

**PROGRAMA FORMATIVO EN BIOMEDICINA Y TECNOLOGÍAS PARA
LA VIDA**

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA PARA LA SALUD Y LA
SOSTENIBILIDAD**

Cueva Garcés, Esteban Oswaldo

Estudio de la adaptación nativa en el sistema CRISPR de *Salmonella*
enterica serovar Typhimurium

Study of the naïve adaptation in the CRISPR system of *Salmonella*
enterica serovar Typhimurium

Tutor: Maldonado Caro, Rafael Diego

Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología

Facultad de Ciencias

Julio 2019

Resumen

El sistema CRISPR-Cas constituye un sistema inmunitario adaptativo de arqueas y bacterias. Compuesto por una “matriz” que contiene en una serie de repeticiones intercaladas con “espaciadores” que constituyen la memoria inmunológica, aguas arriba de esta matriz encontramos una secuencia rica en AT que constituye la región líder. Asociado a CRISPR se encuentran las proteínas Cas que colaboran en las distintas fases de la actividad inmunitaria.

En este trabajo nos hemos centrado en la adaptación nativa del sistema CRISPR-Cas de *Salmonella enterica*, para ello hemos analizado si se produce la incorporación de nuevos espaciadores en la “matriz” CRISPR1 del cromosoma empleado un método recién desarrollado de alta sensibilidad (CAPTURE).

Aunque la utilización de este método no nos ha permitido detectar incorporación de nuevos espaciadores, sí hemos podido identificar la duplicación de espaciadores ya existentes.

Palabras clave: *Salmonella enterica*; adaptación nativa; CAPTURE; *hha*; *hns*; duplicaciones.

Abstract

The CRISPR-Cas system constitutes an adaptive immune system of archaea and bacteria. Composed of an "array" which contains in a series of repetitions interspersed with "spacers" that constitute the immunological memory, upstream of this array we find an AT rich sequence that constitutes the leading region. Associated with CRISPR are the Cas proteins that collaborate in the different phases of the immune activity.

In this work we have focused on the naïve adaptation of the CRISPR-Cas system of *Salmonella enterica*, for this we have analyzed if there is the incorporation of new spacers in the array CRISPR1 of the chromosome using a newly developed method of high sensitivity (CAPTURE).

Although the use of this method has not allowed us to detect the incorporation of new spacers, we have been able to identify the duplication of existing spacers.

Keywords: *Salmonella enterica*; naïve adaptation; CAPTURE; *hha*; *hns*; duplications

Índice

1. Introducción.....	5
1.1. Sistema CRISPR-Cas	5
1.1.1. Adaptación	7
1.1.2. Transcripción y maduración del crRNA.....	10
1.1.3. Interferencia.....	11
1.2. <i>Salmonella enterica</i>.....	12
2. Objetivos	14
3. Materiales y Métodos.....	14
3.1. Cepas y plásmidos.....	14
3.2. Medios de cultivo.....	15
3.3. Transformación.....	16
3.3.1. Electroporación.....	16
3.3.2. Cloruro de calcio y choque térmico.....	17
3.4. Adquisición.....	17
3.5. CAPTURE	18
3.5.1. Primera PCR CAPTURE.....	19
3.5.2. Selección de tamaño.....	20
3.5.3. Segunda PCR CAPTURE.....	21
3.5.4. Segunda electroforesis y purificación de banda.....	22
3.6. Clonación con el <i>Kit TOPO® TA Cloning®</i> (invitrogen).....	23
3.7. Secuenciación y Alineamiento.....	24
4. Resultados y Discusión.....	26
4.1. Transformación con pCR2.1.....	26
4.2. Primera PCR CAPTURE.....	26
4.2.1. Cebadores CAPTURE1 y CAPTURE2.....	26
4.2.2. Cebadores CAPTURE3 y CAPTURE2.....	28

4.3. Segunda PCR CAPTURE.....	30
4.3.1. Cebadores CAPTURE3 y CAPTURE2.....	30
4.3.2. CEBADORES CAPTURE 7 y 8.....	31
4.3.3. Cebadores Degenerados y CAPTURE2.....	33
4.4. Clonación con el <i>Kit</i> TOPO® TA Cloning® (invitrogen)	37
4.5. Análisis de secuencias.....	39
5. Conclusiones	43
6. Bibliografía.....	44
Anexo.....	46

1. Introducción

1.1. Sistema CRISPR-Cas

Los sistemas CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR Associated) han supuesto una verdadera revolución en la ciencia, en particular en el campo de la biotecnología y la ingeniería genética ^{1,2}, debido a que puede ser utilizado como una potente herramienta para la edición genómica y más accesible que las técnicas previas como podían ser las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) y las nucleasas tipo activadores de transcripción (TALENs) ³. Esto ha llevado a su utilización en distintos campos como puede ser la biotecnología agrícola, para desarrollar por ejemplo cultivos resistentes a estrés o modificando alguna característica de interés ^{4,5}. También en el ámbito de la biomedicina ha sido empleado para desarrollar modelos celulares y animales de enfermedades y ver su progresión provocando mutaciones “knock-out” o simular grandes reordenamientos cromosómicos ^{3,6}.

El sistema CRISPR-Cas actúa en la naturaleza como un sistema inmunitario adaptativo y heredable de arqueas y bacterias, siendo un mecanismo que proporciona una respuesta adaptativa rápida y robusta frente DNAs extraños como virus, plásmidos y transposones. La “matriz” (array) CRISPR consiste en una serie de secuencias repetidas cortas parcialmente palindrómicas⁷ intercaladas con secuencias “espaciadoras” que constituyen la memoria inmunológica del sistema debido a que contiene secuencias de fagos y plásmidos ⁸. Aguas arriba de la “matriz” encontramos la secuencia líder rica en AT que contiene el promotor de la expresión de la “matriz”. La adquisición y la utilización de los espaciadores son las etapas principales de la inmunidad mediada por CRISPR (Figura 1), su capacidad de incorporar nuevos espaciadores le confiere una inmunidad rápidamente adaptable ⁹.

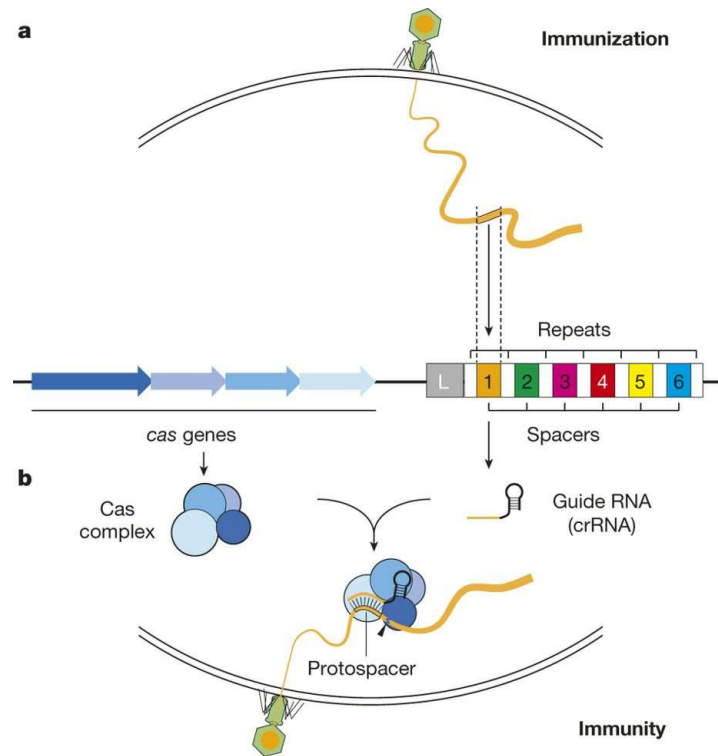


figura 1. Etapas de la inmunidad CRISPR-Cas. La “matriz” CRISPR es un grupo de repeticiones cortas de DNA (cajas blancas) separadas por secuencias espaciadoras igualmente cortas que provienen de fagos o plásmidos (cajas coloreadas, numeradas). Esta matriz de repetición / espaciador está flanqueada por un operón de genes asociados a CRISPR (cas) (flechas de tono azul) que codifican la maquinaria para las etapas de inmunización e inmunidad del sistema. La “matriz” CRISPR está precedida por una secuencia líder (recuadro gris) que contiene el promotor para su expresión. **a**, En la etapa de inmunización, las secuencias espaciadoras se capturan al ingresar el DNA extraño en la célula y se integran en la primera posición de la “matriz” CRISPR. **b**, En la etapa de inmunidad, el espaciador se usa para atacar el DNA invasor que lleva una secuencia análoga para su destrucción. Imagen de Luciano A. Marraffini⁹

Los sistemas CRISPR-Cas se pueden dividir en dos clases principales en función de los genes efectores que codifiquen (Cas). Los sistemas de clase 1 forma complejos multisubunidad de crRNA (RNA CRISPR) - efector (Cascade), mientras en los sistemas de clase 2 todas las funciones del complejo efector se llevan a cabo por una sola proteína

como Cas9 ¹⁰, a su vez dentro de cada clase hay distintos tipos y subtipos, dando unos 6 tipos y 19 subtipos¹¹ (figura 2)

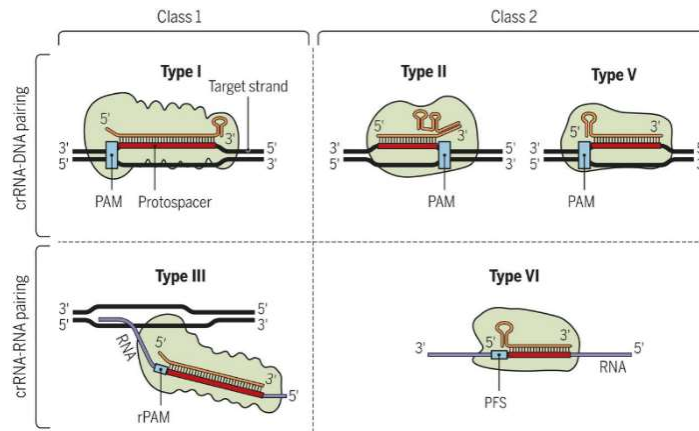


figura 2. Clasificación de los sistemas CRISPR-Cas. Imagen de Simon A. Jackson ¹¹

La actividad inmunitaria del sistema CRISPR-Cas se puede dividir en tres fases, **adaptación** o adquisición, incorporación de nuevos espaciadores; **transcripción y maduración** del crRNA; e **interferencia**, donde los crRNA maduros dirigen a las nucleasas Cas hacia el DNA foráneo.

1.1.1. Adaptación

La capacidad para adquirir nuevos espaciadores es fundamental para el mantenimiento del sistema. En los distintos tipos de sistemas existentes los principales responsables de realizar esta función son las proteínas Cas1 y Cas2, estas proteínas forman un complejo formado por dos dímeros de Cas1 y un dímero de Cas2 ¹²; también es necesario al menos una repetición y una parte de la secuencia líder. Podemos dividir la adquisición en tres etapas, captura del sustrato, reconocimiento del locus CRISPR e integración dentro de la “matriz” ¹¹.

El complejo Cas1-Cas2 toma un protoespaciador (Figura 3) el cual es un fragmento de DNA bicatenario bifurcado con los extremos 3’ sobresaliendo, los cuales interaccionan con los dominios catalíticos de Cas1, el complejo Cas1-Cas2 también actúa como una regla molecular que determina con gran precisión la longitud del del protoespaciador ¹³.

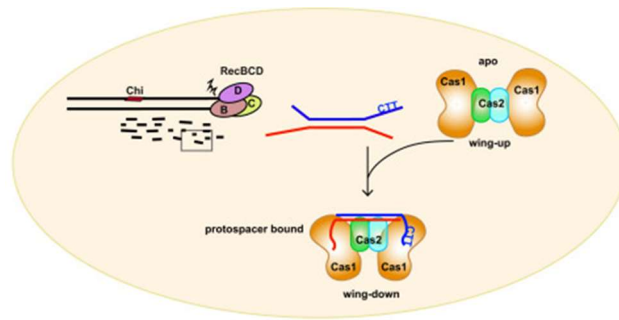


figura 3. Captura de protoespaciador por el complejo Cas1-Cas2. Imagen tomada de Jiuyu Wang¹³

Una vez capturado el protoespaciador el complejo Cas1-Cas2 debe encontrar la “matriz” CRISPR para poder llevar a cabo la integración, la cual se produce de manera polarizada en el extremo de la secuencia líder, lo que permite utilizar la “matriz” CRISPR como un reloj evolutivo. El complejo Cas1-Cas2 muestra afinidad por la región líder-repetición¹⁴, y se ha observado que para el reconocimiento en los sistemas de tipo IE también participa un heterodímero llamado factor de integración del hospedador (IHF) que se une a la secuencia líder generando un cambio conformacional en el mismo¹⁵.

Una vez localizado el locus CRISPR tiene lugar la integración (Figura 4), para lo cual Cas1 procesa el protoespaciador creando extremos 3’ – OH capaz de realizar un ataque nucleofílico sobre los extremos 5’ de la primera repetición lo que permite la integración del nuevo espaciador y la generación de una nueva repetición por la maquinaria de reparación del DNA del organismo¹⁴.

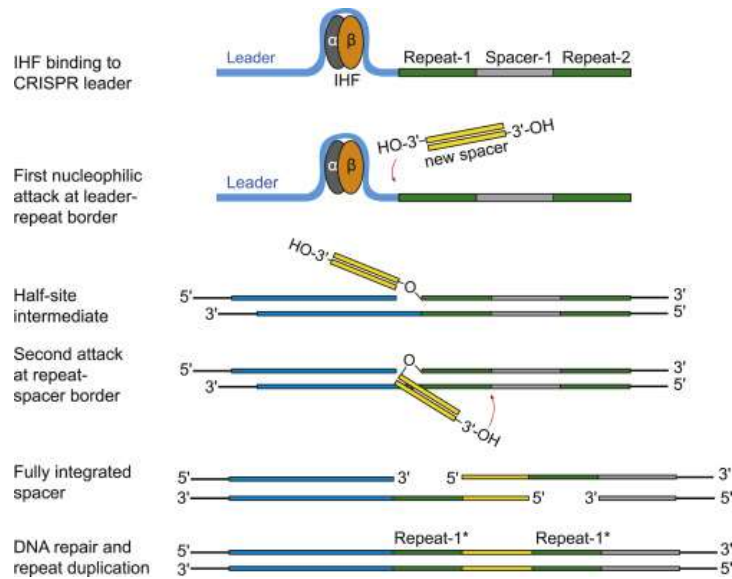


figura 4. Esquema de la integración un nuevo espaciador. IHF curva la DNA permitiendo al complejo Cas1-Cas2 reconocer la región para que se produzca el primer ataque nucleofílico. Imagen tomada de James K. Nuñez ¹⁴

Se diferencia dos tipos principales de adaptación la nativa (naïve) y la cebada (primed). La nativa se produce cuando se lleva a cabo la adquisición de nuevos espaciadores que no se encuentran catalogados previamente, para llevar a cabo esta adquisición participa el complejo Cas1-Cas2 y los protoespaciadores que son generados por el complejo RecBCD que produce fragmentos de DNA monocatenarios (ssDNA) durante el proceso de reparación del DNA, estos fragmentos pueden a continuación formar los fragmentos dúplex para ser captados por el complejo Cas1-Cas2 ¹⁶.

