

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 969 666**

21) Número de solicitud: 202330912

51) Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**C12N 15/70** (2006.01)  
**C12R 1/19** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22) Fecha de presentación:

**08.11.2023**

43) Fecha de publicación de la solicitud:

**21.05.2024**

Fecha de concesión:

**09.01.2025**

45) Fecha de publicación de la concesión:

**16.01.2025**

73) Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
(100.00%)  
AVENIDA DE SÉNECA, 2  
28040 MADRID (Madrid) ES**

72) Inventor/es:

**ESCUADERO GARCÍA-CALDERÓN, José Antonio y  
TRIGO DA ROZA MOUTINHO, Filipa**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

54) Título: **Plataforma para captar casetes de integrones**

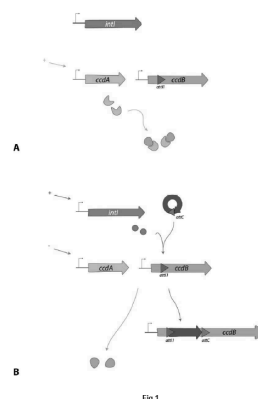
57) Resumen:

Plataforma para captar casetes de integrones.

La presente invención se refiere a una plataforma para captar casetes de integrones a partir de muestras exógenas de ADN o a partir de cepas donadoras que los contienen. La plataforma incluye un sistema reportero ciego construido mediante la inserción de un sitio de integración attI en el gen de la toxina de un sistema toxina/antitoxina, el gen de la antitoxina correspondiente y el gen de la integrasa intl.

La plataforma puede estar construida íntegramente sobre plásmidos o bien incluir algunas partes en el cromosoma de una bacteria Gram negativa, especialmente en *E. coli*.

La invención también incluye métodos y kits para detectar casetes de integrón mediante el uso de la plataforma.



ES 2 969 666 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

## DESCRIPCIÓN

### Plataforma para captar casetes de integrones

#### 5 SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra en el sector de la biotecnología, más concretamente, se refiere a herramientas de biología molecular para la detección de casetes de integrones.

10

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los integrones son plataformas genéticas capaces de capturar, almacenar y reorganizar genes codificados en elementos genéticos pequeños denominados casetes de integrón, mediante reacciones de recombinación específica de sitio. Estas estructuras se encuentran de forma natural en el cromosoma de más del 17% de las bacterias secuenciadas y, algunas, a través de su asociación con transposones y plásmidos conjugativos, se han diseminado por ambientes clínicos. A día de hoy, están presentes en aproximadamente el 50% de los aislados clínicos de bacterias Gram negativas, y pueden vehicular una enorme colección de genes de resistencia a antibióticos. De manera general, la parte estable de los integrones está compuesta por 3 elementos clave: el gen de la integrasa (*intI*), que codifica una recombinasa sitio-específica de la familia de las tirosin-recombinasas que lleva a cabo todas las reacciones de recombinación dentro del integrón; el sitio de integración (*attI*) donde se incorporan los casetes de integrón; y un promotor constitutivo ( $P_c$ ) que permite la expresión de los genes contenidos dentro de los casetes. La parte variable de los integrones está constituida por la colección de casetes, generalmente compuestos por un único marco de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés) seguido de un sitio de recombinación (*attC*) que les permite ser recombinados por la integrasa, dando lugar a su integración y escisión de la plataforma.

La integración sucesiva de casetes en el sitio *attI* lleva a la formación de una colección de genes de funciones adaptativas, donde los más cercanos al  $P_c$  se expresan con más intensidad. En condiciones de estrés se expresa la integrasa, que puede escindir y reintegrar casetes en la primera posición, donde la expresión es máxima.

35

Algunos integrones cromosómicos han sido movilizados a través de transposones a plásmidos conjugativos que los vehiculan por transferencia horizontal; en este caso se conocen como integrones móviles (MI, por sus siglas en inglés). En los años 50, los MI desempeñaron un papel primordial en la aparición y aumento de la multirresistencia a los antibióticos y, en la actualidad, vehiculan más de 170 casetes de resistencia frente a la mayoría de los antibióticos. Se conocen cinco clases de integrones móviles; la clase 1 es la más prevalente y clínicamente relevante, y también la mejor estudiada.

En los últimos años, se han descrito aplicaciones de los integrones o sus elementos como herramientas biotecnológicas. En concreto, se han utilizado los sitios de recombinación *attC* para clonar ADN de interés, incluso de gran tamaño, y se propone la posibilidad de determinar la orientación de los genes diana cuando se inserta el ADN del genoma, por lo que sería útil en terapia génica (CN102517318A). También se ha descrito la creación de sitios *attC de novo* (EP2634256A1), reescribiendo la secuencia primaria de los sitios *attC* para cifrar en ellos una segunda función, o para generar la recombinación entre dominios de proteínas dentro de las proteínas multidominio (WO201809991A1), generando sitios de recombinación sintéticos con secuencias a la medida que pueden insertarse en una región de ADN seleccionada y preservando su funcionalidad.

Sin embargo, a pesar de su importancia, la detección rutinaria de casetes de integrones en microorganismos patógenos sigue siendo compleja. Los métodos clásicos, por reacción de PCR (CN104894283A, CN101948909A, CN106222252A), están basados en secuencias supuestamente conservadas en la región 3' del integrón de clase 1. Los avances en secuenciación masiva han puesto de manifiesto que estas secuencias no se encuentran en gran parte de los integrones de clase 1 (los más comunes), y tampoco están presentes en los integrones de las clases 2 a 5. Por lo tanto, la única forma eficaz de identificar y caracterizar integrones es por secuenciación masiva, un método laborioso y largo de realizar, que requiere de material específico y caro (secuenciadores) y de personal cualificado para el análisis de los datos, lo que limita su implementación de rutina.

35

## EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Plataforma para captar casetes de integrones.

Para resolver el problema de la falta de herramientas para detectar de forma rutinaria casetes de integrones en muestras de ADN, un aspecto de esta invención se refiere a  
5 una plataforma genética de captura de casetes de integrón que incluye un sistema reportero y el gen de la integrasa *intl*.

La plataforma de captura de casetes de integrones está diseñada a partir de un integrón de clase 1, a la que pertenecen los MI más relevantes desde el punto de vista clínico, y  
10 cuya integrasa IntI1 reconoce un espectro más amplio de sitios *attC* de los casetes de integrón que las integrasas de otras clases de integrones. La invención incluye el clonaje de un sitio de integración (*attI*) dentro del gen de la toxina de un sistema toxina/antitoxina (TA), con el objetivo de usarlo como un marcador de lectura ciego para seleccionar eventos de recombinación de modo que la supervivencia del microorganismo que porta  
15 la construcción evidencie el evento de integración. Después de inducir la expresión de *intl*, los casetes captados interrumpen el gen de la toxina, lo que permite la supervivencia bacteriana en ausencia de la antitoxina. Antes de seleccionar estos eventos de recombinación, la expresión controlada de la antitoxina garantiza la viabilidad de la bacteria.

