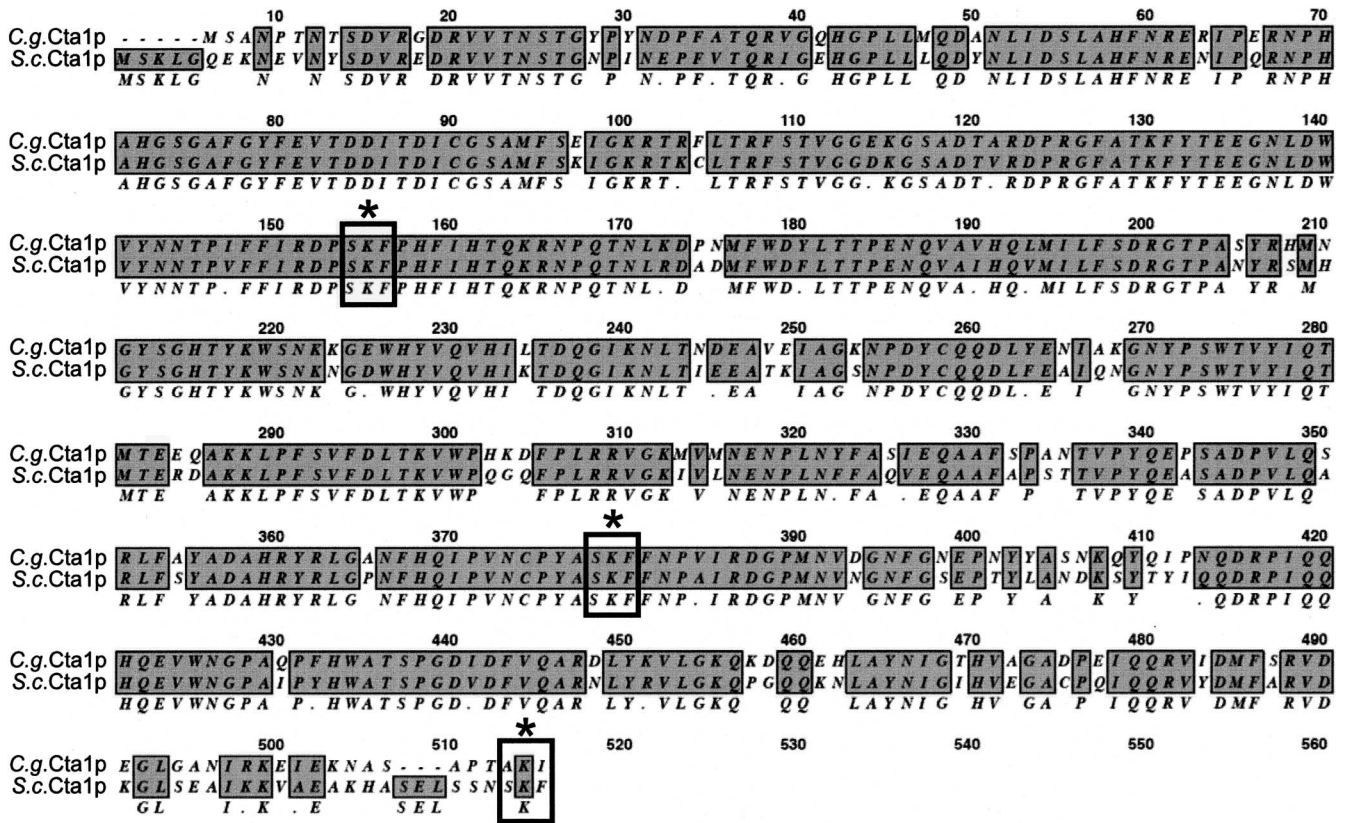
We tested whether *CTAI* is required in *C. glabrata* for the high-level resistance to H_2O_2 displayed by both the LP and SP cells. A *CTAI* null strain (*cta1Δ*) was constructed. *cta1Δ* LP cells (Fig. 6A) and SP cells (Fig. 6B) behaved in the same way: *cta1Δ* cells completely lost their ability to survive at high concentrations of H_2O_2 (>4 mM) (Fig. 6). Interestingly, *cta1Δ* LP cells were still able to adapt but only when exposed to low levels of H_2O_2 (Fig. 6A, lane 1 + 4). This result may indicate the presence of a catalase-independent pathway to respond to H_2O_2 . In SP, the *cta1Δ* mutant also became sensitive to H_2O_2 (Fig. 6B). These results clearly indicate that this single Cta1p

plays a central role in the resistance of *C. glabrata* to H_2O_2 either in LP or in SP cells. In addition, *CTAI* regulation in LP is likely controlled primarily by Skn7p, Yap1p, and Msn4p since the removal of these transcription factors rendered the cells almost as sensitive to H_2O_2 as those of the *cta1Δ* strain (Fig. 6A). In SP, by contrast, the regulation was more complex since the triple and quadruple mutants lacking three or four of the transcription factors (*skn7Δ yap1Δ msn4Δ* and *skn7Δ yap1Δ msn2Δ msn4Δ* strains), while being less resistant than the wt, were still able to grow at 200 mM H_2O_2 , displaying a level of resistance well above that of the *cta1Δ* strain (Fig. 6B). This result suggests the possibility of additional regulators of *CTAI* or an independent pathway to respond to H_2O_2 .

Cta1p is not necessary for virulence in *C. glabrata*. Since Cta1p is entirely responsible for the extremely high level of resistance to H_2O_2 in vitro (Fig. 6), *CTAI* is induced in macrophages (41), and Ca*CTAI* is required for virulence (56, 76), we investigated whether *C. glabrata* catalase plays a role during disseminated infection. Prior to the in vivo analysis, the parental and the mutant strains were made to express the Ura⁺ phenotype by restoring *URA3* at the *URA3* locus to generate BG462 and CGM351 (see Materials and Methods). The two strains grew with identical doubling times in rich medium at 30 or 37°C (Fig. 7). To test for the virulence of the *cta1Δ* strain, we infected groups of 10 mice by tail vein injection using 2×10^7 cells of strain BG462 (wt expressing *URA3*) or CGM351 (*cta1Δ URA3*). Mice were sacrificed on day 7 after infection, and CFUs in kidneys, spleens, and livers were enumerated (Materials and Methods). The average numbers of CFU of the mutant strain and the wt strain recovered from the three organ types showed no difference (Fig. 8). The results of these experiments indicate that Cta1p is required in vitro but is dispensable in the murine disseminated-infection model.

