

Inactivación o supresión de elementos genéticos (incluido el curado de plásmidos)

Introduction

La demostración formal de la función de un gen o elemento genético (isla genómica, plásmido, etc.) requiere su inactivación o delección para demostrar que es esencial para el fenotipo. Utilizamos un plásmido suicida, que puede replicarse en la cepa E. coli donante pero no en Vibrio. Este plásmido se transfiere a Vibrio por conjugación.

El plásmido contiene

- un **origen condicional de replicación, oriV**, cuya replicación está mediada por una proteína (Pir). El gen que codifica esta proteína está presente en el donante de la conjugación pero ausente en el vibrio. Este vector suicida se utiliza para la integración recombinante en el genoma con el fin de inactivar o suprimir un elemento genético. También se puede utilizar para clonar transposones mariner para generar bibliotecas de inserción alélica.
- Utilizamos el sistema oriT RP4, un **origen de transferencia oriT** compatible con el sistema de conjugación expresado por el donante.
- Un **marcador de selección**, un gen de resistencia a los antibióticos.

En caso de integración por recombinación simple, se clona este plásmido:

- **Un inserto de 500 pb situado**
 - en medio de un gen si se desea inactivarlo
 - al final de un gen si se desea introducir un marcador (por ejemplo, resistencia a los antibióticos) en el elemento genético sin inactivar el gen.

En el caso del intercambio alélico (o POP IN-POP OUT), el vector suicida que también contiene:

- **araC_pBAD_ccdB**: una toxina bacteriana dependiente de un promotor condicional, reprimido por glucosa al 1%; activado por arabinosa al 0,2%.
- Un **inserto de fusión** 500 pb aguas arriba y 500 pb aguas abajo del gen que se va a suprimir o intercambiar.

La cepa de clonación de E. coli (denominada Pi 3814) contiene:

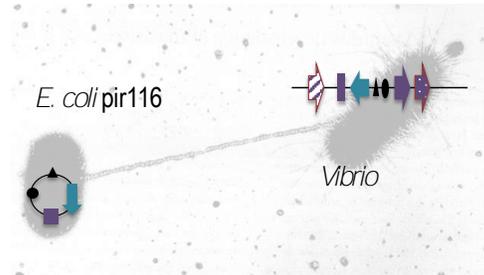
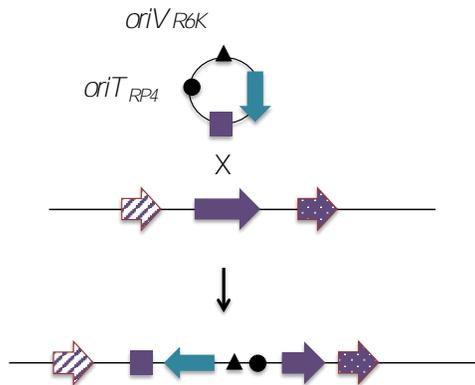
- gen pir para la replicación del vector suicida
- Es auxotrófica a dT (timidina)
- Tiene una mutación gyrA que la hace resistente a ccdB.

La cepa de conjugación de E. coli (denominada Beta 3914) contiene:

- genes de conjugación RP4 acoplados al gen de resistencia a la kanamicina
- gen pir para la replicación del vector suicida
- Es auxotrófica al DAP (diaminopimelato) para eliminarlo (contra selección) después del paso de conjugación y transferencia del plásmido al vibrio.
- También es resistente al ccdB (mutación gyrA).