20 Para conseguir este reportero, se ha clonado el sitio *attI* dentro del gen de una toxina de un sistema TA de manera que, al expresarse, la proteína obtenida no pierda su función normal. Preferentemente, como reportero específico se selecciona el gen *ccdB* y se acompaña del gen de su antitoxina *ccdA* y, como sitio de integración, se selecciona  
25 preferentemente *attI1*. Se ha elegido una zona plástica de *ccdB*, que se especifica más adelante, donde introducir 51 bp respetando el marco de lectura no influye en la actividad de la toxina. La expresión de *ccdB* da lugar a una toxina que se une a la subunidad GyrA de la girasa de ADN bacteriana, impidiendo su funcionamiento correcto. CcdB forma parte de un sistema toxina/antitoxina tipo II, con CcdA como antitoxina que  
30 inhibe la unión de CcdB a GyrA.

Un aspecto de la invención, por lo tanto, se refiere a una plataforma para la captación de casetes de integrones que incluye un sitio *attI* insertado en el gen de la toxina de un sistema toxina/antitoxina, de manera que esa inserción no modifica la funcionalidad de  
35 la proteína resultante del gen de la toxina, y la construcción incluye, además, el gen de

la antitoxina del sistema toxina/antitoxina y el gen de la integrasa *intl*. Preferentemente, el sistema toxina/antitoxina utilizado para realizar la construcción es el sistema CcdB/CcdA por lo que el sitio *attI* se inserta en el gen *ccdB* (*ccdB::attI*) sin modificar la funcionalidad de la proteína resultante de la traducción del gen *ccdB*, y la construcción  
5 también incluye el gen *ccdA* y el gen de la integrasa *intl*. Se seleccionan preferentemente *attI1* e *intl1*.

Esta construcción se incluye dentro de una bacteria hospedadora en la que se activará el mecanismo de captación de casetes de integrón con diferentes objetivos, como captar  
10 casetes de muestras exógenas o del propio hospedador.

En una primera opción de plataforma para captar casetes de integrones, que denominaremos **construcción 1**, tanto el gen de la toxina que incluye el sitio *attI* como el gen de su antitoxina están insertados en el cromosoma de la bacteria hospedadora  
15 bajo el control de promotores inducibles, mientras que *intl* se introduce en un plásmido de alto número de copias también bajo el control de un promotor inducible. Preferentemente, la construcción 1 incluye P<sub>Lac</sub> como promotor inducible de la toxina, P<sub>BAD</sub> como promotor de la antitoxina y P<sub>Van</sub> como promotor de la integrasa. Asimismo, como sitio de integración y como gen de la integrasa se seleccionan, preferentemente,  
20 *attI1* e *intl1*. En una realización preferida, la construcción 1 se realiza en *E. coli*.

Una segunda opción de plataforma para captar casetes de integrones, **construcción 2**, incluye el gen de la toxina que incluye el sitio *attI* controlado por un promotor inducible en un plásmido de alto número de copias, mientras que el gen de la antitoxina e *intl*  
25 están clonados bajo el control de dos promotores inducibles distintos, en otro plásmido de alto número de copias. Preferentemente, se utiliza P<sub>Lac</sub> como promotor de la toxina, P<sub>BAD</sub> como promotor de la antitoxina y P<sub>Van</sub> como promotor de la integrasa. La construcción 2, al estar totalmente construida sobre plásmidos, puede introducirse en cualquier bacteria Gram negativa. Opcionalmente, el gen de la antitoxina e *intl* pueden  
30 estar clonados en el mismo plásmido. Además, como sitio de integración y como gen de la integrasa se seleccionan, preferentemente, *attI1* e *intl1*.

Por plásmido de alto número de copias, el experto en la materia entiende aquellos que tienen una “replicación relajada” cuyo número puede variar entre 15 y varios cientos de  
35 copias.

La construcción 1 se diseña específicamente para el hospedador en el que se quiere insertar. Preferentemente, la construcción 1 se construye en *E. coli*. La construcción 2, al estar totalmente construida sobre plásmidos, es una plataforma para captar casetes de integrones que puede introducirse en cualquier bacteria Gram negativa, entre las que se pueden elegir, por ejemplo, *E. coli* y *V. cholerae*.

Otro aspecto de la invención se refiere a la cepa de *E. coli* MG1655 en la que se ha incluido la plataforma para captar casetes de integrones que hemos denominado construcción 1. Esta cepa ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (Parque Científico de la Universidad de Valencia, calle del Catedrático Agustín Escardino Benlloch, 9, 46980 Paterna, Valencia) con fecha 25/07/2023, donde ha recibido el número de referencia CECT30915.

La invención también se refiere a un método de detección de casetes de integrón a partir de muestras de ADN. En el caso de la construcción 1, se utiliza la bacteria hospedadora que incluye la plataforma para captar casetes de integrones y el ADN bajo estudio mediante conjugación. En el caso de la construcción 2, se introduce la plataforma para la captación de casetes de integrones en la bacteria objeto de estudio; preferentemente, la herramienta se introduce por transformación, y los casetes son captados directamente a partir del cromosoma o de plásmidos del hospedador.

La bacteria hospedadora se selecciona preferentemente entre las cepas de *E. coli* y, más preferentemente, se selecciona la cepa CECT30915. También se refiere a un kit para la detección de casetes de integrón en muestras de ADN que incluye una plataforma para captar casetes de integrones con la construcción 2, preferentemente, con el gen de la antitoxina e *intl* clonados en un mismo plásmido.

Las muestras a analizar pueden ser de origen humano, animal o ambiental y pueden ser clínicas, alimentarias o ambientales, lo que permite analizar la prevalencia y la difusión de los casetes de resistencia a antibióticos y, por lo tanto, comprender la ecología de estos elementos. Por otro lado, al incluir una selección ciega, estas herramientas se pueden utilizar para estudiar el contenido de casetes de integrones en muestras variadas, analizando su función, ya que se sabe que los integrones cromosómicos son un reservorio virtualmente infinito de casetes de integrón de función

desconocida.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña, como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

10 **Figura 1. Base de las plataformas para la captura de casetes de integrón. A.** En situación de reposo, inducimos la expresión de *ccdA*, que permite la supervivencia de la bacteria. **B.** Para captar un casete, se induce la expresión de la integrasa (*intl1*) y se bloquea la expresión de *ccdA*; la bacteria muere si el gen *ccdB* está intacto o sobrevive si un casete se inserta en el sitio *attI*, interrumpiendo la transcripción del gen *ccdB*.

15

**Figura 2. Esquema de la plataforma con la construcción 1 y su ruido de fondo. A.** Detalles de la construcción 1. La construcción *ccdB::attI1* está clonada en el cromosoma de la bacteria hospedadora bajo el control del  $P_{Lac}$ , y *ccdA* bajo el control del  $P_{BAD}$ . *intl1* está clonado en un plásmido bajo el control del  $P_{VanM}$ . **B.** Frecuencias de mutantes de escape (FME) del sistema, comparado con la toxina silvestre.

