

**Universidad Peruana Cayetano Heredia**

**Facultad de Ciencias y Filosofía**

**“Alberto Cazorla Telleri”**



Obtención de determinantes genéticos y producción  
de Microcina J25 (MccJ25) en laboratorio.

*Tesis para optar el título de Licenciado en Biología*

*Rafael Abdel David Dumet Delgado*

*Lima-Perú*

*2020*

# Índice

|             |                                                          |           |
|-------------|----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I.</b>   | <b>Resumen</b>                                           | <b>3</b>  |
| <b>II.</b>  | <b>Abstract</b>                                          | <b>4</b>  |
| <b>III.</b> | <b>Introducción</b>                                      | <b>5</b>  |
| <b>IV.</b>  | <b>Marco teórico</b>                                     | <b>8</b>  |
| 1.          | <i>Enterobacterias</i>                                   | 8         |
| 2.          | <i>Plásmidos</i>                                         | 8         |
| 3.          | <i>Antibióticos</i>                                      | 9         |
| 4.          | <i>Microcina J25</i>                                     | 10        |
| <b>V.</b>   | <b>Objetivos</b>                                         | <b>13</b> |
| 1.          | <i>Objetivo general</i>                                  | 13        |
| 2.          | <i>Objetivos específicos</i>                             | 13        |
| <b>VI.</b>  | <b>Materiales y métodos</b>                              | <b>14</b> |
| 1.          | <i>Diseño de primadores</i>                              | 14        |
| 2.          | <i>Diseño de plásmidos</i>                               | 16        |
| 3.          | <i>Cepas de E. Coli</i>                                  | 19        |
| A.          | Aislados de <i>E. coli</i> a partir de muestras clínicas | 19        |
| B.          | Cepa sensible a MccJ25 de referencia (ATCC10536)         | 19        |
| C.          | NEB® Stable Competent <i>E. coli</i>                     | 19        |
| 4.          | <i>Electroforesis</i>                                    | 19        |
| 5.          | <i>PCR</i>                                               | 20        |
| 6.          | <i>Cribado por PCR</i>                                   | 21        |

|              |                                                                                                           |           |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 7.           | <i>Ensayo de actividad antibiótica Spot-on-lawn</i>                                                       | 22        |
| <b>VII.</b>  | <b>Resultados</b>                                                                                         | <b>24</b> |
| 1.           | <i>Cribado por PCR de bacterias provenientes de muestras clínicas.</i>                                    | 24        |
| 2.           | <i>Obtención de determinantes genéticos de MccJ25 mediante síntesis química del plásmido pKM1.</i>        | 28        |
| 3.           | <i>Síntesis de plásmido pKM2 mediante corrección por mutagénesis dirigida de pKM1 mediada por PCR.</i>    | 35        |
| 4.           | <i>Verificación de actividad antibiótica de sobrenadante de cultivo de bacteria transformada con pKM2</i> | 38        |
| <b>VIII.</b> | <b>Discusión</b>                                                                                          | <b>43</b> |
| 1.           | <i>E. coli de aislados clínicos no mostraron presencia de bacterias productoras de MccJ25.</i>            | 43        |
| 2.           | <i>Plásmidos pKM1 y pKM2</i>                                                                              | 44        |
| 3.           | <i>Perspectivas</i>                                                                                       | 46        |
| <b>IX.</b>   | <b>Conclusiones</b>                                                                                       | <b>48</b> |
| <b>X.</b>    | <b>Referencias</b>                                                                                        | <b>49</b> |
|              | <b>Anexos</b>                                                                                             | <b>57</b> |
| 1.           | <i>Mapa y secuencia del plásmido pDPA</i>                                                                 | 57        |
| 2.           | <i>Secuencia de inserto mcjABCD presente en el plásmido pKM2.</i>                                         | 59        |
| 3.           | <i>Secuencia del plásmido PKM1</i>                                                                        | 61        |
| 4.           | <i>Secuencia del plásmido pKM2</i>                                                                        | 65        |
| 5.           | <i>Flujograma.</i>                                                                                        | 69        |
|              | <b>Agradecimientos</b>                                                                                    | <b>70</b> |

## I. Resumen

En la actualidad, se ha visto un auge de bacterias patógenas resistentes a antibióticos. La aparición de bacterias resistentes a antibióticos no solo de uso regular, pero también resistentes a antibióticos de última línea presenta una seria preocupación de salud a nivel global. Debido a esto, han aumentado los esfuerzos para obtener nuevos compuestos antibióticos. Compuestos ya encontrados en el medio ambiente tienden a ser mejores blancos de estudio, debido a su fácil obtención en comparación con la síntesis de compuestos nuevos. En el presente trabajo se intentó generar una bacteria que produjera microcina J25 (MccJ25) en el laboratorio para futuros estudios.

Se realizó el cribado de 126 aislados de *E. coli* patógenas en búsqueda de los determinantes genéticos de microcina J25 (MccJ25) mediante *colony* PCR. No se encontraron bacterias que arrojaran un diagnóstico positivo en este ensayo, por lo que se diseñó un plásmido, pKM1, con los cuatro genes responsables de la producción de MccJ25 con base en la secuencia reportada por los descubridores originales, Salomón y Farías, en el año 1996. *E. coli* NEB® Stable transformadas con pKM1 no produjeron el antibiótico en las condiciones de cultivo esperadas. El análisis de la secuencia reportada en 1996 indicó la presencia de una mutación sin sentido que produce la interrupción de la traducción del gen *mcjC*. *E. coli* NEB® Stable fue transformada con el plásmido corregido por mutagénesis dirigida mediada por PCR, pKM2, y se procedió a los ensayos antibióticos. Estas bacterias fueron capaces de producir MccJ25 tras 24 horas de cultivo en medio LB sin necesidad de inductor, como se había previsto. Esto muestra la viabilidad del plásmido pKM2 como plásmido productor de MccJ25.

Palabras clave: Clonación, Detección, Microcina, PCR, *E. coli*, Antibiótico

## II. Abstract

Recently, there has been an increase in antibiotic resistant pathogenic bacteria. The apparition of bacteria resistant not only to first line use antibiotic but also last resort antibiotics is a serious global health concern. This has increased efforts to obtain novel antibiotic compounds. Naturally found compounds tend to be better study targets, as they are easier to obtain than lab-synthesized compounds. In this work, we tried to obtain a bacterium that was able to produce microcin J25 (MccJ25) in lab conditions for future studies.

126 pathogenic *E. coli* samples were screened by colony PCR (cPCR) for Microcin J25 (MccJ25) genetic determinants. None of these samples gave reliable positive results, so a plasmid with the four genes responsible for production of MccJ25 was designed using the sequence reported by Salomón & Farías, its original discoverers, in 1996. Colonies transformed with this plasmid, named pKM1, produced no detectable antibiotic in the expected culture conditions. Later, we noted that the sequence reported in 1996 was corrected in 2005, so we turned to correcting pKM1 through directed mutagenesis by PCR. This corrected a nonsensical mutation in *mcjC* gene, responsible for the peptide's maturation. The corrected plasmid, pKM2, was transformed in NEB stable competent cells and we began antibiotic assays. The bacteria were able to produce MccJ25 after 24h incubation in LB media without inductor as foreseen.

Keywords: Cloning, Detectioon, Microcin, PCR, *E. coli*, Antibiotic

### III. Introducción

La bacteria *Escherichia coli* es un bacilo gram negativo de la familia de las enterobacterias. Uno de sus hábitats más comunes es el intestino de mamíferos, más específicamente, el colon. Se ha reportado que, en humanos, *E. coli* coloniza el intestino durante los primeros días de vida (Hewitt & Rigby, 1976), sin embargo, otros estudios reportan tiempos de adquisición mucho mayores (Nowrouzian et al., 2003). Dentro del intestino humano, *E. coli* se encuentra sobre la mucosa del colon, y es el anaerobio facultativo más abundante. Estas bacterias conviven con su anfitrión sin ocasionar patologías y son conocidas como comensales.

El comensalismo es la situación ecológica más común en esta bacteria, y es raro encontrarla en el medio ambiente, por lo que usualmente su presencia en el ambiente es un indicador de contaminación fecal (Jang et al., 2017). Sin embargo, también existen clonas patogénicas que poseen genes de virulencia asociados a adherencia, metabolismo, competencia, y resistencia a defensas del hospedero.

Dada la gran variedad que tienen las *E. coli* patogénicas, han sido clasificadas en relación con el cuadro clínico que generan durante la infección: asociadas a infecciones de tracto urinario (uropathogenic *E. coli*; UPEC); asociadas a infecciones intestinales o a diarrea (Diahrogenic *E. coli*; DEC); y asociadas a sepsis/meningitis (Sepsis associated *E. coli*/meningitis associated *E. coli*; SAEC/MAEC). Según el juego de genes de virulencia que posean, las *E. coli* asociadas a infecciones intestinales (DEC) se pueden separar en 6 distintos patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC) y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (Nataro & Kaper, 1998). Además, es posible que un individuo presente estas bacterias mas no cuadro clínico, caso en el cual se les llama *E. coli* diarrogénicas no sintomáticas (DEC-NS) (Nataro & Kaper, 1998).

Los genes que se han identificado como responsables de estos tipos de virulencia se encuentran en plásmidos en la mayoría de los casos. Sin embargo, también se pueden encontrar en el genoma, en las llamadas islas de virulencia, y en algunos elementos móviles. Los genes de virulencia incluyen: genes que ayudan a la competencia en un ecosistema competitivo como la microflora intestinal, genes que codifican factores de colonización, genes que confieren alguna ventaja metabólica (como adhesinas o sideróforos), y genes productores de toxinas para el hospedero (Kaper et al., 2004; Nataro & Kaper, 1998).

Usualmente, la flora intestinal normal consiste en cientos de especies que ocupan prácticamente la totalidad de nichos posibles en su ecosistema. Esto genera un efecto barrera que impide que especies o cepas exógenas puedan colonizar el intestino (Tancredi, 1992). Las bacterias de la microflora también pueden dificultar la colonización o proliferación de especies exógenas mediante la producción de metabolitos bacteriotóxicos (Guarner & Malagelada, 2003). *E. coli* es una bacteria que forma parte de la microflora normal de mamíferos, y por lo tanto se entiende que puede participar en estos procesos. Lamentablemente, a pesar de que *E. coli* es la bacteria más estudiada, se conoce relativamente poco de su comportamiento dentro de la microflora.

Dentro de la gran variedad de toxinas que *E. coli* puede producir para competir con otras bacterias, se encuentran las microcinas. Las microcinas son péptidos de bajo peso molecular (~10 kDa) pertenecientes a la familia de las bacteriocinas. Esta familia de péptidos es capaz de resistir amplios rangos de temperatura y acidez, y son usualmente producidas durante situaciones de estrés (Duquesne et al., 2007). Las bacteriocinas tienen un efecto antimicrobiano, que comúnmente afecta a la misma familia de bacterias que las produce o a bacterias relacionadas filogenéticamente a la bacteria productora (Cotter et al., 2013).

En particular, la microcina J25 (MccJ25) (Salomón & Farías, 1992) es un péptido de 21 aminoácidos sintetizado por el ribosoma en situaciones de estrés, que muestra una alta termoestabilidad, tolerancia a acidez y resistencia a proteasas. MccJ25 es única en su mecanismo de citotoxicidad, que consiste en la obstrucción del canal secundario de la RNA

polimerasa. Las bacterias más susceptibles a MccJ25 son *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*. Estas son importantes responsables de contaminación de productos avícolas e infecciones intrahospitalarias que pueden llegar a ser letales (Baker & The, 2018; Eng et al., 2015; Galiş et al., 2013; Jones et al., 2016; Marteyn et al., 2012; Ohl & Miller, 2002; Sheikh et al., 2019). Esto hace a la MccJ25 un atractivo candidato para estudios como alternativa antibiótica.

En la actualidad se ha visto un aumento de casos clínicos de infecciones de bacterias resistentes a antibióticos de primera y segunda línea. Esto ha causado un mayor esfuerzo en la producción de nuevos antibióticos. Dado que sintetizar desde cero un antibiótico presenta dificultades, casi todos los antibióticos han sido encontrados en la naturaleza o generados mediante modificaciones a antibióticos ya existentes. Nuevos esfuerzos incluyen la búsqueda de alternativas en el mundo natural (Aminov, 2010; Clardy et al., 2009; Cotter et al., 2013). Las ventajas que podría mostrar usar péptidos antibióticos codificados en el ribosoma (como MccJ25) es la facilidad de modificación a la estructura mediante ingeniería genética y, por consiguiente la capacidad de generar variaciones que sobrelleven la resistencia antibiótica.

En el presente trabajo, se buscará producir MccJ25 mediante dos técnicas. Primero, se analizarán dos grupos de *E. coli* (DEC-NS y UPEC) en búsqueda de los genes responsables de la producción de MccJ25. Luego, se sintetizará estos genes para introducirlos y expresarlos en una bacteria de uso en laboratorio.



## **IV. Marco teórico**

### **1. Enterobacterias**

Las bacterias de la familia Enterobacteriaceae son bacilos Gram-negativos anaerobios facultativos no productores de esporas. Fermentan glucosa y otros azúcares, oxidan nitrato a nitrito y no producen oxidasa, por más que sí catalasa; y la mayoría tienen flagelo peritrico que les otorga motilidad, aunque existen excepciones. Coloquialmente se les conoce como bacterias entéricas, dado que su hábitat principal es el intestino de muchos animales. Estos términos no son sinónimos dado que muchas especies en esta familia se encuentran en otros hábitats y que muchas especies de bacterias que habitan el intestino animal no pertenecen a enterobacterias (Donnenberg, 2010).

Las enterobacterias son responsables de una gran parte de las infecciones intrahospitalarias. Las infecciones que causan incluyen infecciones del tracto urinario, sanguíneas, peritoneales y tracto respiratorio (Donnenberg, 2010).

### **2. Plásmidos**

Los plásmidos son secuencias de DNA de doble hebra extracromosomales capaces de autorreplicación que no codifican genes indispensables para supervivencia y reproducción de las bacterias en condiciones no estresantes (Carattoli, 2011, 2013; Leplae, 2003). Usualmente, codifican genes que otorgan ventajas competitivas a la bacteria que los porta, de tal forma que compensan el gasto metabólico de mantenerlos y la producción de sus proteínas asociadas. Es por esto que, por más que son independientes del material genético del huésped y no codifican genes esenciales para el crecimiento bacteriano en condiciones sin estrés, evolucionan como una parte importante del material genético de las bacterias (Carattoli, 2011). Los plásmidos también pueden ser elementos móviles si codifican un conjunto de genes que le otorgan la capacidad de producir la maquinaria necesaria para transmitirse horizontalmente, y no necesariamente se limitan a la transmisión entre bacterias de la misma especie (Thomas & Nielsen, 2005). A los plásmidos que portan sus propios genes de conjugación se les llama conjugativos o auto transmisibles (Smillie et al.,

2010), y es esta característica es la que hace de los plásmidos la principal forma de adquisición de resistencia en infecciones intrahospitalarias (Carattoli, 2013).

Por definición, los plásmidos no son factores de virulencia; los producen. Un factor de virulencia es el producto de un elemento genético que permite a un microorganismo proliferar en un organismo huésped causando daño, ya sea sistémico o de un tejido específico. Los genes de virulencia contribuyen a la progresión de la enfermedad, y pueden codificar enzimas, toxinas (o la maquinaria proteica para producirlas), glicoproteínas de pared o cápsula, factores de adherencia, etc. (Chen et al., 2005). Se ha visto que muchos plásmidos que contienen genes de resistencia poseen a su vez genes de virulencia, y, de la misma forma, que plásmidos de virulencia también poseen genes de resistencia (Thomas & Nielsen, 2005), y esta conjugación lleva por presión antibiótica a la selección de los genes de virulencia (Martínez & Baquero, 2002).

### **3. Antibióticos**

Los antibióticos son moléculas que reducen la tasa de crecimiento de bacterias (bacteriostáticos) o las matan directamente (bacteriocidas). Los antibióticos son producidos naturalmente como un mecanismo de competencia entre microorganismos, y existen desde mucho antes de su uso en la medicina moderna.

El uso extendido de antibióticos en la modernidad, la llamada era antibiótica, comenzó con Alexander Fleming y Paul Ehrlich. Alexander Fleming es responsable del descubrimiento de la penicilina, un antibiótico de amplio espectro producido por hongos del género *Penicillium*. El descubrimiento de sustancias que pudieran curar infecciones, que en 1930 era la principal causa de muerte hospitalaria, fue un hito médico que le valió el premio nobel en medicina a Fleming en 1945.

Los mecanismos de acción antibiótica son diversos, y se puede agrupar a los antibióticos en base a su mecanismo de inhibición: inhibidores de síntesis de la pared celular (beta-lactamos, polimixinas y glicopéptidos), inhibidores de síntesis de ácidos nucleicos

(inhibidores de síntesis de folato, quinolonas y rifampina) e inhibidores de síntesis proteica (inhibidores de la subunidad 50S o 30S) (Kapoor et al., 2017).

Los mecanismos de resistencia a estos antibióticos son igualmente diversos. La producción de bombas de eflujo o la reducción de la internalización de la molécula en la célula evitarían que el antibiótico llegue a concentraciones letales. También puede obtenerse resistencia mediante la mutación de la molécula blanco, haciendo inefectivo el antibiótico. Por último, se puede obtener resistencia mediante la degradación enzimática de la molécula (Kapoor et al., 2017).

En muchos casos, los genes responsables de resistencia son transmisibles horizontalmente en una población o comunidad mediante plásmidos. Esta forma de propagación es exclusiva de bombas de eflujo y enzimas que inactiven al antibiótico, pues son características que, en lugar de requerir modificación de caracteres existentes (como es la mutación de la molécula blanco del antibiótico), requieren la adición de genes (Carattoli, 2013).

Los antibióticos generan una presión de selección bastante fuerte en poblaciones bacterianas, eliminando a las poblaciones que no poseen el gen de resistencia mientras que proliferan las que sí. El uso prolongado de antibióticos en la era moderna ha llevado al rápido auge de infecciones resistentes a antibióticos, y se estima que pocos años después de la introducción de un nuevo antibiótico al mercado, ya existen cepas resistentes (Iredell et al., 2016).

#### **4. Microcina J25**

Dentro de la gran variedad de toxinas que las bacterias pueden producir para competir en su medio, se encuentran las microcinas. Las microcinas son péptidos de bajo peso molecular (10kDa) pertenecientes a la familia de las bacteriocinas; que son capaces de resistir amplios rangos de temperatura y acidez, y son usualmente producidas durante situaciones de estrés (Duquesne et al., 2007). Estas moléculas tienen efecto antimicrobiano, comúnmente afectado a la misma familia de bacterias que las produce o a bacterias relacionadas filogenéticamente a la bacteria productora.

La microcina J25 (MccJ25) es un péptido de 21 aminoácidos sintetizado por el ribosoma (Salomón & Farías, 1992) que posee una estructura secundaria exótica de nudo. El primer y el octavo residuo del extremo amino terminal se unen covalentemente, formando un anillo por el cual pasa la cola carboxilo terminal. Esta estructura es estabilizada por dos residuos aromáticos en posiciones cercanas a la porción de la cola que atraviesa el nudo. Estos crean un impedimento físico al rompimiento del nudo, y se cree que esta es la razón tras la gran termoestabilidad de la MccJ25 (Blond et al., 1999; K. Johan Rosengren et al., 2003; Wilson et al., 2003).

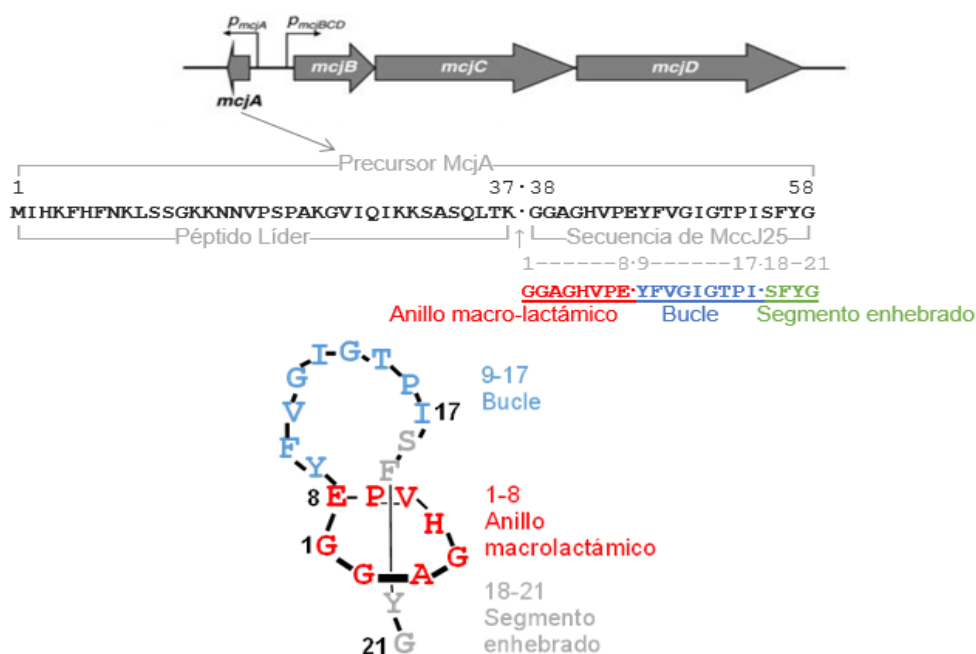


Figura 1. Determinantes genéticos y estructura de MccJ25. La parte superior de la figura muestra los genes: *mcjA*, que codifica al precursor; *mcjB* y *mcjC*, que codifican las enzimas de maduración; y *mcjD*, que codifica a la bomba de exportación. Debajo de estas se presenta la secuencia de 58 aminoácidos del peptide precursor, McjA, y sus respectivas regiones. La flecha  $\uparrow$  indica el sitio de corte por McjB. La parte inferior de la figura muestra la estructura de MccJ25 tras la modificación por las enzimas McjB-McjC (Yan et al., 2012).

