

Transferencia de ADN exógeno (plásmido) a *Vibrio* spp. por conjugación.

Introducción

Muchas cepas ambientales de *Vibrio* no son transformables mediante técnicas clásicas (quimicompetencia, electrocompetencia, quitina) y, por lo tanto, son manipuladas genéticamente por conjugación. Esto implica transferir un plásmido de una cepa donante de *E. coli* a una cepa receptora de *Vibrio*.

El plásmido contiene:

- **Un origen de replicación, oriV**, constitutivo o condicional dependiendo de los objetivos.
 - Utilizamos dos tipos de plásmidos replicativos: oriV-p15A tiene un amplio espectro bacteriano; oriV-pMRB es específico y estable en *Vibrios*. Estos plásmidos se utilizan para expresar un fluorocromo (por ejemplo, GFP) en *Vibrio* o para experimentos de complementación. Cuando se expresa constitutivamente un gen, se clona bajo el control de un promotor P_{Lac}; cuando se desea una expresión controlada, se utiliza el promotor P_{BAD}.
 - Utilizamos un vector condicional (o suicida) cuya replicación es mediada por una proteína (pir). El gen que codifica esta proteína está presente en la cepa donante de conjugación pero ausente en *Vibrios*. Este vector suicida se utiliza para integraciones mediadas por recombinación en el genoma para inactivar o eliminar un elemento genético. Los transposones del tipo mariner también se pueden clonar en él para generar bibliotecas de inserción aleatoria.
- **Un origen de transferencia oriT** compatible con el sistema de conjugación expresado por la cepa donante, utilizamos el sistema oriT RP4.
- Un **marcador de selección**, un gen que confiere resistencia a un antibiótico.

La cepa donante de conjugación de *E. coli* (llamada beta XXX) contiene:

- Los genes de conjugación del sistema RP4 acoplados con el gen de resistencia a la kanamicina.
- El gen pir para permitir la replicación del vector suicida.
- Es auxotrófica para el DAP (diaminopimelato) para su eliminación (contraselección) después de la conjugación y transferencia del plásmido a *Vibrio*.

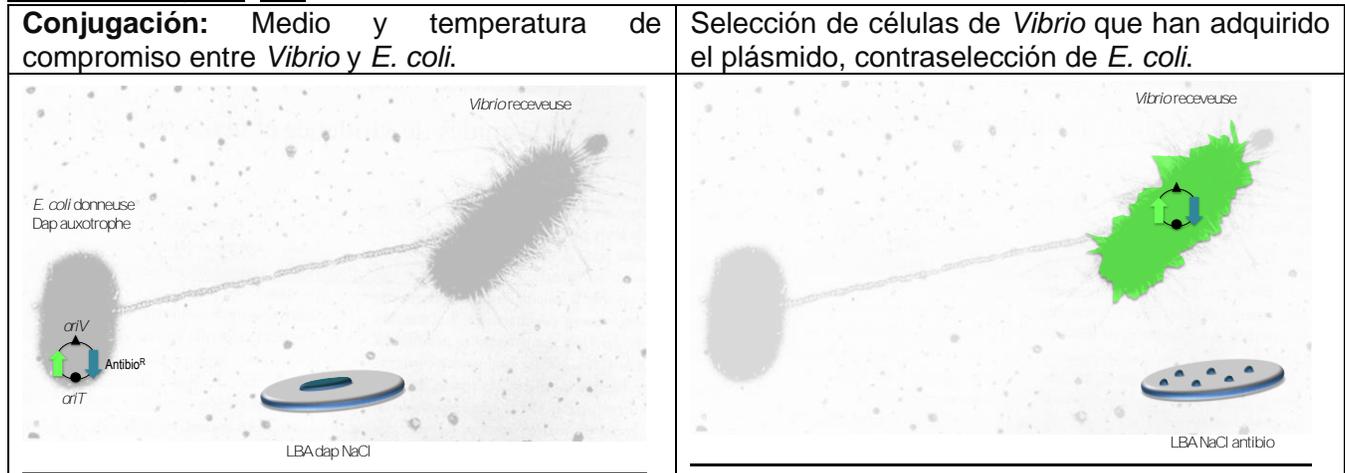
Tenga en cuenta que la competencia en esta cepa beta no es óptima. Por lo tanto, nuestro clonaje se lleva a cabo en otra cepa (llamada Pi XXX), donde se verifican las construcciones y se transfieren los plásmidos al donante. Las cepas Pi contienen:

- El gen pir para permitir la replicación del vector suicida.
- Es auxotrófica para el dT (timidina).

La cepa receptora de *Vibrio* puede ser más o menos resistente a los antibióticos (en nuestras manos, generalmente solo el cloramfenicol y la espectinomicina son utilizables). Pueden ser más o menos permisivas para la transferencia de ADN exógeno (debido a los numerosos sistemas de defensa en *Vibrios*). Por lo tanto, es necesario realizar un antibiograma con anticipación y probar varias cepas de

interés para seleccionar el mejor receptor (si es posible). Los consejos al final de esta sección ayudan a mejorar la frecuencia de conjugación, que puede variar de 10^{-1} a $<10^{-7}$ dependiendo de las cepas.

Resumen esquemático



Materiales (ejemplo para *V. crassostreae*)

- Marine broth (MB)
- Marine agar (MA)
- Lysogeny broth (LB) Miller
- LB + agar (LBA)
- NaCl 5M
- DAP 50mM (SIGMA 33240-5G)
- Chloramphenicol (Cm) 25 mg/mL
- LB NaCl 0.5M
- Kanamicina (Kan) 100 mg/mL
- TSA-2 (BBL Trypticase Soy Broth (TSB), BD, ref. 211768). Pour 1L de TSA-2: TSB 30 g; NaCl 15 g; Agar 15 g; H2O qsp 1L
- Conjugación: TSA-2 + DAP 0.3 mM ou LBA NaCl 0.5M + DAP 0.3 mM
- Selección: TSA-2 + Cm 5ug/mL ou LBA NaCl 0.5M + Cm 5ug/mL

Cultivos bacterianos

E. coli beta: LB DAP 0.3mM, 37°C, 250 rpm

Vibrio: MB, 20°C, ou LB NaCl 0.5M, agitación suave (100 rpm)

37°C incubación para *E. coli*

30°C incubación para conjugación

20°C incubación para *Vibrio* y selección

Protocolo:**Día -2**

Descongelar las células en agar:

- *Vibrio* en MA
- Donante de conjugación en LBA+ DAP 0.3mM+ Kan 100ug/mL + antibiótico codificado por el plásmido, aquí Cm 25 ug/mL

Día -1

Lanzar 5mL de cultivo overnight:

- *Vibrio* en MB
- Donante de *E. coli* en LB DAP0.3 mM+ Cm25 ug/mL (Kan no se añade en fase líquida)

Día 0

Diluir los cultivos 1/100 en 5mL

Vibrio: LB NaCl 0.5M, 20°C, agitación suave

E. coli: LB DAP 0.3 mM (sin antibiótico), 37°C, 250 rpm

Monitorear el crecimiento (OD) regularmente. A OD 0.3, mezclar 1 mL de *Vibrio* con 5 mL de *E. coli* donante, centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos, retirar la mayor parte del sobrenadante (invertir rápidamente el tubo sobre papel absorbente) y resuspender el pellet en un volumen mínimo (25 µL) de LB NaCl 0.5M.

Colocar la mezcla en una placa de agar TSA-2 DAP 0.3 mM bien drenada (el depósito debe ser denso y pequeño), e incubar durante la noche a 30°C.

Día 1

Raspar el biofilm completamente con un tip de pipeta (P1000) para recolectar todo.

Colocar el tip de la pipeta con el pellet bacteriano en un tubo de 15 mL que contenga 2 mL de LB NaCl 0.5M, agitar vigorosamente con vortex durante 5 segundos para resuspender completamente las células.