Resumen:

1- Integración del vector suicida en un evento de recombinación



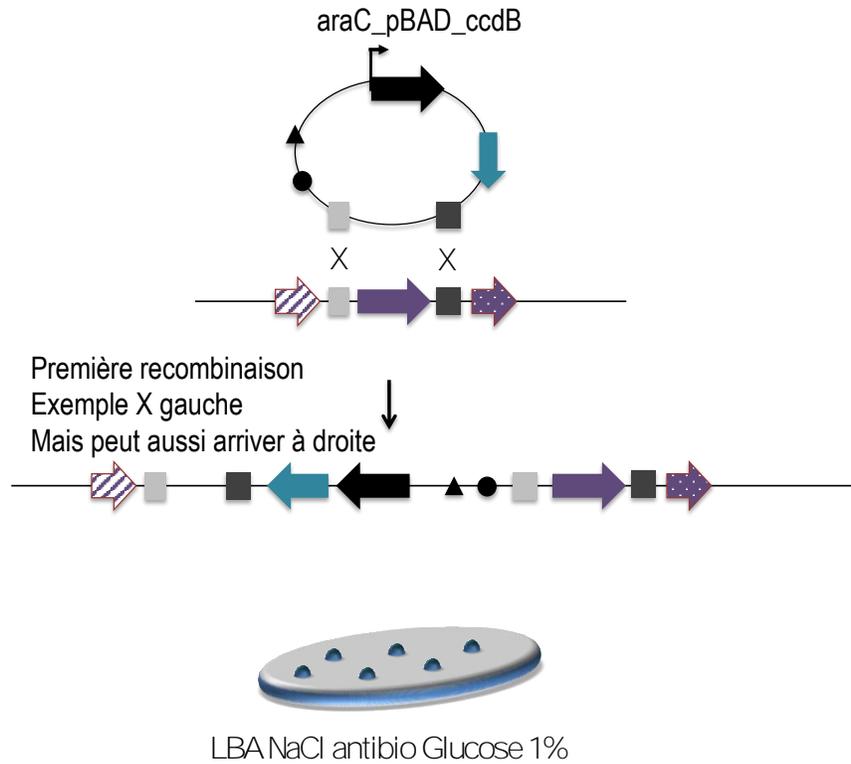
LBA NaCl antibio

Ventajas: técnica rápida (2 días)

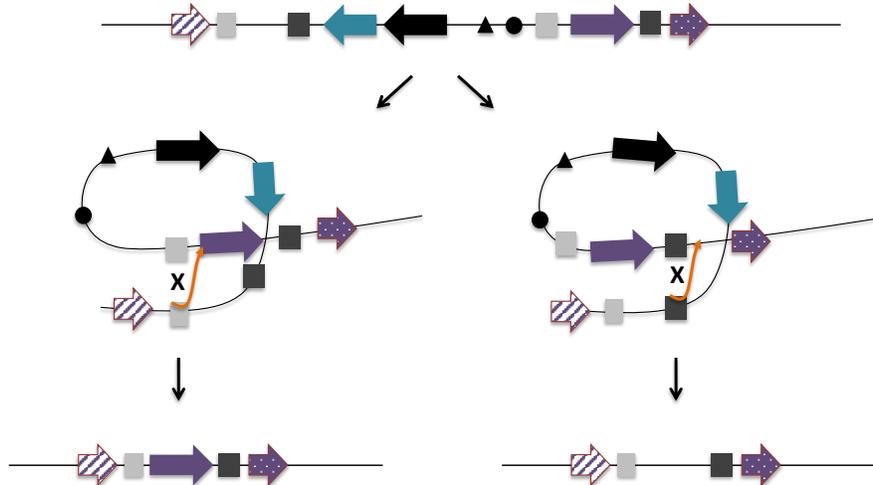
Desventaja: el vibrio es entonces resistente al antibiótico, y no se pueden realizar múltiples inactivaciones. Además, la integración del vector suicida puede alterar la expresión de otros genes en esta región (efecto polar). En general, cuando observamos la pérdida de un fenotipo en un mutante, siempre debemos demostrar que la complementación de esta mutación restaura el fenotipo. Esto puede conseguirse expresando el gen en un plásmido o integrándolo en el genoma.