La MccJ25 se sintetiza, como el resto de bacteriocinas, en situaciones de estrés, especialmente en depleción de glucosa y azufre (Pan et al., 2010; Salomón & Farías, 1992). También se ha visto que la concentración de hierro disponible puede afectar la concentración MccJ25 en el medio (Destoumieux-Garzón et al., 2005).

Los determinantes genéticos de la MccJ25 son de origen plasmídico (Salomón & Farías, 1992). En total, son necesarios 4 genes para la correcta producción de MccJ25: *mcjA*, *mcjB*, *mcjC* y *mcjD*. *mcjA* codifica un péptido precursor de 51 aminoácidos, que es luego procesado por las proteínas McjB y McjC, codificadas en los genes *mcjB* y *mcjC* respectivamente. Las modificaciones específicas que cada una de estas proteínas realiza sobre el péptido precursor no se tienen claras, Pero el resultado final es un péptido de 21 aminoácidos con un lazo. McjD es un transportador ATP-dependiente de tipo ABC, encargado de la exportación de la microcina desde el espacio intracelular al medio. La expresión de esta última proteína confiere resistencia a la MccJ25 (Duquesne et al., 2007; Solbiati et al., 1996, 1999).

La MccJ25 es un bactericida con un mecanismo de acción es único: inhibe la RNA polimerasa (Yuzenkova et al., 2002) mediante obstrucción del canal secundario de la RNA polimerasa (Adelman et al., 2004). El taponamiento de este canal impide la transcripción evitando la adición de nuevos nucleótidos durante la translación, y, por consiguiente, la producción de proteínas. Es especialmente tóxica contra enterobacterias, y se ha visto que es un potente agente microbiano contra *Shigella spp.* y *Salmonella spp.* (Portrait et al., 1999; Rintoul et al., 2001; Sable et al., 2000), que son de gran importancia industrial y médica gracias a su patogenicidad.

Estudios anteriores sugieren que *E.coli* asociada a infecciones extraintestinales, más específicamente, infecciones urinarias, tienen una mayor prevalencia de genes que codifican bacteriocinas, y la presencia de algunos de estos genes correlaciona con factores de virulencia asociados a estas infecciones (Micenková et al., 2014, 2016).

## **V. Objetivos**

### **1. Objetivo general**

Producir una clona de *E. coli* no patogénica, de fácil reproducción en laboratorio y de alta estabilidad genética, capaz de producir MccJ25 microbiológicamente activa.

### **2. Objetivos específicos**

Obtener determinantes genéticos de MccJ25 a partir de aislados clínicos de *E. coli*.

Obtener determinantes genéticos de MccJ25 mediante síntesis química.

Verificar actividad antibiótica de sobrenadante de cultivo de bacteria portadora de determinantes genéticos de MccJ25.

## **VI. Materiales y métodos**

### **1. Diseño de primadores**

Se realizó el diseño de primadores, salvo se indique lo contrario, utilizando la herramienta web Primer3 (Triinu et al., 2016), usando como parámetros del algoritmo los valores por defecto. Luego de generar oligos candidatos para primadores, se utilizó la herramienta OligoAnalyzer (Owczarzy et al., 2008) para escoger las secuencias en base a sus tendencias a no crear estructuras secundarias, homodímeros y heterodímeros, predichas según sus parámetros termodinámicos.

Lista de primadores

| Nombre              | Blanco      | Secuencia (5'→3')               | Fuente                 | Tamaño Esperado |
|---------------------|-------------|---------------------------------|------------------------|-----------------|
| <i>DmcjA-FWR</i>    | <i>mcjA</i> | GCCATAGAAAGATATAGGTGTACCA       | Duarte M. et al., 2001 | <b>166pb</b>    |
| <i>DmcjA-REV</i>    | <i>mcjA</i> | GCATTTTCATTTTAATAAACTGTCTTCTGGT | Duarte M. et al., 2001 |                 |
| <i>DmcjB-FWR</i>    | <i>mcjB</i> | GTTTCAGCATAGTGCCTGAC            | Este trabajo           | <b>535pb</b>    |
| <i>DmcjB-REV</i>    | <i>mcjB</i> | TCCCGCATATTGGGAGCATC            | Este trabajo           |                 |
| <i>DmcjC-FWR</i>    | <i>mcjC</i> | TCCACAGAGGAGATTGCCAG            | Este trabajo           | <b>728pb</b>    |
| <i>DmcjC-REV</i>    | <i>mcjC</i> | GGCTGACCTTCACCTTCTTC            | Este trabajo           |                 |
| <i>DmcjD-FWR</i>    | <i>mcjD</i> | CAACGCAAAGTCTTAACCAG            | Este trabajo           | <b>344bp</b>    |
| <i>DmcjD-REV</i>    | <i>mcjD</i> | TTCCTGAGTGAGAGCATCTTC           | Este trabajo           |                 |
| <i>McjC-Mut-FWR</i> | <i>mcjC</i> | GGTCATCTTCACAGCTAATATTCAGAATT   | Este trabajo           | -               |
| <i>McjC-Mut-REV</i> | <i>mcjC</i> | GTTTGGTTTTTTTCCAGAAAATATCTG     | Este trabajo           |                 |

Tabla SEQ Tabla \\* ARABIC 1: Primadores. La tabla muestra todos los primadores mencionados en este trabajo. La entrada "blanco" refiere al gen en el que estos oligonucleótidos hibridan, mientras que el tamaño esperado de secuencia corresponde al tamaño esperado del amplicón de la reacción de PCR si estos primadores hibridan en la posición esperada y no se generan productos incompletos o mal-apareamientos.



## 2. Diseño de plásmidos

Se realizó el diseño de plásmidos utilizando las herramientas APE (A Plasmid Editor software; por M. Wayne Davis, disponible en: <http://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>) y SnapGene Viewer (SnapGene software de GSL Biotech; disponible en [snapgene.com](http://snapgene.com)) como editores y visualizadores de secuencias. Algunas secuencias integradas en plásmidos se contrastaron con bases de datos disponibles utilizando la herramienta web BLAST (Altschup et al., 1990).

Los determinantes genéticos (el constructo de genes *mcjABCD*) se mandaron a sintetizar y subclonar a la empresa GenScript. El método de subclonación utilizado por la empresa fue el método CloneEZ (GenScript USA Inc., Piscataway, NJ, USA).

Los vectores utilizados y mencionados en este trabajo son pUC57 y pUC57-Kan (Figura 6). La diferencia entre pUC57 y pUC57-Kan es que el primero tiene un gen de resistencia a ampicilina y el segundo tiene un gen de resistencia a kanamicina en su lugar. El origen de replicación es igual en ambos (ColE1) y corresponde al comportamiento de muy alta copia (100+ copias). El sitio de inserción de secuencias está dentro del gen *lacZ*. Estos vectores se escogieron por la disponibilidad de antibióticos, disponibilidad de enzimas de restricción utilizables para futuros ensayos con estos plásmidos, y por el número de copias, que haría más fácil la obtención de grandes cantidades de este plásmido para distintas modificaciones y experimentos.

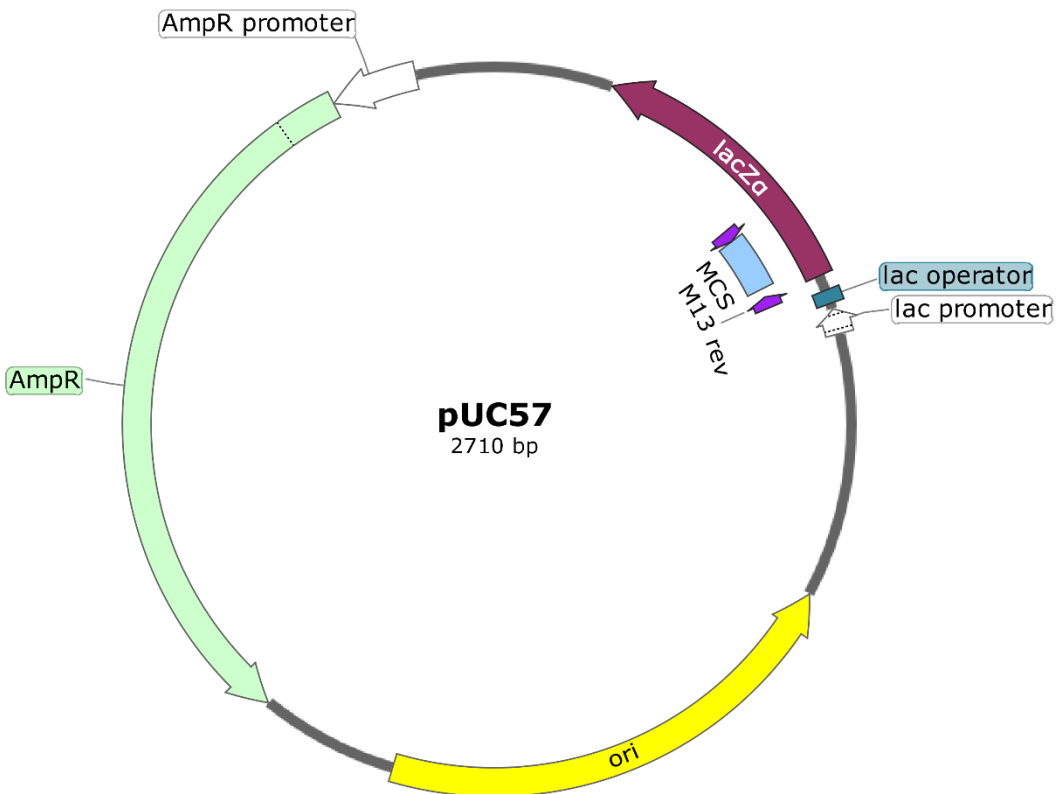


Figura 2. Plásmido pUC57. *AmpR* es un gen de resistencia a ampicilina. El origen de replicación (*ori*) es ColE1, es un origen de replicación de alta copia. El gen *lacZα*, dentro del cual se encuentra el MCS (sitio de clonación múltiple), codifica β-galactamasa. El operador y promotor *lac* controlan la producción de los genes clonados en el MCS. Mapa del plásmido obtenido de [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic\\_cloning\\_vectors&plasmid=pUC57](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pUC57).

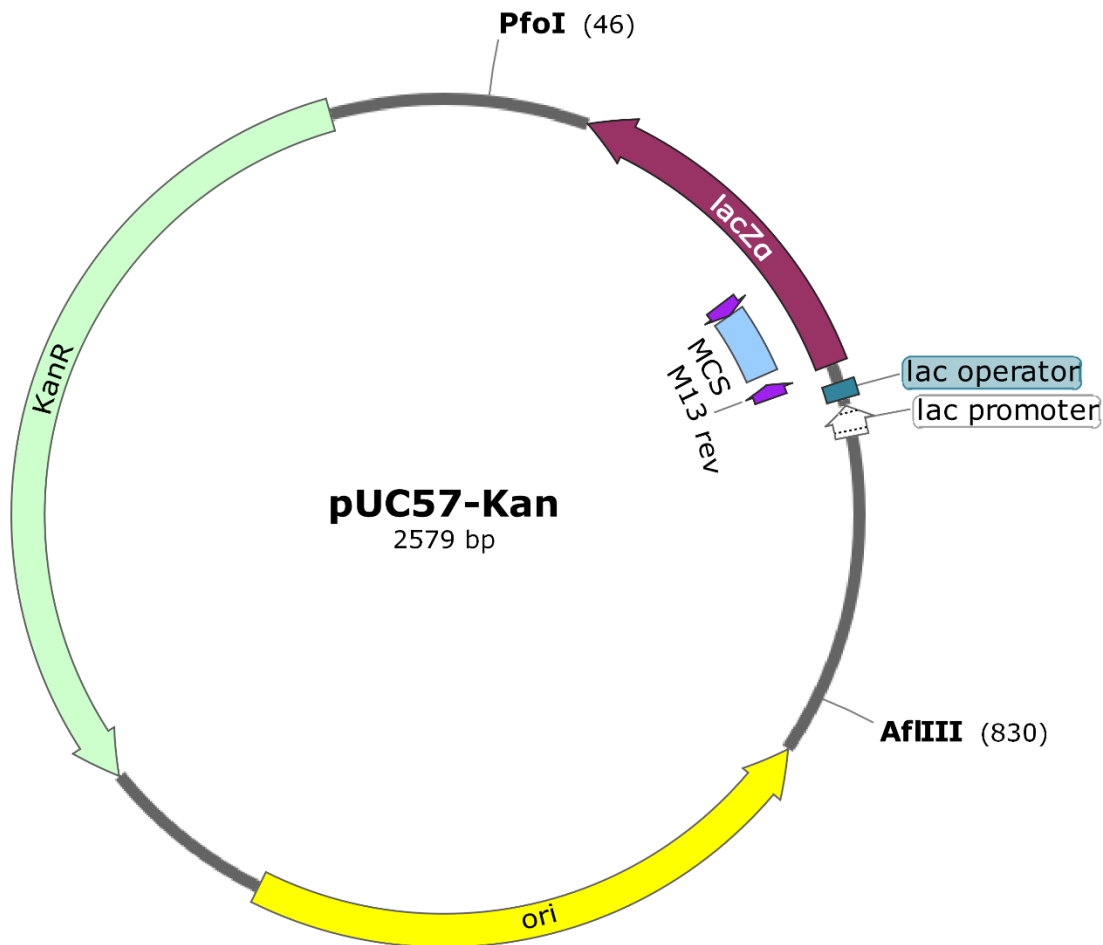


Figura 3. Plásmido pUC57-Kan. Marcadas, las posiciones de las enzimas de restricción PfoI y AflIII, entre las cuales el constructo de genes *mcjABCD* fue clonado. *KanR* es un gen de resistencia a kanamicina. El origen de replicación (*ori*) es ColE1 es un origen de replicación de alta copia. El gen *lacZα*, dentro del cual se encuentra el MCS (sitio de clonación múltiple), codifica β-galactamasa. El operador y promotor *lac* controlan la producción de los genes clonados en el MCS. Mapa del plásmido obtenido de [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic\\_cloning\\_vectors&plasmid=pUC57-Kan](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pUC57-Kan).

### **3. Cepas de *E. Coli***

#### **A. Aislados de *E. coli* a partir de muestras clínicas**

Aislados de *E. coli* crío-preservados en peptona, obtenidas originalmente de heces de pacientes asintomáticos fueron proporcionadas por la Dr. Teresa Ochoa (Laboratorio de Infectología Pediátrica, UPCH). Estos aislados fueron reanimados por siembra en agar MacConkey (Merck) preparado según lo indicado por el fabricante.

#### **B. Cepa sensible a MccJ25 de referencia (ATCC10536)**

Para ensayos microbiológicos de actividad de MccJ25, la cepa de *E. coli* ATCC10536 (<https://www.atcc.org/products/all/10536.aspx>) fue utilizada. Esta cepa fue tratada con  $\text{CaCl}_2$  para la generación de células competentes y su posterior transformación con plásmidos de resistencia antibiótica cuando fue pertinente mediante métodos estándar (Sambrook & Russell, 2006).

#### **C. NEB® Stable Competent *E. coli***

Para la producción de plásmido y la producción de MccJ25 se utilizó la cepa NEB® Stable Competent *E. coli* (NEB), que es una modificación comercial de la cepa Dh5 $\alpha$ . Las células fueron hechas competentes mediante el método de incubación con  $\text{CaCl}_2$  y recuperadas de criopreservación a  $-70^\circ\text{C}$  y transformadas con los plásmidos pertinentes usando el método de choque térmico (Sambrook & Russell, 2006).

### **4. Electroforesis**

Para la visualización de secuencias de DNA, extraídas, amplificadas o digeridas; las muestras fueron montadas en geles de TAE-agarosa y sujetas a electroforesis.

Se sometieron las muestras de electroforesis a 90 V por 50 minutos. Se utilizaron geles al 2% de agarosa en las ocasiones que el tamaño esperado de las bandas oscilaba entre 150 y 1000 pares de bases. Cuando las bandas esperadas eran de más de 1000 pares de bases, se utilizó gel de agarosa al 1%.

Se observaron las muestras utilizando como revelador Safe-Green™ (Applied Biochemical Materials Inc.) o bromuro de etidio en un transiluminador de luz azul o UV, respectivamente

## 5. PCR

Se utilizó la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para detección, amplificación y modificación de secuencias de DNA. Todas las reacciones fueron hechas con DNA polimerasa Phusion de alta fidelidad producida y purificada en el laboratorio, y las concentraciones de reactivos utilizadas fueron las recomendadas para la enzima comercial Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase por su proveedor, New England Biolabs (NEB). Las reacciones se realizaron en termociclador Veriti (Applied Biosystems). A continuación, un resumen de los volúmenes de reactivos y condiciones utilizadas.

| Reactivo                                   | Volume<br>n   |
|--------------------------------------------|---------------|
| <i>5x Phusion HF reaction buffer (NEB)</i> | <i>10μl</i>   |
| <i>dNTPs (10μM)</i>                        | <i>1μl</i>    |
| <i>Primador Delantero (10μM)</i>           | <i>2.5μl</i>  |
| <i>Primador Reverso (10μM)</i>             | <i>2.5μl</i>  |
| <i>Phusion polimerasa</i>                  | <i>0.5μl</i>  |
| <i>DNA modelo</i>                          | <i>1μl</i>    |
| <i>H<sub>2</sub>O</i>                      | <i>32.5μl</i> |
| <b>Total</b>                               | <b>50μl</b>   |

| Paso                        |                     | Tiempo          | Temperatura     |
|-----------------------------|---------------------|-----------------|-----------------|
| <i>denaturación inicial</i> |                     | <i>5:00</i>     | <i>95°C</i>     |
| <i>Ciclos x 35</i>          | <i>denaturación</i> | <i>0:15</i>     | <i>95°C</i>     |
|                             | <i>alineamiento</i> | <i>0:20</i>     | <i>variable</i> |
|                             | <i>extensión</i>    | <i>variable</i> | <i>68°C</i>     |
| <i>Extensión final</i>      |                     | <i>5:00</i>     | <i>68°C</i>     |

Tabla 2. A) Volúmenes de reactivos utilizados para PCR y cPCR. B) Condiciones utilizadas para las reacciones de PCR y cPCR.

El tiempo de extensión utilizado fue dependiente del tamaño esperado de producto para cada reacción, mientras que las temperaturas de alineamiento responden a las propiedades individuales de cada par de primadores usados.

## 6. Cribado por PCR

El protocolo utilizado para la detección de bacterias productoras de MccJ25 via PCR fue una modificación del método descrito por Duarte en 2001 (Duarte et al., 2001): Se utilizó DNA polimerasa Phusion en lugar de Taq polimerasa, el buffer utilizado se cambió para acomodarse al cambio de proteína utilizada, y el volumen total de reacción se redujo de 100  $\mu$ l a 50  $\mu$ l. Los primadores utilizados fueron los descritos por Duarte sin modificaciones (DmcjA-FWR: 5'-gccatagaaagatataggtgtacca-3' y DmcjA-REV 5'-gcattttcattttaataaaactgtcttctggta-3').

Como control positivo, se diseñó el plásmido pUC57-DP, un plásmido que contiene la secuencia de 166 pares de bases con la que los primadores DmcjA-FWR y DmcjA-REV hibridan. Esta secuencia es una porción del gen *mcjA*. Se utilizó este plásmido para la estandarización de la reacción de PCR.

Las reacciones se hicieron de la siguiente manera: A 1  $\mu$ l de DNA molde se le añadió 49  $\mu$ l de mezcla de PCR compuesta de agua ultra pura, Phusion HF Buffer (NEB), 50  $\mu$ M de cada dNTP, 0.5  $\mu$ M de cada primador y 1 U de ADN polimerasa Phusion. Para los *Colony* PCR (cPCR), las colonias fueron picadas usando una punta de pipeta de plástico estéril en 20  $\mu$ l de agua ultra pura y se hirvieron a 95 °C por 10 minutos, y 1  $\mu$ l de este caldo fue utilizado como DNA molde. Para las reacciones convencionales de PCR, 1  $\mu$ l de DNA a una concentración menor a 20ng/ $\mu$ l, extraído mediante kit de extracción plasmídica por columna de sílice, fue utilizada como DNA molde. La amplificación se hizo en un termociclador (Veriti, Applied Biosystems) y consistió en una denaturación inicial a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 20 segundos y 68°C por 20 segundos; y una extensión final a 68°C por 5 minutos. Los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 2%.