DISCUSSION

Higher eukaryotes use ROS through the oxidative burst to eliminate invading pathogens (42, 57). During the coevolution of pathogens and their hosts, pathogens have coopted the antioxidant enzymes and molecules for normal ROS elimination to evade oxidative killing so that survival and persistence



are ensured. *C. glabrata* is no exception; it possesses a defined genetic program to respond to oxidative killing by the host. *C. glabrata* adapts by reprogramming its gene expression, providing a clear advantage to this fungal pathogen upon infection. In this paper, we present evidence that the OSR in *C. glabrata* is controlled in part by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *C. glabrata* is resistant to extreme concen-

trations of H₂O₂, and this resistance is mediated in vitro by the single catalase Cta1p. This single catalase is, however, dispensable in vivo.

Resistance and adaptation to H₂O₂. Both the enzymes and the regulation of the OSR are well conserved among *S. cerevisiae*, *C. albicans*, and *C. glabrata*. Searching for genes involved in oxidative stress in the genome databases (<http://www>

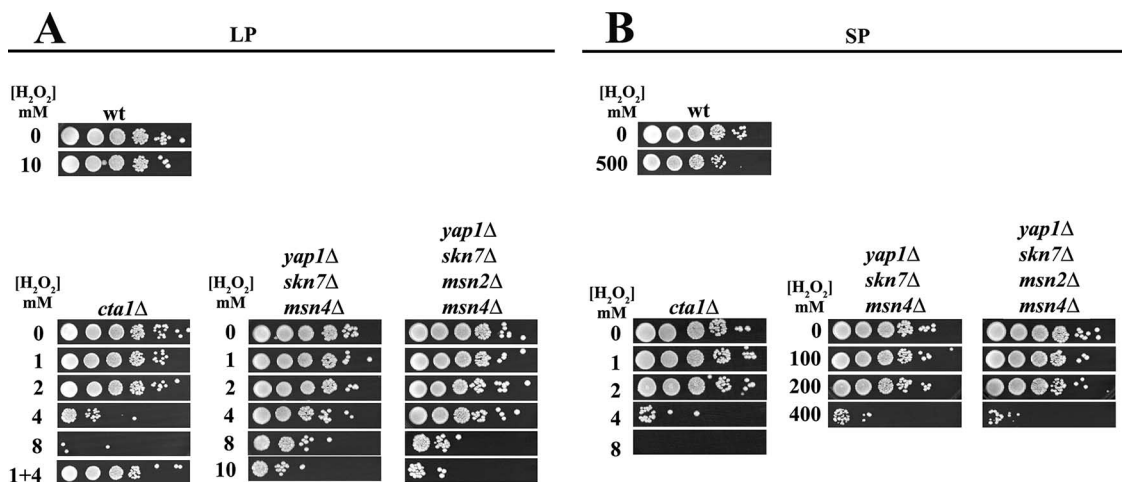


FIG. 6. Analysis of Cta1p in the OSR. Experiments with both LP and SP wt (BG14), *cta1Δ*, *yap1Δ skn7Δ msn4Δ*, and *yap1Δ skn7Δ msn2Δ msn4Δ* cells were performed as described in the legends to Fig. 1 and 2. See Materials and Methods.

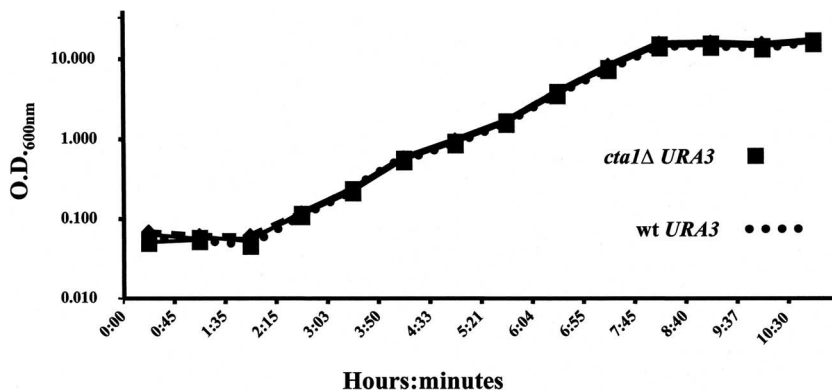


FIG. 7. Growth curves of the *cta1Δ* mutant versus the wt (BG14) at 37°C.

.yeastgenome.org, <http://www.candidagenome.org>, and <http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/CAGL>, we found that of 96 oxidative stress-related genes in *S. cerevisiae*, 67 are present in *C. glabrata* and 49 are present in *C. albicans*. Additionally, six oxidative stress-related genes are present only in *C. albicans*. In *S. cerevisiae*, the OSR is partly under the control of the well-studied transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. These transcription factors have orthologs in *C. glabrata*, as follows: Skn7p (63% similar), Msn2p (41% similar), Msn4p (35% similar), and Yap1p (48% similar). From the results of our study, the roles of these transcription factors seem to be conserved as well.