20

**Figura 3. Esquema de la plataforma con la construcción 2 y su ruido de fondo. A.** Detalles de la construcción 2. La construcción *ccdB::attI1* está clonada bajo el control del  $P_{Lac}$  en un plásmido. *ccdA* e *intl1* están clonados en un mismo plásmido, bajo el control del  $P_{BAD}$  y del  $P_{VanM}$ , respectivamente. **B.** FME del sistema, comparado con la toxina silvestre.

25

**Figura 4. Captura de casetes con la plataforma para captar casetes de integrones que incluye la construcción 1 por conjugación en *E. coli* CECT30915.** Las frecuencias de recombinación (FR) se obtuvieron calculando el número de recombinantes (seleccionando por fenotipo, color violeta, o por selección ciega con nuestra plataforma, color rosa) sobre el número total de bacterias. *ccdB::attI1* representa la construcción 1 y *attI* representa un control similar sin el gen de *ccdB*.

30

**Figura 5. Captura de casetes con la plataforma para captar casetes de integrones que incluye la construcción 2, por transformación de la bacteria a estudiar.** Las FR

35

se obtuvieron calculando el número de recombinantes sobre el número total de bacterias. *ccdB::att1* representa la construcción 2 y en este caso comparamos con un control que no contiene *intl1*.

## 5 REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos de su alcance. Se incluyen, además, tablas con la descripción de los cebadores (tabla 1), los plásmidos (tabla 3) y las cepas (tablas 4) utilizados o generados en estos ejemplos.

En la Figura 1A se representa el clonaje de un sitio de integración (*att1*) dentro del gen de la toxina CcdB, del sistema toxina/antitoxina CcdB/A, con el objetivo de usarlo como marcador de lectura ciego para seleccionar eventos de recombinación de modo que la supervivencia del microorganismo que porta la construcción evidencie el evento de integración. Después de inducir la expresión de *intl*, como esquematiza la Figura 1B, los casetes captados interrumpen el gen de CcdB, lo que permite la supervivencia bacteriana en ausencia de CcdA. Antes de seleccionar estos eventos de recombinación, la expresión controlada de la antitoxina garantiza la viabilidad de la bacteria.

20

### **Ejemplo 1.**

#### **Construcción del reportero ciego.**

Se insertó un sitio *att1* (SEQ ID NO: 28) de *E.coli* en el gen *ccdB* de *Vibrio fischeri*, generando *ccdB<sub>KO</sub>::att1* (SEQ ID NO: 29). Esta construcción se sintetizó en IDT (Integrated DNA Technologies, USA) con un codón STOP, y se regeneró su funcionalidad por SOE-PCR (del inglés "Splicing by Overlap Extension" PCR). Esto se hizo amplificando primero dos fragmentos, a partir de SEQ ID NO: 29, con las parejas de cebadores SEQ ID 1 y 2 y SEQ ID 3 y 4, y uniéndolos a continuación mediante otra PCR con los cebadores SEQ ID 1 y 4, obteniendo *ccdB::att1* (SEQ ID NO: 30).

30

El reportero ciego fue testado en sus diferentes construcciones como se describe en los siguientes ejemplos.

35

**Ejemplo 2.****Elaboración de la construcción 1.**

En este ejemplo, la construcción 1 fue generada en el hospedador *E. coli* MG1655 (A129). Esta cepa contiene un plásmido termosensible denominado pA129 (su nombre en la literatura es pKOBEG; Derbise, A. *et al.* "A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*." *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003 Sep 5 22;38(2):113-6), que codifica el operón *red* del fago lambda, que promueve la recombinación homóloga entre el cromosoma y la construcción que queremos insertar. El lugar de integración en el cromosoma elegido aquí es el sitio *attB* del propio fago lambda, por ser inocua la integración de ADN en esa región.

10 Para generar la construcción 1 se amplificó primero el fragmento P<sub>BAD</sub> *ccdA* a partir del plásmido pA202 con los cebadores SEQ ID 5 y 6, uniéndolo por la técnica SOE-PCR a los dos fragmentos de homología de la zona del sitio *attB* del cromosoma de *E. coli* MG1655 amplificados con los cebadores SEQ ID 7 y 8, y 9 y 10. Procediendo a la inducción del plásmido pKOBEG, se electroporó este fragmento de PCR, seleccionando 15 con un marcador de resistencia (*carb*<sup>R</sup>) para garantizar la correcta inserción de la construcción.

Después, se generó el plásmido pA204 con la construcción P<sub>Lac</sub> *ccdB::attI1* por digestión y ligación digiriendo el fragmento *ccdB::attI1* (SEQ ID NO: 30) y el *backbone* del 20 plásmido pA121 con las enzimas BamHI y XbaI, electroporando a continuación la ligación en la cepa *E. coli* π3813 (A118) resistente a CcdB. Para clonar en *E. coli* MG1655 (A129), se amplificaron dos fragmentos de las regiones de homología de la zona del sitio *attB* del cromosoma de *E. coli* MG1655 con los cebadores SEQ ID 11 y 12, y SEQ ID 9 y 10, uniéndolas posteriormente a la región de interés del plásmido 25 pA204, es decir, el fragmento P<sub>Lac</sub> *ccdB::attI1*, amplificada con los cebadores SEQ ID 13 y 14. Esta unión se hizo por SOE-PCR, insertando P<sub>Lac</sub> *ccdB::attI1* entre los dos fragmentos de las regiones de homología de la zona del sitio *attB*. Del mismo modo, se electroporó el fragmento de PCR (P<sub>Lac</sub> *ccdB::attI1*) sustituyendo el anterior marcador de resistencia (*carb*<sup>R</sup>), y seleccionando con uno nuevo (*zeo*<sup>R</sup>), generando la construcción 30 cromosómica P<sub>Lac</sub> *ccdB::attI1* P<sub>BAD</sub> *ccdA* (SEQ ID NO: 31).

Después de la incorporación sucesiva de los dos fragmentos (el fragmento P<sub>BAD</sub> *ccdA* y el fragmento P<sub>Lac</sub> *ccdB::attI1*), se curó el plásmido pKOBEG por temperatura, incubando a 42°C.

35

A continuación, se electroporó el plásmido pVanM::*intl1* (pA498) generado mediante la técnica de ensamblaje de fragmentos conocida como Gibson Assembly (Gibson DG. “Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments.” *Methods Enzymol.* 2011;498:349-61), mediante el ensamblaje de los siguientes fragmentos: *intl1*, amplificado con los  
5 cebadores SEQ ID 15 y 16 a partir del plásmido pA120, y el *backbone* del plásmido pA215, amplificado con los cebadores SEQ ID 17 y 18, generando así la cepa A787 que se depositó en la Colección Española de Cultivos Tipo, donde recibió el número de referencia CECT30915.