## 7. Ensayo de actividad antibiótica *Spot-on-lawn*

Se realizó el ensayo *Spot-on-lawn* para la evaluación de la actividad antibiótica de MccJ25. Para esta prueba, 10 ml de agar M63 0.58% (p/v) enriquecido con 0.1 ml de glucosa 20% (p/v), 0.01 ml de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) 1M, 0.001 ml 0.5% tiamina y 0.04 ml 10% casaminoácidos (Difco) y que contiene 0.263 ml de un cultivo de ATCC10536 a una densidad de 0.5 McFarland (lo que equivale a aproximadamente 10<sup>7</sup> UFC), fue colocada sobre una capa de 20 ml de agar M63 1.5% (p/v) previamente solidificado. Se esperó a que el gel de dos capas solidifique completamente y se colocaron 10 µl de sobrenadante incógnita y se esperó a que sea absorbido por el gel. Luego, se dejó incubando a 37 °C por 16-24 horas. Al día siguiente, se observaron las placas en búsqueda de halos de inhibición (figura 3).

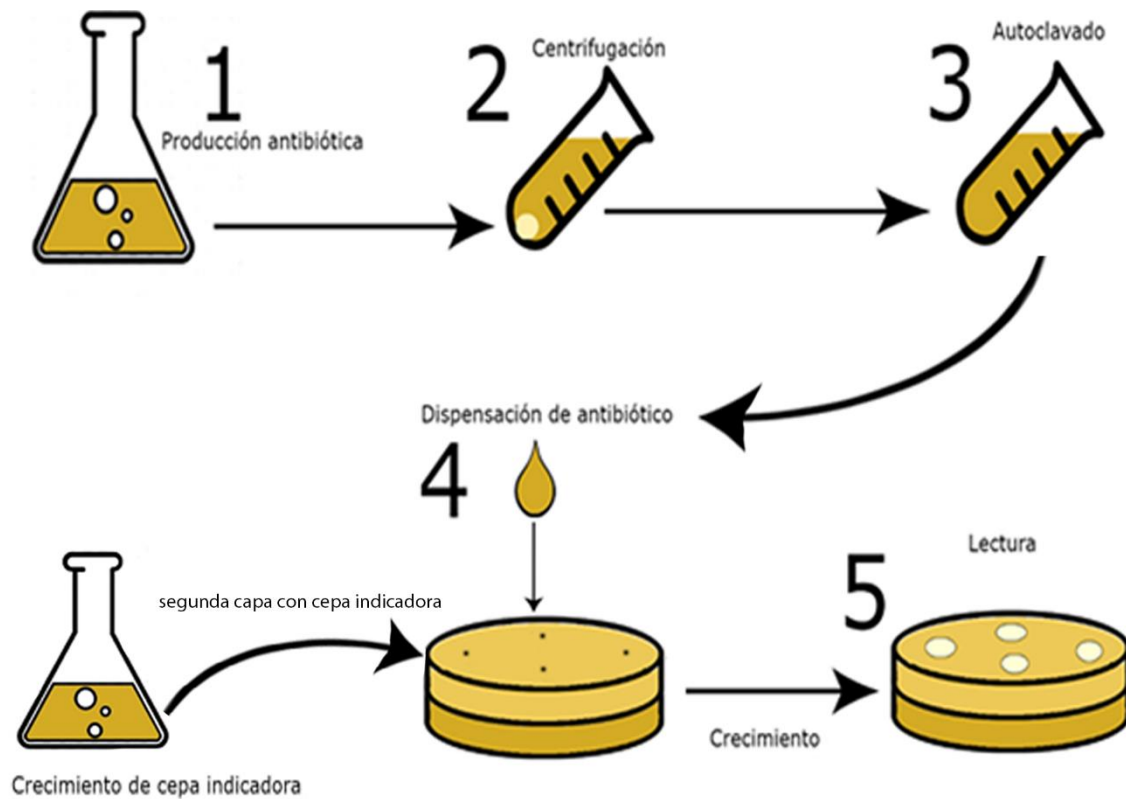


Figura 3. Diagrama de ensayo *Spot-on-lawn*. 1) Producción antibiótica: Se hace un cultivo de la bacteria productora de antibiótico. 2) Centrifugación: Se centrifuga una pequeña parte del cultivo para eliminar la biomasa bacteriana. 3) Autoclavado: Se esteriliza el sobrenadante que aun contiene bacterias productoras, resistentes al antibiótico. 4) Dispensación de antibiótico: Gotas de 10  $\mu$ l del sobrenadante autoclavado son colocadas en posiciones discretas sobre una placa con 2 capas de agar. La capa inferior es una capa de M9-agar 1.5%, mientras que la capa superior es una capa de LB-agar 0.8% a la que se le adicionó bacteria indicadora a 0.5 en la escala de McFarland. 5) Lectura: Esta placa se deja incubando por 16 horas a 37 °C. Pasado este tiempo, se examina la placa en busca de halos de inhibición de crecimiento de la bacteria indicadora.



## VII. Resultados

### 1. Cribado por PCR de bacterias provenientes de muestras clínicas.

Se analizaron un total de 126 aislados (Tabla 3) proporcionados por el laboratorio de Infectología Pediátrica de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID). Estos 126 aislados fueron sometidos al cPCR diagnóstico previamente descrito. Como control positivo de la reacción de PCR y de PCR a partir de colonias se utilizó Neb Stable® transformada con el plásmido pDPA (anexo 1), que contiene un inserto únicamente de la secuencia reconocida por los primadores DmcjA-FWR y DmcjA-REV.

| Aislado |                        | Aislado |                        |
|---------|------------------------|---------|------------------------|
| 1       | EE - 121 C1 02/03/2015 | 64      | EE - 240 C3 20/02/2015 |
| 2       | EE - 121 C3 02/03/2015 | 65      | EE - 240 C4 21/02/2016 |
| 3       | EE - 121 C4 02/03/2015 | 66      | EE - 240 C4 20/02/2015 |
| 4       | EE - 121 C6 02/03/2015 | 67      | EE - 240 C7 20/07/2015 |
| 5       | EE - 121 C7 02/03/2015 | 68      | EE - 241 C2 08/11/2014 |
| 6       | EE - 130 C2 02/03/2015 | 69      | EE - 241 C3 08/12/2014 |
| 7       | EE - 130 C3 02/03/2015 | 70      | EE - 241 C3 20/02/2015 |
| 8       | EE - 130 C4 02/03/2015 | 71      | EE - 241 C6 20/02/2015 |
| 9       | EE - 130 C6 02/03/2015 | 72      | EE - 243 C1 21/01/2015 |
| 10      | EE - 135 C1 22/04/2015 | 73      | EE - 243 C1 22/01/2015 |
| 11      | EE - 135 C2 22/04/2015 | 74      | EE - 243 C2 22/01/2015 |
| 12      | EE - 135 C3 22/04/2015 | 75      | EE - 243 C2 22/01/2015 |
| 13      | EE - 135 C4 22/04/2015 | 76      | EE - 243 C2 23/01/2015 |
| 14      | EE - 135 C5 22/04/2015 | 77      | EE - 243 C2 24/01/2015 |
| 15      | EE - 135 C7 22/04/2015 | 78      | EE - 243 C2 21/01/2015 |
| 16      | EE - 141 C1 22/04/2015 | 79      | EE - 243 C2 22/01/2015 |
| 17      | EE - 141 C2 22/04/2015 | 80      | EE - 243 C3 22/01/2016 |
| 18      | EE - 141 C3 22/04/2015 | 81      | EE - 243 C3 21/01/2015 |
| 19      | EE - 141 C4 22/04/2015 | 82      | EE - 243 C3 22/01/2015 |
| 20      | EE - 141 C5 22/04/2015 | 83      | EE - 243 C4 21/01/2015 |
| 21      | EE - 141 C6 22/04/2015 | 84      | EE - 243 C5 21/01/2015 |
| 22      | EE - 146 C1 02/03/2015 | 85      | EE - 243 C5 22/01/2015 |
| 23      | EE - 146 C2 02/03/2015 | 86      | EE - 243 C6 21/01/2015 |
| 24      | EE - 146 C4 02/03/2015 | 87      | EE - 243 C6 22/01/2015 |
| 25      | EE - 146 C6 02/03/2015 | 88      | EE - 243 C7 21/01/2015 |
| 26      | EE - 146 C7 02/03/2015 | 89      | EE - 243 C7 22/01/2015 |
| 27      | EE - 150 C1 02/03/2015 | 90      | EE - 244 C3 22/01/2016 |

|    |                        |     |                        |
|----|------------------------|-----|------------------------|
| 28 | EE - 150 C2 02/03/2015 | 91  | EE - 245 C2 22/01/2017 |
| 29 | EE - 150 C3 02/03/2015 | 92  | EE - 245 C3 22/01/2018 |
| 30 | EE - 150 C4 02/03/2015 | 93  | U015 30/11/2012        |
| 31 | EE - 150 C5 02/03/2015 | 94  | U023 04/12/2012        |
| 32 | EE - 150 C6 02/03/2015 | 95  | U027 12/12/2012        |
| 33 | EE - 151 C1 22/04/2015 | 96  | U038 20/12/2012        |
| 34 | EE - 151 C3 22/04/2015 | 97  | U048 04/01/2013        |
| 35 | EE - 151 C4 22/04/2015 | 98  | U055 12/01/2013        |
| 36 | EE - 151 C5 22/04/2015 | 99  | U057 11/01/2013        |
| 37 | EE - 151 C6 22/04/2015 | 100 | U080 12/02/2013        |
| 38 | EE - 151 C7 22/04/2015 | 101 | U120 27/03/2013        |
| 39 | EE - 205 C2 13/01/2015 | 102 | U141 15/04/2013        |
| 40 | EE - 209 C3 20/02/2015 | 103 | U169 08/05/2013        |
| 41 | EE - 209 C3 20/02/2015 | 104 | U173 14/05/2013        |
| 42 | EE - 209 C4 20/02/2015 | 105 | U179 20/05/2013        |
| 43 | EE - 211 C7 07/02/2015 | 106 | U182 22/05/2013        |
| 44 | EE - 212 C2 13/03/2015 | 107 | U191 05/16/2013        |
| 45 | EE - 212 C2 14/03/2015 | 108 | U196 14/12/2012        |
| 46 | EE - 212 C2 15/03/2015 | 109 | U198 11/06/2013        |
| 47 | EE - 212 C2 16/03/2015 | 110 | U208 21/06/2013        |
| 48 | EE - 212 C7 13/03/2015 | 111 | U210 24/06/2013        |
| 49 | EE - 216 C1 09/01/2015 | 112 | U212 26/06/2013        |
| 50 | EE - 216 C2 09/02/2015 | 113 | U221 03/07/2013        |
| 51 | EE - 216 C3 09/02/2015 | 114 | U226 10/07/2017        |
| 52 | EE - 221 C1 21/01/2014 | 115 | U227 19/07/2013        |
| 53 | EE - 221 C1 21/01/2015 | 116 | U234 27/07/2013        |
| 54 | EE - 223 C2 12/02/2015 | 117 | U235 30/07/2013        |
| 55 | EE - 223 C5 12/03/2015 | 118 | U240 06/08/2013        |
| 56 | EE - 227 C4 12/01/2015 | 119 | U253 15/08/2013        |
| 57 | EE - 227 C6 12/02/2015 | 120 | U260 29/08/2013        |
| 58 | EE - 228 C1 20/02/2015 | 121 | U273 10/10/2013        |
| 59 | EE - 235 C2 18/12/2014 | 122 | U279 10/09/2013        |
| 60 | EE - 235 C3 18/12/2015 | 123 | U282 29/08/2013        |
| 61 | EE - 239 C2 19/12/2014 | 124 | U288 19/09/2013        |
| 62 | EE - 239 C2 19/12/2015 | 125 | U292 19/09/2013        |
| 63 | EE - 240 C2 20/02/2015 | 126 | U293 19/09/2013        |

Tabla 3. Lista de aislados de *E. coli* extraídos de pacientes asintomáticos que mostraron crecimiento tras incubación de 16h a 37°C en agar MacConkey. Aislados con la etiqueta "EE" corresponden a aislados identificados como *E. coli* entero-diarrogénicas, mientras que las marcadas con "U" corresponden a *E. coli* uropatogénicas.

De los 126 aislados analizados, 122 dieron resultados negativos a la reacción de PCR. Cuatro de ellos, 26, 34, 44 y 46, mostraron una banda a la altura esperada en el ensayo (Figura 4b), sin embargo, estos resultados no se pudieron replicar una vez que las colonias fueron repicadas.

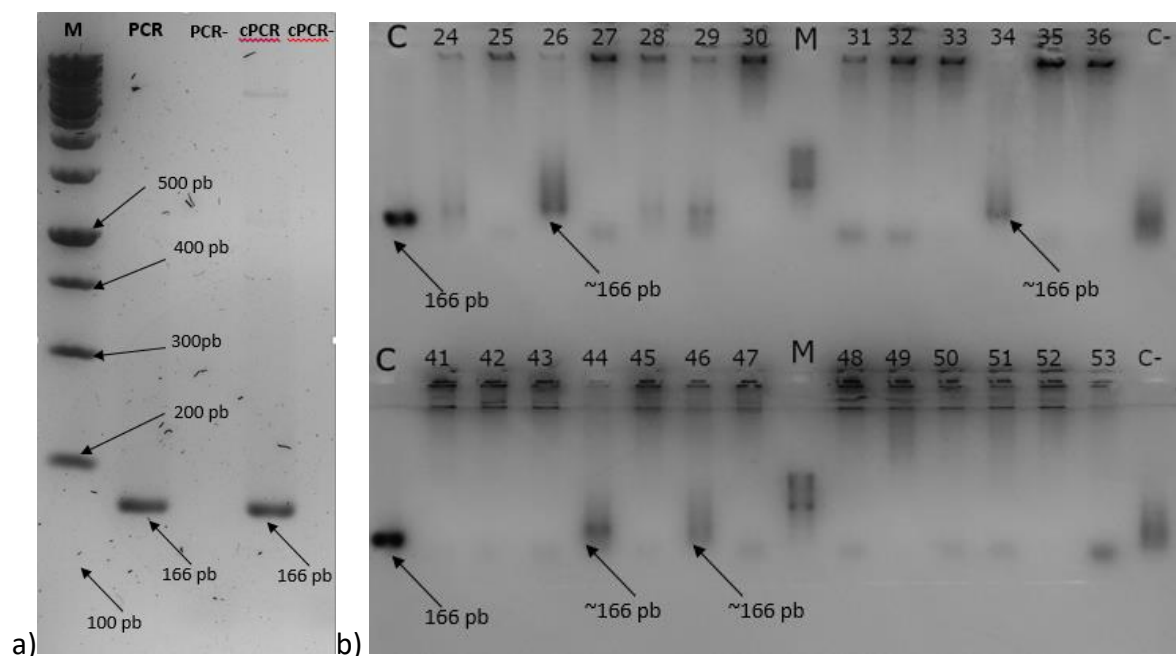


Figura 4. a) Gel de TAE-agarosa a 2%. Carriles PCR y cPCR corresponden a reacciones de PCR (usando los primadores DmcjA-FWR y DmcjA-REV) usando como DNA molde un extracto de plásmido pDPA (anexo 1), que contiene solo la región que reconocen los primadores utilizados (carril PCR) y una bacteria transformada con ese plásmido según el protocolo de *Colony PCR* (carril cPCR). Carriles PCR- y cPCR- corresponden a los controles negativos de las reacciones de los carriles PCR y cPCR respectivamente. El marcador (carril "M") utilizado fue GeneRuler® 100bp. Presencia de bandas en los carriles PCR y cPCR muestra que los primadores funcionan correctamente, y no hay inhibición de la reacción de PCR usada. b) Gel de TAE-agarosa a 2% representativo de ensayos de cPCR de los aislados de *E. coli* de muestras fecales. El marcador (M) utilizado fue GeneRuler™ 100 bp (Thermo Scientific™). Los carriles "C" corresponden a la reacción de PCR en la que se usó como DNA blanco el plásmido pDPA (anexo 1). Carriles "C-" corresponden a reacciones de PCR en las que no se colocó DNA blanco. Los carriles marcados numéricamente corresponden a reacciones de cPCR de diagnóstico para los aislados rotulados en la Tabla 3. Carriles marcados con

\* corresponden a carriles con banda a la altura esperada para el ensayo (~166).

Usando estos 4 aislados, se repitieron ensayos de diagnóstico por cPCR. Solo el aislado 44 mostró la banda vista en la Figura 4 en estos ensayos posteriores. Por esto, se le sometió a un ensayo adicional. Se extrajo DNA plasmídico a partir de un cultivo de 10 ml de esta bacteria en medio LB incubado por 16 h a 37°C. Este extracto fue utilizado como DNA molde para una reacción de PCR diagnóstico utilizando los primadores DmcjA-FWR y DmcjA-REV (Tabla 1), y esta reacción fue revelada en un gel de TAE-agarosa al 1% (Figura 5). Este ensayo, no obstante, no mostró la banda esperada en el gel.

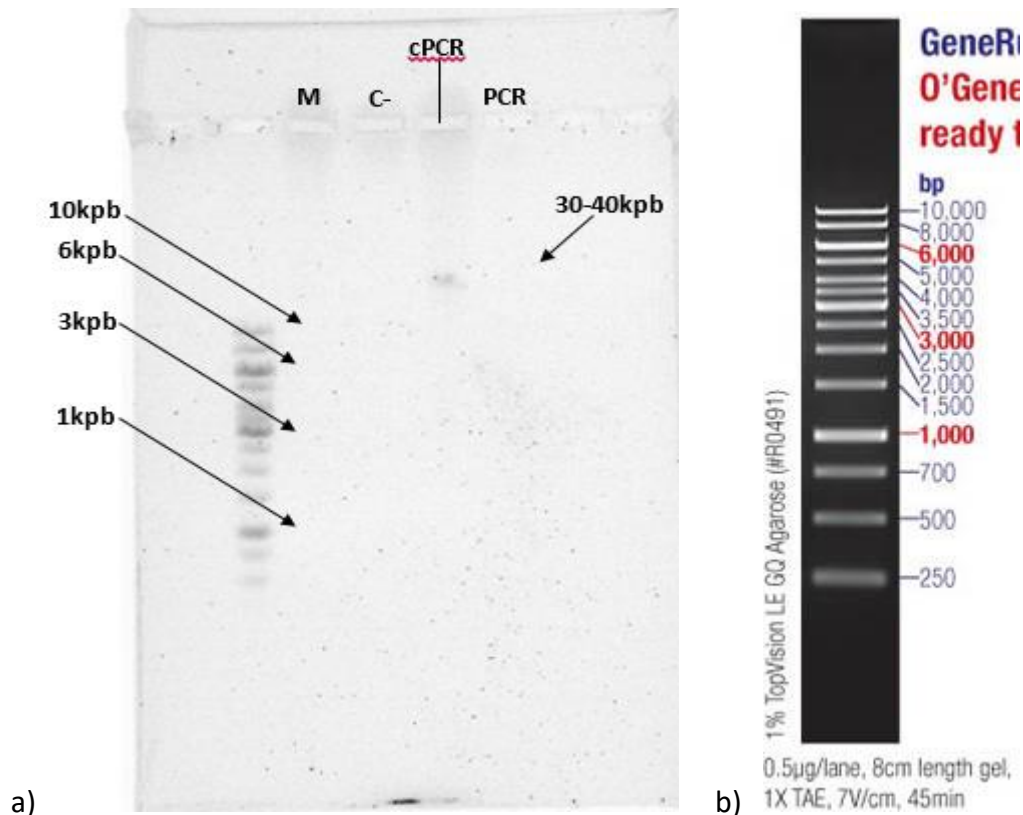


Figura 5. a) Gel TAE-agarosa al 1% x90v x60m. Carriles: M, marcador GeneRuler™ 1kb (Thermo Scientific™); C-, control negativo de reacción de cPCR; cPCR, carril con reacción *colony* PCR del aislado EE – 212 C2 13/03/2015; PCR, carril con reacción de PCR utilizando DNA extraído de un

cultivo de 10ml de medio LB incubado a 37°C x 16h. b) Diagrama de bandas del marcador GeneRuler™ 1bk (Thermo Scientific™).

La presencia de una banda > 10 Kpb (probablemente ~30 kpb) sugiere que la extracción plasmídica fue exitosa, y que el aislado 44 es portador de un plásmido. Sin embargo, la ausencia de banda cerca a la altura de 160 bp (indicada) muestra que el PCR no fue exitoso, lo que significa que el DNA extraído no contiene la secuencia buscada (el gen *mcjA*).

## **2. Obtención de determinantes genéticos de MccJ25 mediante síntesis química del plásmido pKM1.**

Visto que la primera aproximación utilizada para la obtención de los determinantes genéticos de la MccJ25 no dio resultados positivos, se siguió con el diseño de un plásmido que contenga los genes responsables de la producción de MccJ25 y se mandó a sintetizar al proveedor GenScript. A este plásmido se le nombró pKM1 (Figura 6).