La adaptación cebada produce una adquisición intensificada de elementos genéticos móviles (MGE) estimulada por los espaciadores preexistentes que llevan una complementariedad parcial o completa con los MGE, esta estrategia actuaría como una forma de lucha contra las mutaciones de escape de los fagos ¹⁷. El proceso comienza con el reconocimiento por los complejos crRNA-efector de la diana, lo que promueve el reclutamiento de Cas3, que presenta actividades helicasa y endonucleasa que le permiten generar fragmentos de ssDNA, que proporciona los sustratos para la adquisición ¹⁸.

1.1.2. Transcripción y maduración del crRNA

La biogénesis de crRNA (Figura 5) maduros supone una etapa crítica para la capacidad inmunológica del sistema, de forma general la transcripción se inicia en el promotor localizado en la secuencia líder dando lugar al pre-crRNA, el cual a continuación es procesado por ruptura en puntos específicos dentro de las repeticiones. Este procesamiento varía según el tipo de sistema CRISPR, en los tipos I y III, una proteína de la familia Cas6 o Cas5d cataliza este proceso, mientras en el tipo II el proceso es dirigido por un RNA pequeño que actúa en trans (tracrRNA); el corte es producido por la endoribonucleasa III dentro de las repeticiones en presencia de Cas9¹⁹. En los sistemas tipo V y VI, Cas12 y Cas13 respectivamente poseen actividad nucleasa tanto para el procesamiento del crRNA como en la interferencia¹⁷.

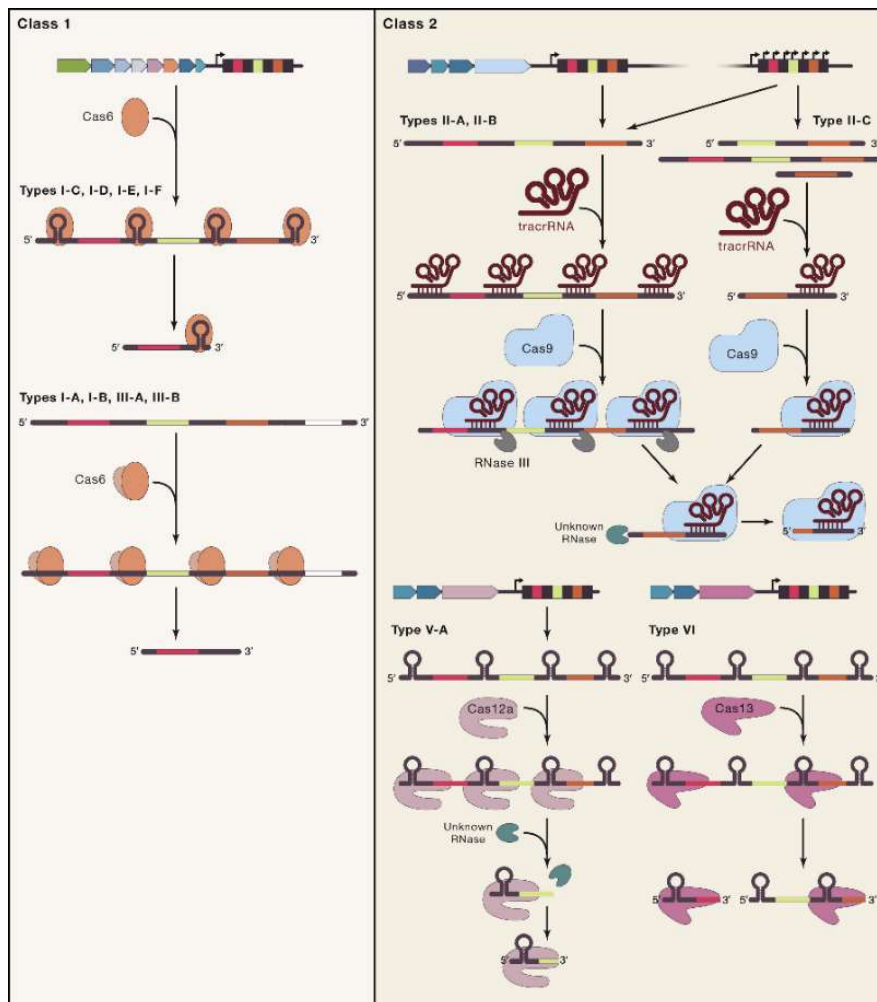


figura 5. Maduración de crRNA en distintos sistemas CRISPR. Imagen tomada de Frank Hille¹⁷.

1.1.3. Interferencia

Es la última etapa de la inmunidad en la que tiene lugar la destrucción de los MGE foráneos. El proceso es guiado por los crRNA maduros que reconoce el material exógeno por complementariedad de secuencias, pero para evitar la autoinmunidad la diana debe poseer algún mecanismo para diferenciarlo con la secuencia presente en la “matriz” CRISPR, en la mayoría de sistemas además de la complementariedad de las secuencias es necesaria una secuencia corta llamada motivo adyacente al protoespaciador (PAM) que no se encuentra en la “matriz” sirve como mecanismo para evitar la autoinmunidad¹⁷.

Los crRNA maduros forman complejos estables con proteínas Cas, en los sistemas tipo I se forma un complejo proteico conocido como Cascade, mientras en los sistemas de tipo II el componente proteico es solo Cas9. En los sistemas tipo I (Figura 6A) la proteína de la Cascade Cas8e (anteriormente Cse1) interacciona con el motivo PAM produciendo la desestabilización del DNA permitiendo la interacción del crRNA con la secuencia del DNA homóloga, lo que provoca un cambio en la conformación local del DNA, estos cambios desencadenan el reclutamiento de Cas3 que presenta actividad nucleasa-helicasa que es la encargada de llevar a cabo la degradación del DNA diana en la cadena no objetivo. Los sistemas tipo II la interferencia (Figura 6B) esta mediada por Cas9 y el crRNA-tracrRNA reconoce la secuencia PAM localizada en el extremo 5' del protoespaciador, formando también un cambio conformacional como el sistema tipo I, a continuación, tiene lugar la actividad nucleasa en ambas cadenas del DNA diana por Cas9 dando lugar a extremos romo en un sitio específico, que suele estar a tres nucleótidos del extremo 3' del protoespaciador ²⁰.

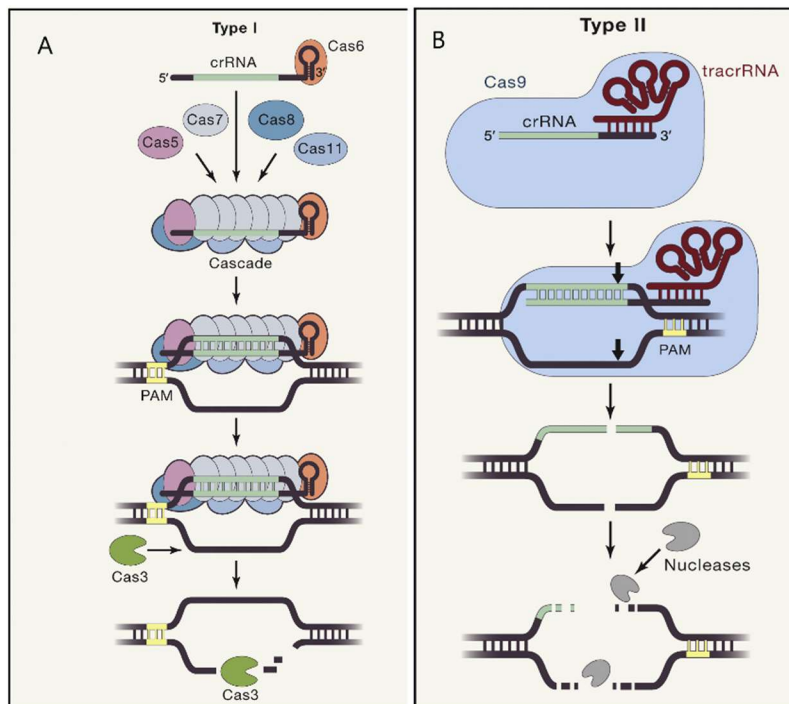


figura 6. Esquema de la interferencia por el sistema CRISPR-Cas. (A) Interferencia en los sistemas de Tipo I. (B) Interferencia en los sistemas de Tipo II. Imagen tomada y modificada de Frank Hille ¹⁷.

1.2. *Salmonella enterica*

Salmonella es un género de bacilos gramnegativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, que consta de dos especies *S. bongori* y *S. enterica*, esta última se divide en seis subespecies, *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. *Salmonella* consta de más de 2500 serotipos de los cual unos 1500 pertenecen a *S. enterica subsp. enterica*, entre las que destacan *S. enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium y *S. enterica subsp. enterica* serovar Enteritidis debido a que son los principales responsables de la salmonelosis en humanos ²¹.

La salmonelosis es una de las enfermedades diarreicas transmitida por alimentos más importantes del mundo, aunque la mayoría de los casos produce infecciones leves puede llegar a producir cuadros más graves e incluso la muerte. En Estados Unidos de América se producen alrededor de 1 400 000 casos de salmonelosis al año provocando unos costes económicos de varios miles de millones de dólares ²².

Salmonella presenta dos loci CRISPR (Figura 7), ambos se localizan en la cadena negativa y se encuentran separados por aproximadamente 16 kb. El locus de CRISPR 1 se localiza aguas abajo del gen *iap*, el CRISPR 2 aguas arriba del gen *ygcF*. La secuencia de repetición consenso es la misma en los dos loci teniendo 29 pb (5'-CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC-3'), aunque se han observado algunas variantes con respecto al consenso. Entre las distintas especies de *Salmonella* el número de espaciadores varía, de media en el primer locus hay 18.6 ± 13.6 espaciadores y en el segundo 15 ± 9.8 , el tamaño de estas secuencia es de manera general de 32 pb pero hay espaciadores más pequeños, de hasta 29 pb, o más grandes de 74 pb ²³.

Aguas arriba de la “matriz” CRISPR se localiza la secuencia líder que es rica en AT. Y asociado a CRISPR 1 tenemos 8 genes *cas*: *cas3*, *cse1 (casA)*, *cse2*, *cas7*, *cas5*, *cas6e*, *cas1* y *cas2* ²⁴, por lo cual presenta la estructura típica de los sistemas tipo IE ¹⁰.

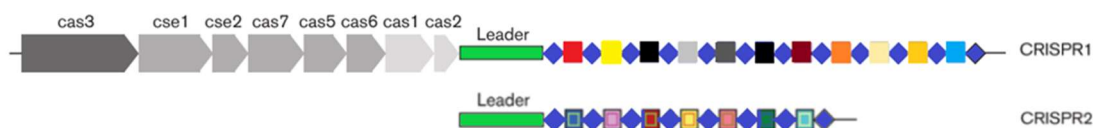


figura 7. Esquema de los loci CRISPR de *Salmonella*, en verde se representa la secuencia líder, en rombos azules las repeticiones y en cuadrados de colores los espaciadores. Imagen tomada y modificada de Nikki Shariat ²⁴

La función más aceptada de CRISPR es la de sistema inmune, sin embargo, en *Salmonella* los distintos estudios apuntan a que no se encuentra activo, aunque tenga las características típicas de un sistema activo como puede ser genes *cas* y secuencia líder conservados, además una diferencia en la composición de los espaciadores que refleja una actividad histórica. Pero cuando se han analizado las secuencias de los espaciadores solo un 10% se encontraron en fagos y un 2% en plásmidos, no se han observado nuevas adquisiciones de espaciadores y la mayoría de los polimorfismos observados dentro de las matrices se deben a pérdida de espaciadores en ambas matrices y también se han observado duplicaciones, pero solo en CRISPR 2. Estos datos sugieren que en un

momento dado el sistema estuvo activo y quizás actualmente ha evolucionado a otra función alternativa ²⁴.

Por otro lado, se ha observado que el sistema CRISPR-Cas se encuentra regulado por promotores inducidos por el regulador global LeuO. en *E. coli* se han observado dos promotores, el primero dependiente de LeuO localizado aguas arriba del gen *casA* (*cse1*) y el segundo ubicado en la secuencia líder de la “matriz” CRISPR lo que sugiere que son dos unidades transcripcionales, mientras que en *Salmonella* solo se observa el primer promotor. Los genes regulados por LeuO pueden reprimidos por el regulador maestro Hns, se ha observado que Hns es capaz de reprimir la expresión de *casA*. Adicionalmente tienen un papel en la represión del sistema CRISPR la proteína LRP (proteína reguladora sensible a leucina) ²⁵ y la proteína Hha que es capaz de suplir a Hns ²⁶.

2. Objetivos

Como objetivo principal se busca analizar la adquisición nativa en *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium.

Como objetivos secundarios:

- Comprobar la posible adquisición u otros eventos poco frecuentes en la “matriz” CRISPR de *Salmonella* utilizando el método de alta sensibilidad CAPTURE ²⁷.
- Analizar si las mutaciones en los genes *hns* y *hha* influye en la adquisición de nuevos espaciadores.

3. Material y Métodos

3.1. Cepas y plásmidos

Para el este trabajo se han utilizado cuatro cepas distintas de *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium, la cepa SV5015 (en adelante WT), de la que derivan las otras tres que presentan mutaciones en los genes *hns* y *hha* (Tabla 1) relacionados en la regulación del sistema CRISPR. También se ha utilizado la cepa de *Escherichia coli* DH5α.

Las cepas se encontraban congeladas a – 80 °C por lo cual primero las refrescamos dejándolas crecer un día en placas con LB sin antibiótico a 37 °C, al día siguiente se transfirieron a placas con LB y su antibiótico correspondiente.

Las secuencias de los plásmidos utilizados y de la región líder hasta el tercer espaciador de la “matriz” CRISPR de *Salmonella* SV5015 se muestran en el anexo.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados. Cm (cloranfenicol), Km (kanamicina), Amp (ampicilina)

Cepa/plásmido	Genotipo	Procedencia
SV5015 (WT)	SI1344 His ⁺	Antonio Juárez Universidad de Barcelona.
SV5015 Δhha	$\Delta hha::Cm$	
SV5015 Δhns	$\Delta hns::Km$	
SV5015 $\Delta hha/\Delta hns$	$\Delta hha::Cm, \Delta hns::Km$	
<i>E. coli</i> DH5 α ²⁸	$\Delta(argF-lac)169,$ $\phi80dlacZ58(M15),$ $\Delta phoA8, glnX44(AS), \lambda;$ $deoR481, rfbC1,$ $gyrA96(NalR), recA1,$ $endA1, thiE1, hsdR17$	Rafael Maldonado Universidad de Alicante
pCR2.1	lacZ α Amp ^R	Kit TOPO [®] TA Cloning [®] (invitrogen)
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	lacZ α Amp ^R	

3.2. Medios de cultivo

- Medio LB (Luria-Bertani): Triptona 10 g/L, extracto de Levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, Agar bacteriológico (medio solido) 18 g/L
- Antibióticos: ampicilina (100 μ g/ml), cloranfenicol (25 μ g/ml), kanamicina (50 μ g/ml). Los antibióticos se encuentran a una disolución concentrada 1000 veces mayor que la de trabajo (mg/ml), en agua (ampicilina y kanamicina) o etanol 96^º (cloranfenicol).
- X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido): a una concentración de 40 mg/ml en dimetilformida, 100 μ l por placa.