2- POP In POP OUT

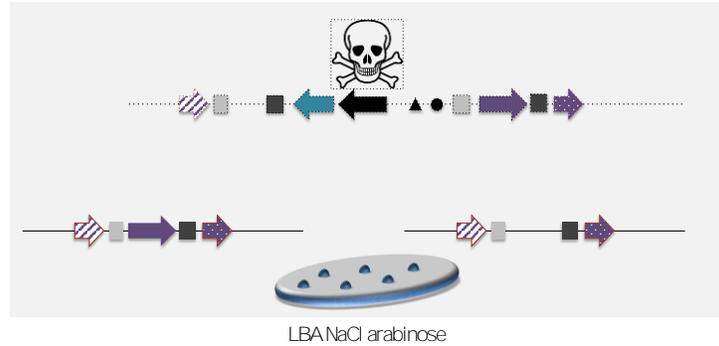
Etapas 1 :



Etapa 2: la integración del vector suicida es seleccionada por el antibiótico. La glucosa impide la expresión de ccdB. Esta integración genera una duplicación de las regiones flanqueantes (X gris claro/oscura) que puede dar lugar a una segunda recombinaison.



Las células que no han sufrido este segundo evento de recombinaison se contra-seleccionan activando la expresión de ccdB (arabinosa); las células que aún portan el plásmido suicida mueren. Las mutaciones se seleccionan mediante un cribado de delección utilizando cebadores PCR externos a la delección.



Ventajas: se pueden acumular tantas deleciones como se quiera, ya que la contra-selección conduce a la pérdida del gen de resistencia a los antibióticos. En teoría, la deleción o el intercambio alélico no modifica los genes adyacentes.

Desventaja: técnica que requiere más tiempo (5 días).

Materiales (ejemplo para *V. crassostreae*)

- Marine broth (MB)
- Lysogeny broth (LB)
- LB + agar (LBA)
- NaCl 5N
- Dap 50mM (SIGMA 33240-5G)
- Chloramphenicol (Cm) 25 mg/mL
- LB NaCl 0.5N
- Kan100 mg/mL
- TSA-2 (BBL Trypticase Soy Broth, BD, ref. 211768). For 1L de TSA-2: TSB 30 g; NaCl 15 g; Agar 15 g; H₂O quantity necessary 1L
- Conjugación TSA-2 + dap 0.3 mM **or** LB NaCl 0.5N + agar + dap 0.3 mM
- Selección : TSA-2 + Cm 5ug/mL **or** LB NaCl 0.5N + agar+ Cm 5ug/mL
- En el caso de intercambio alélico: primera selección de recombinación TSA-2 + Cm 5ug/mL + Glucose 1% **o** LB NaCl 0.5N + agar+ Cm 5ug/mL+ Glucose 1% ; contra-selección segunda recombinación: LB NaCl 0.5N + agar+arabinose 0.2%.

Cultivos bacterianos

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

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

37°C incubador para E. coli

30°C incubador para la conjugación

20°C incubador para vibrio y selección

Protocolo:**Día-2**

Descongelar las células en agar:

- Vibrio en MA
- Donante de conjugación en LBA+ dap+ Kan100+ antibiótico codificado por plásmido, aquí Cm 25 ug/mL

Día -1

Lanzar 5mL de cultivo durante la noche

- Vibrio en MB
- E. coli donante LBA dap0,3 mM+ Cm25 ug/mL (no se añade Kana en fase líquida)

Día 0

Diluir los cultivos 1/100 en 20mL

Vibrio: LB NaCl 0,5N, 20°C, agitación suave

E. coli: LB dap 0,3 mM (sin antibióticos), 37°C, 250 rpm

Controlar regularmente el crecimiento (DO). A la DO 0,3, mezclar 2mL de vibrio con 10 mL de E. coli donante, centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos, eliminar todo el sobrenadante posible (invertir rápidamente el tubo sobre papel adsorbente) y recuperar el pellet con un volumen mínimo (25ul) de LB NaCl 0,5N.

Depositar la mezcla sobre agar TSA-2 Dap 0,3 mM bien seco (el depósito debe tener un tamaño de medio milímetro), e incubar durante la noche a 30°C.

Día 1

Raspar el biofilm/mancha aceitosa con un tip (P1000) para recuperarlo todo.