Se usó el vector pUC57-Kan Para construir el plásmido pKM1. Se eligió este vector porque su resistencia permitiría su uso en conjunto con otros plásmidos y por su alto número de copias, que haría fácil la obtención de grandes cantidades de plásmido extraído, que posteriormente podría ser utilizado para reacciones de PCR, corte y aislamiento de los genes de MccJ25, posteriores subclonamiento de genes en el vector u otros procedimientos en biología molecular. Se utilizó la secuencia reportada por Salomón y Farías en 1999 (GeneBank: AF061787.1). A esta secuencia se le hicieron 12 modificaciones para la generación de secuencias de restricción en las regiones más distales de la secuencia, con el fin de ser capaces de retirar esta secuencia e insertarla en otros plásmidos si así fuera necesario mediante digestión con enzimas de restricción. Estos cambios menores se hicieron lo más alejado posible a las secuencias codantes de los genes *mcjABCD* para replicar lo más posible el plásmido pTUC100, del cual esta secuencia fue obtenida. Dado que los autores originales reportaron producción de MccJ25 usando esta secuencia sin la adición de terminadores, tampoco se añadieron para la generación del plásmido pKM1. La

secuencia completa del inserto que contiene los genes *mcjA*, *mcjB*, *mcjC* y *mcjD* y la secuencia completa del plásmido pKM1 en los anexos 2 y 3 respectivamente.

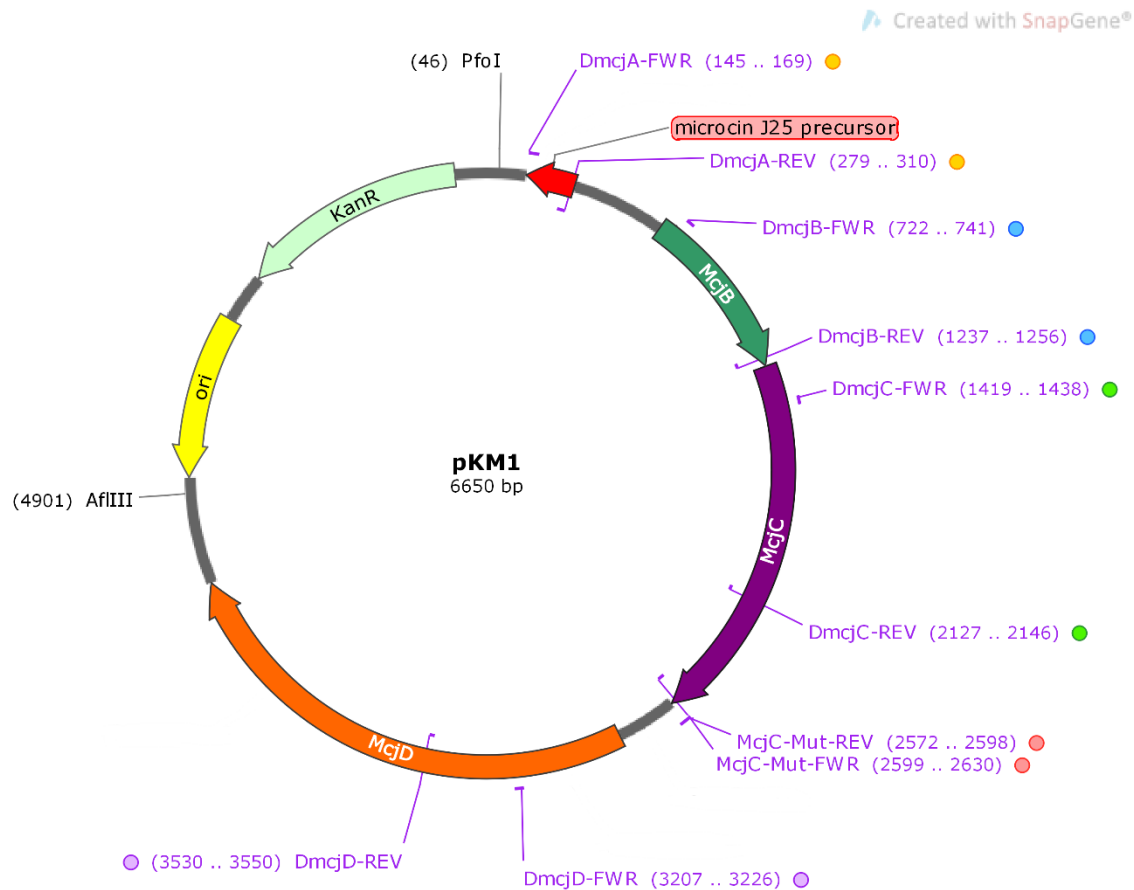


Figura 6. Esquema del plásmido pKM1 y la posición de los primadores de la Tabla 1. El origen de replicación (ori) es ColE1, un origen de replicación de alta copia. El casete *mcjABCD* fue clonado entre los sitios de restricción PfoI y AflIII del vector pUC57-Kan (Figura 2) que se muestran en esta imagen. El gen *mcjA* codifica el precursor de 50 aminoácidos de MccJ25. Genes *mcjB* y *mcjC* codifican proteínas de maduración del péptido precursor de MccJ25. Por último, *mcjD* codifica una bomba de eflujo de MccJ25 que le otorga resistencia a la bacteria frente a ella.

Se transformó una bacteria NEB® Stable Competent *E. coli* con el plásmido pKM1 (Figura 6). Para verificar la presencia de los 4 genes de microcina, 3 pares de primadores de diagnóstico adicionales fueron diseñados para la detección de los genes *mcjB*, *mcjC* y *mcjD* (primadores

DmcjB-FWR y DmcjB-REV, DmcjC-FWR y DmcjC-REV, y DmcjD-FWR y DmcjD-REV respectivamente. Ver tabla 1). Estos primadores fueron diseñados de tal forma que las temperaturas de hibridación fueran todas cercanas entre sí y no produjeran heterodímeros para poder ser usados en reacciones múltiples de PCR, produciendo 4 amplicones de tamaño diferenciable en geles de agarosa al 2% usando el mismo protocolo de PCR que los primadores DmcjA-FWR y DmcjA-REV (Figura 7).

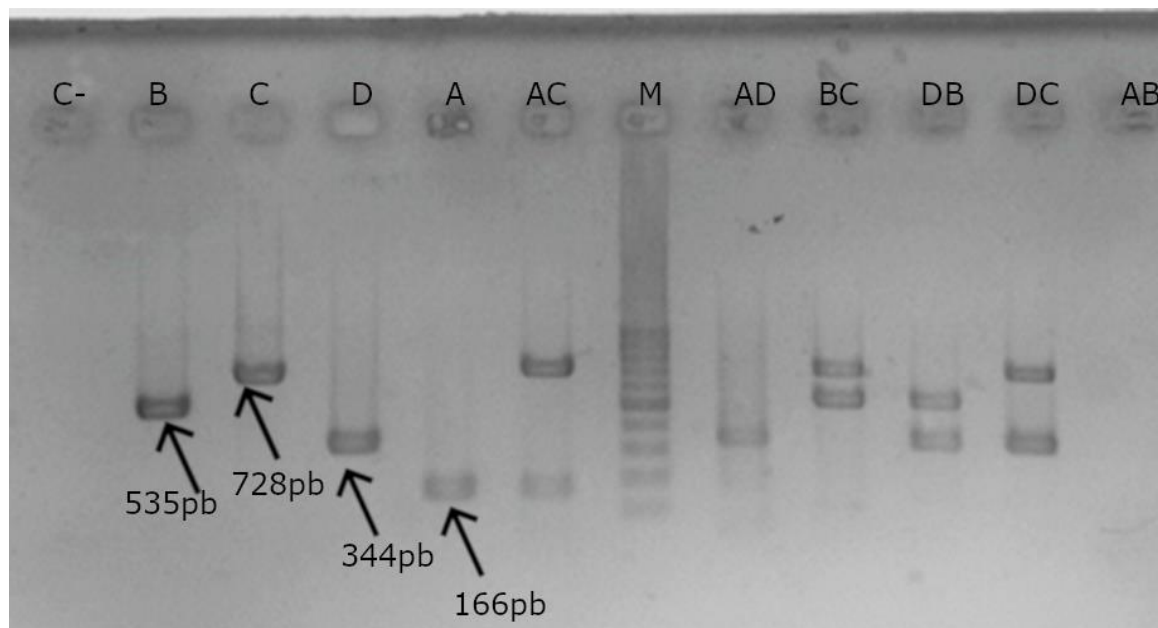


Figura 7. Gel de agarosa al 2% x90V x60m. (M) GeneRuler™ 100bp (Thermo Scientific™). (C-) control negativo. Carriles marcados con código pertinente al par o pares de primadores utilizados en la reacción de PCR (A corresponde a DmcjA, B corresponde a DmcjB, C corresponde a DmcjC y D corresponde a DmcjD. Carriles marcados con más de una letra corresponden a reacciones de PCR múltiple usando los pares de primadores antes descritos. Secuencias y nomenclatura completa de primadores en Tabla 1. Ubicación de los primadores en los genes se ve en Figura 6) utilizando pKM1 extraído cargada en cada carril. Las bandas corresponden al producto de amplificación de PCR de los genes *mcjA*, *mcjB*, *mcjC* y *mcjD*. Los carriles de PCR múltiple tienen dos bandas, que corresponden a las bandas esperadas, lo que muestra que los primadores funcionan individualmente y en reacción múltiple a las mismas condiciones de reacción y sin reducir el poder de detección.

El plásmido pKM1 dio positivo a las reacciones de PCR para los genes *mcjA*, *mcjB*, *mcjC* y *mcjD* antes descritas (Figura 7), lo que demuestra que el plásmido tiene los 4 genes

responsables de la producción y maduración de MccJ25 y no tiene errores mayores en la secuencia.

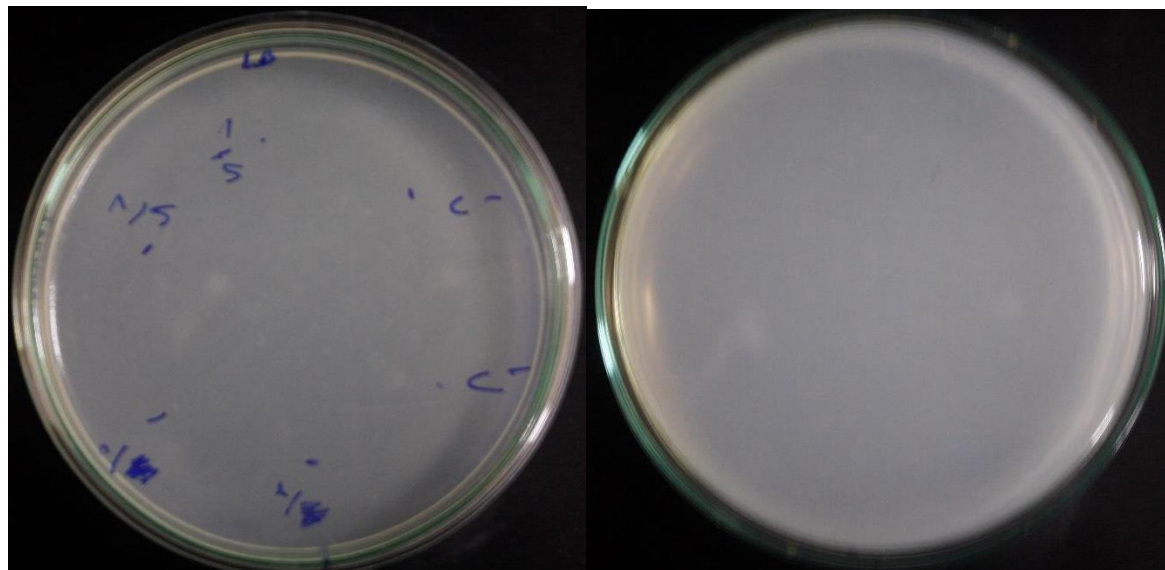
### **Verificación de actividad antibiótica de sobrenadante de cultivo de bacteria transformada con pKM1.**

Se siguió con el ensayo *Spot-on-lawn* para verificar la producción de MccJ25 de bacterias transformadas con el plásmido pKM1. Se obtuvo sobrenadante de cultivos de 10 ml de esta bacteria mediante centrifugación (13 kRPM por 8 min) y se autoclavó para asegurar su esterilidad. Los cultivos se incubaron en agitación vigorosa (220 RPM) durante 24 horas a 37°C. La cepa *E. coli* ATCC10536 fue utilizada como cepa indicadora, susceptible a microcina J25.

Como cepa indicadora se intentó utilizar una cepa de uso común como cepa de referencia, la ATCC 25922 (Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/25922.aspx#generalinformation>) usando un sobrenadante que se sabía contenía MccJ25. Esta cepa no mostró halos de inhibición en el ensayo, así que se procedió a probar utilizando la cepa ATCC 10536 (Disponible en: [https://www.atcc.org/en/Products/Cells and Microorganisms/By Focus Area/Clinical/Antimicrobial Resistance/10536.aspx](https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/By_Focus_Area/Clinical/Antimicrobial_Resistance/10536.aspx)). Esta segunda cepa sí mostró halos de inhibición, por lo que fue utilizada como cepa indicadora en todos los ensayos de *Spot-on-lawn* posteriores. Ambas cepas, ATCC 10536 y ATCC 25922 fueron generosamente donadas por Dora Maurtua.

Ninguno de los sobrenadantes mostró actividad antibiótica denotada por halos de inhibición esperados en el ensayo. Se probaron pequeñas variaciones del ensayo, modificando temperaturas de crecimiento, tiempo de incubación de los cultivos,





Se analizó la secuencia de los genes utilizados en la producción de microcina usando el programa BLAST. Este análisis mostró que entradas más recientes de secuencias del paquete de los 4 genes responsables de la biosíntesis de MccJ25 no eran 100% idénticas a la reportada en GeneBank (número de acceso: AF061787.1) (Figura 9). Esta diferencia se encontró en el gen *mcjC*, por lo que se procedió a la búsqueda de la proteína McjC en la base de datos de proteínas Uniprot ([www.Uniprot.org](http://www.Uniprot.org), Uniprot: Q9X2V9). Así, vimos que la secuencia del gen *mcjC*, que codifica a la proteína de maduración de MccJ25, se había corregido en el 2005 por Duquesne S. V (Número de acceso en ENA: AM116873.1) (Figura 10).

RID [5HHNTU7J015](#) (Expires on 01-13 21:31 pm)

Query ID [IdlQuery\\_83503](#)

Description [mcjabc](#)

Molecule type [nucleic acid](#)

Query Length [4432](#)

Database Name [nr](#)

Description [Nucleotide collection \(nt\)](#)

Program [BLASTN 2.7.1+ ▶ Citation](#)

Other reports: [▶ Search Summary](#) [\[Taxonomy reports\]](#) [\[Distance tree of results\]](#) [\[MSA viewer\]](#)

**Graphic Summary**

**Descriptions**

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[AT](#) [Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

|                          | Description                                                                                                                                   | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession                  |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| <input type="checkbox"/> | <a href="#">Escherichia coli strain CRE1540 plasmid p1540-4, complete sequence</a>                                                            | 8185      | 8185        | 100%        | 0.0     | 100%  | <a href="#">CP019055.1</a> |
| <input type="checkbox"/> | <a href="#">Escherichia coli plasmid pC59-153, complete sequence</a>                                                                          | 8185      | 8185        | 100%        | 0.0     | 100%  | <a href="#">KJ484636.1</a> |
| <input type="checkbox"/> | <a href="#">Escherichia coli O25b:ST131 str. JIE186 plasmid pJIE186-2, complete sequence</a>                                                  | 8185      | 8185        | 100%        | 0.0     | 100%  | <a href="#">JX077110.1</a> |
| <input type="checkbox"/> | <a href="#">Escherichia coli plasmid pTUC100 microcin J25 precursor (mcjA), McjB (mcjB), McjC (mcjC), and McjD (mcjD) genes, complete cds</a> | 8104      | 8104        | 100%        | 0.0     | 99%   | <a href="#">AF061787.1</a> |
| <input type="checkbox"/> | <a href="#">Escherichia coli strain C8 plasmid B, complete genome</a>                                                                         | 8091      | 8091        | 100%        | 0.0     | 99%   | <a href="#">CP010127.1</a> |
| <input type="checkbox"/> | <a href="#">Escherichia coli plasmid pMRY16-002_1 DNA, complete genome, strain: 20Ec-P-124</a>                                                | 7664      | 7664        | 100%        | 0.0     | 98%   | <a href="#">AP017611.1</a> |
| <input type="checkbox"/> | <a href="#">Escherichia coli pTUC202 plasmid mcjC gene for microcin J25 processing protein</a>                                                | 2841      | 2841        | 34%         | 0.0     | 99%   | <a href="#">AM116873.1</a> |

Figura 9. Resultado de la búsqueda mediante BLAST del casete *mcjABCD*. La secuencia original reportada por Salomón y Farías (AN: AF061787.1) muestra 99% de identidad.

a)

|            |      |                                                    |      |
|------------|------|----------------------------------------------------|------|
| AF061787.1 | 2451 | TCGTTATCCCGTTCGTTATGAAGCGTTTCAACGATTTGGTTCAGATATTT | 2500 |
|            |      |                                                    |      |
| AM116873.1 | 1251 | TCGTTATCCCGTTCGTTATGAAGCGTTTCAACGATTTGGTTCAGATATTT | 1300 |
| AF061787.1 | 2501 | TCTGGAAAAAAACCAAACGGTCATCTTCATCATGACTAATATTCAGAATT | 2550 |
|            |      |                                                    |      |
| AM116873.1 | 1301 | TCTGGAAAAAAACCAAACGGTCATCTTCA-CA--GCTAATATTCAGAATT | 1347 |
| AF061787.1 | 2551 | CTATCCGGTAAAAAGGATGAACTAGTGAATACAATAAAACAGTCAGGATT | 2600 |
|            |      |                                                    |      |
| AM116873.1 | 1348 | CTATCCGGTAAAAAGGATGAACTAGTGAATACAATAAAACAGTCAGGATT | 1397 |

b)

|            |     |                                                    |     |
|------------|-----|----------------------------------------------------|-----|
| AF061787.1 | 251 | NKNINFNEKLYFNLNPNSPDEIPLIFEQTDEEGEGQPPIDDDLLYLCGHG | 300 |
|            |     |                                                    |     |
| AM116873.1 | 251 | NKNINFNEKLYFNLNPNSPDEIPLIFEQTDEEGEGQPPIDDDLLYLCGHG | 300 |
| AF061787.1 | 301 | GDHIFGQNPSELFGIDAYRSHGLMFMHKKIVEFSNLKGKRYKDIIFSNI  | 350 |
|            |     |                                                    |     |
| AM116873.1 | 301 | GDHIFGQNPSELFGIDAYRSHGLMFMHKKIVEFSNLKGKRYKDIIFSNI  | 350 |
| AF061787.1 | 351 | AFINTSNGCSPAKQEHVSDMKLASAQFFATDYGKINKLTPFLHKNIIQH  | 400 |
|            |     |                                                    |     |
| AM116873.1 | 351 | AFINTSNGCSPAKQEHVSDMKLASAQFFATDYGKINKLTPFLHKNIIQH  | 400 |
| AF061787.1 | 401 | YAGLPVFSLFNQHFDRYPVRYEAFQRFSGDIFWKTKRSSSS-----     | 442 |
|            |     |                                                    |     |
| AM116873.1 | 401 | YAGLPVFSLFNQHFDRYPVRYEAFQRFSGDIFWKTKRSSSQIFRILSG   | 450 |
| AF061787.1 | 443 | -----                                              | 442 |
| AM116873.1 | 451 | KKDELVNTIKQSGLIEILGINHIELESILYENTTTRLTMELPYILNLYRL | 500 |
| AF061787.1 | 443 | -----                                              | 442 |
| AM116873.1 | 501 | AKFIQLQSIDYKG                                      | 513 |

Figura 10. Sección del alineamiento (realizado con la herramienta EMBOSS Needle (Madeira et al., 2019)) de un fragmento de la secuencia reportada originalmente de *mcjC* (AF061787.1) y un fragmento de la secuencia corregida por Duquesne (AM116873.1). La secuencia alineada corresponde sección final del gen *mcjC*. Las mutaciones fueron: CAJ40934.1:g1323\_1324insT, CAJ40934.1:g1325\_1326insTG y CAJ40934.1:g1326G>A. Estas mutaciones generan un codón de terminación en la posición 1326 de los 1542 nucleótidos del gen *mcjC*, y la pérdida de los aminoácidos a causa de esta mutación no permite la correcta producción de

Mccj25 en el medio. a) alineamiento de DNA de *mcjC*. b) alineamiento de aminoácidos de *mcjC* (AF061787.1) y *mcjC'* (AM116873.1).

### **3. Síntesis de plásmido pKM2 mediante corrección por mutagénesis dirigida de pKM1 mediada por PCR.**

Se corrigió el plásmido pKM1 mediante mutagénesis dirigida mediada por PCR, y al producto de esta mutagénesis se le llamó pKM2 (Figura 11). Se usaron los primadores *mcjC*-Mut-FWR (5'-ggtcattcttcacagctaattcagaatt-3') y *mcjC*-Mut-REV (5'-gtttgggtttttccagaaaatatctg-3') (Tabla 1) (Figura 12). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: denaturación inicial a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 58°C por 20 segundos y 68°C por 200 segundos; y una extensión final a 68°C por 5 minutos. Se utilizó 58°C como temperatura de alineamiento por el apareamiento incompleto presente en CMF. Sin este apareamiento incompleto, la temperatura de alineamiento sube a 61°C.