- Los cultivos de 5ml se hicieron en tubos de plástico de 10 ml
- Las cepas se incubaron a 37°C

3.3. Transformación

Se utilizaron dos métodos de transformación, electroporación; cloruro de calcio y choque térmico. Para llevar a cabo las transformación utilizamos los protocolos modificados de Ausubel (3rd edn) ²⁹

3.3.1. Electroporación.

- Se inoculan 5 ml de LB con una colonia y se deja toda la noche a 37°C con agitación.
- Se transfieren los 5ml del cultivo de la noche anterior a 50 ml de LB.
- Se deja crecer a 37 °C hasta una DO (densidad óptica) de 0.6-0,9
- Centrifugar a 4°C 5 minutos a 6500 rpm
- Retirar sobrenadante y resuspender el precipitado en 50 ml H₂O mili-Q (fría).
- Centrifugar a 4°C 5 minutos a 6500 rpm
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 1 ml H₂O mili-Q.
- Centrifugar a 4°C 5 minutos a 6500 rpm
- Retirar sobrenadante y resuspender el precipitado en 250 µl de glicerol al 10% (congelar)
- 60 µl de células competentes + 1 µl del plásmido, se incuba 5 minutos en hielo
- Se transfiere a una cubeta de electroporación
- Electroporación a 25 µFD, 200 Ω y 1,8 kV
- 1 ml de LB y se transfieren a tubos de cultivo
- Incubar 1 hora y transferir a placas con medio LB con ampicilina.
- Se incuban 24 horas a 37 °C

3.3.2. Cloruro de calcio y choque térmico.

- Se inoculan 3 ml de LB con una colonia y se deja toda la noche a 37°C con agitación.
- Se transfieren 500 µl del cultivo de la noche anterior a 50 ml de LB.
- Se deja crecer a 37 °C hasta una DO de 0.4
- 4°C durante 15 minutos.
- Centrifugar a 4°C 10 minutos a 6500 rpm
- Retirar sobrenadante y resuspender el precipitado en 50 ml CaCl₂ 0.1M
- Centrifugar a 4°C 10 minutos a 6500 rpm
- Eliminar el sobrenadante y resuspender otra vez 50 ml CaCl₂ 0.1M y dejar 30 minutos en hielo
- Centrifugar a 4°C 10 minutos a 6500 rpm
- Retirar sobrenadante y añadir 5 ml de (CaCl₂ 0.05M + Glicerol 20%)
- 100 µl de células competentes + 1 µl plásmido
- 15 minutos en hielo
- Choque térmico, 45 segundos en un baño a 42 °C
- Se devuelven al hielo los tubos y se dejan allí durante 2min
- Se añade 400 µl de LB y se dejan a 37°C durante una hora.
- Se transfieren a placas de LB con ampicilina
- Se incuban 24 horas a 37°C.

3.4. Adquisición

Con el fin de aumentar la probabilidad de adquisición, las distintas cepas de *Salmonella* se transformaron con el plásmido pCR2.1 mediante la técnica de electroporación, con el fin de que este actué como fuente de DNA exógeno.

A continuación, se inoculan 5ml de LB sin antibiótico con una colonia transformada de cada cepa (3 réplicas A, B, C para cada una) y se la deja incubando 24 horas a 37 °C, al día siguiente se realiza un pase de 100 µl del cultivo del día anterior a 4,9 ml de LB fresco y se deja incubar otras 24 horas a 37 °C, el proceso se repite hasta un total de 5 pases. Como control negativo de la adquisición se utilizó una colonia de la cepa WT sin plásmido y sin pases.

Una vez realizados los pases se centrifugan 200 µl de cultivo y el precipitado se resuspende en 50 µl de agua mili-Q y se congelan a -20 °C.

3.5. CAPTURE

El método CAPTURE (CRISPR Adaptation PCR Technique Using Reamplification and Electrophoresis), fue desarrollado por Mckenzie ²⁷ para la detección de nuevas adquisiciones en la “matriz” CRISPR cuando estas ocurren a muy baja frecuencia. El método aprovecha dos pasos de PCR separados por electroforesis y extracción de amplicones de DNA de un tamaño correspondiente a los producidos en caso de que se haya generado la adquisición de un nuevo espaciador ²⁷.

En nuestro trabajo realizamos dos primeras PCR CAPTURE y cuatro segundas PCR CAPTURE (FIGURA 8). El procedimiento se aplicó a las cuatro cepas transformadas con el plásmido pCR2.1 y a la cepa SV5015 sin plásmido ni pases (control negativo de la adquisición).

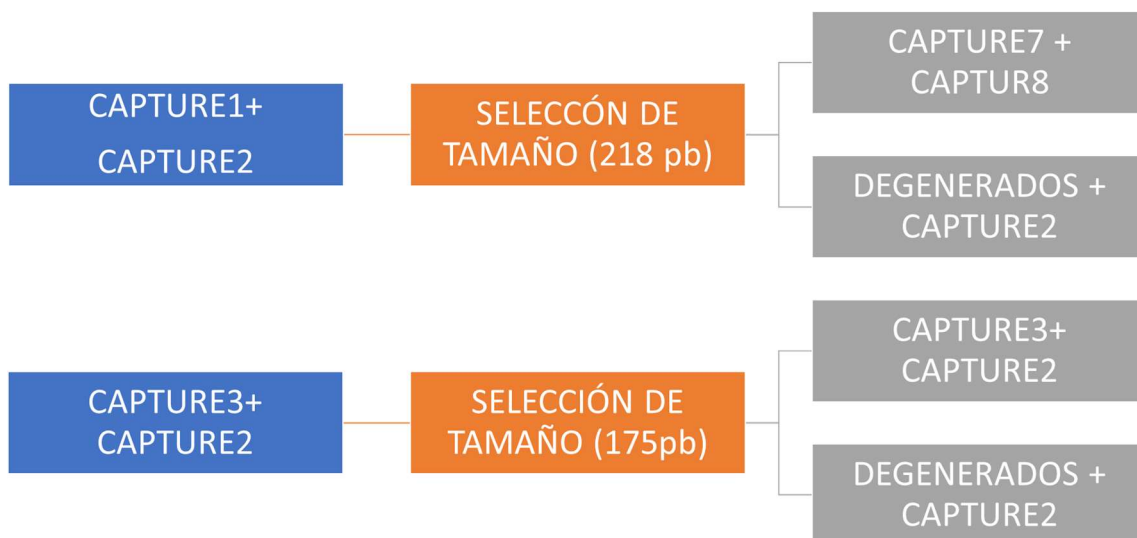


figura 8. Esquema de PCRs CAPTURE. En azul se muestra la primera PCR CAPTURE, en naranja la selección de tamaño y en gris la segunda PCR CAPTURE. CAPTURE(1,2,3,7y8) y DEGENERADOS hace referencia a los cebadores utilizados en cada PCR.

3.5.1. Primera PCR CAPTURE

Para analizar la adquisición en la “matriz” CRISPR 1 realizamos dos PCRs distintas utilizando como DNA molde las células congeladas de los países de adquisición.

Una PCR se hace utilizando el cebador CAPTURE1 como directo que se localiza en el inicio de la secuencia líder y el cebador CAPTURE2 como reverso en el primer espaciador. La otra PCR se realiza utilizando el cebador CAPTURE3 como directo que se localiza a mitad de la secuencia líder y el cebador CAPTURE2.

Los cebadores se diseñaron utilizando el programa SnapGene® versión 2.3.2 (Anexo, Tabla 1). En el anexo también se muestran la secuencia de la “matriz” CRISPR1 desde la secuencia líder hasta la repetición aguas abajo del tercer espaciador.

Para realizar las PCRs se utilizó NZYtaq II 2× Green Master Mix (NZYTech), es una solución premezclada lista para usar que contiene DNA polimerasa NZYtaq II (MB354), DNA polimerasas derivada de Taq, dNTPs y MgCl₂ a una concentración final de 2,5 mM, lo que permite la implementación de una amplia gama de protocolos PCR.

La composición de las PCRs se describe a continuación (Tabla 2):

Tabla 2. Composición PCR

Componente	Volumen
Cebador directo (5 μM)	5 μl
Cebador reverso (5 μM)	5 μl
NZYtaq II 2× Green Master Mix	25 μl
H ₂ O mili-Q	Hasta 50 μl (14 μl)
DNA	1 μl

Las condiciones de las PCRs fueron las siguientes (Tabla 3):

Tabla 3. Parámetros 1ª PCR CAPTURE

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	35
Hibridación	45 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	15 segundos	
Extensión final	72 °C	5 minutos	1

3.5.2. Selección de tamaño

El producto de cada una de las primeras PCR CAPTURE se someten a electroforesis en gel de agarosa al 3% (p/v), las condiciones de la carrera fueron 110 V durante 2 horas en tampón TAE 1X (Anexo, Tabla 2). Para la tinción del gel se utilizó RedSafe™ (iNtRON) 1µl/10 ml de gel, lo que permite el revelado sin necesidad de usar EtBr (bromuro de etidio).

Después de correr el gel cortamos un fragmento de este a la altura donde debería encontrarse una banda correspondiente a la adquisición de un nuevo espaciador, aunque no seamos capaces de verla en el gel.

Una vez cortadas las “bandas” donde esperamos que se encuentre el nuevo espaciador las purificamos utilizando el *kit* de purificación de banda (illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification *Kit*, GE Healthcare Life Sciences). El protocolo para purificar la banda es el siguiente:

- 10 µl de tampón 3 por 10 mg de banda.
- Incubar a 65°C hasta que la banda se funda (30-45min).
- Se pasa a la columna y se incuba un minuto.
- Centrifugación 30 segundos a máxima velocidad en microcentrífuga.
- Se descarta el eluido y se añade a la columna 500 µl de tampón 1.
- Centrifugación 30 segundos a máxima velocidad en microcentrífuga.

- Se descarta el eluido y el tubo y se pone la columna en un eppendorf, se añade a la columna 30 µl de tampón 4.
- Centrifugación 1 minuto a máxima velocidad en microcentrífuga y se guarda el eluido (DNA purificado).

3.5.3. Segunda PCR CAPTURE

Se realizan dos PCRs distintas para cada una de las “bandas” purificadas de las primeras PCRs CAPTURE, usando distintas combinaciones de cebadores (Figura 9).

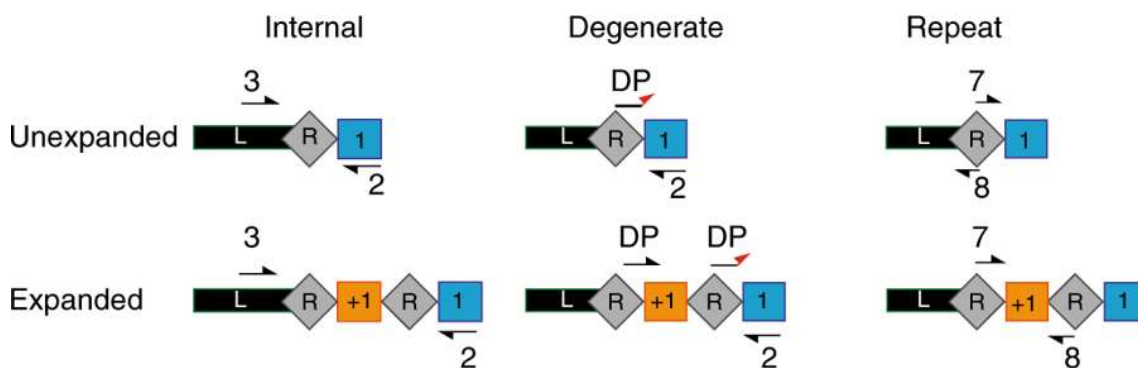


figura 9. Distintas combinaciones de cebadores para detectar adquisición después de la selección de tamaño. Imagen tomada de Rebecca E. McKenzie²⁹.

A las bandas producto de la PCR de la pareja de cebadores CAPTURE1 y CAPTURE2, se les hizo dos PCRs distintas, una utilizando una mezcla equimolar de los cebadores degenerados como directo (CAPTURE4, CAPTURE5 y CAPTURE6) que abarcan el final de la secuencia de repetición y el primer nucleótido del nuevo espaciador junto con el cebador CAPTURE2. Estos cebadores degenerados presentan un apareamiento erróneo en su extremo 3' con la secuencia del espaciador 1, por lo que la reacción no tendría lugar. La otra PCR que se realiza es utilizando la pareja de cebadores CAPTURE7 como directo y CAPTURE8 como reverso que hibridan con la repetición de tal manera que solo amplificaran en caso de una nueva adquisición. Las secuencias de los cebadores se encuentran en la tabla 1 del anexo.

Con el producto de la PCR CAPTURE3 y CAPTURE2 realizamos una PCR con los cebadores degenerados y el cebador CAPTURE2 y otra con los cebadores CAPTURE3 y CAPTURE2, esta última PCR es menos sensible para detectar adquisición que las otras dos, ya que puede volver a amplificar, aunque no haya habido adquisición de nuevos espaciadores.

La composición de las PCRs fueron las mismas que en las primeras PCRs CAPTURE (Tabla 2) y Las condiciones de las PCRs fueron las siguientes (Tabla 4):

Tabla 4. Parámetros 2ª PCR CAPTURE

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	35
Hibridación	45 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	15 segundos	
Extensión final	72 °C	5 minutos	1

3.5.4. Segunda electroforesis y purificación de banda

Los productos de las segundas PCRs CAPTURE se corrieron en un gel de agarosa al 3% con las mismas condiciones de la primera electroforesis (Apartado 3.5.2).

Las bandas de agarosa se purificaron con el *kit* de purificación de banda, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente (Apartado 3.5.2). Estas fueron:

- Las de un tamaño en torno a 109 pb, correspondientes a tres réplicas de las cuatro cepas con el plásmido pCR2.1, tras cinco pases para potenciar la adquisición. Son el producto de la primera PCR con los cebadores CAPTURE1 y CAPTURE2
- Después de la selección de tamaño, y tras la segunda PCR con los cebadores degenerados junto con el cebador CAPTURE2.

3.6. Clonación con el *Kit* TOPO® TA Cloning® (invitrogen)

El producto de las bandas purificadas se utiliza como inserto en el vector de clonación pCR®2.1-TOPO® (Figura 10), aprovechando que la polimerasa Taq añade un nucleótido de adenina protuberante en los extremos 3'. El vector de clonación empleado tiene un nucleótido de timidina protuberante en los extremos 3' que permiten aparear con la adenina del inserto.