Sembrar en agar de selección TSA-2 Cm 5 ug/mL puro y/o diluido; alternativamente (cuando la frecuencia de conjugación es buena, es decir, un mínimo de 10^{-3}), depositar 10 µl de suspensión y realizar estriado de aislamiento en placas.

Incubar durante 24 a 28 horas a 20°C dependiendo de las cepas de *V. crassostreae*.

La relación entre el número de conjugantes (seleccionados con antibiótico) y el número total de *Vibrios* (agar sin antibiótico) le proporciona la frecuencia de conjugación.

Repicar algunos clones en medio selectivo LBA NaCl 0.5M Cm 5 ug/mL e incubar a 20°C toda la noche. Confirmar la presencia del plásmido con miniprep o PCR.

Tips importantes!

Es esencial entender que cada cepa de *Vibrio* tiene sus propias características: posibles tipos de antibióticos para la selección, permisividad al ADN exógeno, etc. Por lo tanto, proporcionamos algunos consejos aquí para comenzar un proyecto de genética con su cepa preferida.

- Procure tener una **colección de cepas** en lugar de una sola para manipular. Determinar si su cepa es modificable genéticamente (la más modificable genéticamente) puede ser algo a determinar antes de secuenciarla.
- Pruebe la **resistencia de sus cepas a antibióticos** de laboratorio comúnmente utilizados (y resistencias llevadas por sus plásmidos), generalmente cloramfenicol, espectinomicina, ampicilina y kanamicina.
- Los *Vibrios* spp. habitan diversos nichos ecológicos. Los *Vibrios* spp. bretones se cultivan a 20°C, los *Vibrios* spp. noruegos a 16°C y los *Vibrios* spp. neocaledonios a 28°C. Estos parámetros deben considerarse para el cultivo líquido y la conjugación. Por ejemplo, los *Vibrios* spp. fríos morirán a 30°C, por lo que planifique la conjugación a una temperatura más baja pero más larga.
- La conjugación y la selección se pueden llevar a cabo en LBA NaCl 0.5M en lugar de TSA-2, dependiendo de las cepas. La referencia inicial citada utiliza exclusivamente LB y derivados.
- La conjugación generalmente ocurre con *Vibrios* en fase de crecimiento exponencial, pero algunos prefieren OD más altas (0.9).
- La **selección de antibióticos también es variable**; por ejemplo, *V. crassostreae* se selecciona en Cm 5 µg/mL, mientras que *V. nigripulchritudo* y *V. aestuarinus* son seleccionables en Cm 1 µg/mL.
- Cuando la frecuencia de conjugación es alta, una alternativa "rápida" es recoger directamente un pellet de donante y receptor del agar, mezclarlos con una punta de pipeta en la placa de conjugación TSA-2 DAP 0.3mM e incubar (es decir, sin pasar por una etapa de cultivo líquido); luego, después de una incubación nocturna a 30°C, recoja el biofilm y resuspéndalo en LB NaCl 0.5M.
- Por el contrario, cuando la frecuencia de conjugación es baja, es posible que necesite realizar 10 veces una mezcla de 10 mL de donantes y 1 mL de receptor, hacer 10 gotas de biofilm y seleccionar en un gran número de placas.
- Cuando se recoge el biofilm en 2 mL de LB NaCl 0.5M y se esparce la mezcla pura, puede ocurrir un ruido de fondo significativo, por lo que es necesario diluirlo para el paso de selección.
- Algunas cepas son poco permisivas para la transferencia de plásmidos replicativos (frecuencia baja a nula) pero aceptan plásmidos suicidas, quedando así genéticamente modificables (ver protocolos para mutación por integración y mutación por intercambio alélico).

Referencia

Le Roux F, Binesse J, Saulnier D, Mazel D. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene vsm by use of a novel counterselectable suicide vector. **Appl Environ Microbiol.** 2007 73(3), 777-84.