Una vez terminado el PCR, se procedió a la limpieza del DNA molde. 2 ul de la reacción de PCR fueron colocados en un microtubo de PCR junto con 1 ul de buffer T4 ligasa, 1 ul de T4 ligasa, 1 ul de DpnI y 1 ul de PNK en un volumen total de 10 ul y la reacción se dejó a temperatura ambiente por 2 horas. Pasado este tiempo, 5 ul fueron utilizados para la transformación de NEB® Stable Competent *E. coli* quimiocompetente y se sembró en agar LB suplementado con kanamicina a 50 µl/100ml.

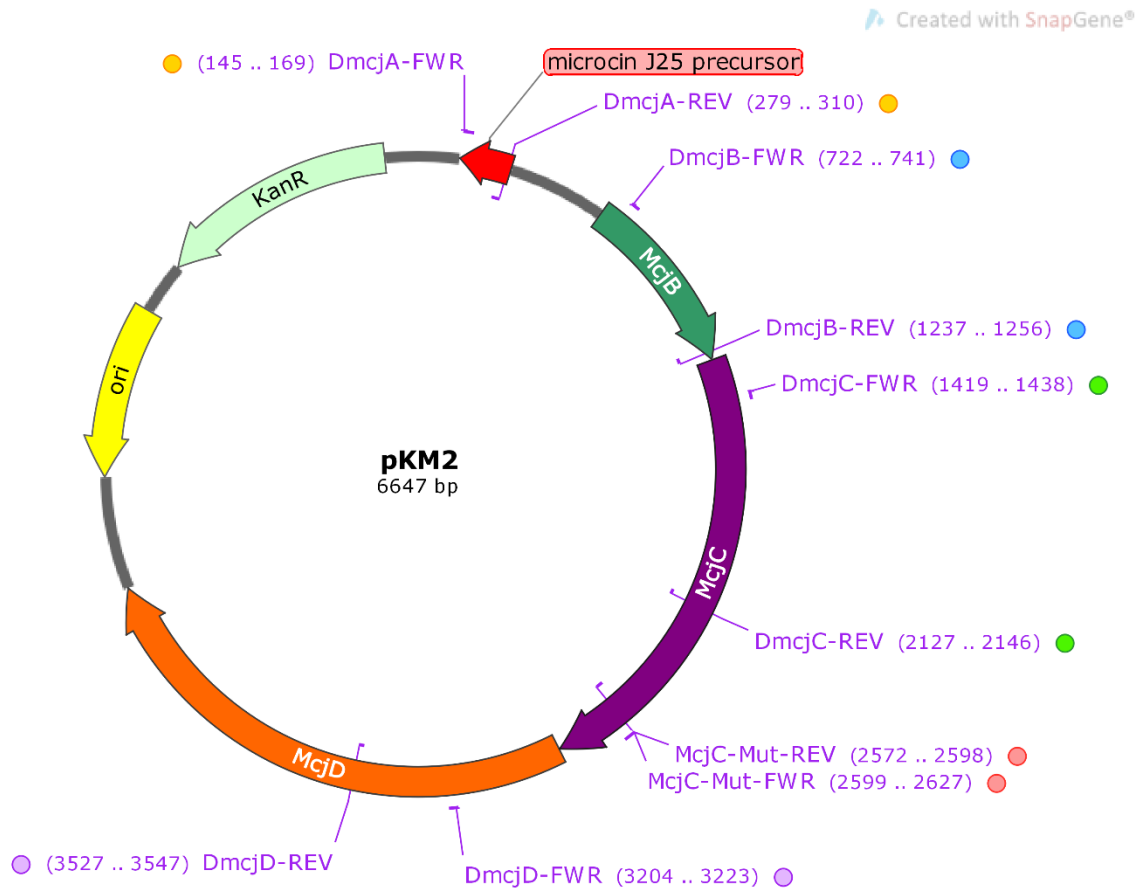


Figura 11. Diagrama esperado del plásmido pKM2. La corrección introducida por mutagénesis dirigida elimina un codón de terminación erróneo en el gen *mcjC* que truncaba 72 aminoácidos. El codón de terminación de *mcjC* corregido se encuentra 2 pares de bases detrás del codón de inicio de *mcjD*.

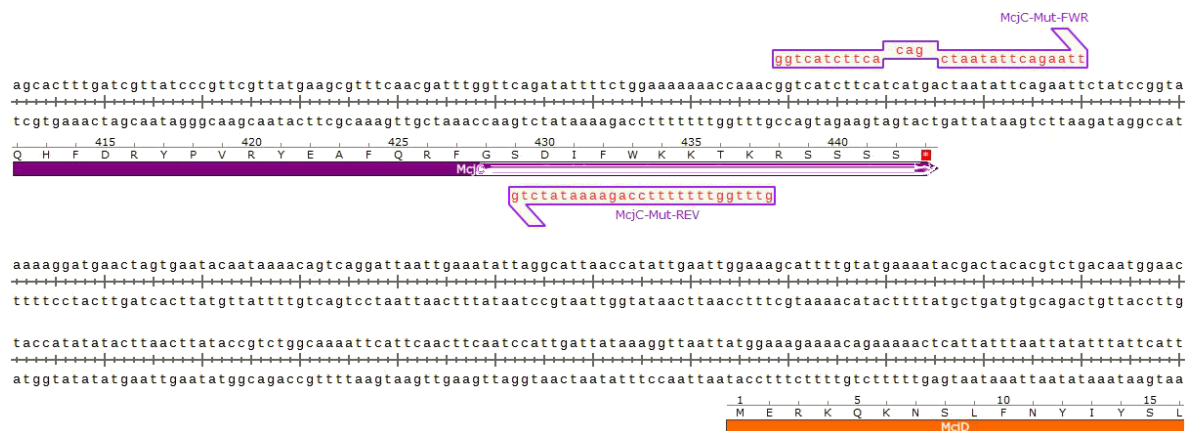


Figura 12. Posición de los primadores mcjC-Mut-FWR y mcjC-Mut-REV en el plásmido pKM1 y su posición relativa a los genes *mcjC* y *mcjD*.

La placa se incubó durante 16 h y presentó crecimiento de numerosas colonias. 10 de estas colonias fueron elegidas al azar y fueron cultivadas en 10 ml de LB suplementado con Kanamicina a 50 µl/100 ml. Luego de 24 h de crecimiento a 37°C, se extrajo plásmido de estas bacterias y se guardó el sobrenadante a -20°C.

Los plásmidos extraídos fueron sometidos a PCR para determinar si estos presentaban la mutación (pKM2) o eran idénticos al DNA molde (pKM1). Dado el emparejamiento imperfecto del primador mcjC-Mut-FWR necesario para inducir la mutación (como muestra la Figura 12), un PCR usando este primador es muy sensible a temperatura. A una temperatura de alineamiento de 58°C, el plásmido pKM1 es amplificado usando este primador, pero a una temperatura de 61°C, el emparejamiento imperfecto entre primador y DNA molde no lo permite.

Se aprovechó esta sensibilidad a temperatura para verificar a través de PCR la correcta mutación del plásmido pKM1 a pKM2. Se usó el mismo protocolo de PCR utilizado para la mutagénesis, incluyendo los primadores, pero se cambió la temperatura de alineamiento a 61°C. De esta forma, solo colonias bacterianas que posean el plásmido pKM2 mostrarían una banda de electroforesis alrededor de 6,6 kpb a esta prueba de PCR, mientras que colonias que posean únicamente el plásmido pKM1 no mostrarían esta banda (secuencia completa del plásmido mutado, pKM2, presente en anexo 4).

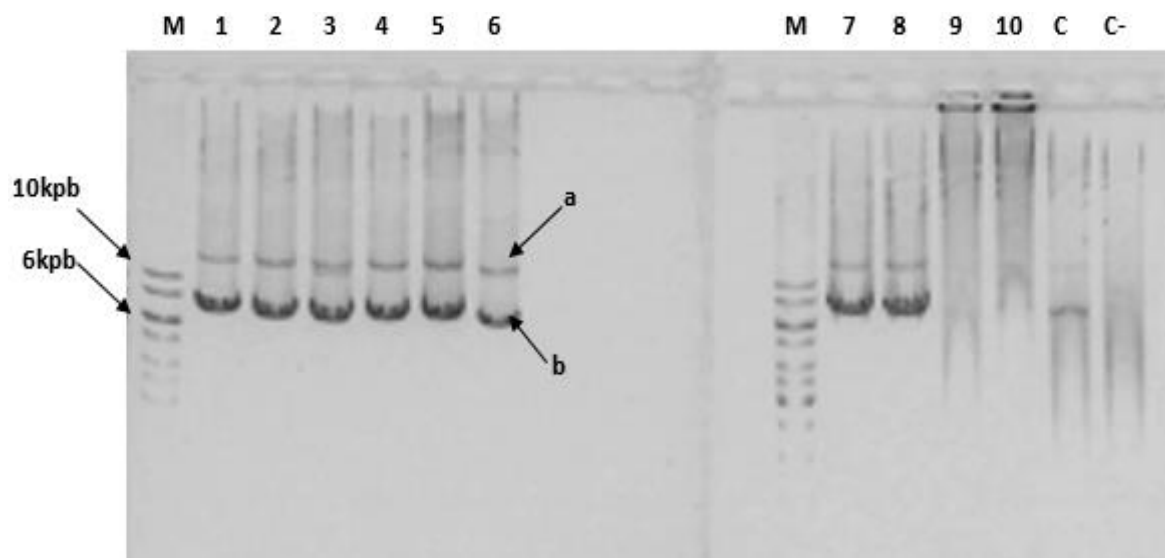


Figura 13. PCR de mutagénesis de pKM1 para la síntesis de pKM2. Carriles “M” corresponden a marcadores de tamaño (GeneRuler® 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). Carriles numerados corresponden a las reacciones de PCR de los plásmidos extraídos de las 10 colonias seleccionadas. Carril “C” corresponde a plásmido pKM1 extraído diluido a la misma concentración usada en las reacciones de PCR para servir como control negativo de amplificación. Carril “C-” corresponde al control negativo de reacción de PCR, para la cual se adicionó agua ultrapura en lugar de primadores. La banda “a” tiene la longitud esperada de la concatenación de 2 plásmidos (pKM1 o pKM2)., mientras que la banda “b” tiene la longitud esperada de los plásmidos pKM1 o pKM2. La comparación entre las intensidades de las bandas en los carriles de PCR (carriles numerados) y las bandas del carril de pKM1 a la concentración esperada en las reacciones de PCR (carril “C”) permite diferenciar entre las reacciones que presentaron amplificación.

8 de las 10 colonias (colonias 1-8) seleccionadas dieron positivo a este ensayo (Figura 13), por lo que se procedió a la evaluación de actividad microbiológica de sus sobrenadantes extraídos previamente.

#### 4. Verificación de actividad antibiótica de sobrenadante de cultivo de bacteria transformada con pKM2

Se autoclavaron los 10 sobrenadantes para asegurar esterilidad y se realizó el ensayo *Spot-on-lawn* para evaluar su actividad antibiótica. Debido a que las bacterias potencialmente productoras de microcina McJ25 fueron cultivadas en presencia de kanamicina, fue

importante utilizar una cepa indicadora también resistente a este antibiótico (Figura 16). La cepa susceptible usada fue ATCC10536 transformada el plásmido pCOLADuet, un plásmido inducible, que le otorga resistencia a kanamicina (Figura 16). Solo se usó este plásmido por la resistencia a kanamicina. Dados los resultados anteriores, se esperó que los sobrenadantes de los cultivos de bacterias 1-8 generen un halo de inhibición, mientras que los sobrenadantes de los cultivos de bacterias 9-10 no lo presenten.

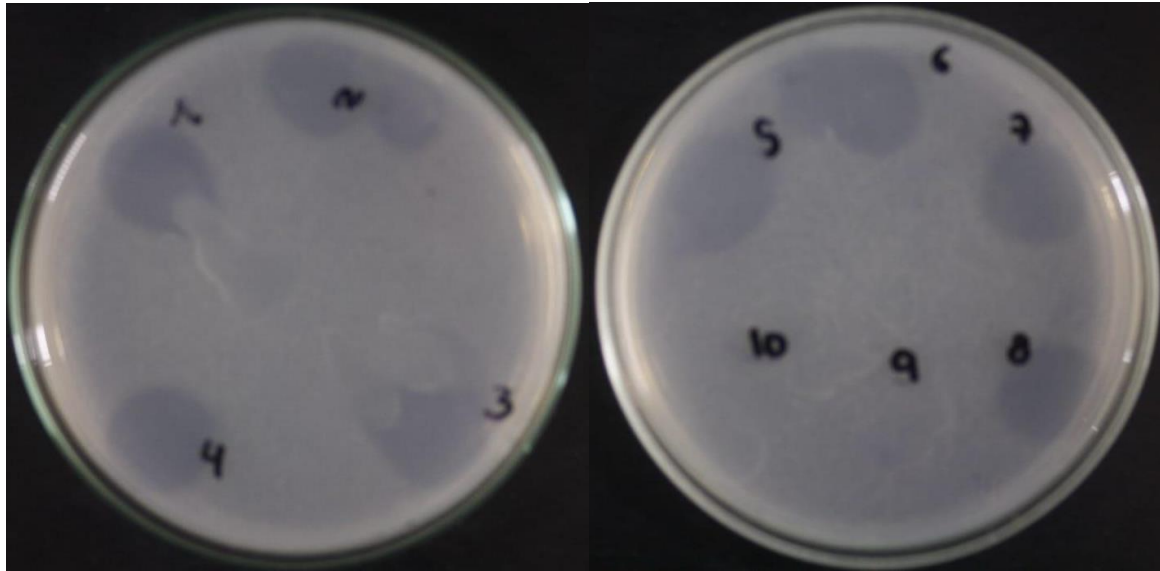


Figura 14. Prueba antibiótica *Spot-on-lawn* de los sobrenadantes de las 10 colonias picadas de la transformación. Los números en las placas corresponden al lote de bacterias que produjo el sobrenadante usado para el ensayo.



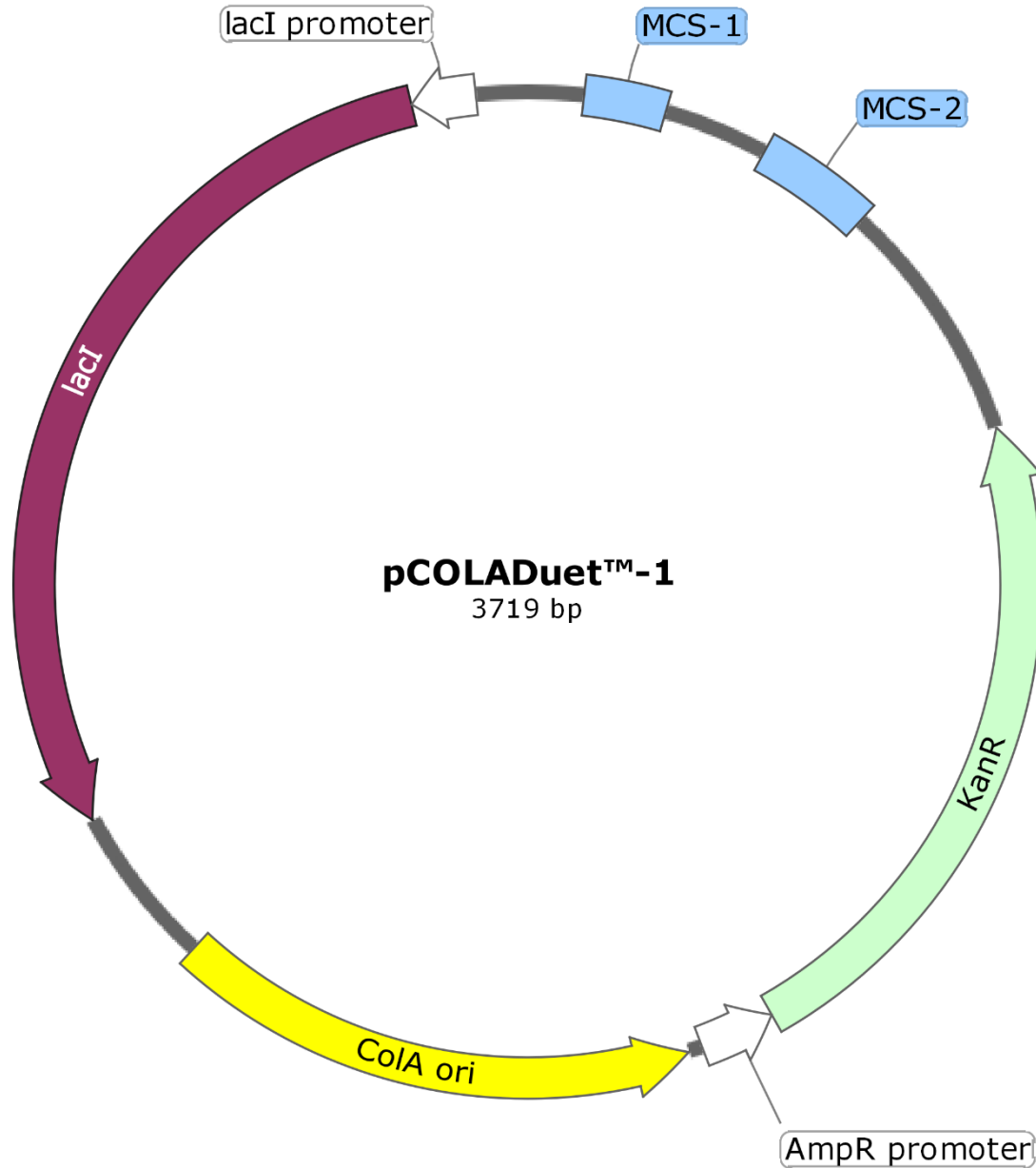


Figura 15. Plásmido pCOLADuet™-1. Este vector tiene un gen de resistencia a kanamicina, un origen de replicación (ori) ColA de número de copia medio (entre 20 y 40), dos sitios de clonamiento múltiple (MCS), y el plásmido tiene un sistema de expresión inducible usando el sistema *lac*. Se usó este

plásmido únicamente para otorgar resistencia a kanamicina a la bacteria indicadora ATCC10536.

Los sobrenadantes de los cultivos de las 8 colonias que dieron positivo al PCR de verificación de mutación mostraron halos de inhibición, mientras que aquellos provenientes del cultivo de las 2 colonias que dieron negativo al PCR no los mostraron. (Figura 14). Se realizó además un control de resistencia a kanamicina, colocando una gota de este antibiótico a la misma concentración que está presente en el medio de cultivo en el que se cultivaron las bacterias portadoras del plásmido pKM2. Como se ve en la Figura 16, la kanamicina presente en el sobrenadante por sí sola no genera halo de inhibición en el pasto de bacterias, por lo que podemos atribuir los halos observados en la figura 14 a la producción de McJ25.

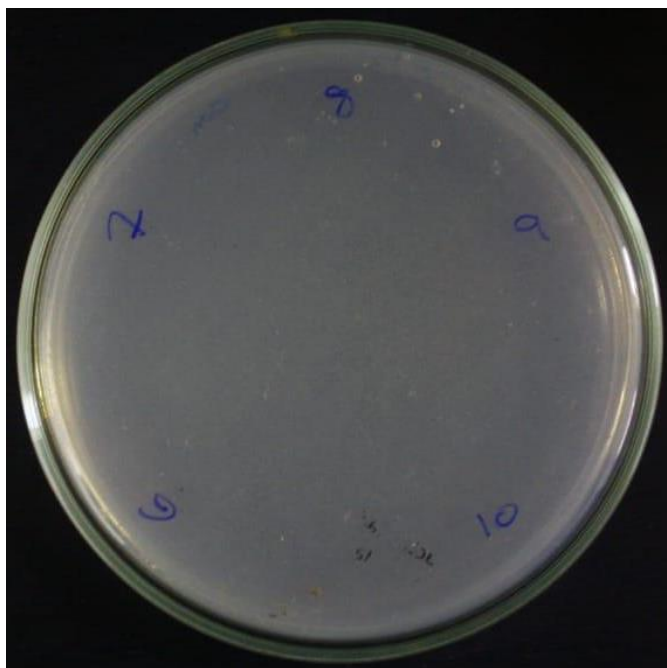


Figura 16. Prueba antibiótica *spot-on-lawn* usando 10ul de kanamicina a 50ng/100ul. Número en la placa corresponden a repeticiones de la prueba. No se observan halos de inhibición en ninguna de las repeticiones.

### Cualidad antibiótica de sobrenadante de bacterias transformadas con pKM2 presente hasta una concentración de $10^{-2}$ del sobrenadante original

Se utilizó uno de los sobrenadantes de bacterias productoras de microcina para realizar un ensayo de inhibición de diluciones sucesivas. Se hicieron diluciones seriadas y se repitió el ensayo *Spot-on-lawn*. Los diámetros de las zonas de inhibición fueron de 2 cm, 1.6 cm, 1.5 cm, 1.3 cm, 1.1 cm, 1 cm, 0.7 cm para las diluciones  $2^0$ ,  $2^{-1}$ ,  $2^{-2}$ ,  $2^{-3}$ ,  $2^{-4}$ ,  $2^{-5}$  y  $2^{-6}$ , respectivamente (Figura 17). En comparación, diluciones sucesivas usando el antibiótico cloramfenicol resultaron en 2.5 cm, 1.7 cm, 1.5 cm y 1.1 cm para las diluciones  $5^0$ ,  $5^{-1}$ ,  $5^{-2}$  y  $5^{-3}$ . Esto nos muestra que la capacidad antibiótica de la microcina producida por el plásmido pKM2 es menos eficaz que el cloranfenicol, pero su concentración y acción es suficientemente alta como para ser detectada usando métodos convencionales hasta una concentración aproximada de  $10^{-2}$ .