10 La construcción final está esquematizada en la Figura 2A.

Esta construcción fue testada con un ensayo de muerte, para garantizar el correcto funcionamiento de la toxina y evaluar el ruido de fondo de la herramienta. Brevemente, la cepa CECT30915 se incubó en caldo de cultivo con arabinosa durante la noche,  
15 garantizando la producción de antitoxina y, por lo tanto, la supervivencia de las bacterias. Al día siguiente, se realizaron diluciones seriadas del cultivo en condiciones de supervivencia (arabinosa 0,2%) y en condiciones de muerte (glucosa 1% e IPTG 200 µg/mL). De esta manera, obtuvimos una frecuencia de mutantes de escape de  $10^{-5}$  (Figura 2B). Por mutantes de escape entendemos el “ruido de fondo”, es decir, las  
20 bacterias que sobreviven pero que no han captado ADN en el sitio de integración.

### **Ejemplo 3.**

#### **Elaboración de la construcción 2.**

Para generar la construcción 2 se generaron dos plásmidos: pB746 y pB842.

25

Se generó el plásmido pB746 conteniendo *ccdA* (SEQ ID NO 33) bajo el control del P<sub>BAD</sub> e *intl1* (SEQ ID NO 32) bajo el control del P<sub>VanM</sub>. El plásmido fue construido mediante la técnica Gibson Assembly por ensamblaje del fragmento P<sub>VanM</sub> *intl1* amplificado con los  
30 cebadores SEQ ID NO 19 y 20 a partir del plásmido pA498, y del plásmido pA202 linealizado con los cebadores SEQ ID NO 21 y 12. A continuación, se transformó la cepa DH5α de *E. coli* con el plásmido generado (pB746).

Posteriormente, generamos una nueva versión del plásmido pA204, cambiando el marcador de resistencia. Esto se hizo amplificando el gen de zeocina, a partir del  
35 plásmido pA249, con los cebadores SEQ ID NO 22 y 23, y amplificando el plásmido

pA204 sin su marcador de resistencia original con los cebadores SEQ ID NO 24 y 25. Los fragmentos se unieron por Gibson Assembly y con ellos se transformó la cepa *E. coli* π3813 (A118), resistente a CcdB, generando el pB824.

- 5 Para testar esta construcción se transformó la cepa *E. coli* DH5α que contenía el pB746 con el plásmido pB824 (Figura 3A). El ensayo de muerte se realizó como se ha descrito en el ejemplo 2 para la construcción 1, y se obtuvo una FME de  $10^{-6}$  (Figura 3B).

#### **Ejemplo 4.**

##### **10 Método de detección de casetes de integrón utilizando la construcción 1.**

El método de detección de casetes de integrón utilizando la construcción 1 está basado en un ensayo de conjugación/recombinación.

- 15 En este ejemplo, se utilizó el plásmido suicida pA123 que incluye el plásmido pSW23T con un sitio *attC* y que, por lo tanto, asegura la entrega de uno de los sustratos de recombinación en su forma monohebra, que es su forma recombinogénica (utilizamos el sitio *attC* como simulación de casetes de integrón). La cepa donadora de pA123 conjuga el plásmido que entra en la célula receptora, en este ejemplo la cepa CECT30915, en forma de monohebra. Al ser un plásmido suicida, esto es, un plásmido  
20 que necesita una determinada proteína, la proteína Pi ( $\pi$ ), para su replicación, la cepa receptora, CECT30915 que contiene la construcción 1 según se describe en el ejemplo 2, no puede sostener su replicación y la forma de monohebra se mantiene. La única manera de que se mantenga el vector pA123 en las células receptoras es que recombine con el sitio *attI1* contenido en la construcción 1 de CECT30915. La eficiencia de la  
25 captación del casete se mide calculando la frecuencia de recombinación (FR).

- Para realizar este ejemplo, como cepa bajo estudio se cultivó la cepa de *E. coli* A123, donadora del plásmido pA123, durante la noche en medio LB suplementado con cloranfenicol 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (marcador de resistencia de pA123) y ácido diaminopimélico  
30 (DAP) a 0,3 mM (ya que la cepa donadora A123 requiere DAP para crecer). La cepa receptora CECT30915 se cultivó durante la noche en medio LB suplementado con zeocina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (marcador de resistencia de la construcción en el cromosoma), kanamicina 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (marcador de resistencia de pA498, que incluye *intI1* en CECT30915) y arabinosa 0,2% (para asegurar la supervivencia de la bacteria). Al día  
35 siguiente, los cultivos tanto de la donadora A123 como de la receptora CECT30915 se

diluyeron 1/100 en LB con los antibióticos mencionados anteriormente y con DAP 0,3 mM, o arabinosa 0,2% + vanilato 25 $\mu$ M (para inducir la expresión de *intl*), respectivamente, y se incubaron hasta una DO = 0,6. A continuación, después de lavar los cultivos, se mezclaron, en 1 mL de volumen total, la receptora y la donadora en partes de 4:1, centrifugando 2 min a 7000 rpm, y resuspendiendo en 100  $\mu$ l de LB. Este volumen se extendió sobre una membrana de conjugación (membrana de éster de celulosa mixta de Millipore, 47 mm de diámetro y 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro) sobre una placa de Petri LB + DAP 0,3 mM + arabinosa 0,2% + vanilato 25 $\mu$ M y se incubó durante la noche (18 horas) para que tuvieran lugar la conjugación y la recombinación. Al día siguiente, se resuspendieron las células contenidas en la membrana de conjugación en 5 mL de LB, después de lo cual se realizaron diluciones en serie 1:10 hasta 10<sup>-7</sup> y se sembraron 5  $\mu$ L de cada dilución en placas en medio LB suplementado con distintos antibióticos y reactivos. Para contar las bacterias receptores totales se sembró en zeocina 50  $\mu$ g/mL, kanamicina 40  $\mu$ g/mL y arabinosa 0,2%. Para contar las bacterias recombinantes por el fenotipo conferido por el plásmido suicida integrado, se sembró en zeocina 50  $\mu$ g/mL, kanamicina 40  $\mu$ g/mL, cloranfenicol 25 $\mu$ g/mL y arabinosa 0,2%. Para contar las bacterias recombinantes por supervivencia, consecuencia de la inserción de pA123 dentro del gen *ccdB* contenido en la construcción 1, se sembró en zeocina 50  $\mu$ g/mL, kanamicina 40  $\mu$ g/mL, glucosa 1% y IPTG 200  $\mu$ g/mL. La frecuencia de recombinación se calculó como la proporción de unidades formadoras de colonias (UFC) recombinantes, con respecto al número total de UFC receptoras. Esto se calculó de dos formas diferentes: en primer lugar, mediante el método de supervivencia, en el que comparamos el número de células supervivientes (induciendo la muerte como en el ejemplo 2) y el número total de células receptoras. En segundo lugar, comparamos la frecuencia de recombinación calculada según se acaba de indicar con la frecuencia de recombinación por fenotipo. En este segundo método, comparamos el número de células que han adquirido el marcador de resistencia portado por el vector pA123 sin inducir su muerte, y el número total de células receptoras. La frecuencia de recombinación global es una media de al menos 3 réplicas biológicas. En este caso, obtuvimos una frecuencia de recombinación de 10<sup>-1</sup> en los dos casos, comparables con el control que solo contiene un *attI1* (cepa A785, Tabla 3) (Figura 4).