C. glabrata was naturally resistant to higher levels of H₂O₂ than *C. albicans* and *S. cerevisiae* (Fig. 1 and 2). LP cells of *C. glabrata* were able to detect low levels of oxidant and induce a set of enzymes that would allow resistance to high levels and adaptation to the new environment. This response was mediated mainly by the transcription factors Skn7p and Yap1p but also by Msn2p and Msn4p (Fig. 3). This adaptation was present

among cells of both *C. albicans* (Fig. 1) and *S. cerevisiae*, in which both catalases and the transcription factors Yap1p and Skn7p are required for this response (14, 17, 23, 27, 37, 39). Furthermore, Yap1p, Skn7p, and Msn4p coordinated the response to oxidative stress in LP cells, which required at least the activation and induction of the catalase gene (Fig. 3). The roles of Msn2p and Msn4p are interesting in two ways: first, CaMsn2p and CaMsn4p have no obvious role in oxidative stress (58), and second, ScMsn2p and ScMsn4p perform non-redundant functions depending on the stress (reviewed in references 20 and 55). In *C. glabrata* upon oxidative stress, these two transcription factors appeared to work independently of each other. Both were needed for SP resistance (see below), and Msn4p was required for LP resistance, along with Skn7p and Yap1p (Fig. 3 and 4).

SP is important for resistance. It has been shown previously that not only yeast but other microorganisms in SP are more resistant to oxidants than the same organisms in LP (38, 61, 62), and *C. glabrata* is no exception. *C. glabrata* in SP was naturally resistant to high levels of H₂O₂, up to 1,000 mM, compared to about 100 mM H₂O₂ for *S. cerevisiae* and 300 mM H₂O₂ for *C. albicans* (Fig. 2) (5, 9). This resistance was controlled by Msn2p, Msn4p, and Skn7p (Fig. 4), whereas Yap1p did not appear to have a central role. This high-level resistance suggests that *C. glabrata* has an extremely efficient Cta1p and that it is probably able to repair efficiently the damage generated by the oxidant. It is possible that *C. glabrata* catalase activity may increase post-exponential phase. For example, *S. cerevisiae* catalase activity increases in SP (37), *C. albicans* shows growth phase-dependent resistance to H₂O₂ (38, 75), and the *C. albicans* Mn-SOD3 superoxide dismutase is induced in SP and is needed for the OSR (45). This high-level natural resistance to H₂O₂ may, in part, explain why *C. glabrata* is able to evade elimination by macrophages (41). Another clear advantage would be that *C. glabrata* can compete with H₂O₂-generating pathogens for specific niches inside the host. It has been shown previously that H₂O₂-producing bacteria inhibit the proliferation of *C. albicans* (75). Interestingly, CI of the nonpathogenic *S. cerevisiae* showed increased resistance to H₂O₂ relative to that of the reference strain (Fig. 1C and 2C). This result is consistent with the idea that pathogens, in order to survive, require a proper response to oxidative stress.

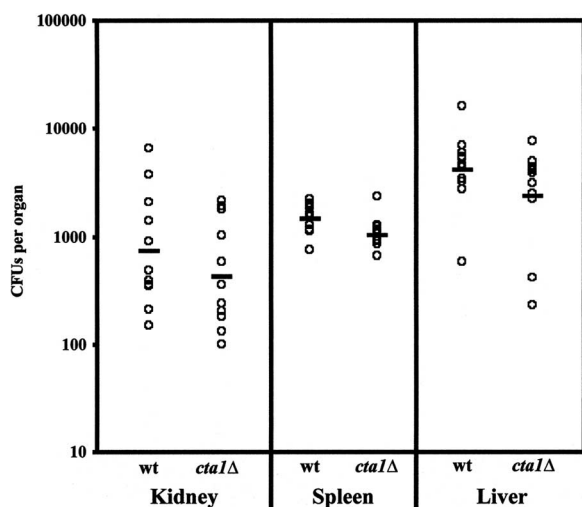


FIG. 8. Cta1p is dispensable in vivo. Numbers of CFU in kidney, spleen, and liver tissues 7 days postinfection with the wt (BG462) and the *cta1Δ* mutant (CGM351) are shown. Individual datum points represent results for individual mice in groups of 10 mice. The bars indicate the geometric mean for each group. See Materials and Methods.

Catalase and virulence. The *C. glabrata* single catalase (Cta1p) was absolutely required to confer resistance on LP and SP cells in vitro. *cta1Δ* cells were extremely sensitive (Fig. 6) to H₂O₂. CgCta1p is the ortholog of the *S. cerevisiae* peroxisomal catalase (ScCta1p; 85% similar) (Fig. 5), which converts H₂O₂ formed by acyl coenzyme A oxidase (Pox1p) during fatty acid beta-oxidation (34) to H₂O and O₂ in the peroxisomal matrix. CgCta1p is a monofunctional 57-kDa protein classified as a group III catalase (42). It is interesting that *S. cerevisiae* has two catalases, cytoplasmic (Ctt1p) and peroxisomal (Cta1p), and that *S. cerevisiae* was about 10 times less resistant than *C. glabrata* (Fig. 2). Surprisingly, it has been shown previously that both catalases in *S. cerevisiae* (Ctt1p and Cta1p) are dispensable in growing cells and that glutathione compensates for the lack of the catalases (37). The fungal pathogens *C. albicans* and *C. glabrata*, though distantly related phylogenetically, show increased resistance to oxidative stress relative to that of *S. cerevisiae*.

The results presented in Fig. 6 suggest that in LP cells *CTA1* may be controlled by the concerted actions of Yap1p, Skn7p, and Msn4p. The triple (*yap1Δ skn7Δ msn4Δ*) and quadruple (*yap1Δ skn7Δ msn2Δ msn4Δ*) mutants behaved exactly the same, rendering LP cells almost as sensitive as the *cta1Δ* strain (Fig. 6A). In fact, bioinformatic analyses of the CgCTA1 promoter have previously revealed putative conserved *cis*-acting elements for each of these transcriptional regulators (reviewed in references 24, 32, and 36). In SP, however, both triple (*yap1Δ skn7Δ msn4Δ*) and quadruple (*yap1Δ skn7Δ msn2Δ msn4Δ*) mutants showed increased resistance to H₂O₂ relative to that of the reference strain W303. (Fig. 6B). These mutants could still grow at elevated levels of H₂O₂ (up to 200 mM). This finding would indicate that in SP but not in LP, other transcriptional regulators of the *CTA1* gene besides Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p are in play.