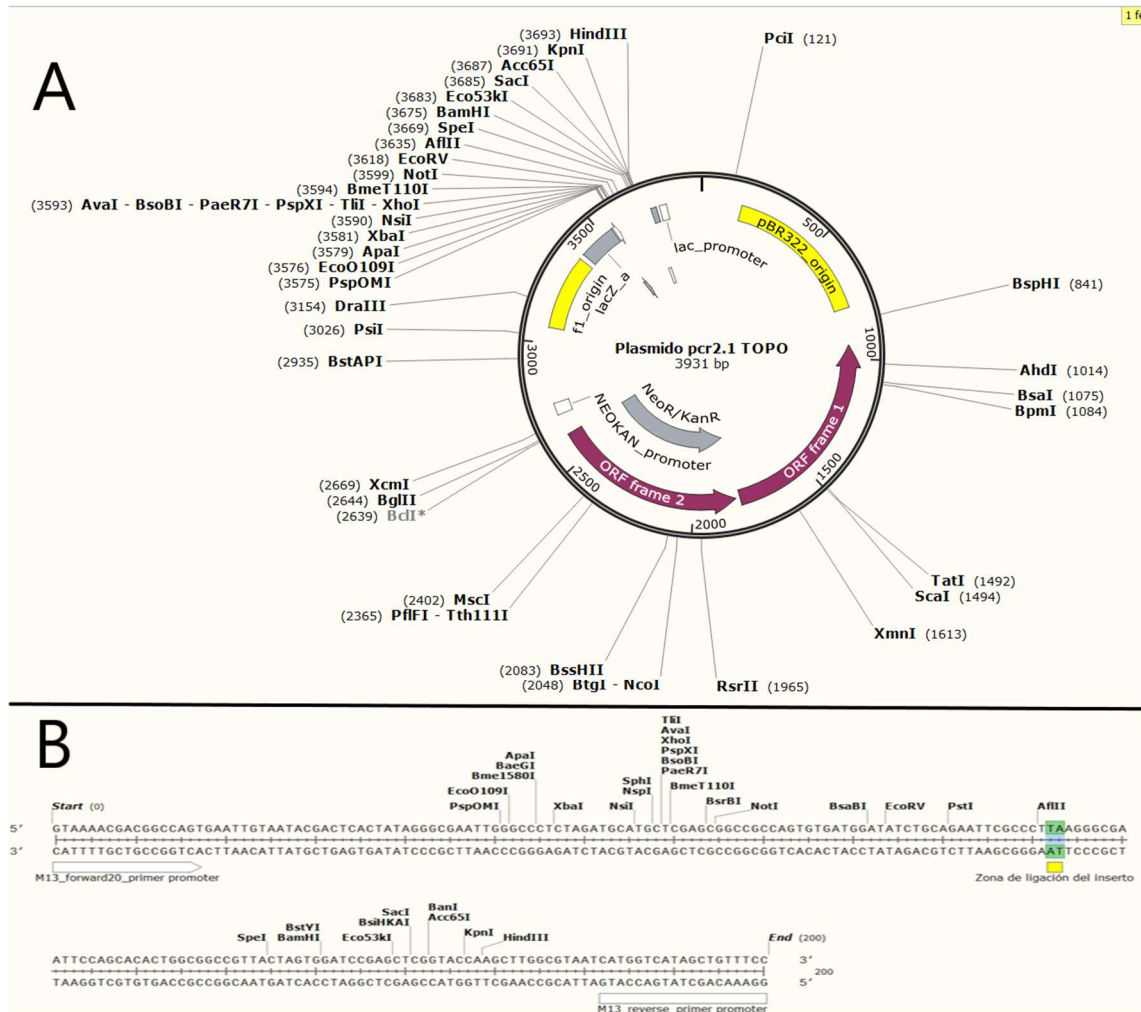


figura 10. Vector de clonación pCR®2.1-TOPO®. (A) Mapa del vector de clonación. (B) Secuencia del sitio de clonación múltiple, en blanco los cebadores del promotor M13 directo y reverso. Resaltado la zona donde tiene lugar la ligación con el inserto.

Para realizar la ligación seguimos el protocolo del *kit* TOPO® TA Cloning® (invitrogen) que consiste en 4 µl producto de PCR recién purificado (inserto), 1 µl de la solución de sales y 1 µl del vector pCR®2.1-TOPO® dando un volumen final de 6 µl, el cual se deja

incubando 5 minutos a temperatura ambiente y se pasa a hielo para posteriormente utilizarlo en la transformación.

Se utiliza *E. coli* DH5 α competentes para la transformación con cloruro de calcio y choque térmico. Las células transformadas se incubaron en medio LB con ampicilina y X-gal, durante 24 horas a 37°C.

Se realizó una PCR de las colonias transformadas utilizando los cebadores del promotor M13 directo y reverso incluidos en el *kit* de clonación, para confirmar la presencia del inserto. La composición de las PCRs fuer las mismas que en las anteriores PCRs (Tabla 2) y Las condiciones de las PCRs fueron las siguientes (Tabla 5):

Tabla 5. Parámetros PCR

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	30
Hibridación	55 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	15 segundos	
Extensión final	72 °C	5 minutos	1

3.7. Secuenciación y Alineamiento

Se extrajo el plásmido de las colonias transformadas para su posterior secuenciación, para la extracción del plásmido lo que se utilizó el *kit* comercial, High Pure Plasmid Isolation *Kit* (Roche), el protocolo seguido fue el siguiente:

- Inocular 5ml de LB con una colonia y se deja toda la noche a 37 °C con agitación
- Centrifugar 2 min a máxima velocidad
- Eliminar sobrenadante y resuspender las células en 250 µl de tampón 1
- Añadir 250 µl de tampón de lisis 2, invertir 6 veces e incubar 3 minutos a temperatura ambiente
- Añadir 350 µl de tampón 3 (frío), invertir 6 veces e incubar 5 minutos en hielo
- Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad
- Transferir el sobrenadante a una columna
- Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad
- Descartar el eluido y añadir 700 µl de tampón 5
- Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad, descartar el eluido y volver a centrifugar
- Transferir la columna a un nuevo eppendorf
- Añadir 30 µl de H₂O mili-Q, incubar 1 minuto a temperatura ambiente
- Centrifugar 2 minutos a máxima velocidad
- Guardar el eluido (plásmido) a -20 °C.

Los plásmidos se cuantificaron con NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), debido que para secuenciar se exige una concentración mínima de plásmido de 100 ng/ µl y 15 µl de plásmido. Los plásmidos se mandaron a secuenciar a la empresa Stabvida (<https://www.stabvida.com/es>), mediante secuenciación Sanger y utilizando el cebador M13 reverso.

Una vez obtenidas las secuencias junto con la del vector pCR[®]2.1-TOPO[®] se alinearon con el algoritmo ClustalW utilizando el programa informático MEGA-X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)³⁰ versión 10.0.5. Con el fin de identificar la secuencia de insertada.

4. Resultados y Discusión

4.1. Transformación con pCR2.1

La transformación de las cepas de *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium, WT, Δhha , Δhns , $\Delta hha/\Delta hns$, con el plásmido pCR2.1 les confirió resistencia a ampicilina (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

4.2. Primera PCR CAPTURE

4.2.1. Cebadores CAPTURE1 y CAPTURE2

Cuando realizamos la PCR con la pareja de cebadores CAPTURE1 (inicio de la secuencia líder) como directo y CAPTURE2 como reverso (primer espaciador), esperamos encontrarnos un amplicón de 157 pb (figura 11). Que corresponde a la “matriz” CRISPR sin que haya ocurrido su expansión por un nuevo espaciador.

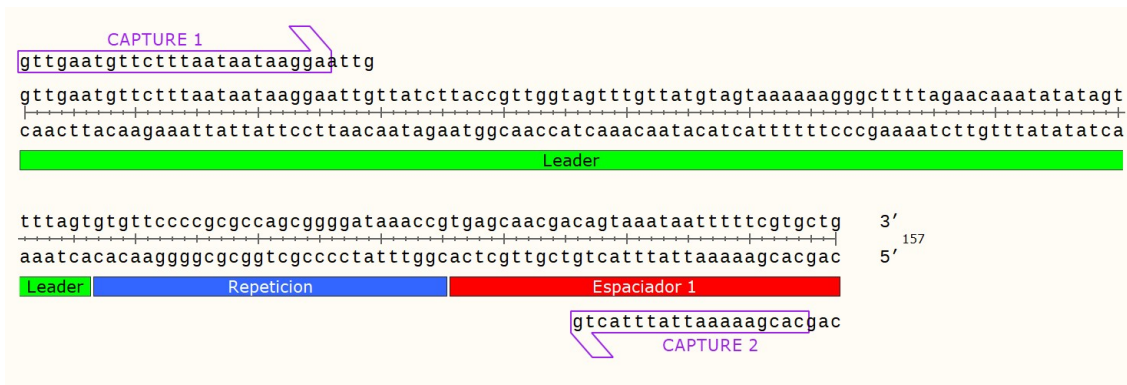


figura 11. Amplicón de 157 pb de la PCR con el cebador CAPTURE1 (flecha superior) y CAPTURE2 (flecha inferior). En verde se muestra la secuencia líder, en azul la primera repetición y en rojo el primer espaciador

Por otro lado, en caso de haber ocurrido la adquisición de algún nuevo espaciador nos encontraríamos también con un amplicón de 218 pb (Figura 12).

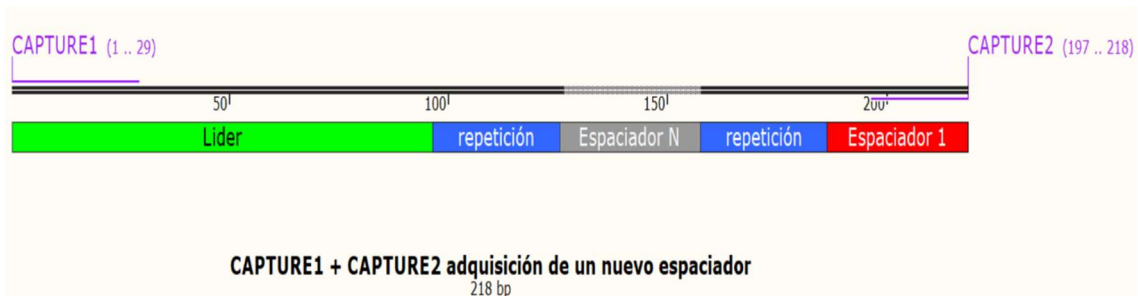


figura 12. Amplicón esperado en caso de adquisición de un nuevo espaciador con cebadores CAPTURE1 + CAPTURE2 (218pb). En verde se muestra la secuencia líder, en azul las repeticiones, en rojo el primer espaciador y en gris el nuevo espaciador.

Cuando observamos los productos de esta PCR en un gel de agarosa (Figura 13), podemos apreciar de forma clara en todas las cepas bandas entorno a las 157 pb (Figura 11). Pero no se aprecia ninguna banda entorno a las 218 pb (figura 12) que sería indicativo de la adquisición de un nuevo espaciador.

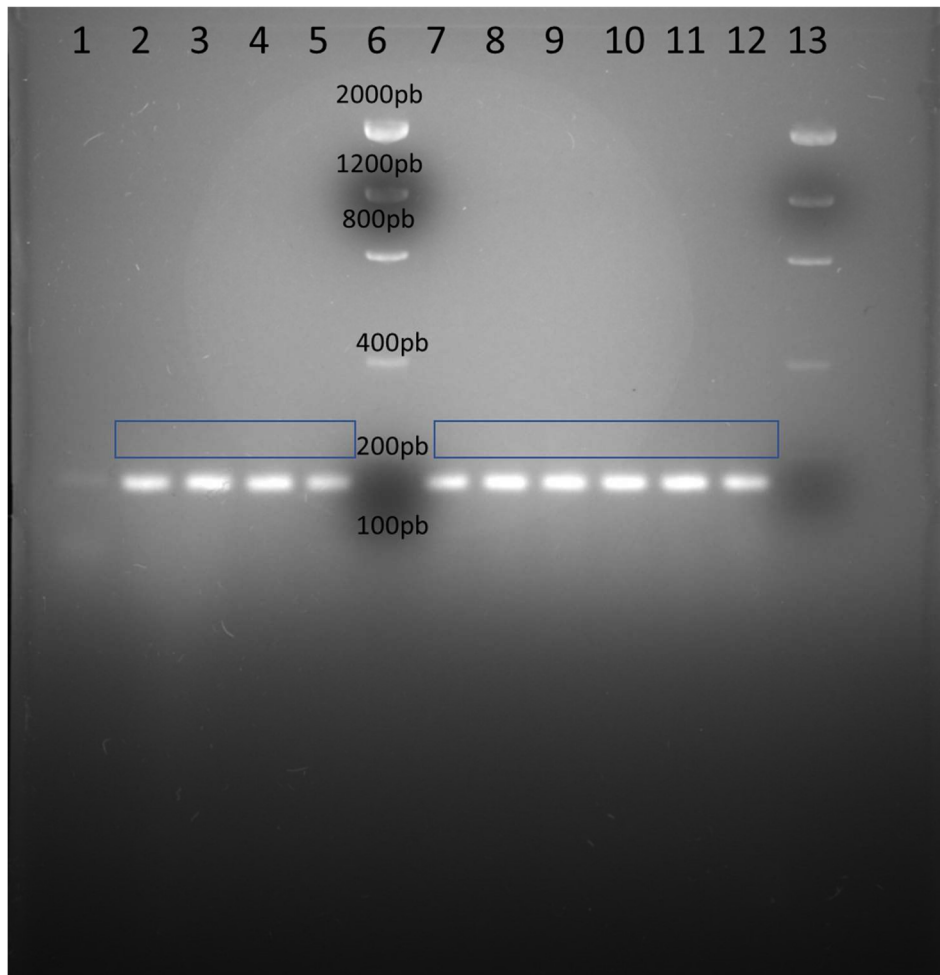


figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la PCR con los cebadores CAPTURE1 + CAPTURE2. Calle 1 control negativo PCR; calle 2 control negativo adquisición (WT sin pases ni plásmido); calle 3 WT A; calles 4 y 5 Δhha A y C respectivamente; calle 6 y 13 marcador de peso molecular (Invitrogen, Low DNA Mass Ladder); calles 8 y 9 Δhns A y B respectivamente; calles 10, 11 y 12 $\Delta hha/\Delta hns$ A, B y C respectivamente. Las cajas azules marcan la zona que se recorta para la selección de tamaño.

Sin embargo, la ausencia de una banda a 218 pb no descarta la posibilidad que se haya generado la adquisición de nuevos espaciadores, solo indica que con esta primera PCR no podemos detectarla en un gel de agarosa. Debido a ello cortamos y purificamos las

“bandas” del gel más o menos a 218 pb (cajas azules en la Figura 13), para utilizarlas en una segunda PCR.

4.2.2. Cebadores CAPTURE3 y CAPTURE2

En la PCR con los cebadores CAPTURE3 (a mitad de la secuencia líder) como directo y CAPTURE2 como reverso, esperamos obtener un producto de PCR de 114 pb (Figura 14), correspondiente a la secuencia sin una nueva adquisición. En caso de una nueva adquisición obtendríamos también un amplicón de 175 pb (Figura 15).

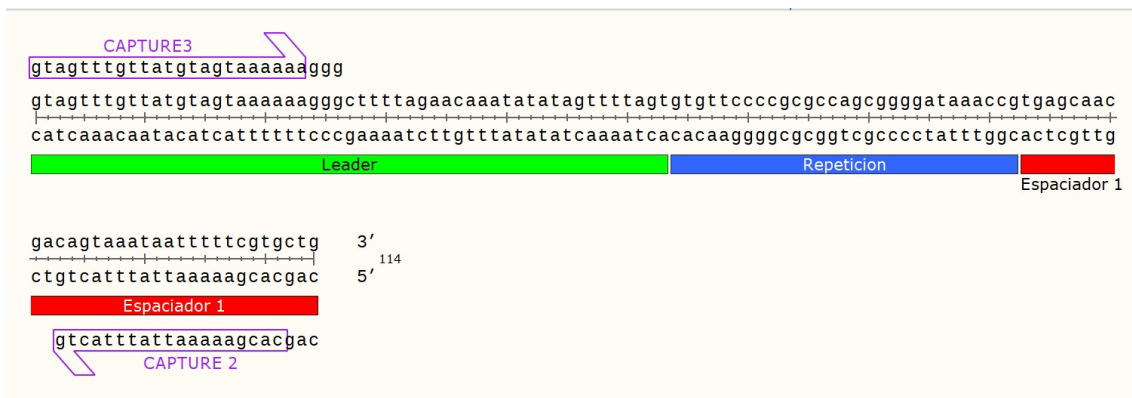


figura 14. Amplicón de 114 pb de la PCR con el cebador CAPTURE3 (flecha superior) y CAPTURE2 (flecha inferior). En verde se muestra la secuencia líder, en azul la primera repetición y en rojo el primer espaciador.