### **Ejemplo 5.**

#### **Método de detección de casetes de integrón utilizando la construcción 2.**

Para detectar casetes de integrones con la construcción 2 adoptamos una estrategia

distinta. En este caso, el objetivo era captar casetes del cromosoma de la bacteria bajo estudio o plásmidos que pueda contener la bacteria bajo estudio. Elegimos para este ejemplo la cepa silvestre de *Vibrio cholerae* N16961 (A095). En primer lugar, esta cepa se electroporó con el plásmido pB746, que contiene *ccdA* e *int1*. A continuación, y cultivando las células en presencia de arabinosa 0,2% para garantizar la producción de *ccdA*, se electroporó con el plásmido pB824, que contiene la construcción *ccdB::att1*. Al día siguiente, se eligieron 3 colonias transformantes que se crecieron en medio LB líquido en presencia de zeocina 50 µg/mL, carbenicilina 100 µg/mL, arabinosa 0,2% y vanilato 25µM (para inducir la expresión de la integrasa). Después de 3 horas de incubación, se realizaron diluciones en serie 1:10 del cultivo líquido, hasta la dilución  $10^{-7}$ , y se sembraron 5 µL de cada dilución en placas en medio LB suplementado con distintos antibióticos y reactivos. Para contar las receptoras totales se sembró en zeocina 50 µg/mL, carbenicilina 100 µg/mL y arabinosa 0,2%. Para contar las bacterias recombinantes por supervivencia por inserción dentro de *ccdB*, se sembró en zeocina 50 µg/mL, carbenicilina 100 µg/mL, glucosa 1% y IPTG 200 µg/mL. Una vez más, la frecuencia de recombinación se calculó como la proporción de unidades formadoras de colonias (UFC) recombinantes, con respecto al número total de UFC receptoras. Esto se calculó comparando el número de células supervivientes (induciendo la muerte como en el ejemplo 4), y el número total de células receptoras. Obtuvimos una frecuencia de recombinación de  $10^{-3}$  (Figura 5).

Por otro lado, amplificamos y secuenciamos, con los cebadores SEQ ID NO: 26 y 27, un total de 79 casetes. Entre ellos, encontramos 61 casetes diferentes, correspondientes a casetes del superintegrón de *V. cholerae* N16961, la bacteria bajo estudio.

25

**Tabla 1.** Cebadores utilizados en las construcciones

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Descripción
<b>pBAD EcoRI F (SEQ ID NO: 1)</b>	TTTTGGGCTAGCGAATTCGA GC	Amplificación de <i>ccdB</i> sin codón STOP
<b>ccdB in frame R (SEQ ID NO: 2)</b>	TCCATAACATCGTTTCTTATC AAGTAGTTCG	Amplificación de <i>ccdB</i> sin codón STOP
<b>ccdB in frame F (SEQ ID NO: 3)</b>	GATAAGAAACGATGTTATGGA GCAGCAACG	Amplificación de <i>ccdB</i> sin codón STOP
<b>pBAD BamHI XbaI R (SEQ ID NO: 4)</b>	TGCAGGTCGACTCTAGAGGA T	Amplificación de <i>ccdB</i> sin codón STOP
<b>PBAD <i>ccdB</i> chrom F</b>	AAATAGAAAAATGAATCCGTT GAAGCCTGCTTTTTTATACTC	Amplificación de P <sub>BAD</sub> <i>ccdA</i> para clonar en el

(SEQ ID NO: 5)	ATCGATGCATAATGTGCC	cromosoma de <i>E. coli</i> MG1655
<b>PBAD ccdB chrom R</b> (SEQ ID NO: 6)	TTTGTCTTTTTACCTTCCCGT TTCGCTCAAGTTAGTATAACA CTACGTGAACCATCACCC	Amplificación de P <sub>BAD</sub> ccdA para clonar en el cromosoma de <i>E. coli</i> MG1655
<b>ybhC F</b> (SEQ ID NO: 7)	CCTGTACCGTACAGAGTAAT	Amplificación de la región de homología izquierda de la zona de clonaje en el cromosoma de <i>E. coli</i> MG1655
<b>attB universal R</b> (SEQ ID NO: 8)	GTATAAAAAAGCAGGCTTCA	Amplificación de la región de homología izquierda de la zona de clonaje en el cromosoma de <i>E. coli</i> MG1655
<b>attB universal F</b> (SEQ ID NO: 9)	TTATACTAACTTGAGCGAAAC GGG	Amplificación de la región de homología derecha de la zona de clonaje en el cromosoma de <i>E. coli</i> MG1655
<b>ybhB R</b> (SEQ ID NO: 10)	TGGCGATAATATTTACCGC	Amplificación de la región de homología derecha de la zona de clonaje en el cromosoma de <i>E. coli</i> MG1655
<b>PBAD F</b> (SEQ ID NO: 11)	AGATTAGCGGATCCTACCTG	Amplificación de la región de homología izquierda de la zona de clonaje en el cromosoma de <i>E. coli</i> MG1655 conteniendo P <sub>BAD</sub> ccdA
<b>XylS Pm F</b> (SEQ ID NO: 12)	TTGTCCTACTCAGGAGAGCG	Amplificación de la región de homología izquierda de la zona de clonaje en el cromosoma de <i>E. coli</i> MG1655 conteniendo P <sub>BAD</sub> ccdA / Amplificación de pA202
<b>ccdB zeo PBAD ccdA chrom F II</b> (SEQ ID NO: 13)	CGCTCTCCTGAGTAGGACAA GGTTTCCCGACTGGAAAGCG	Amplificación de P <sub>Lac</sub> ccdB::attI1 para clonar en el cromosoma de <i>E. coli</i> MG1655
<b>ccdB zeo chrom R</b> (SEQ ID NO: 14)	TTTGTCTTTTTACCTTCCCGT TTCGCTCAAGTTAGTATAAGC GGATTTGTCCTACTCAGG	Amplificación de P <sub>Lac</sub> ccdB::attI1 para clonar en el cromosoma de <i>E. coli</i> MG1655
<b>IntI1 Marionette F</b> (SEQ ID NO: 15)	GAGAAAGAGGGGAAATACTA GATGAAAACCGCCACTGCGC C	Amplificación de <i>intI1</i> para clonar en pVan <sub>M</sub>
<b>IntI1 Marionette R</b> (SEQ ID NO: 16)	GGCCTCTTTTCTGGAATTTGG TACCGAGCTACCTCTCACT	Amplificación de <i>intI1</i> para clonar en pVan <sub>M</sub>