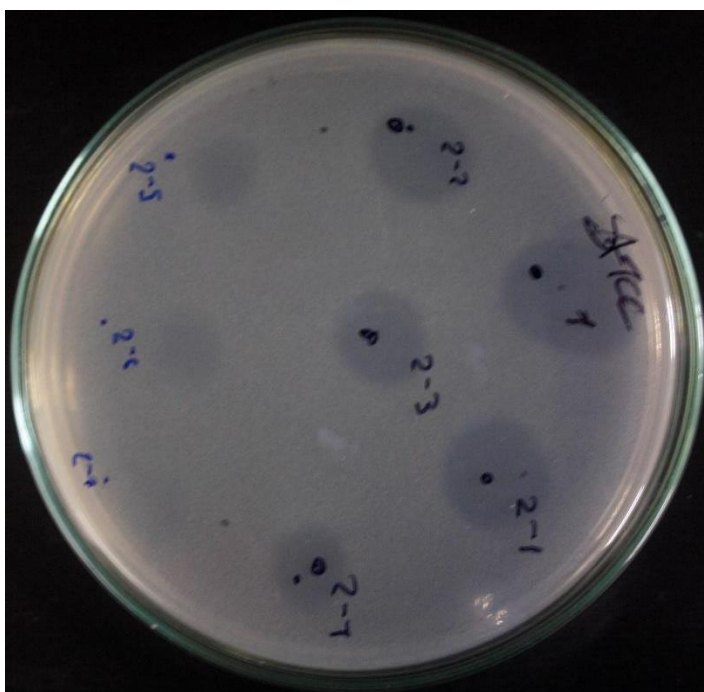


Figura 17. Diluciones sucesivas en *Spot-on-lawn* de ATCC10546 resistente a kanamicina utilizando el sobrenadante de un cultivo de 10ml de una *E. coli* productora de MccJ25 (transformada con el plásmido pKM2).

## VIII. Discusión

### 1. *E. coli* de aislados clínicos no mostraron presencia de bacterias productoras de MccJ25.

Duarte reporta que se encontraron genes productores de MccJ25 en 9 de 26 aislados de bacterias (Duarte et al., 2001). Sin embargo, utilizando el mismo protocolo, las proporciones de las poblaciones estudiadas en este trabajo y los antes citados no coinciden: De las 126 bacterias sometidas al PCR diagnóstico, ninguna dio positivo al ensayo. Se descartó la mala aplicación del método como posible causa de los resultados negativos. Se probaron múltiples variaciones, hirviendo previamente la bacteria a probar y utilizando este caldo para reducir contaminación con material biológico de la colonia; se hizo un control positivo de reacción de PCR y cPCR: y se repitieron los ensayos múltiples veces. Los aislados provinieron de muestras de heces de infantes, al igual que el aislado del cual se extrajo los genes productores de MccJ25 originalmente (Salomón & Farías, 1992).

Esta discrepancia se puede deber a múltiples factores. Primero, es posible que el intestino de aves de crianza estudiadas por Duarte sea un hábitat mucho más favorable para el crecimiento o selección de bacterias productoras de MccJ25. Por esto, es interesante la posibilidad de realizar estudios que ayuden a determinar la prevalencia real de MccJ25 u otras microcinas o bacteriocinas en poblaciones humanas y, más específicamente, poblaciones del Perú (como la estudiada en este trabajo), y evaluar su relación con distintas condiciones, como la capacidad de patogenicidad de las bacterias, el estado de la enfermedad en los pacientes, su interacción con coinfecciones, su relación con la estructura de las poblaciones bacterianas en la microflora, la dieta de los pacientes, entre otras.

Otra posibilidad es la pérdida de los genes responsables de la producción de MccJ25 tras la criopreservación de las bacterias. Los aislados fueron criopreservados en peptona desde su obtención, que en algunos casos fue en el 2012, y el plásmido que contiene los genes de MccJ25 es un plásmido masivo de más de 100 kpb. Se ha visto que las condiciones de crecimiento y preservación (Brownlie et al., 2009), tamaño de plásmido (Smith & Bidochka,

1998) y tiempos de crecimiento (Lau et al., 2013) afectan la estabilidad de plásmidos en cultivos bacterianos. Otros autores utilizaron aislados bacterianos recién obtenidos, sin pasar por un proceso de criopreservación o reanimación. Un plásmido único de más de 100 kpb en una bacteria sometida a una condición de estrés como criopreservación podría tender a perderse para aminorar la carga metabólica asociada a su manutención. La descripción de cómo plásmidos que codifican microcinas reaccionan a este tipo de factores ambientales podría ser un interesante camino de estudio.

## 2. Plásmidos pKM1 y pKM2

El plásmido pKM1 fue sintetizado mediante la clonación del casete *mcjABCD* visto en GeneBank: AF061787.1 al que se le adicionaron sitios de restricción en las regiones más distales, en el vector pUC57-Kan. El fragmento se clonó entre las enzimas PfoI y AflIII, y las enzimas de restricción que se adicionaron a la secuencia fueron NdeI, Eco53kI, SacI, DraIII y NcoI en la región más cercana a *mcjA* y BstAPI, KpnI, ApaI, BamHI, XhoI y NotI en el extremo cercano a *mcjD*. Estas enzimas se escogieron por su disponibilidad en el laboratorio y se introdujeron para poder retirar el casete y clonarlo en otros vectores.

El casete no fue modificado adicionalmente pues se quería replicar lo más posible el plásmido pTUC200 (Salomón & Farías, 1992) para asegurar el éxito de los ensayos posteriores. Esto, sin embargo, llevó a la inclusión del error en la secuencia de *mcjC*, que, a su vez, significó una dificultad más que no se tomó en cuenta hasta ya muy entrados los experimentos. Este error en la secuencia no permitía la correcta maduración de MccJ25. No hay publicaciones que dejen en claro este error, y la modificación solo se pudo encontrar en UniProt. Si bien las diferencias entre las entradas mostradas en el resultado de BLAST de la Figura 9 se vieron durante la revisión bibliográfica previa a la síntesis de pKM1, la ausencia de publicaciones que expliquen esta discrepancia me hizo virar hacia la idea de utilizar la secuencia reportada por los autores originales, que ya habían probado que esta secuencia en un plásmido era suficiente para que una bacteria produzca MccJ25. Esta anécdota, en mi valoración personal, debería mostrar que se necesita una mayor disposición a la clara

corrección de errores en ciencia, porque errores mínimos pueden causar resultados inesperados y complicaciones innecesarias en estudios posteriores.

El plásmido pKM2 se generó mediante la corrección por mutagénesis dirigida mediada por PCR del plásmido pKM1 utilizando las indicaciones sugeridas por New England BioLabs (Kunkel, 1985). Este plásmido sí resultó capaz de producir MccJ25 activa en el medio.

Una vez confirmada la actividad antibiótica de pKM2, se generó además el plásmido pKM2', con una mutación en *mcjA* que introduce el sitio de restricción BaeI (Figura 18). Esta enzima corta este plásmido de tal forma que retira la secuencia codante de los aminoácidos 12 a 20 del péptido maduro de MccJ25. Se pretende usar este plásmido para la mutación de la sección carboxilo terminal de MccJ25 para futuros experimentos, evaluando la actividad de estas mutantes en diversas bacterias. Sin embargo, esta mutación modifica el aminoácido 11 de una valina a una isoleucina. Se ha visto, en algunos estudios, que modificaciones a aminoácidos modifican visiblemente la actividad antibiótica de MccJ25 (Pan et al., 2011), sin embargo, el efecto en la actividad antibiótica de MccJ25 con esta mutación específica todavía no ha sido probado individualmente y se requieren posteriores experimentos para hacerlo.

A)

|       |     |                                                     |     |
|-------|-----|-----------------------------------------------------|-----|
| mcjA' | 1   | tcagccatagaaagatacaggtgtaccaatccccacaaaataactcaggca | 50  |
|       |     |                                                     |     |
| mcjA  | 1   | tcagccatagaaagatataggtgtaccaatccccacaaaataactcaggca | 50  |
| mcjA' | 51  | catgtcctgcaccaccttttgtagttgcatgctgattttttatttgt     | 100 |
|       |     |                                                     |     |
| mcjA  | 51  | catgtcctgcaccaccttttgtagttgcatgctgattttttatttgt     | 100 |
| mcjA' | 101 | ataacccccctttgcaggagatggaacattatTTTTTTaccagaagacag  | 150 |
|       |     |                                                     |     |
| mcjA  | 101 | ataacccccctttgcaggagatggaacattatTTTTTTaccagaagacag  | 150 |
| mcjA' | 151 | tttattaaaatgaaaatgcttaatcat                         | 177 |
|       |     |                                                     |     |
| mcjA  | 151 | tttattaaaatgaaaatgcttaatcat                         | 177 |

B)

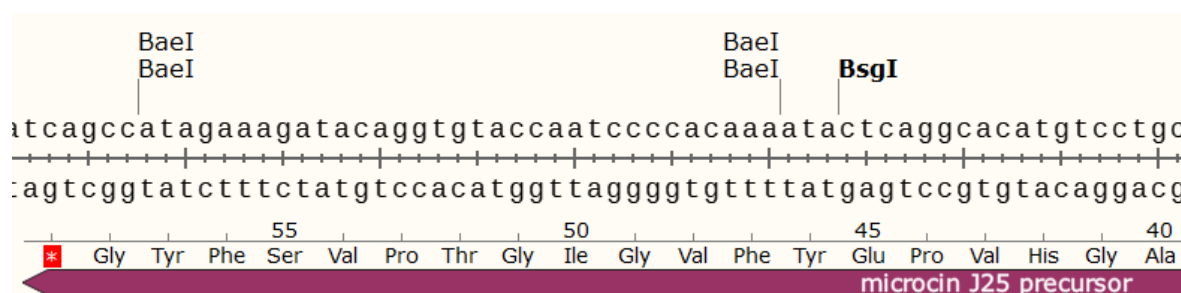


Figura 18. A) Alineamiento de secuencias de los genes mcjA (del plásmido pKM2) y mcjA' (del plásmido pKM2'). La mutación mostrada en amarillo introduce los sitios de restricción BaeI. B) Posición de los cortes realizados por BaeI en mcjA'.

### 3. Perspectivas

Teniendo un plásmido que consistentemente produce MccJ25 en el medio se puede pasar a estudios adicionales. Hace poco, la estructura tridimensional del complejo de interacción MccJ25-RNA polimerasa fue elucidada (Braffman et al., 2019). Esto muestra que todavía es posible descubrir cosas nuevas sobre esta molécula. Como se menciona antes, estudios sobre la posibilidad de usar MccJ25 mutantes como alternativas antibióticas selectivas contra bacterias es un camino todavía sin explorar a fondo. El uso directo como alternativa antibiótica, sin embargo, es una posibilidad lejana, pues como se ha mencionado antes, existen múltiples barreras a su uso sobre otras opciones ya existentes.

Este trabajo aporta a la posterior generación de versiones mutantes de MccJ25 que permitan estudios sobre cómo estas pueden interactuar y afectar el comportamiento de las RNA polimerasas de bacterias no relacionadas con *E. coli*.



## **IX. Conclusiones**

- No se encontraron bacterias productoras de MccJ25 en los 126 aislados utilizados en este trabajo.
- La corrección en la secuencia del gen mcjC hecha por Duquesne en el 2005 es necesaria para el correcto procesamiento de MccJ25 y su actividad antibiótica.

Bacterias transformadas con el plásmido pKM2, plásmido que contiene los genes mcjA, mcjB, mcjC y mcjD según la secuencia original reportada por Salomón y Farías y corregida (en el gen mcjC) por Duquesne, producen Mccj25 microbiológicamente activa en sobrenadante de cultivo.

## X. Referencias

- Adelman, K., Yuzenkova, J., La Porta, A., Zenkin, N., Lee, J., Lis, J. T., Borukhov, S., Wang, M. D., & Severinov, K. (2004). Molecular mechanism of transcription inhibition by peptide antibiotic Microcin J25. *Molecular Cell*, 14(6), 753–762. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.017>
- Altschup, S. F., Gish, W., Pennsylvania, T., & Park, U. (1990). *Altschul-1990-Basic Local Alignmen.pdf*. 403–410.
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1(DEC), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Baker, S., & The, H. C. (2018). Recent insights into Shigella: a major contributor to the global diarrhoeal disease burden. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 31(5), 449–454. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000475>
- Blond, A., Péduzzi, J., Goulard, C., Chiuchiolo, M. J., Barthélemy, M., Prigent, Y., Salomón, R. A., Farías, R. N., Moreno, F., & Rebuffat, S. (1999). The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from Escherichia coli. *European Journal of Biochemistry*, 259(3), 747–755. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00085.x>
- Braffman, N. R., Piscotta, F. J., Hauver, J., Campbell, E. A., Link, A. J., & Darst, S. A. (2019). Structural mechanism of transcription inhibition by lasso peptides microcin J25 and capistruin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(4), 1273–1278. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817352116>
- Brownlie, L., Stephenson, J. R., & Cole, J. A. (2009). Effect of growth rate on plasmid maintenance by Escherichia coli HB101(pAT153). *Journal of General Microbiology*, 136(12), 2471–2480. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-12-2471>
- Carattoli, A. (2011). Plasmids in Gram negatives: Molecular typing of resistance plasmids.

*International Journal of Medical Microbiology*, 301(8), 654–658.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.003>

Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>

Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y., & Jin, Q. (2005). VFDB: A reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*, 33(DATABASE ISS.), 325–328.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gki008>

Clardy, J., Fischbach, M. A., & Currie, C. R. (2009). The natural history of antibiotics. *Current Biology*, 19(11), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.001>

Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews. Microbiology*, 11(2), 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>

Destoumieux-Garzón, D., Duquesne, S., Peduzzi, J., Goulard, C., Desmadril, M., Letellier, L., Rebuffat, S., & Boulanger, P. (2005). The iron–siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val 11 –Pro 16  $\beta$ -hairpin region in the recognition mechanism . *Biochemical Journal*, 389(3), 869–876. <https://doi.org/10.1042/bj20042107>

Donnenberg, M. S. (2010). Enterobacteriaceae. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, & R. Dolin (Eds.), *MANDELL, DOUGLAS, AND BENNETT'S PRINCIPLES AND PRACTICE OF INFECTIOUS DISEASES* (7th ed.). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00220-4>

Duarte, M., Cottenceau, G., Portrait, V., & Pons, A. M. (2001). Rapid identification of *Escherichia coli* microcin J25 producing strains using polymerase chain reaction and colony blot hybridization. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(9), 877–882.  
<https://doi.org/10.1139/cjm-47-9-877>

Duquesne, S., Petit, V., Peduzzi, J., & Rebuffat, S. (2007). Structural and functional diversity

- of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 200–209. <https://doi.org/10.1159/000104748>
- Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284–293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- Galiş, A. M., Marcq, C., Marlier, D., Portetelle, D., Van, I., Beckers, Y., & Théwis, A. (2013). Control of salmonella contamination of shell eggs-preharvest and postharvest methods: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(2), 155–182. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12007>
- Guarner, F., & Malagelada, J. R. (2003). Role of bacteria in experimental colitis. *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology*, 17(5), 793–804. [https://doi.org/10.1016/S1521-6918\(03\)00068-4](https://doi.org/10.1016/S1521-6918(03)00068-4)
- Hewitt, J. H., & Rigby, J. (1976). Effect of Various Milk Feeds on Numbers of Escherichia coli and Bifidobacterium in the Stools of New-Born Infants. *The Journal of Hygiene*, 77(1), 129–139. <http://www.jstor.org/stable/3861700>
- Iredell, J., Brown, J., & Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: Mechanisms and clinical implications. *BMJ (Online)*, 352. <https://doi.org/10.1136/bmj.h6420>
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental Escherichia coli: Ecology and Public Health Implications - A Review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570–581. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Jones, D. R., Guard, J., Gast, R. K., Buhr, R. J., Fedorka-Cray, P. J., Abdo, Z., Plumblee, J. R., Bourassa, D. V., Cox, N. A., Rigsby, L. L., Robison, C. I., Regmi, P., & Karcher, D. M. (2016). Influence of commercial laying hen housing systems on the incidence and

- identification of Salmonella and Campylobacter. *Poultry Science*, 95(5), 1116–1124. <https://doi.org/10.3382/ps/pew036>
- K. Johan Rosengren, Richard J. Clark, Norelle L. Daly, Ulf Göransson, Alun Jones, and, Craik\*, D. J., Rosengren, K. J., Clark, R. J., Daly, N. L., G??ransson, U., Jones, A., Craik, D. J., Gö, U., Jones, A., Craik, D. J., K. Johan Rosengren, Richard J. Clark, Norelle L. Daly, Ulf Göransson, ... Craik\*, D. J. (2003). Microcin J25 has a threaded sidechain-to-backbone ring structure and not a head-to-tail cyclized backbone. *Journal of the American Chemical Society*, 125(41), 12464–12474. <https://doi.org/10.1021/ja0367703>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). PATHOGENIC ESCHERICHIA COLI. *Nature Reviews Microbiology*, 2(February), 123–140. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384731-7.00035-0>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), 300–305. <https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP>
- Kunkel, T. A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection (M13 cloning vectors/silent mutations/in vitro mutagenesis/synthetic oligonucleotides/uracil-containing DNA). *Genetics*, 82(January), 488–492.
- Lau, B. T. C., Malkus, P., & Paulsson, J. (2013). New quantitative methods for measuring plasmid loss rates reveal unexpected stability. *Plasmid*, 70(3), 353–361. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.07.007>
- Leplae, R. (2003). ACLAME: A CLAssification of Mobile genetic Elements. *Nucleic Acids Research*, 32(90001), 45D – 49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh084>
- Madeira, F., Park, Y. mi, Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>

- Marteyn, B. S., Gazi, A. D., & Sansonetti, P. J. (2012). Shigella A model of virulence regulation in vivo. *Gut Microbes*, 3(2), 104–120.
- Martínez, L., & Baquero, F. (2002). *Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance*. 15(4), 647–679. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.647>
- Micenková, L., Bosák, J., Vrba, M., Ševčíková, A., & Šmajš, D. (2016). Human extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains differ in prevalence of virulence factors, phylogroups, and bacteriocin determinants. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0835-z>
- Micenková, L., Štaudová, B., Bosák, J., Mikalová, L., Littnerová, S., Vrba, M., Ševčíková, A., Woznicová, V., & Šmajš, D. (2014). Bacteriocin-encoding genes and ExPEC virulence determinants are associated in human fecal Escherichia coli strains. *BMC Microbiology*, 14(109), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-109>
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic Escherichia coli Strains. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142–201. <https://doi.org/file:///Z:/References/Text Files/00000004472.txt>
- Nowrouzian, F., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegård, I. L., Åberg, N., Wold, A. E., & Adlerberth, I. (2003). Escherichia coli in infants' intestinal microflora: Colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatric Research*, 54(1), 8–14. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000069843.20655.EE>
- Ohl, M. E., & Miller, S. I. (2002). Salmonella: A Model for Bacterial Pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, 52(1), 259–274. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.52.1.259>
- Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., Pedersen, K. F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N. O., Sailor, C. A., Dawson, R. B., & Peek, A. S. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), 163–169.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkn198>

- Pan, S. J., Cheung, W. L., Fung, H. K., Floudas, C. A., & Link, A. J. (2011). Computational design of the lasso peptide antibiotic microcin J25. *Protein Engineering, Design and Selection*, 24(3), 275–282. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq108>
- Pan, S. J., Cheung, W. L., & Link, A. J. (2010). Engineered gene clusters for the production of the antimicrobial peptide microcin J25. *Protein Expression and Purification*, 71(2), 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.12.010>
- Portrait, V., Gendron-Gaillard, S., Cottenceau, G., & Pons, A. M. (1999). Inhibition of pathogenic *Salmonella enteritidis* growth mediated by *Escherichia coli* microcin J25 producing strains. *Canadian Journal of Microbiology*, 45(12), 988–994. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10696477>
- Rintoul, M. R., De Arcuri, B. F., Salomón, R. A., Farías, R. N., & Morero, R. D. (2001). The antibacterial action of microcin J25: Evidence for disruption of cytoplasmic membrane energization in *Salmonella newport*. *FEMS Microbiology Letters*, 204(2), 265–270. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00416-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00416-5)
- Sable, S., Pons, A. M., Gendron-Gaillard, S., & Cottenceau, G. (2000). Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4595–4597. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4595-4597.2000>
- Salomón, R. a, & Farías, R. N. (1992). Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174(22), 7428–7435.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb--prot3932.
- Sheet, P. (2013). *Escherichia coli* ( ATCC ® Live Culture : See. 1–2.
- Sheikh, A. F., Moosavian, M., Abdi, M., Heidary, M., Shahi, F., Jomehzadeh, N., Seyed-