Colocar la punta con el sedimento bacteriano en un tubo de 15 mL que contenga 2 mL de LB NaCl 0,5N, y agitar enérgicamente durante 5 segundos para resuspender las células.

Esparza 500 ul en una placa grande de agar de selección; dependiendo de la cepa y del gen objetivo, se necesitarán una o más placas.

- Para la integración de recombinación única, seleccione en TSA-2 Cm5
- Para el intercambio alélico, seleccione TSA-2 Cm5 Glucosa 1%.

Incubar de 24 a 48 horas a 20°C, dependiendo de la cepa de *V. crassostreae*.

En caso de integración de recombinante único, confirme la integración en el sitio correcto mediante PCR utilizando un cebador en el plásmido y un cebador en el genoma bacteriano.

En el caso de un intercambio alélico, continúe con la segunda recombinación para este:

Día 2

Seleccionar 4 clones en TSA-2 Cm5 Glucosa 1% y cultivarlos en LB NaCl 0,5N Cm5 durante 6-8 h.

Esparcir 10 (aislamiento) y 100 ul (rastrillo) en LB NaCl 0,2% arabinosa.

Incubar durante 24 horas a 20°C.

Cribar los mutantes por PCR utilizando cebadores externos

Tips importantes!

Es importante entender que cada cepa de vibrio tiene sus propias particularidades: tipo de antibiótico disponible para la selección, permisividad al ADN exógeno, etc. Además de los consejos dados en el protocolo de conjugación, he aquí algunos consejos para la integración:

- Las frecuencias de conjugación/integraciones acumuladas varían mucho según la cepa y el objetivo. Para *V. crassostreae*, generalmente aislamos varios meriploides en un solo plato (selección de 500 ul de jugo de conjugación); para *V. aestuarianus*, necesitamos de 10 a 20 platos grandes (5 conjugaciones, ocupando 2 mL = 10 mL , 500 uL repartidos en 20 platos).
- La frecuencia de integración del plásmido suicida depende del tamaño de la región utilizada para la recombinación, generalmente 500 pb, pero puede reducirse a 150 pb si es necesario.
- Algunas cepas no son permisivas a los plásmidos replicativos pero sí a la integración de un vector suicida, ¡así que no desesperes!
- Algunas personas tienden a añadir glucosa al agar de conjugación, ¡pero no lo hagas! La glucosa tiene un efecto negativo sobre *E. coli*, que deja de conjugarse. La glucosa sólo se utiliza para la selección de vibrios conjugadores.
- En el caso de los islotes genómicos (en particular los implicados en la defensa antifágica), puede ser necesario realizar subdelecciones para suprimir el islote completo; al igual que con los plásmidos, la supresión de la toxina de un sistema de adicción también puede utilizarse para realizar la supresión total.
- Las mismas herramientas se utilizan para la curación de plásmidos, para:
 - o Clonar el origen de replicación del plásmido vibrio en el vector suicida (sin *ccdB*), transferirlo a la cepa vibrio y seleccionar con antibióticos. El plásmido endógeno y el plásmido transferido entran en competición (incompatibilidad ligada al mismo origen de replicación) y se seleccionan las cepas que han perdido el plásmido endógeno (Le Roux NAR 2011).
 - o Clonar 500 pb del plásmido endógeno en el plásmido suicida que codifica *ccdB*, seleccionar la integración por recombinación en antibiótico/glucosa y, a continuación, cultivar en arabinosa para contrarrestar la pérdida de plásmido (Bruto ISME J 2017).

Referencias

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.

Le Roux F, Davis BM, Waldor MK. Conserved small RNAs govern replication and incompatibility of a diverse new plasmid family from marine bacteria. **Nucleic Acids Res.** 2011 39(3), 1004-13.

Bruto M, James A, Petton B, Labreuche Y, Chenivresse S, Alunno-Bruscia M, Polz MF, Le Roux F. *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. **ISME J.** 2017 11(4), 1043-1052.