Is the catalase a virulence factor? (i) *cta1Δ* strains are extremely sensitive to H₂O₂ in vitro, (ii) CaCta1p is important for virulence (56, 76; reviewed in reference 10), and (iii) *CTA1* is induced after phagocytosis (26, 41, 47). We therefore assayed *cta1Δ* cells in a mouse model of systemic infection. The experiment showed no difference in the colonization of the kidney, spleen, and liver by the *cta1Δ* strain (Fig. 8). This finding is in strong contrast with the results of the in vitro experiments, in which *cta1Δ* cells were extremely sensitive to H₂O₂. Our results suggest either that the catalase is not important in the OSR in vivo or that there are additional factors that may compensate for the lack of Cta1p in vivo. One possibility is that glutathione may mediate H₂O₂ resistance in vivo, since it has been shown previously that both catalases and glutathione provide an overlapping antioxidant defense system in *S. cerevisiae* (28). The results also suggest that these additional factors are silent in vitro. In fact, the *cta1Δ* strain was still able to adapt to oxidative stress in vitro, though at low levels of H₂O₂ (Fig. 6A). This finding indicates that there may be an additional catalase-independent pathway to respond to H₂O₂. Currently, we are working to identify these additional regulators/ effectors of the OSR.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank B. Cormack and B. Ma for careful reading of the manuscript. We thank B. Cormack, A. Johnson, M. Christman, and C. Gross

for kindly providing strains. We are grateful to W. Hansberg, J. Aguirre, M. Soberón, A. Bravo, G. Soberón, P. León, M. Zurita, X. Soberón, A. González, J. Folch, E. Merino, B. Valderrama, and F. Sánchez for providing reagents and supplies. We thank B. Cormack, S. Pan, and M. Zupancic for helping with the in vivo experiments. We thank R. López-Revilla and L. Salazar for providing space and equipment.

This work was funded by CONACyT fellowships to M.C.-C. (163140), M.B.-M.-D.-C. (209276), I.C.-V.(224300), and J.M.-A.(209255) and by CONACyT grant no. CB-2005-48279 to A.D.L.P.

REFERENCES

1. Aguirre, J., W. Hansberg, and R. Navarro. 2006. Fungal responses to reactive oxygen species. *Med. Mycol.* **44**(Suppl.):101–107.
2. Aguirre, J., M. Rios-Mombreg, D. Hewitt, and W. Hansberg. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* **13**:111–118.
3. Alarco, A. M., and M. Raymond. 1999. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **181**:700–708.
4. Ausubel, F., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 2001. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
5. Avery, A. M., and S. V. Avery. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J. Biol. Chem.* **276**:33730–33735.
6. Brown, J. L., H. Bussey, and R. C. Stewart. 1994. Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *EMBO J.* **13**:5186–5194.
7. Calvin, N. M., and P. C. Hanawalt. 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* **170**:2796–2801.
8. Castano, I., R. Kaur, S. Pan, R. Cregg, A. De Las Penas, N. Guo, M. C. Biery, N. L. Craig, and B. P. Cormack. 2003. Tn7-based genome-wide random insertional mutagenesis of *Candida glabrata*. *Genome Res.* **13**:905–915.
9. Chauhan, N., D. Inglis, E. Roman, J. Pla, D. Li, J. A. Calera, and R. Calderone. 2003. *Candida albicans* response regulator gene *SSK1* regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress. *Eukaryot. Cell* **2**:1018–1024.
10. Chauhan, N., J. P. Latge, and R. Calderone. 2006. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:435–444.
11. Chen, K. H., T. Miyazaki, H. F. Tsai, and J. E. Bennett. 2007. The bZip transcription factor CgAp1p is involved in multidrug resistance and required for activation of multidrug transporter gene CgFLR1 in *Candida glabrata*. *Gene* **386**:63–72.
12. Clemons, K. V., J. H. McCusker, R. W. Davis, and D. A. Stevens. 1994. Comparative pathogenesis of clinical and nonclinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Infect. Dis.* **169**:859–867.
13. Cohen, G., W. Rapatz, and H. Ruis. 1988. Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino acid sequence of catalase A derived from it. *Eur. J. Biochem.* **176**:159–163.
14. Collinson, L. P., and I. W. Dawes. 1992. Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *J. Gen. Microbiol.* **138**:329–335.
15. Cormack, B. P., and S. Falkow. 1999. Efficient homologous and illegitimate recombination in the opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata*. *Genetics* **151**:979–987.
16. Cyrne, L., L. Martins, L. Fernandes, and H. S. Marinho. 2003. Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. *Free Radic. Biol. Med.* **34**:385–393.
17. Davies, J. M., C. V. Lowry, and K. J. Davies. 1995. Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**:1–6.
18. De Las Penas, A., S. J. Pan, I. Castano, J. Alder, R. Cregg, and B. P. Cormack. 2003. Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev.* **17**:2245–2258.
19. Domergue, R., I. Castano, A. De Las Penas, M. Zupancic, V. Locketell, J. R. Hebel, D. Johnson, and B. P. Cormack. 2005. Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* **308**:866–870.
20. Estruch, F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:469–486.
21. Estruch, F., and M. Carlson. 1993. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**:3872–3881.
22. Fidel, P. L., Jr., J. L. Cutright, L. Tait, and J. D. Sobel. 1996. A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. *J. Infect. Dis.* **173**:425–431.
23. Flattery-O'Brien, J., L. P. Collinson, and I. W. Dawes. 1993. *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide. *J. Gen. Microbiol.* **139**:501–507.