- Mohammadi, S., Saki, M., & Khoshnood, S. (2019). Prevalence and antimicrobial resistance of shigella species isolated from diarrheal patients in Ahvaz, Southwest Iran. *Infection and Drug Resistance*, 12, 249–253. <https://doi.org/10.2147/IDR.S187861>
- Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 434–452. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10>
- Smith, M. A., & Bidochka, M. J. (1998). Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 351–355. <https://doi.org/10.1139/cjm-44-4-351>
- Solbiati, J. O., Ciaccio, M., Farías, R. N., José, E., Moreno, F., Salomón, R. a, Solbiati, O., & Fari, R. N. (1999). *Sequence Analysis of the Four Plasmid Genes Required To Produce the Circular Peptide Antibiotic Microcin J25*. 181(8), 2659–2662.
- Solbiati, J. O., Ciaccio, M., Farías, R. N., & Salomón, R. A. (1996). Genetic analysis of plasmid determinants for microcin J25 production and immunity. *Journal of Bacteriology*, 178(12), 3661–3663.
- Tancrède, C. (1992). The Human Microbiota in Health and Disease. *European Journal of Microbiological Infectuous Disease*, 11(11), 1012–1015. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.01.008>
- Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 711–721. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>
- Triinu, K., Maarja, L., Lauris, K., Kairi, R., Reidar, A., & Mado, R. (2016). Primer3\_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/xxxxx>

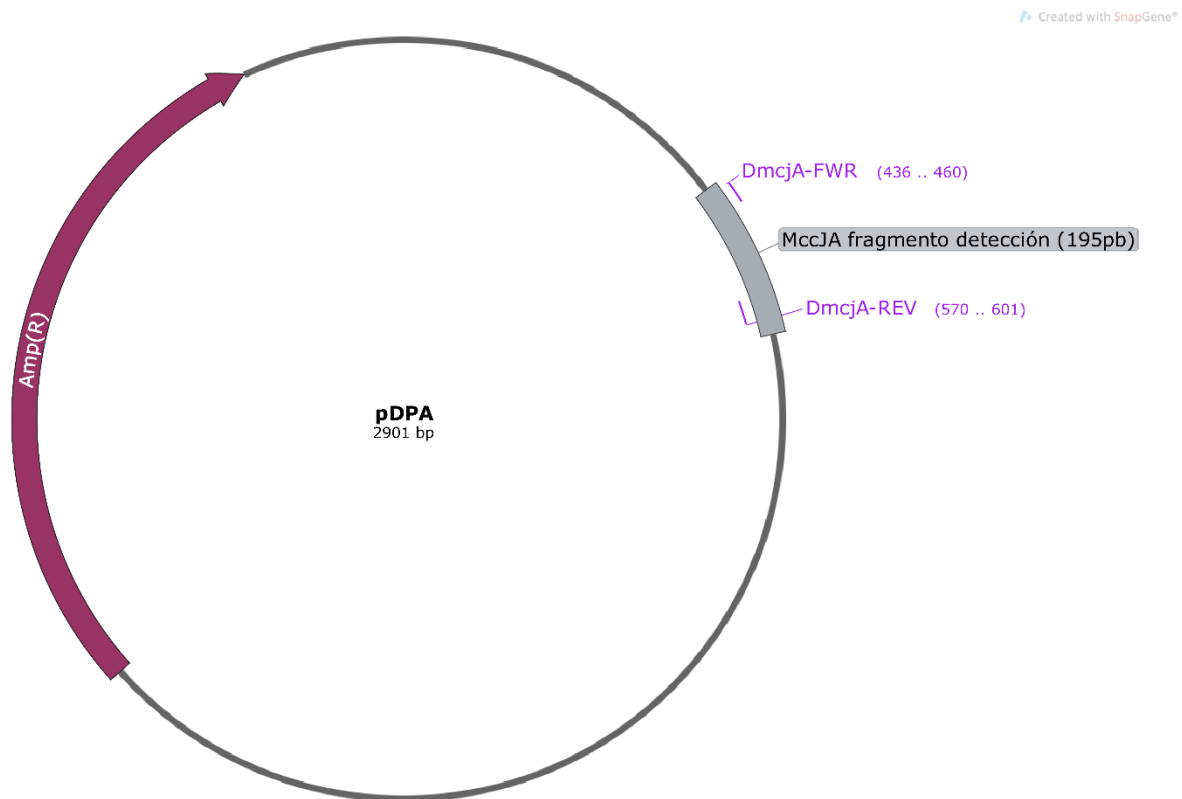


- Wilson, K. A., Kalkum, M., Ottesen, J., Yuzenkova, J., Chait, B. T., Landick, R., Muir, T., Severinov, K., & Darst, S. A. (2003). Structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase, is a lassoed tail. *Journal of the American Chemical Society*, 125(41), 12475–12483. <https://doi.org/10.1021/ja036756q>
- Yan, K. P., Li, Y., Zirah, S., Goulard, C., Knappe, T. A., Marahiel, M. A., & Rebuffat, S. (2012). Dissecting the Maturation Steps of the Lasso Peptide Microcin J25 in vitro. *ChemBioChem*, 13(7), 1046–1052. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200016>
- Yuzenkova, J., Delgado, M., Nechaev, S., Savalia, D., Epshtein, V., Artsimovitch, I., Mooney, R. A., Landick, R., Farias, R. N., Salomon, R., & Severinova, K. (2002). Mutations of bacterial RNA polymerase leading to resistance to microcin J25. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50867–50875. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209425200>

## Anexos

### 1. Mapa y secuencia del plásmido pDPA

a)



b)

```
TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCT
TGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGT
GTCGGGGCTGGCTTA ACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGT
GAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCG
CAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGA
TGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGAC
GGCCAGTGAATTCGAGCTCGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCAGCCATAGAAAGATATAGG
TGTACCAATCCCCACAAAATACTCAGGCACATGTCCTGCACCACCTTTTGTGAGTTGCGATGCTGA
TTTTTTTATTTGTATAACCCCTTTGCAGGAGATGGAACATTATTTTTTTTACCAGAAGACAGTTTAT
```

TAAAATGAAAATGCTTAATCATCCATGGTCTAGATATCGGATCCCGGGCCCGTCGACTGCAGAGG  
CCTGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACA  
ATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTA  
ACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCA  
TTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGC  
TCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTA  
ATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAA  
AGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTTCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAG  
CATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGG  
CGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTC  
CGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGT  
GTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCCAGCGCTGCGCCTT  
ATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCAC  
TGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCT  
AACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA  
AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTC  
AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTC  
TGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCT  
TCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTG  
GTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCC  
ATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGT  
GCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGC  
CGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTG  
CCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAG  
GCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGC  
GAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCA  
GAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCA  
TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTA  
TGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACT

TTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTG  
 AGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCG  
 TTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGA  
 AATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATG  
 AGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCGCGGCACATTTCCCCGA  
 AAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATC  
 ACGAGGCCCTTTCGTC

## 2. Secuencia de inserto *mcjABCD* presente en el plásmido pKM2.

ATGATCCGTTACTGCTTAACCAGTTATAGAGAGGATCTTGTTATCCTGGATATAATTAATGATAGTT  
 TCAGCATAGTGCCTGACGCAGGTAGCTTGCTAAAAGAAAGAGATAAATTGCTTAAAGAATTCCCA  
 CAACTATCTTACTTTTTTGACAGTGAATATCATATTGGAAGTGTTTCTCGTAATAGTGACACTTCTTT  
 TCTTGAAGAACGCTGGTTTCTACCAGAACCTGACAAAACATTATATAAGTGTTCTCTATTTAAACGA  
 TTTATATTATTACTCAAAGTCTTTTACTATAGCTGGAATATTGAAAAAAAAGGGATGGCATGGATT  
 TTCATAAGTAATAAAAAAGAGAATAGGCTATACTCCTTGAATGAAGAGCATCTTATCCGGAAAGA  
 AATTAGTAATCTTTCATTATCTTTCATCTTAATATTTTAAATCTGACTGTCTTACCTATTCATACGC  
 ACTAAAAAGAATTCTTAATTCCAGAAATATTGATGCTCATCTTGTTATTGGTGTAAGGACACAACCT  
 TTTTATAGCCACTCTTGGGTGGAGGTTGGGGGACAAGTTATCAATGATGCTCCCAATATGCGGGA  
 TAAATTATCTGTTATTGCAGAGATATAGTTATGGAAATATTTAATGTCAAGTTAAATGATACTTCAA  
 TTAGAATTATTTTCTGTAAACGCTTTCTGCCTTCCGGACAGAAAATACCATCGTTATGCTCAAAGG  
 AAAAGCAGTTTCAAATGGCAAACCTGTATCCACAGAGGAGATTGCCAGAGTAGTGGAAGAAAAA  
 GGTGTTTCAGAAGTAATAGAAAATTTAGATGGTGTTTTCTGTATCCTAATTTATCATTTTAATGATC  
 TCCTTATAGGGAAAAGCATTCAATCAGGCCCGCTCTATTTTATTGTAAAAAGAATATGGATATTTT  
 TGTTTCGGATAAAATTTCTGATATCAAATTTTTGAATCCAGATATGACATTCAGTCTAAATATAACA  
 ATGGCAGAACATTATCTGTCAGGAAATCGAATAGCAACCCAGGAATCACTAATCACTGGCATTTCAC  
 AAAGTAAATAATGGTGAGTTTATAAAATTTAATAATCAGTTGAAACCTGTGCTACTTCGTGATGAG  
 TTTAGTATTACCAAAAAGAACAATTCAACTATCGACAGTATCATTGATAATATTGAGATGATGCGG  
 GATAATAGAAAAATAGCCCTATTATTTTCCGGAGGATTGGATTCTGCATTAATTTTTCACACACTTA  
 AAGAATCAGGTAACAAATTCTGCGCTTATCATTTTTTTTTCTGATGAATCTGATGACAGTGAAAAGT

ATTTTGCTAAGGAATACTGTTCAAAATATGGAGTTGATTTTATATCTGTTAATAAAAACATCAACTT  
TAATGAAAAACTTTATTTCAATTTAAATCCTAATAGTCCGGACGAAATCCCTTTGATATTTGAACAG  
ACAGATGAAGAAGGTGAAGGTCAGCCCCCATAGACGATGATTATTATATCTATGTGGTCACGG  
TGGAGATCATATTTTCGGACAAAATCCTTCAGAACTTTTTGGCATTGATGCATATCGAAGTCATGG  
CTTGATGTTTATGCATAAAAAAATAGTAGAATTTTCCAATCTCAAGGGAAAGAGATATAAAGATAT  
CATATTTTCAAATATTTCCGCATTCATTAATACATCCAACGGATGTTCTCCAGCAAAGCAAGAGCAC  
GTATCAGATATGAACTTGCCTCTGCTCAGTTTTTTGCAACTGATTATACAGGAAAAATTAATAAAC  
TAACTCCATTCTGCATAAAAAATATTATCCAGCATTATGCTGGCTTACCAGTTTTTAGTCTATTTAAC  
CAGCACTTTGATCGTTATCCCGTTCGTTATGAAGCGTTTCAACGATTTGGTTCAGATATTTTCTGGA  
AAAAAACCAAACGGTCATCTTCACAGCTAATATTCAGAATTCTATCCGGTAAAAAGGATGAACTAG  
TGAATACAATAAAACAGTCAGGATTAATTGAAATATTAGGCATTAACCATATTGAATTGGAAAGCA  
TTTTGTATGAAAATACGACTACACGTCTGACAATGGAAGTACCATATATACTTAACTTATACCGTCT  
GGCAAAATTCATTCAACTTCAATCCATTGATTATAAAGGTTAATTATGGAAAGAAAACAGAAAAAC  
TCATTATTTAATTATATTTATTCATTAATGGATGTAAGAGGTAAATTTTTATTCTTTTCCATGTTATTC  
ATTACATCATTATCATCGATAATCATATCTATTTACCATTGATTCTTGCAAAGATTACAGATTTACT  
GTCTGGCTCATTGTCAAATTTTAGTTATGAATATCTGGTTTTACTTGCCTGTTTATACATGTTTTGCG  
TTATATCTAATAAAGCAAGTGTTTTTTTATTTATGATACTGCAAAGTAGTCTACGTATTAACATGCA  
GAAAAAATGTCGCTAAAGTATTTGAGAGAATTGTATAACGAAAAATATACTAACTTGAGTAAAA  
ATAATGCTGGATATACAACGCAAAGTCTTAACCAGGCTTCAAATGACATTTATATTCTTGTGAGAA  
ATGTTTCCAGAAATATCCTGTCACCTGTTATACAACCTATTTCCACTATTGTTGTTGTTTTATCTACG  
AAGGACTGGTTTTCTGCCGGTGTGTTTTTCTCTATATTCTGGTATTTGTAATTTTAATACCAGACT  
GACTGGCAGTTTAGCGTCTCTCAGAAAACACAGCATGGATATCACTCTTAACTCTTATAGTCTGTTA  
TCTGATACTGTTGATAACATGATAGCAGCTAAAAAGAATAATGCATTAAGACTTATTTCTGAACGT  
TATGAAGATGCTCTCACTCAGGAAAACAATGCTCAGAAAAAATACTGGTTACTCAGTTCTAAAGTT  
CTTTTATTGAACTCTTACTTGCTGTAATATTATTTGGTTCTGTATTCATATATAATATTTTAGGTGT  
GCTGAATGGTGTAGTTAGTATCGGCCACTTCATTATGATTACATCATATATCATTCTTCTTTCAACG  
CCAGTGGAATAATAGGGGCATTGCTAAGTGAGATCAGGCAGTCAATGTCTAGCCTGGCAGGTTT  
TATTCAACGTCATGCCGAGAATAAAGCCACATCTCCTTCAATACCTTTTCTCAACATGGAGCGAAA  
ATTAACCTGTCCATAAGAGAGCTTTCATTTAGCTATAGTGATGATAAAAAAATACTTAATTCAGTC

AGTCTTGACCTTTTTACCGGAAAAATGTATTCATTAACCGGACCCAGTGGTTCAGGAAAAATCCACC  
 CTTGTAAAAATAATATCAGGTTACTATAAAAAATTACTTTGGAGACATTTATCTGAATGATATATCCT  
 TACGTAATATCAGTGATGAGGATTTGAATGATGCTATTTACTACCTAACACAAGATGATTATATTTT  
 TATGGATACACTACGATTTAATCTCCGGCTCGCAAATTACGACGCGTCAGAAAAATGAAATATTTAA  
 AGTTCTTAAACTGGCAAATCTTTCTGTCGTCAACAATGAACCAGTGAGTCTGGATACACACCTTAT  
 AAACAGAGGCAATAACTATTCAGGAGGGCAAAAACAACGAATTCGTTAGCGCGACTGTTTTTGA  
 GAAAACCTGCAATAATTATTATTGATGAAGCCACATCGGCTCTGGATTATATTAATGAATCAGAAA  
 TTTTATCATCAATAAGAACTCATTTTCCTGATGCGTTAATTATAAATATTAGTCACCGAATAAATCTT  
 CTGGAGTGTTCCGATTGTGTTTATGTATTGAATGAAGGAAATATTGTTGCTTCTGGCCATTTTCAGG  
 GATTTGATGGTCAGCAATGAATACATATCGGGACTGGCTTCTGTTACTGAATAATTTGCACACTCC  
 CTCCTGTAGTTATGCCTTTACACTCAATTGGAATAATAAACTTCTGAATTTATCTACAAGCTAAAT  
 TTTTTCTTAATTGATGGCTAAATATTCTGAAATAATTAGAAAAATGTATAAAAATCCAAAATATTG  
 TACTAAATTTGACCACTTTTGCAGATTGATTAGTTTATGGATGTTTGTATCTAAATGATTTTATTGAT  
 AAATTACTAAAGCGTAATGATTATTGATCTCAATTGTATTTTGTGCTAATAAAAATTCTAACAGAAGG  
 ACGTGAGGTTCTCTGTAAAAATCATCATACTATTTCCATCAAATAAGGAACGTAAAAATGATTAA  
 GCATTTTCATTTAATAAACTGTCTTCTGGTAAAAAAAATAATGTTCCATCTCCTGCAAAGGGGGTT  
 ATACAAATAAAAAAATCAGCATCGCAACTCACAAAAGGTGGTGCAGGACATGTGCCTGAGTATTT  
 TGTGGGGATTGGTACACCTATATCTTTCTATGGCTGA

### 3. Secuencia del plásmido PKM1

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGACATATGGAGCTCC  
 ACTTTGTGCCATGGAAGCTTCTAGATATGTGATTTATTGTTGATAGACAAAATGACAGAGTTCTTCT  
 TTCAGAATATCAGCCATAGAAAGATATAGGTGTACCAATCCCCACAAAATACTCAGGCACATGTCC  
 TGCACCACCTTTTGTGAGTTGCGATGCTGATTTTTTTATTTGTATAACCCCTTTGCAGGAGATGGA  
 ACATTATTTTTTTTACCAGAAGACAGTTTATTAATAATGAAAATGCTTAATCATTTTTACGTTCTTAT  
 TTGATGGAAATAGTATGATGATTTTACAGAGGAACCTCACGTCCTTCTGTTAGAATTTTATTAGCA  
 CAAAATACAATTGAGATCAATAATCATTACGCTTTAGTAATTTATCAATAAAATCATTTAGATACAA  
 ACATCCATAAACTAATCAATCTGCAAAAAGTGGTCAAATTTAGTACAATATTTTGGATTTTTATACAT  
 TTTTCTAATTATTTTCAGAATATTTAGCCATCAATTAAGAAAAAATTTAGCTTGTAGATAAATTCAG

AAGTTTTATTATTCCAATTGAGTGTAAGGCATAACTACAGGAGGGAGTGTGCAAAATGATCCGT  
TACTGCTTAACCAGTTATAGAGAGGATCTTGTTATCCTGGATATAATTAATGATAGTTTCAGCATA  
GTGCCTGACGCAGGTAGCTTGCTAAAAGAAAGAGATAAATTGCTTAAAGAATTCCCACAACCTATCT  
TACTTTTTTGACAGTGAATATCATATTGGAAGTGTTCGTAATAGTGACACTTCTTTTCTTGAAG  
AACGCTGGTTTCTACCAGAACCTGACAAAACATTATATAAGTGTTCTCTATTTAAACGATTTATATT  
ATTACTCAAAGTCTTTTACTATAGCTGGAATATTGAAAAAAAGGGATGGCATGGATTTTCATAAG  
TAATAAAAAAGAGAATAGGCTATACTCCTTGAATGAAGAGCATCTTATCCGGAAAGAAATTAGTA  
ATCTTTCATTATCTTTCATCTTAATATTTTTAAATCTGACTGTCTTACCTATTCATACGCACTAAAAA  
GAATTCTTAATTCCAGAAATATTGATGCTCATCTTGTTATTGGTGTAAGGACACAACCTTTTTATAG  
CCACTCTTGGGTGGAGGTTGGGGGACAAGTTATCAATGATGCTCCAATATGCGGGATAAATTAT  
CTGTTATTGCAGAGATATAGTTATGGAAATATTTAATGTCAAGTTAAATGATACTTCAATTAGAATT  
ATTTTCTGTAAAACGCTTTCTGCCTTCCGGACAGAAAATACCATCGTTATGCTCAAAGGAAAAGCA  
GTTTCAAATGGCAAACCTGTATCCACAGAGGAGATTGCCAGAGTAGTGGAAGAAAAAGGTGTTTC  
AGAAGTAATAGAAAATTTAGATGGTGTTTTCTGTATCCTAATTTATCATTTTAATGATCTCCTTATA  
GGGAAAAGCATTCAATCAGGCCCGCTCTATTTTATTGTAAAAAGAATATGGATATTTTGTTCG  
GATAAAATTTCTGATATCAAATTTTTGAATCCAGATATGACATTCAGTCTAAATATAACAATGGCAG  
AACATTATCTGTCAGGAAATCGAATAGCAACCCAGGAATCACTAATCACTGGCATTACAAAGTAA  
ATAATGGTGAGTTTATAAAATTTAATAATCAGTTGAAACCTGTGCTACTTCGTGATGAGTTTAGTAT  
TACCAAAAAGAACAATTCAACTATCGACAGTATCATTGATAATATTGAGATGATGCGGGATAATA  
GAAAAATAGCCCTATTATTTTCCGGAGGATTGGATTCTGCATTAATTTTTCACACACTTAAGAATC  
AGGTAACAAATTCTGCGCTTATCATTTTTTTCTGATGAATCTGATGACAGTGAAAAGTATTTTGCT  
AAGGAATACTGTTCAAATATGGAGTTGATTTTATATCTGTTAATAAAAAACATCAACTTTAATGAA  
AACTTTATTTCAATTTAAATCCTAATAGTCCGGACGAAATCCCTTTGATATTTGAACAGACAGATG  
AAGAAGGTGAAGGTCAGCCCCCATAGACGATGATTTATTATATCTATGTGGTCACGGTGGAGAT  
CATATTTTCGGACAAAATCCTTCAGAACTTTTTGGCATTGATGCATATCGAAGTCATGGCTTGATGT  
TTATGCATAAAAAAATAGTAGAATTTTCCAATCTCAAGGGAAAGAGATATAAAGATATCATATTTT  
CAAATATTTCCGCATTCATTAATACATCCAACGGATGTTCTCCAGCAAAGCAAGAGCACGTATCAG  
ATATGAACTTGCCTCTGCTCAGTTTTTTGCAACTGATTATACAGGAAAAATTAATAAACTAACTCC  
ATTCCTGCATAAAAAATATTATCCAGCATTATGCTGGCTTACCAGTTTTTAGTCTATTTAACCAGCACT