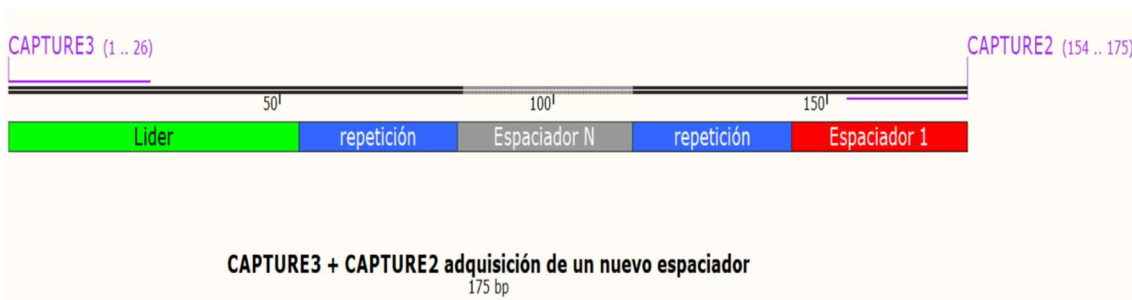


figura 15. Amplicón esperado en caso de adquisición de un nuevo espaciador con los cebadores CAPTURE3 + CAPTURE2 (175 pb). En verde se muestra la secuencia líder, en azul las repeticiones, en rojo el primer espaciador y en gris el nuevo espaciador.

En el gel de agarosa de esta PCR (Figura 16) podemos observar como todas las cepas generaron el amplicón de 114 pb. En esta PCR tampoco observamos ninguna banda correspondiente a la adquisición de un nuevo espaciador (175 pb), debido a ello como

en el caso anterior cortamos la “banda” entorno a las 175 pb para que sirva de molde en las segundas PCRs CAPTURE.

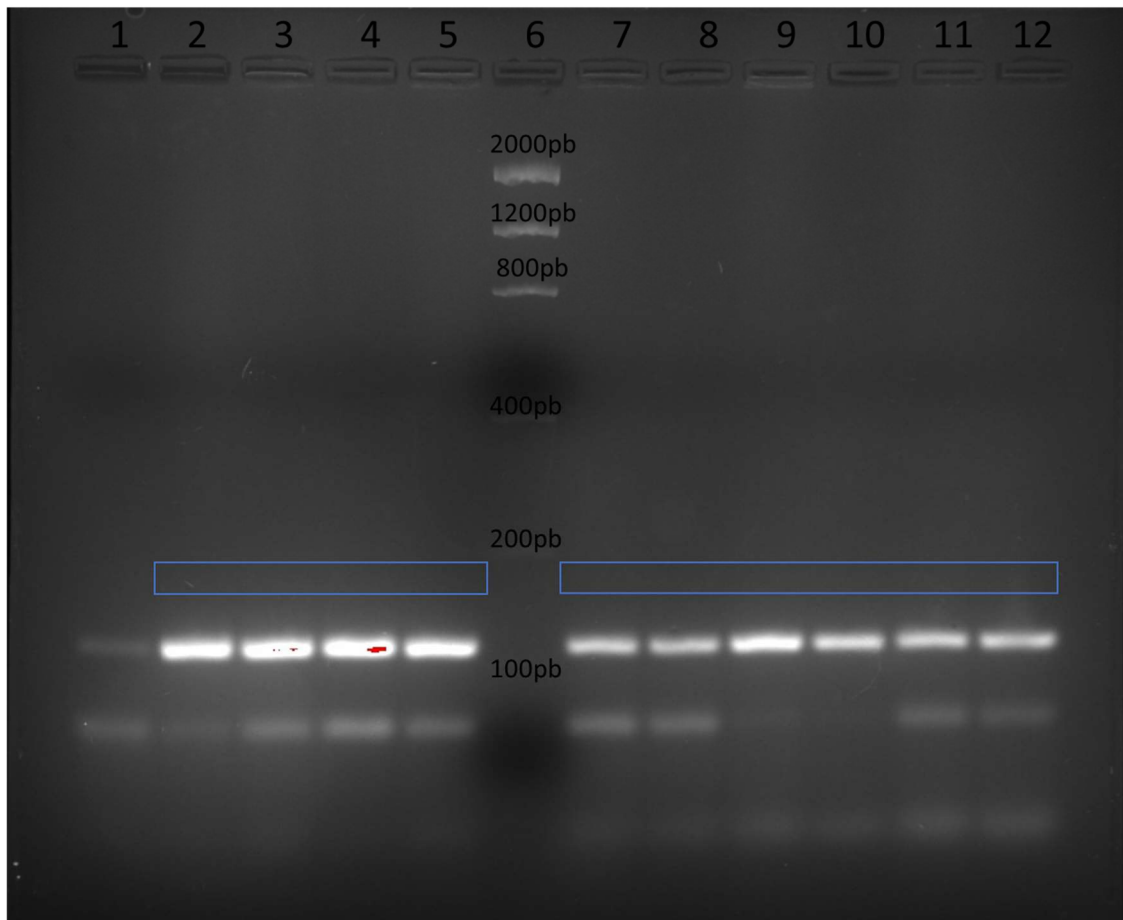


figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de la PCR con los cebadores CAPTURE3 + CAPTURE2. Calle 1 control negativo PCR; calle 2 control negativo adquisición (WT sin pases ni plásmido); calles 3 y 4 WT A y B respectivamente; calles 5 y 7 Δhha B y C respectivamente; calle 6 marcador de peso molecular (Invitrogen, Low DNA Mass Ladder); calles 8 y 9 Δhns A y C respectivamente; calles 10, 11 y 12 $\Delta hha/\Delta hns$ A, B y C respectivamente. Las cajas azules marcan la zona que se recorta para la selección de tamaño.

4.3. Segunda PCR CAPTURE

Tomando como DNA molde las “bandas” purificadas de las primeras PCRs correspondientes al tamaño de amplicón esperado en caso de adquisición realizamos dos PCR distintas para cada una de ellas.

4.3.1. Cebadores CAPTURE3 y CAPTURE2

Con el DNA purificado de la “banda” de 175 pb de la PCR con los cebadores CAPTURE3 y CAPTURE2, repetimos la misma PCR. Obteniendo otra vez una banda de 114 pb (Figura 17). Esto nos estaría indicando que con esta PCR no somos capaces de observar la adquisición de nuevos cebadores, lo que puede deberse a que si estuviera ocurriendo sería en una parte muy baja de la población y por debajo del límite de detección de esta PCR.

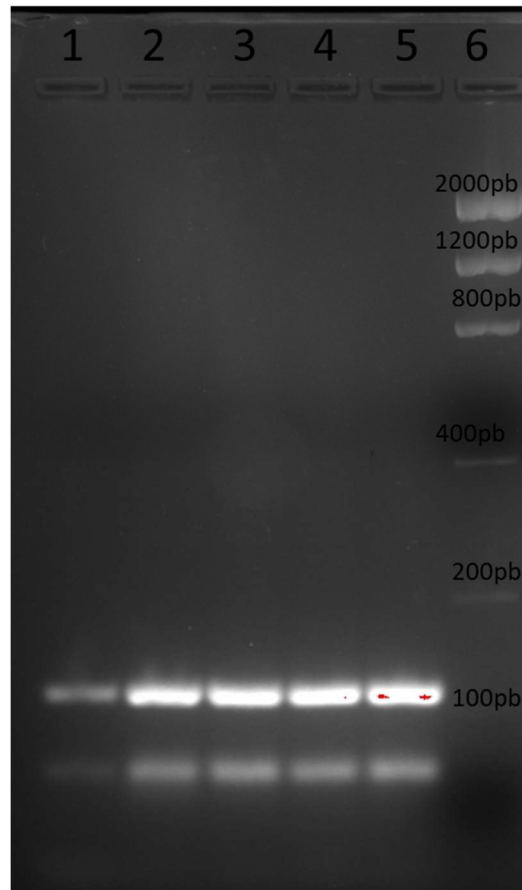


figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de la segunda PCR con los cebadores CAPTURE3 + CAPTURE2. Calle 1 control negativo PCR; calle 2 WT A; calle 3 Δ hha A; calle 4 Δ hns A; calle 5 Δ hha/ Δ hns A; calle 6 marcador de peso molecular (Invitrogen, Low DNA Mass Ladder)

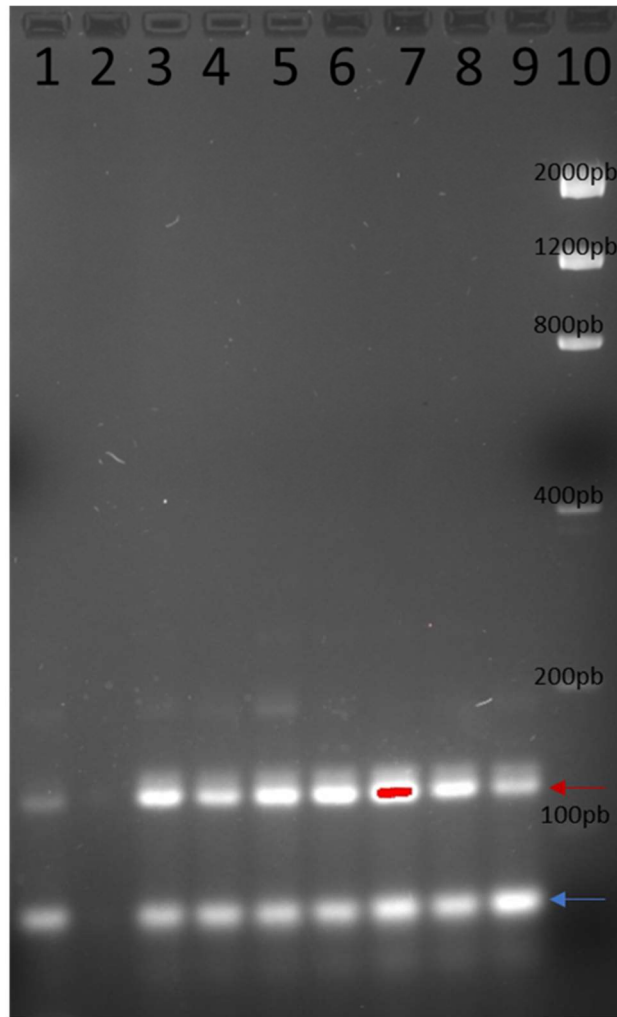


figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de la segunda PCR con los cebadores CAPTURE7 + CAPTURE8. Calle 1 control negativo PCR; calle 2 vacía; calle 3 control negativo adquisición (WT sin pases ni plásmido); calles 4 y 5 WT A y B respectivamente; calles 6 Δhha C; calle 7 Δhns A; calles 8 y 9 $\Delta hha/\Delta hns$ A y C respectivamente; calle 10 marcador de peso molecular (Invitrogen, Low DNA Mass Ladder). La flecha azul marca las bandas de en torno a 66 pb y la flecha roja las bandas de 127 pb.

La primera banda podría corresponder a la adquisición de un nuevo espaciador. Sin embargo, cabe destacar la segunda banda a 127 pb que corresponde al tamaño de un amplicón producto de la adquisición de dos nuevos espaciadores (Figura 20).

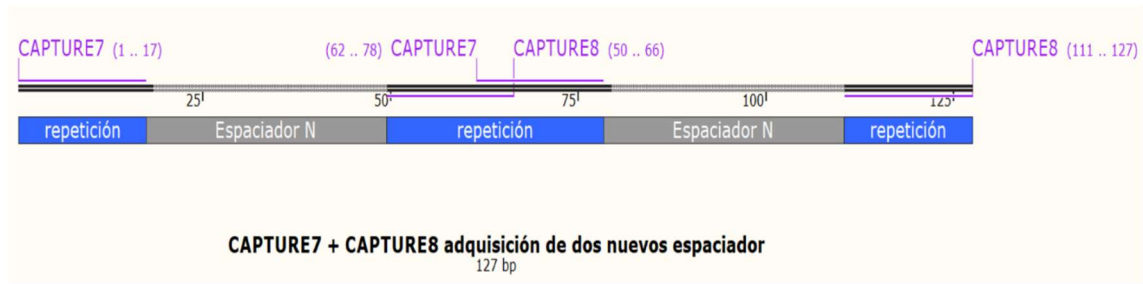


figura 20. Amplicón esperado en caso de adquisición de dos nuevos espaciadores con los cebadores CAPTURE7 + CAPTURE8 (66 pb)., En azul las repeticiones y en gris los nuevos espaciadores.

La utilización de esta pareja de cebadores parece ser lo suficientemente sensible para detectar eventos que están ocurriendo en muy baja frecuencia en la población. Parece que estos eventos están ocurriendo en todas las cepas de *Salmonella* independientemente de sus mutaciones o si han sido sometidas a un proceso de para potenciar la adquisición.

4.3.3. Cebadores Degenerados y CAPTURE2

Para la PCR con los cebadores degenerados (directo) y el cebador CAPTURE2 (reverso) utilizamos como DNA molde las “bandas” purificadas tanto de la PCR con los cebadores CAPTURE1 y CAPTURE2 (218 pb) como con los cebadores CAPTURE3 y CAPTURE2 (175pb).

En este caso esperamos obtener una banda de 109 pb en caso de la adquisición de un nuevo espaciador (Figura 21) y en caso de dos nuevos espaciadores 170 pb (Figura 22).

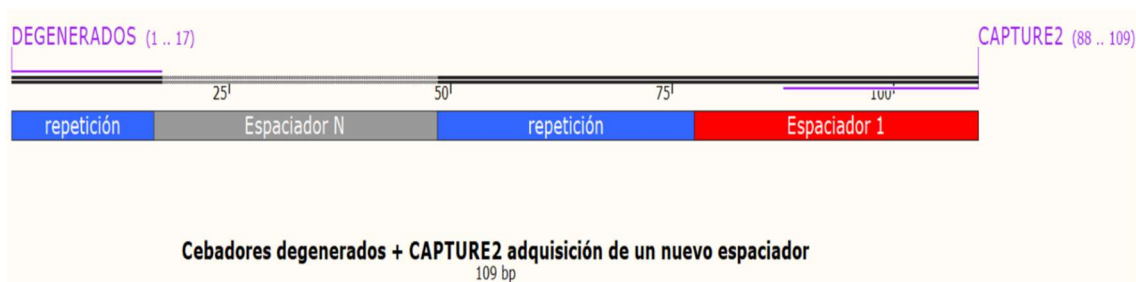


figura 21. Amplicón esperado en caso de adquisición de un nuevo espaciador con los cebadores degenerados + CAPTURE2 (109 pb). En azul las repeticiones, en rojo el primer espaciador y en gris el nuevo espaciador.

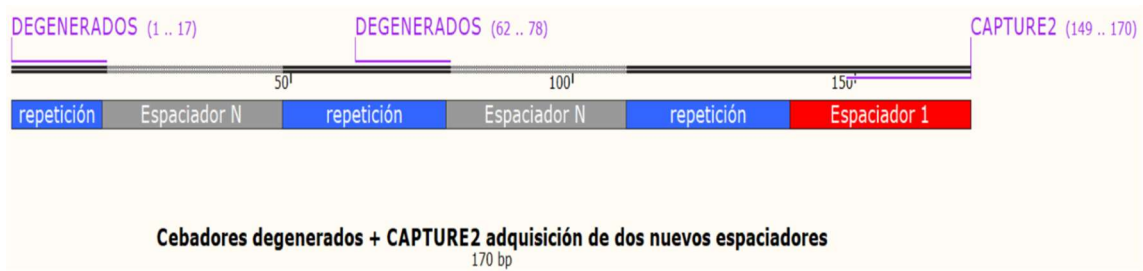


figura 22. Amplicón esperado en caso de adquisición de dos nuevos espaciadores con los cebadores degenerados + CAPTURE2 (170 pb). En azul las repeticiones, en rojo el primer espaciador y en gris los dos nuevos espaciadores.