24. Folch-Mallol, J. L., A. Garay-Arroyo, F. Lledias, and A. A. Covarrubias Robles. 2004. The stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **46**:24–46. (In Spanish.)
25. Fonzi, W. A., and M. Y. Irwin. 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**:717–728.
26. Fradin, C., P. De Groot, D. MacCallum, M. Schaller, F. Klis, F. C. Odds, and B. Hube. 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol. Microbiol.* **56**:397–415.
27. Gonzalez-Parraga, P., J. A. Hernandez, and J. C. Arguelles. 2003. Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress (H_2O_2) and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. *Yeast* **20**:1161–1169.
28. Grant, C. M., G. Perrone, and I. W. Dawes. 1998. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**:893–898.
29. Gray, J. V., G. A. Petsko, G. C. Johnston, D. Ringe, R. A. Singer, and M. Werner-Washburne. 2004. “Sleeping beauty”: quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:187–206.
30. Hartig, A., and H. Ruis. 1986. Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T. *Eur. J. Biochem.* **160**:487–490.
31. Hasan, R., C. Leroy, A. D. Isnard, J. Labarre, E. Boy-Marcotte, and M. B. Toledano. 2002. The control of the yeast H_2O_2 response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol. Microbiol.* **45**:233–241.
32. He, X. J., and J. S. Fasser. 2005. Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **58**:1454–1467.
33. Higgins, D. G., J. D. Thompson, and T. J. Gibson. 1996. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol.* **266**:383–402.
34. Hiltunen, J. K., A. M. Mursula, H. Rottensteiner, R. K. Wierenga, A. J. Kastaniotis, and A. Gurvitz. 2003. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:35–64.
35. Hwang, C. S., G. E. Rhie, J. H. Oh, W. K. Huh, H. S. Yim, and S. O. Kang. 2002. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology* **148**:3705–3713.
36. Ikner, A., and K. Shiozaki. 2005. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat. Res.* **569**:13–27.
37. Izawa, S., Y. Inoue, and A. Kimura. 1996. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **320**:61–67.
38. Jamieson, D. J. 1992. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J. Bacteriol.* **174**:6678–6681.
39. Jamieson, D. J., S. L. Rivers, and D. W. Stephen. 1994. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology* **140**:3277–3283.
40. Kaur, R., R. Domergue, M. L. Zupancic, and B. P. Cormack. 2005. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:378–384.
41. Kaur, R., B. Ma, and B. P. Cormack. 2007. A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:7628–7633.
42. Klotz, M. G., and P. C. Loewen. 2003. The molecular evolution of catalytic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Mol. Biol. Evol.* **20**:1098–1112.
43. Krems, B., C. Charizanis, and K. D. Entian. 1996. The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance. *Curr. Genet.* **29**:327–334.
44. Kuge, S., and N. Jones. 1994. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* **13**:655–664.
45. Lamarre, C., J. D. LeMay, N. Deslauriers, and Y. Bourbonnais. 2001. *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon the entry and during the stationary phase. *J. Biol. Chem.* **276**:43784–43791.
46. Lee, J., C. Godon, G. Lagniel, D. Spector, J. Garin, J. Labarre, and M. B. Toledano. 1999. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.* **274**:16040–16046.
47. Lorenz, M. C., J. A. Bender, and G. R. Fink. 2004. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot. Cell* **3**:1076–1087.
48. Lupo, S., C. Aranda, L. Miranda-Ham, O. Olivera, L. Riego, L. Servin, and A. Gonzalez. 1997. Tyrosine is involved in protection from oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* **43**:963–970.
49. Mansour, M. K., and S. M. Levitz. 2002. Interactions of fungi with phagocytes. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:359–365.
50. Martinez-Pastor, M. T., G. Marchler, C. Schuller, A. Marchler-Bauer, H. Ruis, and F. Estruch. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* **15**:2227–2235.
51. McDonald, J. P., A. S. Levine, and R. Woodgate. 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* RAD30 gene, a homologue of *Escherichia coli* dinB and umuC, is DNA damage inducible and functions in a novel error-free postreplication repair mechanism. *Genetics* **147**:1557–1568.
52. Molina, L., and R. Kahmann. 2007. An *Ustilago maydis* gene involved in H_2O_2 detoxification is required for virulence. *Plant Cell* **19**:2293–2309.
53. Morgan, B. A., G. R. Banks, W. M. Toone, D. Raitt, S. Kuge, and L. H. Johnston. 1997. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **16**:1035–1044.
54. Morgan, B. A., N. Bouquin, G. F. Merrill, and L. H. Johnston. 1995. A yeast transcription factor bypassing the requirement for SBF and DSC1/MBF in budding yeast has homology to bacterial signal transduction proteins. *EMBO J.* **14**:5679–5689.
55. Moye-Rowley, W. S. 2002. Transcription factors regulating the response to oxidative stress in yeast. *Antioxid. Redox Signal.* **4**:123–140.
56. Nakagawa, Y., T. Kanbe, and I. Mizuguchi. 2003. Disruption of the human pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene decreases survival in mouse-model infection and elevates susceptibility to higher temperature and to detergents. *Microbiol. Immunol.* **47**:395–403.
57. Nathan, C., and M. U. Shiloh. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:8841–8848.
58. Nicholls, S., M. Straffon, B. Enjalbert, A. Nantel, S. Macaskill, M. Whiteway, and A. J. Brown. 2004. Msn2- and Msn4-like transcription factors play no obvious roles in the stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **3**:1111–1123.
59. Petrova, V. Y., D. Drescher, A. V. Kujumdzieva, and M. J. Schmitt. 2004. Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem. J.* **380**:393–400.
60. Pfaller, M. A., and D. J. Diekema. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:133–163.
61. Schenberg-Frascino, A. 1972. Lethal and mutagenic effects of elevated temperature on haploid yeast. II. Recovery from thermolesions. *Mol. Gen. Genet.* **117**:239–253.
62. Schenberg-Frascino, A., and E. Moustacchi. 1972. Lethal and mutagenic effects of elevated temperature on haploid yeast. I. Variations in sensitivity during the cell cycle. *Mol. Gen. Genet.* **115**:243–257.
63. Schmitt, A. P., and K. McEntee. 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:5777–5782.
64. Schnell, N., B. Krems, and K. D. Entian. 1992. The PAR1 (YAP1/SNQ3) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr. Genet.* **21**:269–273.
65. Seah, T. C., A. R. Bhatti, and J. G. Kaplan. 1973. Novel catalytic proteins of bakers' yeast. I. An atypical catalase. *Can. J. Biochem.* **51**:1551–1555.
66. Seah, T. C., and J. G. Kaplan. 1973. Purification and properties of the catalase of bakers' yeast. *J. Biol. Chem.* **248**:2889–2893.
67. Sherman, F., G. R. Fink, and J. B. Hicks. 1986. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
68. Singh, P., N. Chauhan, A. Ghosh, F. Dixon, and R. Calderone. 2004. *SKN7* of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. *Infect. Immun.* **72**:2390–2394.
69. Temple, M. D., G. G. Perrone, and I. W. Dawes. 2005. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol.* **15**:319–326.
70. Thorpe, G. W., C. S. Fong, N. Alic, V. J. Higgins, and I. W. Dawes. 2004. Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:6564–6569.
71. Toda, T., M. Shimanuki, and M. Yanagida. 1991. Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev.* **5**:60–73.
72. Traczyk, A., T. Bilinski, J. Litwinska, M. Skoneczny, and J. Rytka. 1985. Catalase T deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiol. Pol.* **34**:231–241.
73. Trick, W. E., S. K. Fridkin, J. R. Edwards, R. A. Hajjeh, and R. P. Gaynes. 2002. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. *Clin. Infect. Dis.* **35**:627–630.
74. Vermitsky, J. P., K. D. Earhart, W. L. Smith, R. Homayouni, T. D. Edlind, and P. D. Rogers. 2006. Pdr1 regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. *Mol. Microbiol.* **61**:704–722.
75. Westwater, C., E. Balish, and D. A. Schofield. 2005. *Candida albicans*-con-

- ditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryot. Cell* **4**:1654–1661.
76. **Wysong, D. R., L. Christin, A. M. Sugar, P. W. Robbins, and R. D. Diamond.** 1998. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect. Immun.* **66**:1953–1961.
77. **Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103–119.
78. **Zhang, X., M. De Micheli, S. T. Coleman, D. Sanglard, and W. S. Moye-Rowley.** 2000. Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p. *Mol. Microbiol.* **36**:618–629.

ANEXOS

Cálculo de la concentración de ADN por espectrofotometría

$$\boxed{\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g/ml}) \text{ de doble cadena}} = \frac{(\text{Abs}_{260\text{nm}}) (\text{Fcu}) (\text{dil})}{0.020}$$

donde:

Abs= Lectura de la absorbancia de la muestra de ADN, a 260nm en una celda de cuarzo.

Fcu= Factor de la celda de cuarzo TRAY CELL [HELLMA®] generalmente es 10.

Dil = Factor de dilución.

0.020= Factor para ADN de doble cadena.

Cálculo de la eficiencia de transformación de un plásmido

La eficiencia de transformación es el número células transformadas (transformantes) generadas por 1 µg de ADN plasmídico superenrollado en la reacción de transformación.

$$\boxed{\text{Eficiencia de transformación (transformantes}/\mu\text{g)}} = \frac{\# \text{ colonias en la transformación}}{\mu\text{g de ADN transformado}}$$

Cálculo de número de revertantes Sac^R

$$\boxed{\text{Frecuencia de reversión del pMB11}} = \frac{\# \text{ colonias Sac}^R / \mu\text{g DNA}}{\# \text{ colonias Cm}^R / \mu\text{g DNA}}$$

Cálculo de la eficiencia de clonación de un plásmido

$$\boxed{\text{Eficiencia de clonación (\%)}} = \frac{\# \text{ colonias con inserto}}{\# \text{ total de colonias analizadas}} \times 100$$

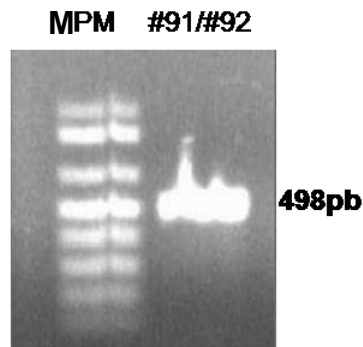


Figura 16. Producto de PCR de 498pb amplificado con los oligonucleótidos #91/ #92 usando como molde el pAP636. MPM, marcador de peso molecular de 1kb Plus

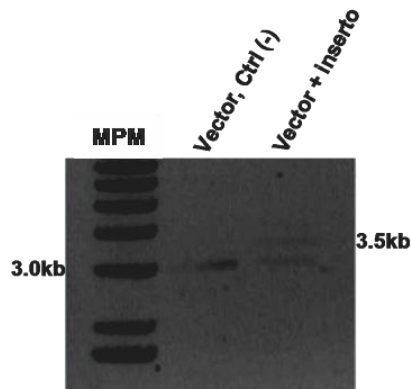


Figura 17. Ligación del producto de PCR #91/ #92 en pGEM. El tamaño del vector es de 3.0kb, el tamaño del inserto es de 498pb. La construcción tiene un tamaño de ~3.5kb. MPM, marcador de peso molecular de 1kb Plus

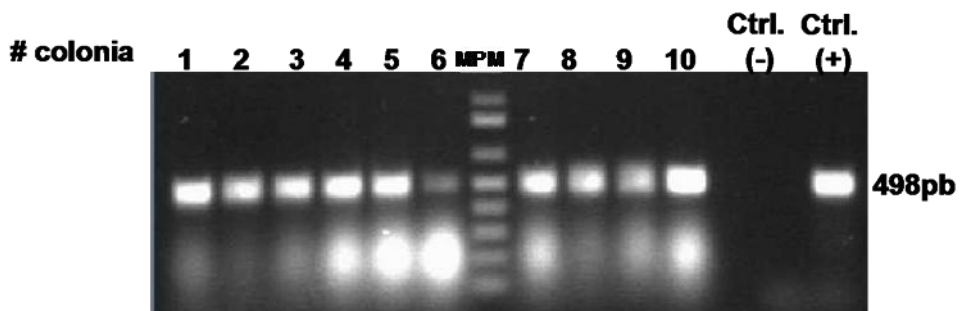


Figura 18. Diagnóstico por PCR de colonia de la clonación del producto de PCR #91/#92 en un vector derivado de pUC. Se amplificó un producto de PCR de 498pb con los oligos #91/ #92. Eficiencia de clonación del 100%. Los moldes de ADN fueron 10 colonias escogidas al azar de la transformación. El molde usado en el control positivo fue ADN plasmídico del vector pAP636. MPM, marcador de peso molecular de 1kb Plus