<b>bb Marionette F</b> (SEQ ID NO: 17)	CAAATTCCAGAAAAGAGGCC	Amplificación del <i>backbone</i> del plásmido pA215 y pA839
<b>bb Marionette R</b> (SEQ ID NO: 18)	CTAGTATTTCCCCTCTTTCTC	Amplificación del <i>backbone</i> del plásmido pA215 y pA839
<b>PVan Intl1 ccdA F</b> (SEQ ID NO: 19)	CGCTCTCCTGAGTAGGACAA CCAATTATTGAAGGCCTCCC	Amplificación de P <sub>VanM</sub> <i>intl1</i> para clonar en pA202
<b>PVan Intl1 ccdA R</b> (SEQ ID NO: 20)	CGCAACGTTCAAATCCGCTC AGTCAGTGAGCGAGGAAGC	Amplificación de P <sub>VanM</sub> <i>intl1</i> para clonar en pA202
<b>pBAD ins F</b> (SEQ ID NO: 21)	GAGCGGATTTGAACGTTGCG	Amplificación de pA202
<b>Zeo pSU38 F II</b> (SEQ ID NO: 22)	CGTCCCGGAAAACGATTCCG TCTTAATCCTGTTCTTCGGC	Amplificación del gen de resistencia a zeocina para clonar en pA204
<b>Zeo pSU38 R II</b> (SEQ ID NO: 23)	GCCAGTCCGCAGAAACGGTG AATTGTCGGCACGTAAGAGG	Amplificación del gen de resistencia a zeocina para clonar en pA204
<b>bb pSU38 res F II</b> (SEQ ID NO: 24)	CACCGTTTCTGCGGACTGGC	Amplificación de pA204 sin marcador de resistencia
<b>bb pSU38 res R II</b> (SEQ ID NO: 25)	CGGAATCGTTTTCCGGGACG	Amplificación de pA204 sin marcador de resistencia
<b>MRV II</b> (SEQ ID NO: 26)	GGTTTCCCGACTGGAAAGCG	Amplificación de casetes captados en pSU38
<b>MFD</b> (SEQ ID NO: 27)	GCCAGGGTTTTCCAGTCAC	Amplificación de casetes captados en pSU38

**Tabla 2.** Plásmidos utilizados y generados

Nombre	Descripción	Propiedades	Referencia
<b>pA120</b>	pBAD18:: <i>intl1</i>	<i>oriColE1</i> ; [Carb <sup>R</sup> ]	PMID: 15716446
<b>pA121</b>	pSU38	<i>ori</i> p15A; [Km <sup>R</sup> ]	PMID: 15716446
<b>pA123</b>	pSW23T:: <i>attC<sub>aadA7</sub></i>	<i>oriV<sub>R6Ky</sub></i> , <i>oriT<sub>RP4</sub></i> ; [Cm <sup>R</sup> ]	PMID: 27496283
<b>pA129</b>	pKOBEG Cm <sup>R</sup>	<i>ori</i> pSC101; [Cm <sup>R</sup> ]	PMID: 13129645
<b>pA202</b>	pBAD18:: <i>ccdA</i>	<i>oriColE1</i> ; [Carb <sup>R</sup> ]	Colección del laboratorio
<b>pA204</b>	pSU38:: <i>ccdB</i> :: <i>attI1</i>	<i>ori</i> p15A; [Km <sup>R</sup> ]	Esta invención
<b>pA215</b>	pVan Marionette	<i>ori</i> p15A; [Km <sup>R</sup> ]	PMID: 30478458
<b>pA249</b>	pMBA1	<i>ori</i> p15A; [Zeo <sup>R</sup> ]	Colección del laboratorio
<b>pA498</b>	pVan <sub>M</sub> :: <i>intl1</i>	<i>ori</i> p15A; [Km <sup>R</sup> ]	Esta invención
<b>pB746</b>	pBAD:: <i>ccdA</i> + P <sub>VanM</sub> <i>intl1</i>	<i>oriColE1</i> ; [Carb <sup>R</sup> ]	Esta invención
<b>pB824</b>	pSU38:: <i>ccdB</i> :: <i>attI1</i> Zeo <sup>R</sup>	<i>ori</i> p15A; [Zeo <sup>R</sup> ]	Esta invención

**Tabla 3.** Cepas utilizadas y generadas

<b>Nombre</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
<b>A095</b>	<i>V. cholerae</i> N16961	Colección del laboratorio
<b>A118</b>	<i>E. coli</i> $\pi$ 3813 resistente a CcdB (B410gyrA462zei::Tn10)	PMID: 17122399
<b>A123</b>	<i>E. coli</i> $\beta$ 2163 donadora para conjugación (F-) RP4-2-Tc::Mu $\Delta$ dapA::(erm-pir) [Km <sup>R</sup> Em <sup>R</sup> ] /pSW23T::attC aadA7	PMID: 15748991
<b>A129</b>	<i>E. coli</i> MG1655 /pKOBEG	Colección del laboratorio
<b>A785</b>	<i>E. coli</i> Top10 /pSU38::attI1 /pBAD18::intI1	Colección del laboratorio
<b>A787</b>	<i>E. coli</i> MG1655 attB:: P <sub>BAD</sub> ccdA P <sub>Lac</sub> ccdB::attI1 /pVanM::intI1	Esta invención Cepa CECT30915

**REIVINDICACIONES**

1. Plataforma para captar casetes de integrones que incluye un sitio de integración *attI* insertado en el gen que codifica una toxina de un sistema toxina/antitoxina, el gen de la antitoxina de la toxina de dicho sistema toxina/antitoxina y el gen de la integrasa *intI*,  
5 donde el sitio de integración *attI* está insertado en el gen de la toxina sin modificar la funcionalidad de la proteína.
2. Plataforma para captar casetes de integrones según la reivindicación 1 en la que el  
10 sitio de integración es *attI1*.
3. Plataforma para captar casetes de integrones según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el sistema toxina/antitoxina es el sistema *ccdB/ccdA*.
- 15 4. Plataforma para captar casetes de integrones según la reivindicación 3 en la que el gen *ccdB* con el sitio de integración *attI* insertado se corresponde con la secuencia SEQ ID NO:30.
5. Plataforma para captar casetes de integrones según cualquiera de las  
20 reivindicaciones anteriores en la que el gen que codifica la toxina y tiene el sitio de integración *attI* insertado está incluido en el cromosoma de una bacteria hospedadora.
6. Plataforma para captar casetes de integrones según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en la que el gen que codifica la toxina y tiene el sitio de integración  
25 *attI* insertado está incluido en un plásmido.
7. Plataforma para captar casetes de integrones según la reivindicación 5 en la que el gen que codifica la antitoxina se introduce en el cromosoma de una bacteria  
30 hospedadora.
8. Plataforma para captar casetes de integrones según cualquiera de las reivindicaciones 5-6 en la que el gen de la antitoxina se introduce en un plásmido.
9. Plataforma para captar casetes de integrones según cualquiera de las  
35 reivindicaciones anteriores en la que el gen *intI* está incluido en un plásmido.