Debido al diseño de los cebadores degenerados, no podrá amplificarse el espaciador 1. Esto hace que la PCR sea extremadamente sensible al no poder amplificarse las moléculas molde más abundantes, es decir, las que en principio no han sufrido adquisición, aunque tampoco las hayan adquirido un espaciador cuya secuencia empiece con el mismo nucleótido del espaciador 1, es decir, timina.

Al observar los geles de estas PCRs (Figura 23 y 24) podemos comprobar que partiendo tanto del producto de la PCR con los cebadores CAPTURE1 y CAPTURE2 como de la pareja CAPTURE3 y CAPTURE2, obtenemos en ambos casos, como en la PCR anterior, dos bandas una de 109 pb y otra de 170 pb, correspondientes a la supuesta adquisición de uno o dos nuevos espaciadores respectivamente.

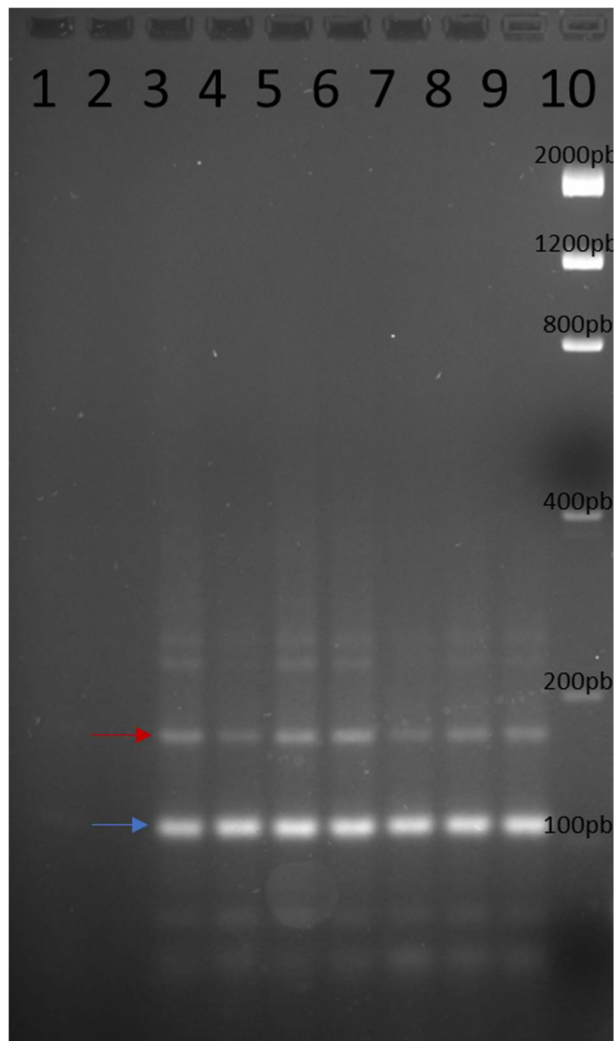


figura 23 . Electroforesis en gel de agarosa al 3% de la segunda PCR con los cebadores degenerados + CAPTURE2 a partir de la PCR CAPTURE1 + CAPTURE2. Calle 1 control negativo PCR; calle 2 vacía; calle 3 control negativo adquisición (WT sin pases ni plásmido); calles 4 y 5 WT A y B respectivamente; calles 6 Δhha C; calle 7 Δhns A; calles 8 y 9 $\Delta hha/\Delta hns$ A y C respectivamente; calle 10 marcador de peso molecular (Invitrogen, Low DNA Mass Ladder). La flecha azul marca las bandas de en torno a 109 pb y la flecha roja las bandas de 170 pb

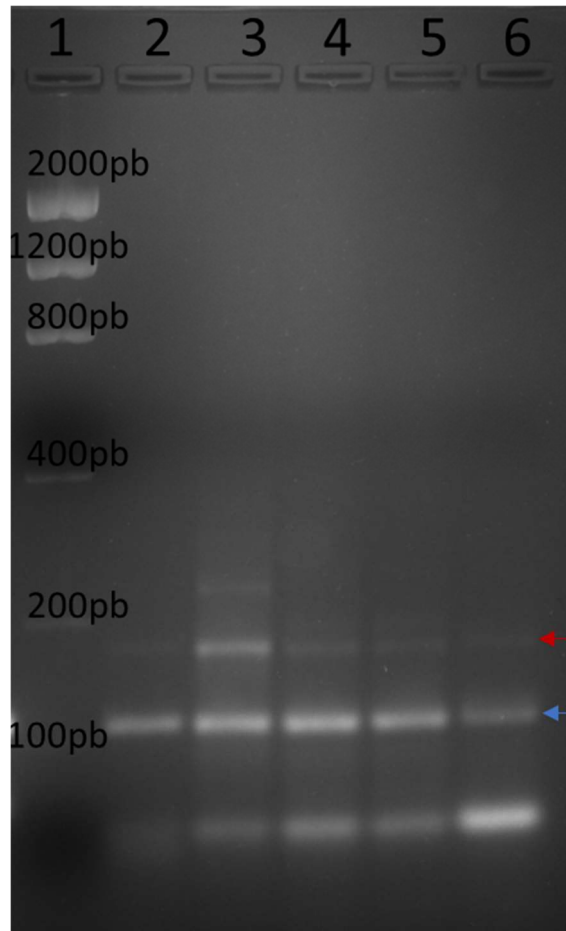


figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de la segunda PCR con los cebadores degenerados + CAPTURE2 a partir de la PCR con los cebadores CAPTURE3 + CAPTURE2. Calle 1 marcador de peso molecular (Invitrogen, Low DNA Mass Ladder); calle 2 control negativo PCR; calle 3 WT A; calle 4 Δhha A; calle 5 Δhns A; calle 6 $\Delta hha/\Delta hns$ A. La flecha azul marca las bandas de en torno a 109 pb y la flecha roja las bandas de 170 pb

4.4. Clonación con el *Kit TOPO® TA Cloning®* (Invitrogen)

Debido a que en todos los geles observamos bandas inespecíficas en el control negativo de la PCR y que las bandas correspondientes a adquisición aparecían en todas las cepas incluyendo el control negativo de la adquisición, se decidió clonar de inicio solo las bandas de 109 pb de la cepa *Δhha* producto de una primera PCR con los cebadores CAPTURE1 y CAPTURE2 y una segunda PCR con los cebadores degenerados. El propósito fue, antes de mandar a secuenciar todas las bandas por secuenciación masiva o clonación, comprobar que no eran debidas a artefactos de la PCR o contaminantes desconocidos. Se eligió la cepa *Δhha* debido, aunque presenta una de las mutaciones que deseamos estudiar, inicialmente no esperábamos altos niveles de expresión de los genes Cas, ni por ello niveles detectables de adquisición. Una vez descartados falsos positivos, nuestro propósito era posteriormente repetir el procedimiento con el resto de las cepas, pero por falta de tiempo no se pudo realizar.

El DNA de estas bandas purificadas de 109 pb de la cepa *Δhha*, se utilizó como inserto en el vector de clonación pCR[®]2.1-TOPO[®] y posteriormente se clonó en *E. coli* DH5α, obteniendo un total de 10 colonias transformadas con el vector. Para confirmar que las colonias tenían el vector con el inserto realizamos una PCR de las colonias utilizando los cebadores del *kit* (M13 directo y reverso).

Al observar el gel de agarosa (Figura 25) pudimos apreciar que cuatro colonias tenían el vector sin el inserto ya que presentaban una banda de 200 pb correspondiente al amplicón generado por los cebadores M13 del plásmido (Figura 15B), mientras que 6 colonias habían incorporado el vector con el inserto dando una banda de 309 pb.

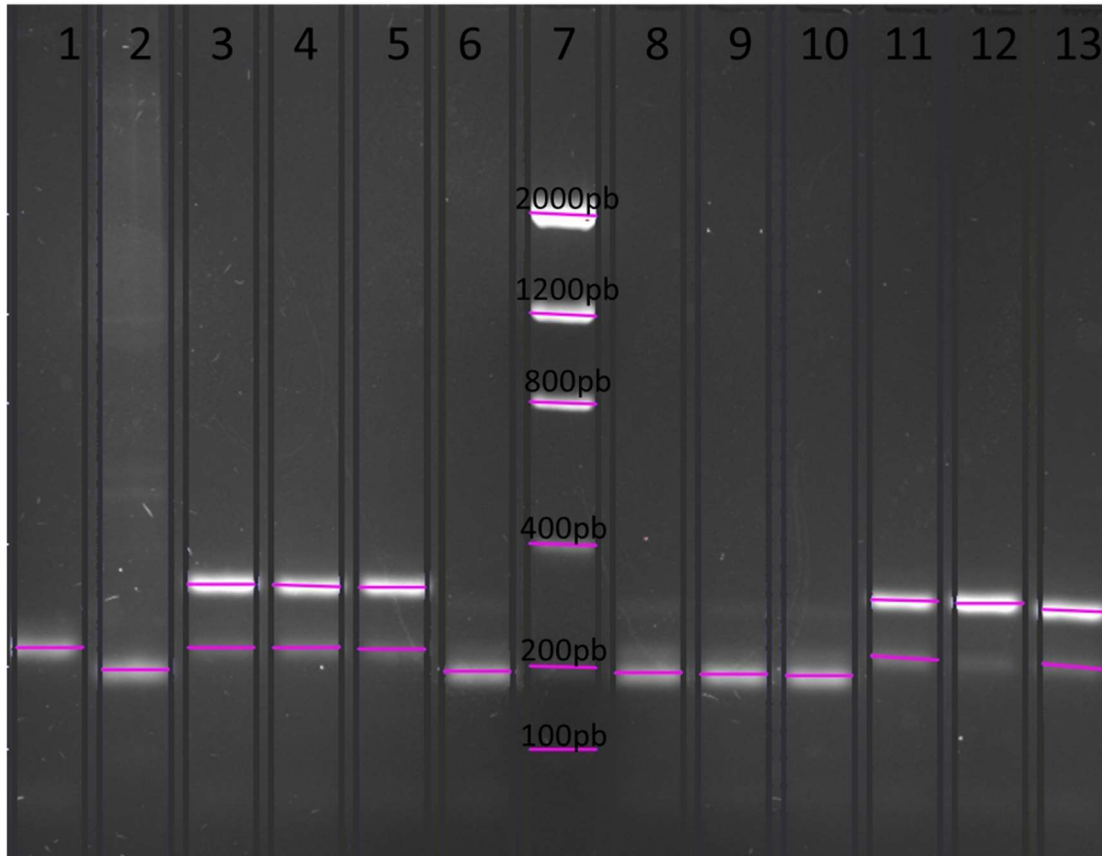


figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de la PCR con los cebadores M13 de las colonias transformadas con el vector de clonación pCR[®]2.1-TOPO[®]. Calle 1 control negativo de la PCR; calle 2 control positivo de la PCR (pCR[®]2.1-TOPO[®]), calle 7 marcador de peso molecular (Invitrogen, Low DNA Mass Ladder); calles 3,4,5,11,12 y 13 colonias DH5 α transformadas con el plásmido con inserto; calles 6, 8, 9, 10 colonias transformadas con el plásmido sin incorporar el inserto.

Se extrajo el plásmido de las 6 colonias (TOPO1, TOPO2, TOPO3, TOPO8, TOPO9 y TOPO10) que habían incorporado el vector con el inserto y de una (TOPO5) que había incorporado el vector sin inserto para que ser secuenciadas.

4.5. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas de vector pCR®2.1-TOPO® de las colonias (TOPO1, TOPO2, TOPO3, TOPO5, TOPO8, TOPO9 y TOPO10) (Anexo), se alinearon con la secuencia del plásmido (Figura 26) para poder determinar la secuencia del posible nuevo espaciador en la cepa Δhha .

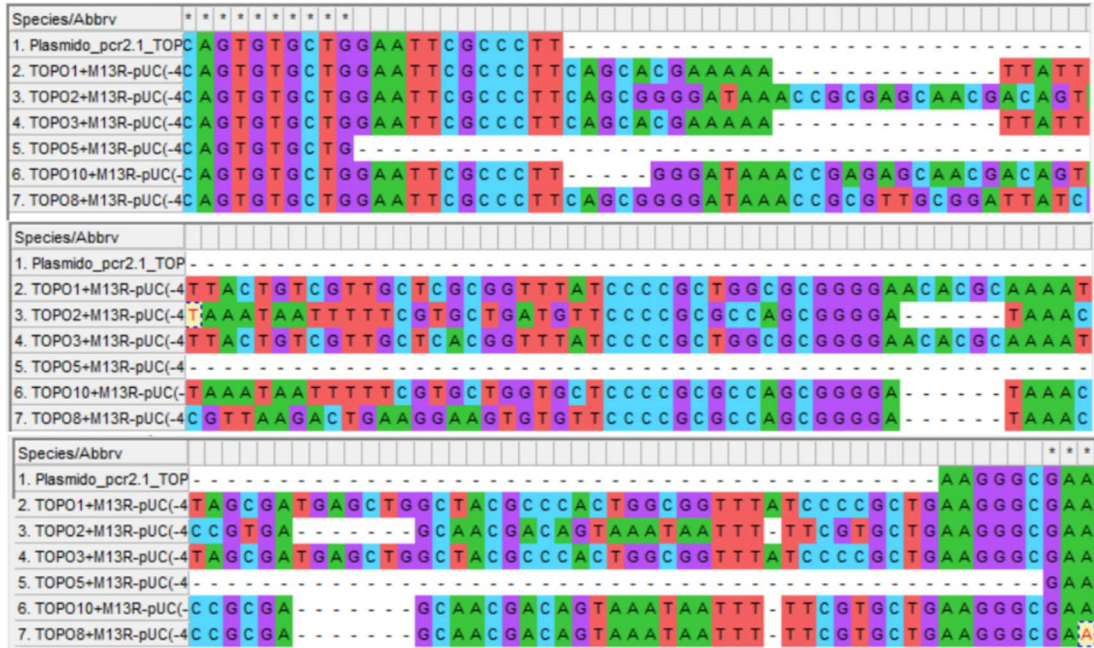


figura 26. Alineamiento en MEGA-X de las secuencias de las colonias TOPO (1, 2, 3, 5, 8, 9 y 10) y el plásmido pCR®2.1-TOPO®. Se muestra la zona de la secuencia del inserto.

Una vez obtenidas las secuencias del inserto se analizó cual era la secuencia del posible nuevo espaciador y su procedencia (Anexo). Encontramos que no habían sido nuevas adquisiciones, sino que se trataba de espaciadores ya presentes en la “matriz”.

En concreto las colonias TOPO1, TOPO3 y TOPO9, habían incorporado el espaciador 2 (Figura 27).