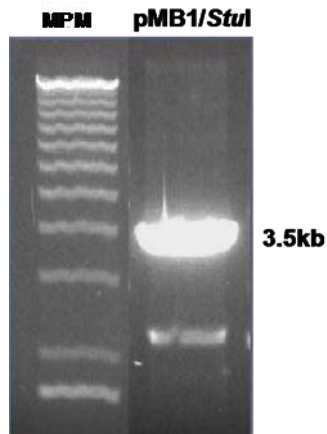


Figura 19. Digestión del vector pMB1 con *Stu* I. El tamaño del pMB1 lineal es de 3.5kb. La banda adicional indica una digestión parcial. MPM, marcador de peso molecular de 1kb Plus

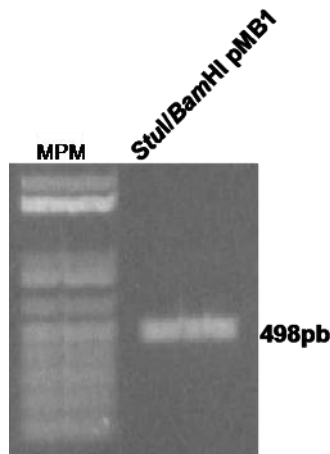


Figura 20. Fragmento *Stu* I/*Bam*H I de 498pb del vector pMB1, purificado de gel. MPM, marcador de peso molecular de 1kb Plus

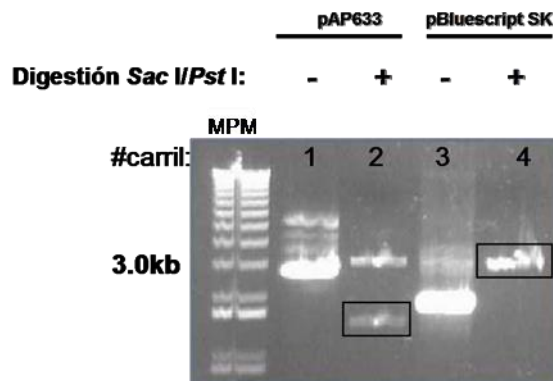


Figura 21. Digestión *Sac* I/*Pst* I de los vectores pAP636 y pBluescript SK. Las bandas en recuadro de los carriles 2 y 4 fueron purificadas de gel. MPM, marcador de peso molecular de 1kb Plus

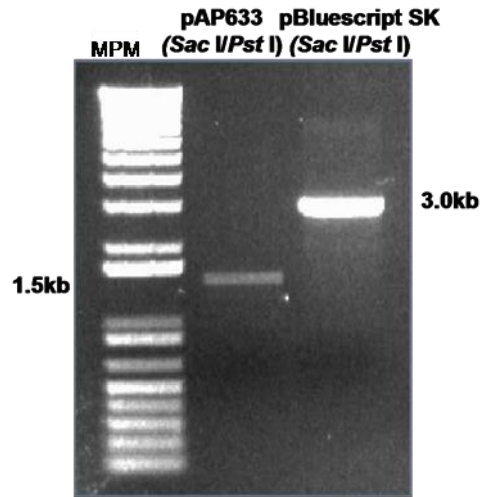


Figura 22. Fragmentos *Sac I/Pst I* del pAP633 (1.5kb) y del pBluescript SK (3.0kb) purificados de gel. Estos fragmentos fueron ligados posteriormente para construir el plásmido pMB3. MPM, marcador de peso molecular de 1kb Plus

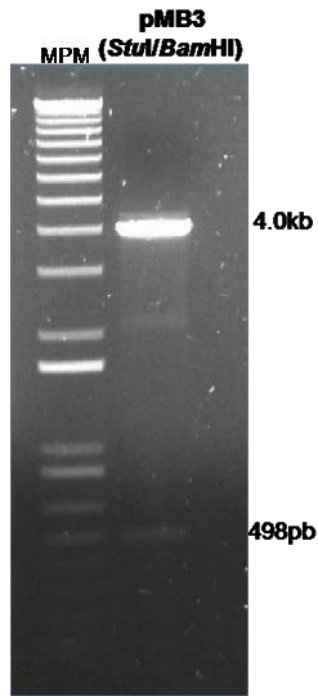


Figura 23. Digestión *Stu I/BamH I* del vector pMB3. Produce dos bandas, una de 4.0kb y otra de 498pb. El ADN provenía de la cepa ER2925 (*dam⁻, dcm⁻*). MPM, marcador de peso molecular de 1kb Plus

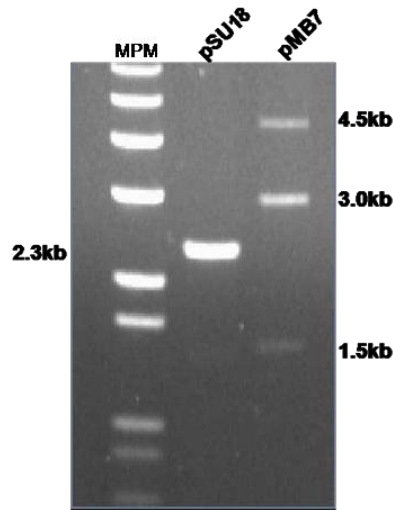


Figura 24. Digestión *Sac I/Pst I* de los vectores pMB7 y pSU18. La digestión del pMB7 fue parcial. La banda de 4.5kb equivale al vector sin digerir. MPM, marcador de peso molecular de 1kb Plus