TTGATCGTTATCCCGTTCGTTATGAAGCGTTTCAACGATTTGGTTCAGATATTTTCTGGAAAAAAC  
CAAACGGTCATCTTCATCATGACTAATATTCAGAATTCTATCCGGTAAAAAGGATGAACTAGTGAA  
TACAATAAACAGTCAGGATTAATTGAAATATTAGGCATTAACCATATTGAATTGGAAAGCATTTT  
GTATGAAAATACGACTACACGTCTGACAATGGAACCTACCATATATACTTAACTTATACCGTCTGGC  
AAAATTCATTCAACTTCAATCCATTGATTATAAAGGTTAATTATGGAAAGAAAACAGAAAACTCA  
TTATTTAATTATATTTATTCATTAATGGATGTAAGAGGTAAATTTTTATTCTTTTCCATGTTATTCATT  
ACATCATTATCATCGATAATCATATCTATTTACCATTGATTCTTGCAAAGATTACAGATTTACTGTC  
TGGCTCATTGTCAAATTTTAGTTATGAATATCTGGTTTTACTTGCCTGTTTATACATGTTTTGCGTTA  
TATCTAATAAAGCAAGTGTTTTTTATTTATGATACTGCAAAGTAGTCTACGTATTAACATGCAGAA  
AAAAATGTCGCTAAAGTATTTGAGAGAATTGTATAACGAAAATATAACTAACTTGAGTAAAAATA  
ATGCTGGATATACAACGCAAAGTCTTAACCAGGCTTCAAATGACATTTATATTCTTGTGAGAAATG  
TTTCCCAGAATATCCTGTCACCTGTTATACAACCTATTTCCACTATTGTTGTTGTTTTATCTACGAAG  
GACTGGTTTTCTGCCGGTGTGTTTTTCTCTATATTCTGGTATTTGTAATTTTAATACCAGACTGAC  
TGGCAGTTTAGCGTCTCTCAGAAAACACAGCATGGATATCACTCTTAACTCTTATAGTCTGTTATCT  
GATACTGTTGATAACATGATAGCAGCTAAAAAGAATAATGCATTAAGACTTATTTCTGAACGTTAT  
GAAGATGCTCTCACTCAGGAAAACAATGCTCAGAAAAAATACTGGTACTCAGTTCTAAAGTTCTT  
TTATTGAACTCTTACTTGCTGTAATATTATTTGGTTCTGTATTCATATATAATATTTTAGGTGTGCT  
GAATGGTGTAGTTAGTATCGGCCACTTCATTATGATTACATCATATATCATTCTTCTTTCAACGCCA  
GTGGAAAATATAGGGGCATTGCTAAGTGAGATCAGGCAGTCAATGTCTAGCCTGGCAGGTTTTAT  
TCAACGTCATGCCGAGAATAAAGCCACATCTCCTTCAATACCTTTTCTCAACATGGAGCGAAAATT  
AAACCTGTCCATAAGAGAGCTTTCATTTAGCTATAGTGATGATAAAAAAATACTTAATTCAGTCAG  
TCTTGACCTTTTTACCGGAAAAATGTATTCATTAACCGGACCCAGTGGTTCAGGAAAATCCACCCTT  
GTAAAAATAATATCAGGTTACTATAAAAAATTACTTTGGAGACATTTATCTGAATGATATATCCTTAC  
GTAATATCAGTGATGAGGATTTGAATGATGCTATTTACTACCTAACACAAGATGATTATATTTTTAT  
GGATACACTACGATTTAATCTCCGGCTCGCAAATTACGACGCGTCAGAAAATGAAATATTTAAAGT  
TCTTAAACTGGCAAATCTTTCTGTCGTCACAATGAACCAAGTGAGTCTGGATACACACCTTATAAA  
CAGAGGCAATAACTATTCAGGAGGGCAAAAACAACGAATTCGTTAGCGCGACTGTTTTGAGAA  
AACCTGCAATAATTATTATTGATGAAGCCACATCGGCTCTGGATTATATTAATGAATCAGAAATTTT  
ATCATCAATAAGAACTCATTTTCCTGATGCGTTAATTATAAATATTAGTCACCGAATAAATCTTCTG



GAGTGTTCCGATTGTGTTTATGTATTGAATGAAGGAAATATTGTTGCTTCTGGCCATTCAGGGAT  
TTGATGGTCAGCAATGAATACATATCGGGACTGGCTTCTGTTACTGAATAAAATATCTGACTCCTG  
CTCTGTATTCAGAAAGGGAGTCGCTTGGAAAACGGAATTTTTCCACGTTAAGAGAATTGGGTTG  
CACGAGTGGTTACATCCCGGCAAGCTAAGCCCCAGAATGTAAGGGTTGTTGAAATGCTCTGACC  
GTCCGCTAATCGTTTAGCTTACTTCTCCGCACATCCTGCGTAAATGTACAGAATTGTACGATTCG  
GTACCACCAAACCGCTGTTGTCCCGCCATTCTGGGCCCTATTCTGAAAGTTATTTGACTAAAAA  
ATAGTCTTAACGTGGATCCTTATTTTCCGAATCTCGAGGCGGCCGCACATGTGAGCAAAAGGCCA  
GCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTG  
ACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATA  
CCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC  
CTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTT  
CGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTAGCCCCGACCGCTGC  
GCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCA  
GCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGT  
GGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCT  
TCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTT  
GTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACG  
GGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAG  
GATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAAGCCCAATCTGAATAATGTTA  
CAACCAATTAACCAATTCTGATTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAAATGAACTGCAATTTATTCATA  
TCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGG  
CAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAA  
CCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAA  
TCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGC  
TCGTATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGA  
AATACGCGATCGCTGTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCCGAGGAACA  
CTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTT  
TCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCG  
GAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGC

TACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAAGCGATAGATTGTCTG  
CACCTGATTGCCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATT  
TAATCGCGGCCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAA  
GCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG  
ACACGGGGCCAGAGCTGCA

#### 4. Secuencia del plásmido pKM2

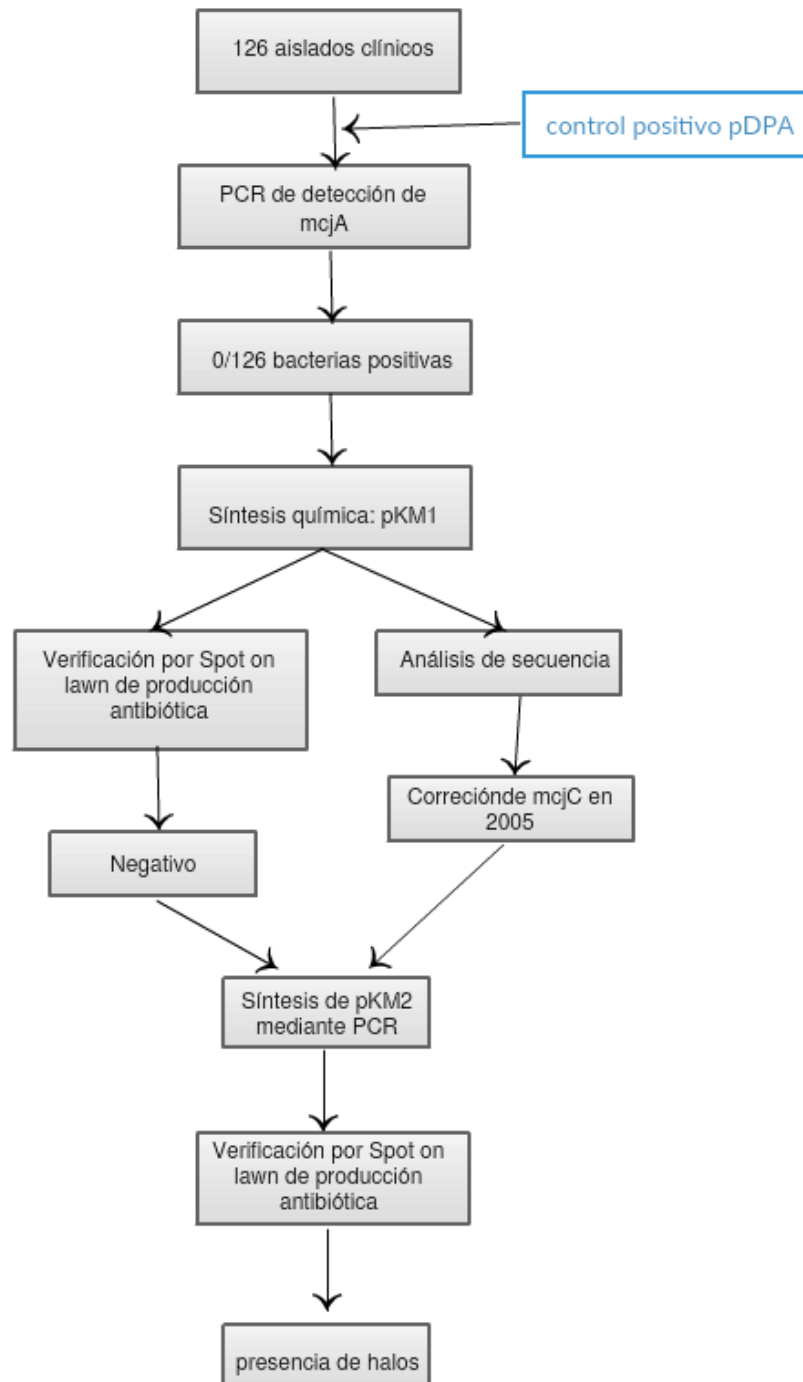
TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGACATATGGAGCTCC  
ACTTTGTGCCATGGAAGCTTCTAGATATGTGATTTATTGTTGATAGACAAAATGACAGAGTTCTTCT  
TTCAGAATATCAGCCATAGAAAGATATAGGTGTACCAATCCCCACAAAATACTCAGGCACATGTCC  
TGCACCACCTTTTGTGAGTTGCGATGCTGATTTTTTTATTTGTATAACCCCTTGCAGGAGATGGA  
ACATTATTTTTTTTACCAGAAGACAGTTTATTAATAATGAAAATGCTTAATCATTTTTACGTTCTTAT  
TTGATGGAAATAGTATGATGATTTTTTACAGAGGAACCTCACGTCCTTCTGTTAGAATTTTATTAGCA  
CAAAATACAATTGAGATCAATAATCATTACGCTTTAGTAATTTATCAATAAAATCATTTAGATACAA  
ACATCCATAAACTAATCAATCTGCAAAAAGTGGTCAAATTTAGTACAATATTTTGGATTTTTTATACAT  
TTTTCTAATTATTTTACAATATTTAGCCATCAATTAAGAAAAAATTTAGCTTGTAGATAAATTCAG  
AAGTTTTATTATTCCAATTGAGTGTAAGGCATAACTACAGGAGGGAGTGTCAAAATGATCCGT  
TACTGCTTAACCAGTTATAGAGAGGATCTTGTTATCCTGGATATAATTAATGATAGTTTCAGCATA  
GTGCCTGACGCAGGTAGCTTGCTAAAAGAAAGAGATAAATTGCTTAAAGAATTCACAACTATCT  
TACTTTTTTGACAGTGAATATCATATTGGAAGTGTTTCTCGTAATAGTGACACTTCTTTTCTGAAG  
AACGCTGGTTTCTACCAGAACCTGACAAAACATTATATAAGTGTTCTCTATTTAAACGATTTATATT  
ATTACTCAAAGTCTTTTACTATAGCTGGAATATTGAAAAAAAGGGATGGCATGGATTTTCATAAG  
TAATAAAAAAGAGAATAGGCTATACTCCTTGAATGAAGAGCATCTTATCCGGAAAGAAATTAGTA  
ATCTTTCCATTATCTTTTCATCTTAATATTTTTAAATCTGACTGTCTTACCTATTCATACGCACTAAAAA  
GAATTCTTAATTCCAGAAATATTGATGCTCATCTTGTTATTGGTGTAAGGACACAACCTTTTTATAG  
CCACTCTTGGGTGGAGGTTGGGGGACAAGTTATCAATGATGCTCCCAATATGCGGGATAAATTAT  
CTGTTATTGCAGAGATATAGTTATGGAAATATTTAATGTCAAGTTAAATGATACTTCAATTAGAATT  
ATTTTCTGTAAAACGCTTTCTGCCTTCCGGACAGAAAATACCATCGTTATGCTCAAAGGAAAAGCA  
GTTTCAAATGGCAAACCTGTATCCACAGAGGAGATTGCCAGAGTAGTGGAAGAAAAAGGTGTTTC

AGAAGTAATAGAAAATTTAGATGGTGTCTTCTGTATCCTAATTTATCATTTTAATGATCTCCTTATA  
GGGAAAAGCATTCAATCAGGCCCGCTCTATTTTATTGTAAAAAGAATATGGATATTTTTGTTTCG  
GATAAAATTTCTGATATCAAATTTTTGAATCCAGATATGACATTCAGTCTAAATATAACAATGGCAG  
AACATTATCTGTCAGGAAATCGAATAGCAACCCAGGAATCACTAATCACTGGCATTACAAAAGTAA  
ATAATGGTGAGTTTATAAAATTTAATAATCAGTTGAAACCTGTGCTACTTCGTGATGAGTTTAGTAT  
TACCAAAAAGAACAATTCAACTATCGACAGTATCATTGATAATATTGAGATGATGCGGGATAATA  
GAAAAATAGCCCTATTATTTTCCGGAGGATTGGATTCTGCATTAATTTTACACACTTAAGAATC  
AGGTAACAAATTCTGCGCTTATCATTTTTTTTTCTGATGAATCTGATGACAGTGAAAAGTATTTTGCT  
AAGGAATACTGTTCAAATATGGAGTTGATTTTATATCTGTTAATAAAAACATCAACTTTAATGAA  
AACTTTATTTCAATTTAAATCCTAATAGTCCGGACGAAATCCCTTGATATTTGAACAGACAGATG  
AAGAAGGTGAAGGTCAGCCCCCATAGACGATGATTTATTATATCTATGTGGTCACGGTGGAGAT  
CATATTTTCGGACAAAATCCTTCAGAACTTTTTGGCATTGATGCATATCGAAGTCATGGCTTGATGT  
TTATGCATAAAAAAATAGTAGAATTTTCCAATCTCAAGGGAAAGAGATATAAAGATATCATATTTT  
CAAATATTTCCGCATTCATTAATACATCCAACGGATGTTCTCCAGCAAAGCAAGAGCACGTATCAG  
ATATGAACTTGCCTCTGCTCAGTTTTTGCAACTGATTATACAGGAAAAATTAATAAACTAACTCC  
ATTCCTGCATAAAAAATATTATCCAGCATTATGCTGGCTTACCAGTTTTTAGTCTATTTAACCAGCACT  
TTGATCGTTATCCCGTTCGTTATGAAGCGTTTCAACGATTTGGTTCAGATATTTTCTGGAAAAAAC  
CAAACGGTCATCTTCACAGCTAATATTCAGAATTCTATCCGGTAAAAAGGATGAACTAGTGAATAC  
AATAAACAGTCAGGATTAATTGAAATATTAGGCATTAACCATATTGAATTGGAAAGCATTGTTGTA  
TGAAAATACGACTACACGTCTGACAATGGAACCTACCATATATACTTAACCTTATACCGTCTGGCAAA  
ATTCATTCAACTTCAATCCATTGATTATAAAGGTTAATTATGGAAAGAAAACAGAAAACTCATTAT  
TTAATTATATTTATTCATTAATGGATGTAAGAGGTAAATTTTTATTCTTTTCCATGTTATTCATTACA  
TCATTATCATCGATAATCATATCTATTTACCATTGATTCTTGCAAAGATTACAGATTTACTGTCTGG  
CTCATTGTCAAATTTTAGTTATGAATATCTGGTTTTACTTGCCTGTTTATACATGTTTTGCGTTATAT  
CTAATAAAGCAAGTGTTTTTTTTATTTATGATACTGCAAAGTAGTCTACGTATTAACATGCAGAAAA  
AAATGTCGCTAAAGTATTTGAGAGAATTGTATAACGAAAAATATACTAACTGAGTAAAAATAATG  
CTGGATATACAACGCAAAGTCTTAACCAGGCTTCAAATGACATTTATATTCTTGTGAGAAATGTTTC  
CCAGAATATCCTGTCACCTGTTATACAACCTATTTCCACTATTGTTGTTGTTTTATCTACGAAGGACT  
GGTTTTCTGCCGGTGTGTTTTTTCTCTATATTCTGGTATTTGTAATTTTAATACCAGACTGACTGGC

AGTTTAGCGTCTCTCAGAAAACACAGCATGGATATCACTCTTAACTCTTATAGTCTGTTATCTGATA  
CTGTTGATAACATGATAGCAGCTAAAAAGAATAATGCATTAAGACTTATTTCTGAACGTTATGAAG  
ATGCTCTCACTCAGGAAAACAATGCTCAGAAAAAATACTGGTACTCAGTTCTAAAGTTCTTTTATT  
GAACTCTTACTTGCTGTAATATTATTTGGTTCTGTATTCATATATAATATTTTAGGTGTGCTGAATG  
GTGTAGTTAGTATCGGCCACTTCATTATGATTACATCATATATCATTCTTCTTCAACGCCAGTGGA  
AAATATAGGGGCATTGCTAAGTGAGATCAGGCAGTCAATGTCTAGCCTGGCAGGTTTTATTCAAC  
GTCATGCCGAGAATAAAGCCACATCTCCTTCAATACCTTTTCTCAACATGGAGCGAAAATTAACC  
TGTCCATAAGAGAGCTTTCATTTAGCTATAGTGATGATAAAAAAATACTTAATTCAGTCAGTCTTG  
ACCTTTTTACCGGAAAAATGTATTCATTAACCGGACCCAGTGGTTCAGGAAAAATCCACCCTTGTA  
AAATAATATCAGGTTACTATAAAAAATTACTTTGGAGACATTTATCTGAATGATATATCCTTACGTAA  
TATCAGTGATGAGGATTTGAATGATGCTATTTACTACCTAACACAAGATGATTATATTTTTATGGAT  
ACACTACGATTTAATCTCCGGCTCGCAAATTACGACGCGTCAGAAAATGAAATATTTAAAGTTCTT  
AAACTGGCAAATCTTTCTGTCGTCAACAATGAACCAGTGAGTCTGGATACACACCTTATAAACAGA  
GGCAATAACTATTCAGGAGGGCAAAAAACAACGAATTCGTTAGCGCGACTGTTTTTGAGAAAACC  
TGCAATAATTATTATTGATGAAGCCACATCGGCTCTGGATTATATTAATGAATCAGAAATTTTATCA  
TCAATAAGAACTCATTTTCCTGATGCGTTAATTATAAATATTAGTCACCGAATAAATCTTCTGGAGT  
GTTCCGATTGTGTTTATGTATTGAATGAAGGAAATATTGTTGCTTCTGGCCATTTACAGGATTTGAT  
GGTCAGCAATGAATACATATCGGGACTGGCTTCTGTTACTGAATAAAATATCTGACTCCTGCTCTG  
TATTCAGAAAGGGAGTCGCTTGGAACCGGAATTTTTCCACGTTAAGAGAATTGGGTTGCACGA  
GTGGTTACATCCCGGCAAGCTAAGCCCCAGAATGTAAGGGTTGTTGAAATGCTCTGACCGTCCG  
CTAATCGTTTAGCTTACTTCTCCGCACATCCTGCGTAAATGTACAGAATTGTACGATTTCCGTACC  
ACCAAAACCGCTGTTGTCCCGCCATTCTGGGCCCTATTCCTGAAAGTTATTTGACTAAAAAATAGTC  
TTAACGTGGATCCTTATTTTCCGAATCTCGAGGCGGCCGCACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA  
GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGC  
ATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGC  
GTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCC  
GCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTG  
TAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTA  
TCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACT

GGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTA  
ACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAA  
AAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGCA  
AGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCT  
GACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTT  
CACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAAGCCCAATCTGAATAATGTTACAACCA  
ATTAACCAATTCTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGG  
ATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTT  
CCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTAT  
TAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGG  
TGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTC  
ATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATAC  
GCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCC  
AGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTTCCGG  
GGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAG  
AGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCT  
TTGCCATGTTTCAGAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAAGCGATAGATTGTCGCACCT  
GATTGCCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATC  
GCGGCCTCGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGA  
CAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACG  
GGCCAGAGCTGCA

## 5. Flujograma.



## **Agradecimientos**

Agradezco al FONDECY, pues este fue un estudio financiado por FONDECYT CONV-000114-2015-FONDECYT-DE.

Agradezco a la Dra. Teresa Ochoa del laboratorio de Infectología Pediátrica de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) por proporcionarme los aislados clínicos de *E. coli* utilizados en este trabajo. A su vez, agradezco a Déborath Aguirre, del laboratorio de Infectología pediátrica por el apoyo en la resucitación de estos aislados.

Agradezco al Dr. Daniel Guerra y a todos los miembros del laboratorio de Moléculas Individuales por el apoyo que me brindaron en todo el camino recorrido para generar este trabajo y por el ámbito de trabajo cálido. Gracias especiales a Anderson Javier, miembro del laboratorio, por su ayuda con la técnica de *Spot on lawn*.