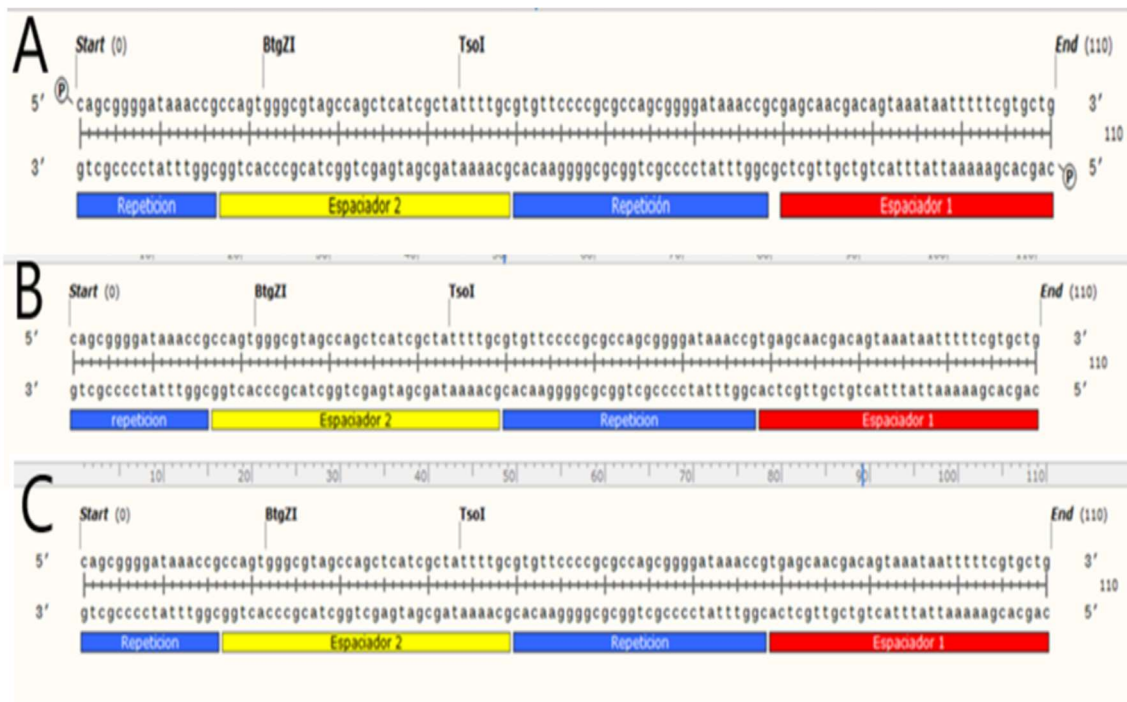


figura 27. Secuencia del inserto en la colonias TOPO1, TOPO3 y TOPO9 (A, B y C). En azul se muestra las secuencias de repetición, en rojo el espaciador 1 y en amarillo el espaciador 2. Las discontinuidades indican nucleótidos diferentes a la secuencia original.

Las colonias TOPO2 y TOPO10 presentaban duplicado el espaciador 1 (Figura 28).

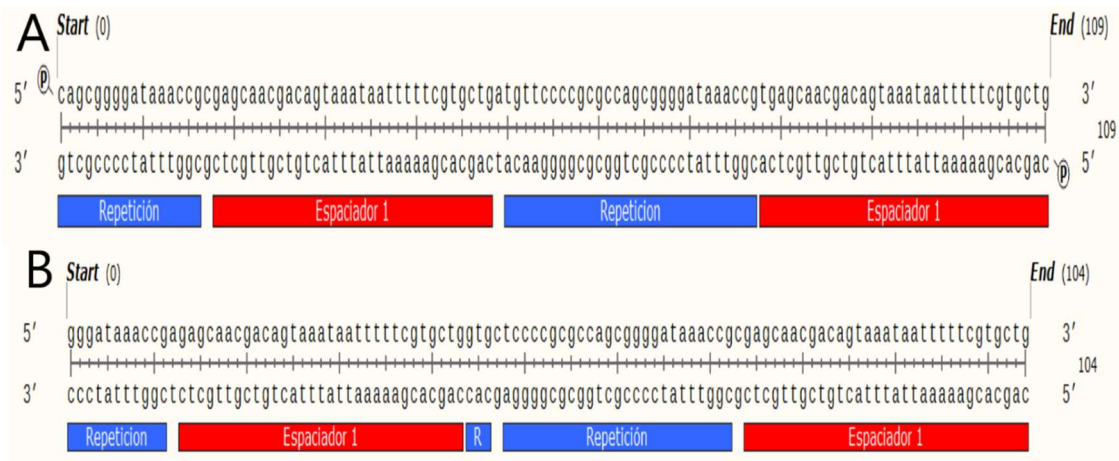


figura 28. Secuencia del inserto en la colonias TOPO2, TOPO10 (A y B). En azul se muestra las secuencias de repetición, en rojo el espaciador 1. Las discontinuidades indican nucleótidos diferentes a la secuencia original.

Y la colonia TOPO8 presenta incorporado el espaciador 3 de la “matriz” (Figura 29).



figura 29. Secuencia del inserto en la colonia TOPO8. En azul se muestra las secuencias de repetición, en rojo el espaciador 1 y en negro el espaciador 3. Las discontinuidades indican nucleótidos diferentes a la secuencia original.

El hecho de observar bandas de un tamaño correspondiente a la adquisición de uno o dos nuevos espaciadores en todas las cepas independientemente de transformarlas con el plásmido y someterles a distintos pases, o detener mutados los genes Δhha y/o Δhns que están implicados en la regulación del sistema CRISPR-Cas ²⁵ nos sugiere que el mismo fenómeno subyace en todos los casos. Ya que al analizar las secuencias de los nuevos espaciadores en Δhha estos no provenían de una fuente exógena de DNA, sino que eran espaciadores ya existentes, pensamos que no se trata fenómenos de adquisición sino de otro tipo de fenómenos relacionados con la “matriz” CRISPR.

Hay diferentes explicaciones para los reordenamientos observados:

- Podrían ser duplicaciones, posiblemente debido a recombinación homóloga, este proceso se ha estudiado ampliamente en *Salmonella*³¹ y se ha visto que la presencia de secuencias repetidas juegan un papel importante en estas³². Sin embargo, dentro del locus CRISPR1 estos procesos estarían ocurriendo a muy baja frecuencia dentro de la población, debido a ello no fuimos capaces de detectarlo en la primera PCR CAPTURE, ni en la segunda PCR utilizando los cebadores CAPTURE3 y CAPTURE2.
- También podrían deberse a artefactos generados durante la PCR. Puesto que los cebadores aparean en las repeticiones, cabe la posibilidad que diversos productos de la reacciones de síntesis de las cadenas de ADN puedan ser empleados como cebadores en ciclos posteriores de la PCR.

Cuando analizamos las secuencias podemos observar, en las secuencias TOPO2 y TOPO10 en la duplicación del primer espaciador una modificación en su secuencia, el cambio del primer nucleótido timina a una citosina y a una adenina respectivamente, lo que permite que sean amplificados por los cebadores degenerados (CAPTURE4 y CAPTURE6). En estas dos cepas también observamos una modificación en la secuencia consenso de repetición (Figura 28). En las cepas TOPO1, TOPO8 y TOPO10 se observa que el primer espaciador presenta una sustitución en su nucleótido 5', cambiando la timina por citosina. Estas modificaciones pueden ser debidas a mutaciones en la secuencia original, producto entre otras causas a los procesos de reordenación cromosómica generando, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) o a errores producidos durante la amplificación de las secuencias mediante la PCR.

También pueden explicarse en parte en la secuencia degenerada de los cebadores. Si estos cebadores han participado en la producción de estas moléculas en algún paso inicial, pueden quedar fijados en la secuencia interna de la molécula amplificada, de forma que este suceso apoyaría la hipótesis del artefacto durante la realización de la PCR.

La presencia de duplicaciones de espaciadores en la "matriz" CRISPR se había observado previamente en algunas cepas de *Salmonella*, pero solo en el locus CRISPR2²⁴. Otros

estudios han observado la duplicación de espaciadores en diferentes cepas de *E. coli* ³³, *Streptococcus agalactiae* ³⁴ o *Streptococcus thermophilus* ³⁵, aunque siempre en un número reducido de estirpes. Sin embargo, no podemos distinguir si el origen de estas duplicaciones encontradas en las matrices CRISPR está en duplicaciones como las encontradas en este trabajo, o en adquisiciones repetidas del mismo espaciador.

Por otra parte, habría que analizar lo que está sucediendo en el resto de las cepas de *Salmonella*, debido a que no hemos podido comprobar si en las cepas Δhns y en $\Delta hha/\Delta hns$ las bandas observadas en la segundas PCRs son debidas también a reordenamientos cromosómicos y/o nuevos espaciadores, ya que estos genes reprimen la expresión de los genes Cas. También cabe la posibilidad de que la adquisición está sucediendo a una frecuencia inferior al límite de detección de esta técnica o como apuntan varios trabajos, el sistema CRISPR-Cas no presenta actividad inmune y este sistema ha evolucionado a otras funciones diferentes ²⁴ como puede ser: la regulación de la expresión génica por ejemplo regulando la virulencia bacteriana; o participando en procesos de reparación del DNA ³⁶.

5. Conclusiones

- No hemos podido detectar adquisición de nuevos espaciadores en la matriz CRISPR de *S. typhimurium*.
- Hemos identificado un tipo de reordenamientos de espaciadores que o suceden a muy baja frecuencia en el locus CRISPR1., o se generan mediante un artefacto derivado del diseño del sistema.
- La utilización del método CAPTURE es un procedimiento muy sensible para detectar adquisición y reordenaciones cromosómicas poco frecuentes.

6. Bibliografía

1. Wright AV, Nuñez JK, Doudna JA. Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. *Cell*. 2016;164(1-2):29-44. doi:10.1016/j.cell.2015.12.035
2. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821. doi:10.1126/science.1225829
3. Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell*. 2017;168(1-2):20-36. doi:10.1016/j.cell.2016.10.044
4. Alagoz Y, Gurkok T, Zhang B, Unver T. Manipulating the Biosynthesis of Bioactive Compound Alkaloids for Next-Generation Metabolic Engineering in Opium Poppy Using CRISPR-Cas 9 Genome Editing Technology. *Sci Rep*. 2016;6:30910. doi:10.1038/srep30910
5. Xu R, Wei P, Yang J. Use of CRISPR/Cas Genome Editing Technology for Targeted Mutagenesis in Rice. In: Reeves A, ed. *In Vitro Mutagenesis*. Vol 1498. New York, NY: Springer New York; 2017:33-40. doi:10.1007/978-1-4939-6472-7_3
6. Seruggia D, Montoliu L. The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals. *Transgenic Research*. 2014;23(5):707-716. doi:10.1007/s11248-014-9823-y
7. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*. 2000;36(1):244-246. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x
8. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution*. 2005;60(2):174-182. doi:10.1007/s00239-004-0046-3
9. Marraffini LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*. 2015;526(7571):55-61. doi:10.1038/nature15386
10. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(11):722-736. doi:10.1038/nrmicro3569
11. Jackson SA, McKenzie RE, Fagerlund RD, Kieper SN, Fineran PC, Brouns SJJ. CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science*. 2017;356(6333):eaal5056. doi:10.1126/science.aal5056
12. Nuñez JK, Kranzusch PJ, Noeske J, Wright AV, Davies CW, Doudna JA. Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2014;21(6):528-534. doi:10.1038/nsmb.2820

13. Wang J, Li J, Zhao H, et al. Structural and Mechanistic Basis of PAM-Dependent Spacer Acquisition in CRISPR-Cas Systems. *Cell*. 2015;163(4):840-853. doi:10.1016/j.cell.2015.10.008
14. Nuñez JK, Lee ASY, Engelman A, Doudna JA. Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature*. 2015;519(7542):193-198. doi:10.1038/nature14237
15. Nuñez JK, Bai L, Harrington LB, Hinder TL, Doudna JA. CRISPR Immunological Memory Requires a Host Factor for Specificity. *Mol Cell*. 2016;62(6):824-833. doi:10.1016/j.molcel.2016.04.027
16. Levy A, Goren MG, Yosef I, et al. CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. *Nature*. 2015;520(7548):505-510. doi:10.1038/nature14302
17. Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E. The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*. 2018;172(6):1239-1259. doi:10.1016/j.cell.2017.11.032
18. Künne T, Kieper SN, Bannenberg JW, et al. Cas3-Derived Target DNA Degradation Fragments Fuel Primed CRISPR Adaptation. *Molecular Cell*. 2016;63(5):852-864. doi:10.1016/j.molcel.2016.07.011
19. Charpentier E, Richter H, van der Oost J, White MF. Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *FEMS Microbiology Reviews*. 2015;39(3):428-441. doi:10.1093/femsre/fuv023
20. van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12(7):479-492. doi:10.1038/nrmicro3279
21. Grimont PAD, Weill FX (2007) Antigenic formulae of the Salmonella serovars. 9th ed. Paris, France: WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella. Available: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Antigenic+Formulae+of+the+Salmonella+Serovars&author=P.+Grimont&author=F.+Weill&publication_year=2007&
22. Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, et al. FoodNet Estimate of the Burden of Illness Caused by Nontyphoidal *Salmonella* Infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;38(s3):S127-S134. doi:10.1086/381578
23. Fabre L, Zhang J, Guigon G, et al. CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of Salmonella infections. *PLoS One*. 2012;7(5):e36995. doi:10.1371/journal.pone.0036995
24. Shariat N, Timme RE, Pettengill JB, Barrangou R, Dudley EG. Characterization and evolution of Salmonella CRISPR-Cas systems. *Microbiology*. 2015;161(Pt 2):374-386. doi:10.1099/mic.0.000005

25. Medina-Aparicio L, Rebollar-Flores JE, Gallego-Hernandez AL, et al. The CRISPR/Cas Immune System Is an Operon Regulated by LeuO, H-NS, and Leucine-Responsive Regulatory Protein in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *Journal of Bacteriology*. 2011;193(10):2396-2407. doi:10.1128/JB.01480-10
26. Madrid C, Balsalobre C, García J, Juárez A. The novel Hha/YmoA family of nucleoid-associated proteins: use of structural mimicry to modulate the activity of the H-NS family of proteins. *Molecular Microbiology*. 2007;63(1):7-14. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05497.x
27. McKenzie RE, Almendros C, Vink JNA, Brouns SJJ. Using CAPTURE to detect spacer acquisition in native CRISPR arrays. *Nature Protocols*. 2019;14(3):976-990. doi:10.1038/s41596-018-0123-5
28. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983;166(4):557-580.
29. Ausubel FM, ed. *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*. 3. ed. New York: Wiley; 1997.
30. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Battistuzzi FU, ed. *Molecular Biology and Evolution*. 2018;35(6):1547-1549. doi:10.1093/molbev/msy096
31. Anderson P, Roth J. Spontaneous tandem genetic duplications in *Salmonella typhimurium* arise by unequal recombination between rRNA (*rrn*) cistrons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981;78(5):3113-3117. doi:10.1073/pnas.78.5.3113
32. Shyamala V, Schneider E, Ames GF. Tandem chromosomal duplications: role of REP sequences in the recombination event at the join-point. *The EMBO Journal*. 1990;9(3):939-946. doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb08192.x
33. Diez-Villasenor C, Almendros C, Garcia-Martinez J, Mojica FJM. Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2010;156(Pt 5):1351-1361. doi:10.1099/mic.0.036046-0
34. Lopez-Sanchez M-J, Sauvage E, Da Cunha V, et al. The highly dynamic CRISPR1 system of *Streptococcus agalactiae* controls the diversity of its mobilome. *Mol Microbiol*. 2012;85(6):1057-1071. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08172.x
35. Li W, Bian X, Evvie SE, Huo G-C. Comparative Analysis of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) of *Streptococcus thermophilus* St-I and its Bacteriophage-Insensitive Mutants (BIM) Derivatives. *Curr Microbiol*. 2016;73(3):393-400. doi:10.1007/s00284-016-1076-y
36. Westra ER, Buckling A, Fineran PC. CRISPR–Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12(5):317-326. doi:10.1038/nrmicro3241

Anexo

1. Tablas

Tabla 6. Cebadores PCR CAPTURE. En rojo los cebadores que componen el cebador "degenerado"

Cebador	Secuencia (5'→3')	%GC	Tm (50 mM NaCl)
CAPTURE1	gttgaatggtctttaataataaggaattg	24.1%	50.3 °C
CAPTURE2	cagcacgaaaaattattactg	31.8%	48,4 °C
CAPTURE3	gtagtttgtatgtagtaaaaaaggg	30.8%	50.4 °C
CAPTURE4	cagcggggataaacgc	64.7 %	56.6 °C
CAPTURE5	cagcggggataaacgg	64.7%	56.0 °C
CAPTURE6	cagcggggataaacga	58.8%	54.6 °C
CAPTURE7	ccagcggggataaacgg	64.7%	56.0 °C
CAPTURE8	gctggcgcggggaacac	76.5%	63.2 °C

Tabla 7. Composición TAE 50X

Compuesto	Cantidades
Base tris	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA (0,5 M, pH 8)	100 ml
H ₂ O	Hasta 1 L

2. Secuencias

>Secuencia de los tres primeros espaciadores del array CRISPR 1 (309 bp).

```
gttgaatggtctttaataataaggaattgtatcttaccgttgtagttggtatgtagtaaaaaagggcttttagaacaatat
atagtttagtgtgtccccgcgccagcggggataaacggtgagcaacgacagtaaataattttcgtgctggtgtccccgc
gccagcggggataaacgccagtgggctagccagctcatcgctattttgcgtgttccccgcgccagcggggataaacgc
ggtgcggattatcgttaagactgaaggaagtgtgttccccgcgccagcggggataaacg
```

En verde se muestra la región Leader, en azul las repeticiones, en rojo el primer espaciador, en amarillo el segundo y en negro el tercero.