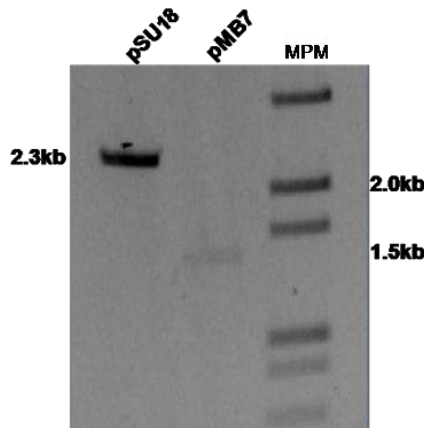


Figura 25. Fragmentos del pSU18 y del pMB7 purificados de gel. Fragmento *Sac I/Pst I* del pSU18 de 2.3kb y fragmento *Sac I/Pst I* del pMB7 de 1.5kb. MPM, marcador de peso molecular de 1kb Plus

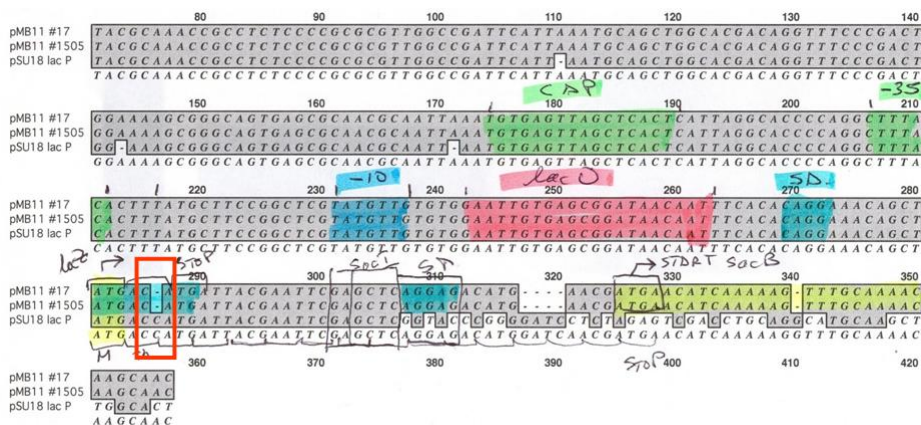


Figura 26. Secuenciación de dos pMB11 y su alineamiento. Para la secuenciación se usaron los oligos #17 y #125. El recuadro rojo indica la mutación puntual dentro del ORF de *lacZ* que ocasiona la aparición de un codón de paro inmediatamente después.

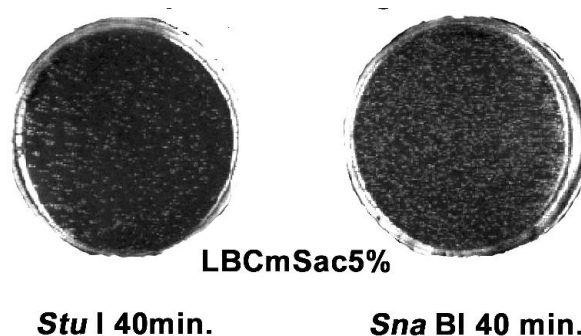


Figura 27. Comparación de las UFC de DH10B pMB11/*Stu* I/ religado y DH10B pMB11/*Sna*B I/ religado. Células electrocompetentes de DH10B fueron electroporadas con pMB11 digerido con *Stu* I o *Sna*B I durante 40 minutos y después religados. Se platearon 100µl de la transformación en DH10B. Las células DH10B fueron electrocompetentes a 1×10^8 /µg pUC.

Tabla 13. Eficiencia de transformación y reversión del pMB11/*Stu* I en DH10B. El pMB11 digerido con *Stu* I fue transformado en DH10B.

Efic (Cm^R)	Sac^R Cm^R	Rev (Sac^R / Cm^R)
3.1×10^5	0	0
1.8×10^5	0	0

Se presentan dos experimentos independientes. Cm^R , #UFC/µg ADN por ml de transformación. Efic, eficiencia de transformación. Sac^R , #UFC/µg ADN por ml de transformación, Rev, frecuencia de reversión. Las células DH10B fueron electrocompetentes a 1×10^8 /µg pUC.

Tabla 14. Comparación de las frecuencias de reversión de pMB11 superenrollado y de pMB11/*Stu* I/religado.

Rev (Sac^R/Cm^R)	
pMB11 superenrollado	pMB11/ <i>Stu</i> I/religado
5.3×10^{-5}	1.4×10^{-2}
1.9×10^{-5}	7.7×10^{-3}
	1.0×10^{-2}
	3.2×10^{-3}
	2.8×10^{-3}
	1.0×10^{-3}
	3.4×10^{-4}

Se transformaron en DH10B. Experimentos independientes. Cm^R , #UFC/µg ADN por ml de transformación. Sac^R , #UFC/µg ADN por ml de transformación, Rev, frecuencia de reversión. Las células DH10B fueron electrocompetentes a 1×10^8 /µg pUC.

Tabla 15. Costo de los reactivos usados por los plásmidos pMB11, pGEM[®] y pCRII[®]-TOPO[®].

		\$ Reactivos*		
		INVITROGEN	SIGMA	SHELTON
pMB11	Cloranfenicol(20µg/ml)	No vende	\$0.58	\$0.12
	Sacarosa (5%)	\$0.94	\$1.73	
pGEM[®] y	Carbenicilina (100µg/ml)	\$1.80	\$8.32	
pCRII[®]-TOPO[®]	X-gal (40µl,40mg/ml)	\$11.97	\$11.96	
	IPTG (100µl,100mM)	\$1.72	\$1.90	

Se muestran los precios de los reactivos utilizados para la selección o escrutinio de dos vectores comerciales y del pMB11. Se comparan los precios de tres diferentes compañías. \$ Reactivos, costos de los reactivos para una caja con 30ml de medio. Todos los costos están en pesos mexicanos e incluyen el 15% del impuesto del IVA. *Precios del 2008