10. Plataforma para captar casetes de integrones según la reivindicación 9 en la que el plásmido donde está incluido el gen *intl* es de alto número de copias.
- 5 11. Plataforma para captar casetes de integrones según la reivindicación 6 en la que el gen de la antitoxina y el gen *intl* están incluidos en un mismo plásmido y el gen de la toxina con el sitio de integración *attI* insertado está en otro plásmido.
12. Plataforma para captar casetes de integrones según la reivindicación 11 en la que  
10 los dos plásmidos son de alto número de copias.
13. Plataforma para captar casetes de integrones según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que los promotores del gen de la toxina, del gen de la antitoxina y del gen *intl* son promotores inducibles.  
15
14. Plataforma para captar casetes de integrones según la reivindicación 13 en la que los promotores inducibles se seleccionan del grupo formado por: P<sub>Lac</sub>, P<sub>BAD</sub> y/o P<sub>Van</sub>.
15. Plataforma para captar casetes de integrones según la reivindicación 14 en la que  
20 el promotor inducible del gen de la toxina es P<sub>Lac</sub>, el promotor inducible del gen de la antitoxina es P<sub>BAD</sub> y el promotor inducible de *intl* es P<sub>Van</sub>.
16. Plataforma para captar casetes de integrones según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el gen de la integrasa es *intl1*.  
25
17. Bacteria hospedadora de la especie *E. coli* que incluye cualquiera de las plataformas definidas en las reivindicaciones 1-5, 7, 9, 10 13-16 en la que el gen que codifica la toxina y tiene el sitio de integración *attI* insertado está incluido en el cromosoma de la bacteria hospedadora, el gen que codifica la antitoxina está incluido en el cromosoma  
30 de la bacteria hospedadora, y el gen *intl* está incluido en un plásmido.
18. Bacteria hospedadora de la especie *E. coli* depositada con la referencia CECT30915.
- 35 19. Bacteria hospedadora que incluye cualquiera de las plataformas definidas en las

reivindicaciones 1-4, 6, 8-16 en la que el gen que codifica la toxina y tiene el sitio de integración *attI* insertado está incluido en un plásmido, el gen que codifica la antitoxina está incluido en un plásmido, y el gen *intI* está incluido en un plásmido.

5 20. Método de detección de casetes de integrón de una cepa bacteriana bajo estudio que incluye poner en contacto la cepa bajo estudio con la bacteria hospedadora definida en cualquiera de las reivindicaciones 18-19 en condiciones que permitan la conjugación de plásmidos de la cepa bajo estudio, y la recombinación de los casetes de integrón de la cepa bajo estudio en el sitio *attI* de la bacteria hospedadora.

10

21. Método de detección de casetes de integrón de una cepa bacteriana bajo estudio que incluye la introducción en la cepa bajo estudio de cualquiera de las plataformas definidas en las reivindicaciones 1-4, 6, 8-16 donde el gen que codifica la toxina y tiene el sitio de integración *attI* insertado, el gen de la antitoxina y el gen *intI* están incluidos en plásmidos.

15

22. Método de detección de casetes de integrón de una cepa bacteriana bajo estudio que incluye poner en contacto la cepa bajo estudio con la bacteria hospedadora definida en la reivindicación 19.

20

23. Kit para la detección de casetes de integrón en muestras de ADN que incluye cualquiera de las bacterias definidas en las reivindicaciones 17-19.

24. Kit para la detección de casetes de integrón en muestras de ADN que incluye cualquiera de las plataformas definidas en las reivindicaciones 1-4, 6, 8-16.

25

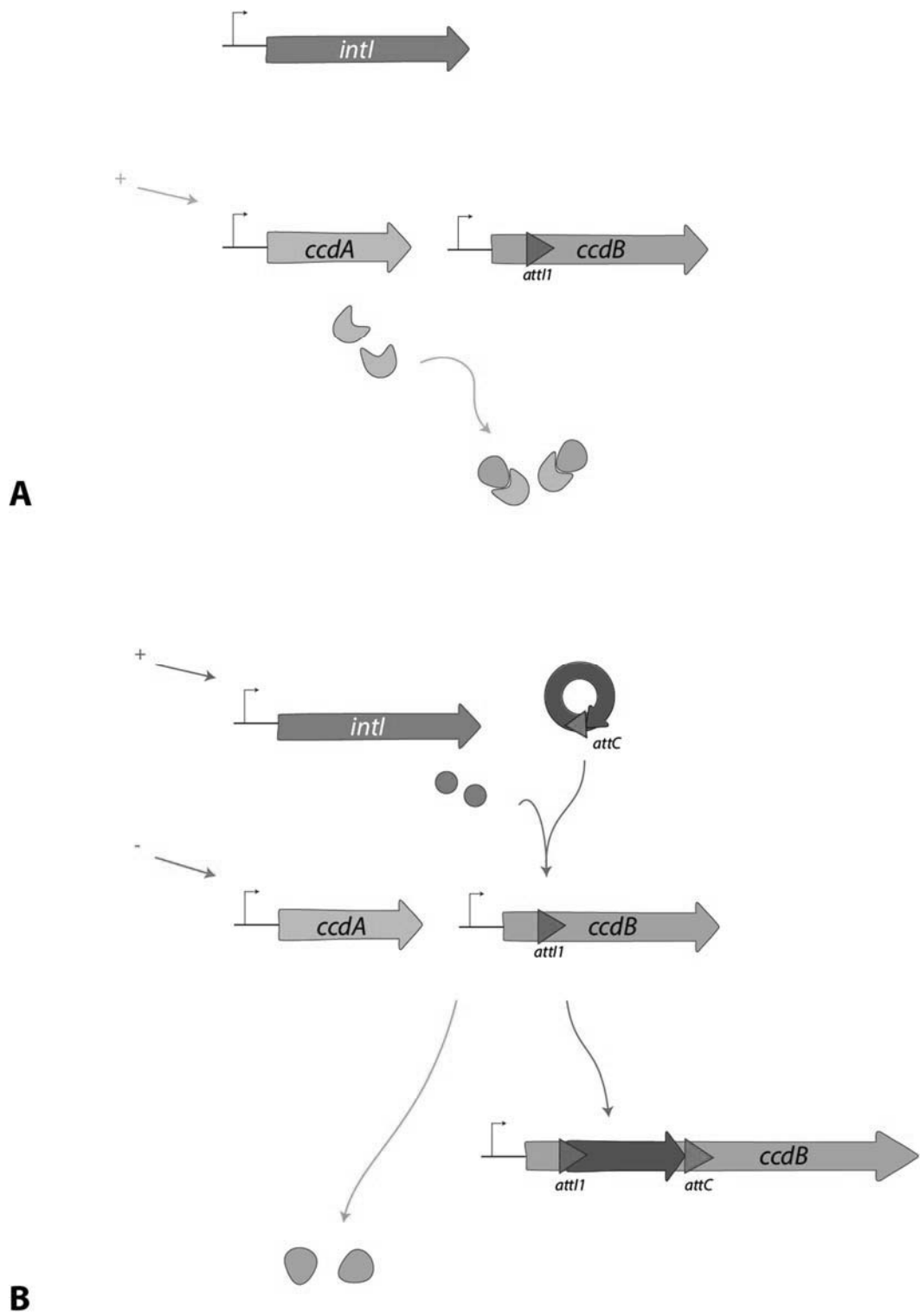
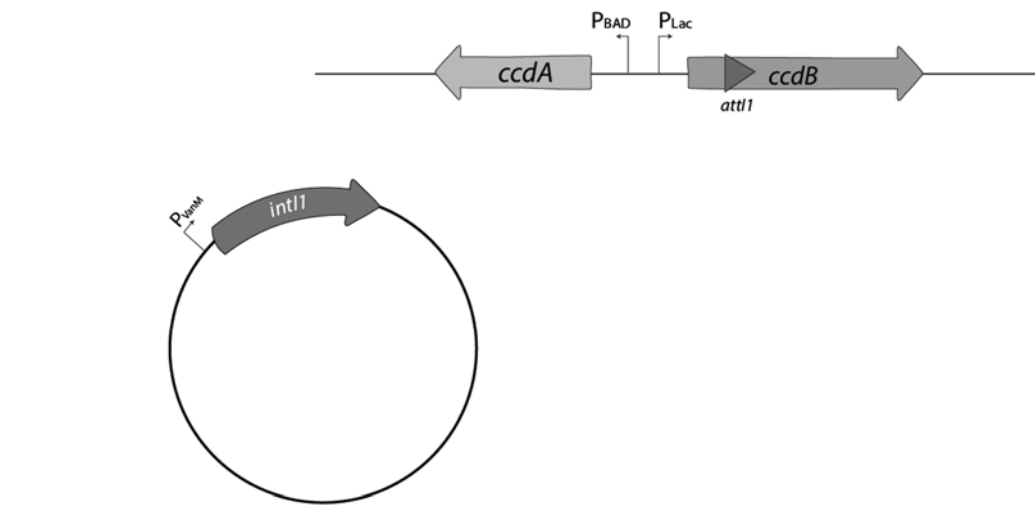
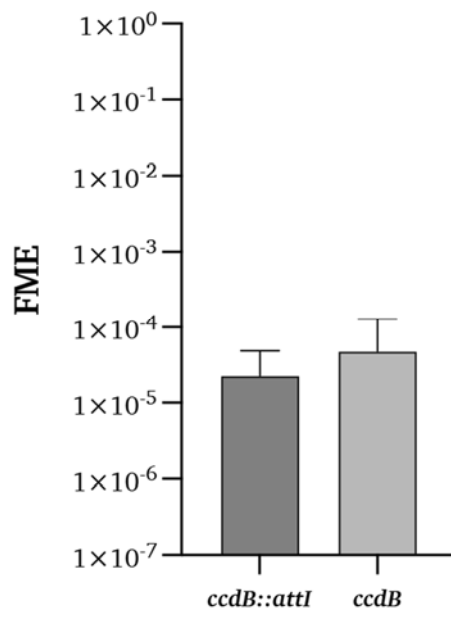