>Secuencia plásmido PCR2.1 (3929 bp)

AGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGC
ACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACT
CATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCG
GATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCG
GATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTAAGCCGAATTCTGCAGATATCC
ATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTA
TTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTT
AATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGGCCCGCACCGAT
CGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATT
AGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCC
CGCTCCTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTCCCCGTCAAGCTCTAAA
TCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGGATTAAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGAT
TAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTG
GAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGG
TCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATT
TAACAAAAATTAACCGGAATTTAACAAAATTCAGGGCGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGG
AACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGC
TATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACA
TGCGGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCAGGAATTGCCAGCTGGGGC
GCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTCTTGCCGCCAAGGAT
CTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTTCGCATGATTG
AACAAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGAC
TGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTGAGCGCAGGGGCG
CCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGC
GCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCAGTGA
AGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCCCACC
TTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGTTGATC
CGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATG
GAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGA
ACTGTTCCGCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCG
ATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCC
GGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAG
CTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCAG
CGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTGACGAGTTCTTCTGAATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTAT
TCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGCATTTCCTTCTGTTTTTGTCCACC
AGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCG
AACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAAGTTTTCCAATGA
TGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGC
AACTCGGTCCCGCATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAA
AGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATA
ACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGC
ACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATA
CCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATT
AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAA
AGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGG

AGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCC
GTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATC
GCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATAC
TTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAAT
CTCATGACCAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAG
ATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAC
CACCGTACCAGCGGTGGTTTGGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAA
CTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACC
ACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGC
TGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGG
CGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGAGCGAACGACCTA
CACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAA
AGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGCGCACGAGGGGAGCTTC
CAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTC
GATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTT
TTACGGTTCCTGGCCTTTTGGCTGGCCTTTTGGCTCACATGTTCTTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCT
GTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACCCGAACGACCGA
GCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG

>Secuencia vector pCR®2.1-TOPO® (3931 bp)

AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGC
ACAGGTTTCCCGACTGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACT
CATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCG
GATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCG
GATCCACTAGTAACGGCCGCGCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTAAGGGCGAATTCTGCAGATAT
CCATCACACTGGCGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTGC
TATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAAC
TTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCG
ATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATT
AAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGC
CCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTCCTTTCTCGCCACGTTCCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAA
ATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTG
ATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGT
TGGAGTCCAGTTCCTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTC
GGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTG
ATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATTCAGGGCGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGC
GGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGG
GCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTA
CATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCAGGAAATTGCCAGCTGGG
GCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTTCTTGGCCCAAG
GATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGA
TTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTAT
GACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGG
GCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGC
AGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCAC

TGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCCC
ACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTG
ATCCGGCTACCTGCCATTGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTA CT CGGA
TGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCC
GAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCGACGCGGAGGATCTCGTCGTGACCCATGG
CGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGG
CCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAG
AGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCG
AGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTGACGAGTTCTTCTGAATTGAAAAGGAAGAGTATGAG
TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCA
CCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACA
TCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCAA
TGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAG
AGCAACTCGGTGCGGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACTCACCAGTCACAG
AAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGT
GATAACACTGCGGCCA ACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTT
TTGCACAACATGGGGGATCATGTA ACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGC
CATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC
TATTA ACTGGCGAACTACTTACTTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGG
ATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATC
TGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCT
CCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAG
ATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA ACTGTGACACCAAGTTTACTCATATA
TACTTTAGATTGATTTAAA ACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGAT
AATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAA
AGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAA
ACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGT
AACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCA
CCACTTCAAGAACTCTGTAGCACC GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCT
GCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA
GGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACC
TACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAG
AAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCT
TCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCG
TCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCT
TTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCTTATCCCCTGATT
CTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCG
AGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG

>TOPO1+M13R-pUC_-40__raw (861 bp)

Nnnncnnnnncgagctcggatcncctagtaacggccgagtgctggaattcgcccttcagcacgaaaaattattact
gtcgttgctcgggtttatccccgctggcgggggaacacgcaaaatagc gatgagctggctacgcccactggcggttatc
cccgtgaagggcgaattctgcagatatccatcacactggcggcgcctcgagcatgcatctagagggccaattcgccctat
agtgagtcgtattacaattcactggcgtcgttttaaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccct
gcagcacatcccccttccagctggcgtaatagcgaagaggcccgaccgatcgccctcccaacagttgcgcagcctg
aatggcgaatggacgcgcctgtagcggcgattaagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacactg

ccagcgcctagcggcctcctttcgtttcttcccttcttctcggcagttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcgg
gggctcccttaggggtccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggatggttcacgtagtgg
gcatcgccctgatagacggttttcgcccttgacgttggagtcacggttcttaaatagtgactctgttccaaactggaaca
aactcaaccctatctcggctattctttgattataanngatgttgcgatttcggcctattggttaaaaaaatgagctgatt
taacnaaaatatacgaatttaaccnaat

>TOPO2+M13R-pUC_-40__raw (761 bp)

Nnnnnnnncgagctcgatccnctagtaacggccagtgctggaattcgccctcagcggggataaacgcgagc
aacgacagtaataatcttctgctgatgtccccgcgacggggataaacctgagcaacgacagtaataatcttct
gtgctgaagggcgaattctgcagatatccatcacactggcggcagctcgaggatgcatctagagggccaattcgccctata
gtgagtcgtattacaattcactggcctcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgcttg
cagcacatcccccttcgacgctggcgaatagcgaagaggcccgcacgatcgccctccaacagttgcgcagcctga
atggcgaatggacgcgcctgtagcggcgattaagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttg
cagcgccttagcggcctcctttcgtttcttcccttcttctcggcagttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcggg
ggctcccttaggggtccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggatggttcacgtagtggg
ccatcgccctgatagacggttttcgcccttgacgttggagtcacggttcttaaatagtgactctgttccaaactggaaca
aactcaaccctatctcng

>TOPO3+M13R-pUC_-40__raw (835 bp)

Nnnnnnnncgagctcgatccnctagtaacggccagtgctggaattcgccctcagcacgaaaaattattact
gtcgttgctcacggttatccccgctggcgcggggaacacgcaaaatagcgtgagctggctacgccactggcggttatc
cccgtgaagggcgaattctgcagatatccatcacactggcggcagctcgaggatgcatctagagggccaattcgccctat
agtgagtcgtattacaattcactggcctcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgctt
gcagcacatcccccttcgacgctggcgaatagcgaagaggcccgcacgatcgccctccaacagttgcgcagcctg
aatggcgaatggacgcgcctgtagcggcgattaagcgcggcggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttg
ccagcgccttagcggcctcctttcgtttcttcccttcttctcggcagttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcgg
gggctcccttaggggtccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggatggttcacgtagtgg
gcatcgccctgatagacggttttcgcccttgacgttggagtcacggttcttaaatagtgactctgttccaaactggaaca
aactcaaccctatctcngtattctnttgattataagggantttgcgatttcggcctattngntnaaaaaatgancttga
ttaaac

>TOPO5+M13R-pUC_-40__raw (743 bp)

Nnnnnnnnnncgagctcgatccnctagtaacggccagtgctggaattctgcagatatccatcacactggcggc
cgctcgagcatgcatctagagggccaattcgccctatagtgagtcgtattacaattcactggcctcgttttacaacgtcgt
gactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgcttgacgacatcccccttcgacgctggcgaatagcgaagagg
cccgcacgatcgccctccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggacgcgcctgtagcggcgattaagcgcggc
gggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccttagcggcctcctttcgtttcttcccttcttctc
ggcagttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcggggctcccttaggggtccgatttagtgctttacggcacctcgac
cccaaaaaacttgattagggatggttcacgtagtgggcatcgccctgatagacggttttcncctttgacgttggagtc
cacgttcttaaatagtgactctgttccaaactggaacaactcaaccctatctcggctattcttttgattataanggatt
ttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctganttaaaaaatatacgaatttaaaaaatcanggcgca

>TOPO8+M13R-pUC_-40__raw (864 bp)

Nnnnnnnnnncgagctcgatccnctagtaacggccagtgctggaattcgccctcagcggggataaacgcggtt
gaggattatcgttaagactgaaggaagtgttccccgcgacggggataaacgcgagcaacgacagtaataatctt
ctgctgaagggcgaattctgcagatatccatcacactggcggcggctcgagcatgcatctagagggccaattcgccctat
tagtgagtcgtattacaattcactggcctcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgctt

tcgagcacatcccccttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttccaacagttgcgagcctg
aatggcgaatggacgcgccctgtagcggcgattaagcggcggggtgtggtggttacgcgagcgtgaccgctacactg
ccagcgccttagcggcctccttctccttctccttctcggcagttcgccggcttccccgtaagctctaaatcgg
gggctcctttaggggtccgatttagtctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggatggttcacgtagtg
gcatcgccctgatagacggttttcgcccttgacgttggagtccacgttcttaaatagtgactctgttccaaactggaaca
aactcaaccctatctcggctattctttgattataagggantttgccgatttcggncatttggttaaaaaatgagctgatt
taacnaaaatttaacgcaatttaacaaatcn

>TOPO9+M13R-pUC_-40__raw (868 bp)

nnnnnnnnnnncgagctcggatccnctagtaacggccgaccagtgctggaattcgcccttcagcggggataaacgcc
agtggcgtagccagctcatcgtattttcgtgttccccgcccagcggggataaacctgagcaacgacagtaataat
ttcgtgctgaagggcgaattctgcagatatccatcacactggcggcggctcgagcatgcatctagagggccaattcgcc
tatagtgagctgattacaattcactggcctcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccttaactg
ccttcgagcacatcccccttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttccaacagttgcgagc
ctgaatggcgaatggacgcgccctgtagcggcgattaagcggcggggtgtggtggttacgcgagcgtgaccgctacac
ttgccagcgccttagcggcctccttctccttctccttctcggcagttcgccggcttccccgtaagctctaaat
cgggggctcctttagggttccgatttagtctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggatggttcacgtag
tgggcatcgccctgatagacggttttcgcccttgacgttggagtccacgttcttaaatagtgactctgttccaaactgga
acaactcaaccctatctcggctattctttgattataanggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctg
atnaaaaaatnaacgcaatnaacaaatcann

>TOPO10+M13R-pUC_-40__raw (1226 bp)

nnnnnnncngctcggatccnctagtaacggccgaccagtgctggaattcgcccttgggataaacggagagcaacgac
agtaataattttctgctggtgctccccgcccagcggggataaacggagcaacgacagtaataattttctgctg
aagggcgaattctgcagatatccatcacactggcggcggctcgagcatgcatctagagggccaattcgccctatagtgag
cgtattacaattcactggcctcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccttaactcgcttcgagca
catcccccttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttccaacagttgcgagcctgaatggcg
aatggacgcgccctgtagcggcgattaagcggcggggtgtggtggttacgcgagcgtgaccgctacacttgccagcgc
cctagcggcctccttctccttctccttctcggcagttcgccggcttccccgtaagctctaaatcgggggctcc
cttagggttccgatttagtctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggatggttcacgtagtgggccatcg
cctgatagacggttttcgcccttgacgttggagtccacgttcttaaatagtgactctgttccaaactggaacaactc
aacctatctcggctattctttgattataagggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgattnaaaa
aatnaacgcaatnaacaaatcagggcgcaagggctgctaaaggaagcgaacacgtagaaagccagtcgcgaga
aacggtgctgacccggatgaatgtcagctactgggctatctggananggaaaacgcaagcgaagagaaagcnnatg
ttcagtgncctacatggcagtagactggcgggtttatggacagcaagcgaaccggaattccagctgggggcn
cctctgtaannnggaagcngnaagtaacnggatgntttcngcggcnnntctgatgncagggntcanatctgat
nannnnngntgngntcnnnnncannannnnnnnnnnntncanncnggncnnnnngcngncntnnn
nnnnnnnan

>Topo1_inserto (110 bp)

cagcacgaaaattattactgtcgttgctcgggttatccccgctggcgggggaacacgcaaaatagcgatgagctggc
tacgcccactggcggtttatccccgctg

>TOPO2_inserto (109 bp)

cagcggggataaacggcagcaacgacagtaataattttctgctgattttccccgcccagcggggataaacctgag
caacgacagtaataattttctgctg

>Topo3_inserto (110 pb)

cagcggggataaaccgccagtgggcgtagccagctcatcgctatcttgcgtgttcccgcgccagcggggataaaccgtga
gcaacgacagtaaataatcttgcgtgctg

>TOPO8_inserto (109 bp)

cagcggggataaaccgcgttgccgattatcgtaagactgaaggaagtgttcccgcgccagcggggataaaccgcga
gcaacgacagtaaataatcttgcgtgctg

>Topo9_inserto (110 bp)

cagcggggataaaccgccagtgggcgtagccagctcatcgctatcttgcgtgttcccgcgccagcggggataaaccgtga
gcaacgacagtaaataatcttgcgtgctg

>Topo10_inserto (104 bp)

gggataaaccgagagcaacgacagtaaataatcttgcgtgctggtgctcccgcgccagcggggataaaccgcgagcaac
gacagtaaataatcttgcgtgctg