Fig.1

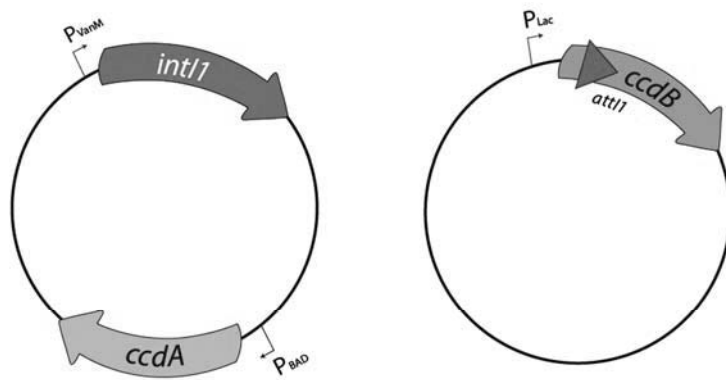


**A**

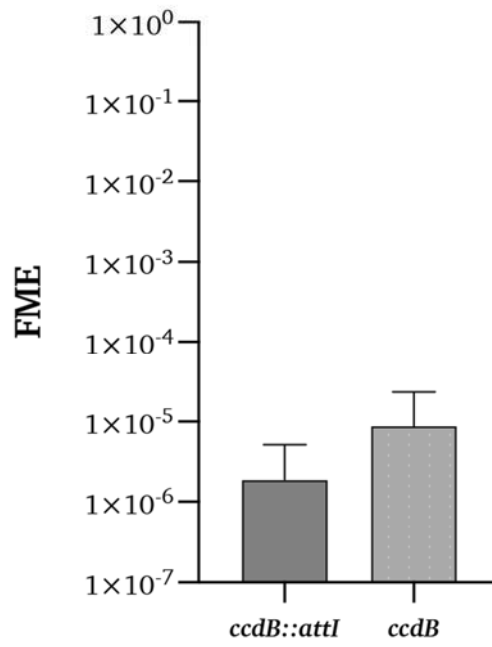


**B**

**Fig. 2**



**A**



**B**

**Fig. 3**

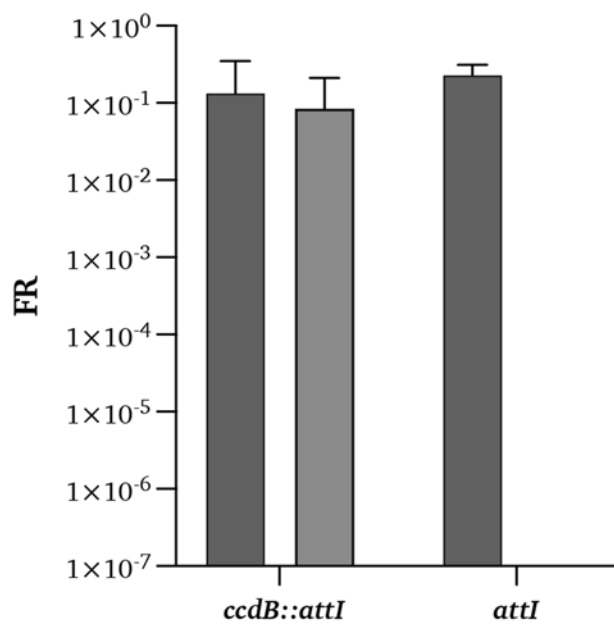


Fig. 4

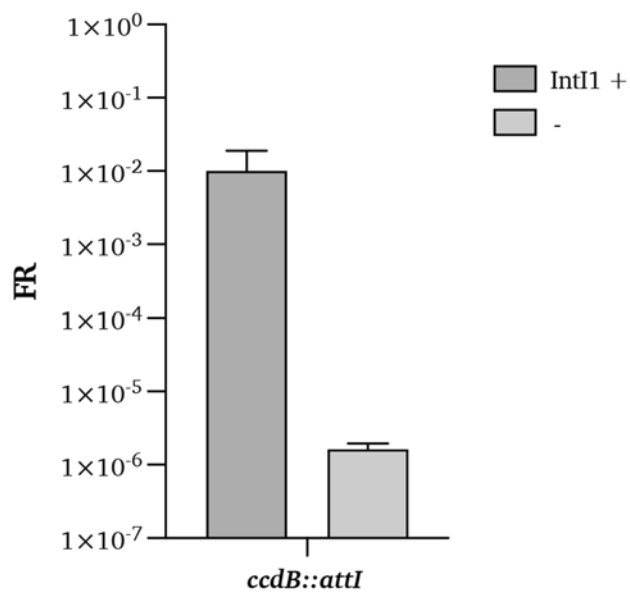


Fig.5