

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 970 040**

21 Número de solicitud: 202330947

51 Int. Cl.:

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

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**16.11.2023**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**24.05.2024**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
(75.0%)  
 AVENIDA DE SÉNECA, 2  
 28040 MADRID (Madrid) ES y  
 INSTITUT PASTEUR (25.0%)**

72 Inventor/es:

**ESCUDERO GARCÍA-CALDERÓN, José Antonio;  
 TRIGO DA ROZA MOUTINHO, Filipa;  
 BLANCO TORRES, Paula;  
 MAZEL, Didier y  
 LÓPEZ IGUAL, M<sup>a</sup> Del Rocío**

54 Título: **Cepas de *Vibrio cholerae* para captar casetes de integrones**

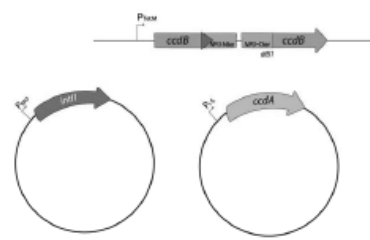
57 Resumen:

Cepas de *Vibrio cholerae* para captar casetes de integrones.

La invención se refiere a una cepa de *V. cholerae* en la que se ha construido una plataforma para detectar casetes de integrones. 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, que se inserta en el cromosoma de la bacteria; el gen de la antitoxina correspondiente y el gen de la integrasa intl, ambos incluidos en plásmidos.

La invención también se refiere a cepas de *V. cholerae* a las que se ha delecionado el superintegrón ( $\Delta$ SI), al método para obtenerlas, y a cepas de *V. cholerae*  $\Delta$ SI en las que se ha incluido la plataforma de captación de casetes de integrón.

La invención incluye métodos y kits para detectar casetes de integrón mediante el uso de las cepas y plataformas construidas.



A

Fig. 2

ES 2 970 040 A1

## DESCRIPCIÓN

### Cepas de *Vibrio cholerae* 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

Como se ha indicado, los integrones están naturalmente presentes en los cromosomas de más del 17% de los genomas secuenciados disponibles. El paradigma de estos integrones cromosómicos sedentarios (SCI) es el superintegrón (SI) de *Vibrio cholerae*, una estructura masiva que alberga aproximadamente 200 casetes que, en su mayoría, codifican genes de funciones desconocidas. Algunos integrones cromosómicos han sido movilizadas 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.

## EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

5

Cepas de *Vibrio cholerae* 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  
10 una plataforma génica 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  
15 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  
20 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.

25

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  
30 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  
35 inhibe la unión de CcdB a GyrA.

Un aspecto de la invención, por lo tanto, se refiere a una construcción de un reportero ciego 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 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 *intI*. 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 también incluye el gen *ccdA* y el gen de la integrasa *intI*. Se seleccionan preferentemente *attI1* e *intI1*.

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 casetes de muestras exógenas.

El gen de la toxina que incluye el sitio *attI* se introduce en el cromosoma de la bacteria hospedadora de la construcción, mientras que el gen de la antitoxina e *intI* están cada uno en un plásmido distinto. Por un lado, el gen de la toxina está clonado bajo un promotor inducible, mientras el gen de la antitoxina está clonado bajo el control de un promotor constitutivo y, preferentemente, en un plásmido de origen de replicación termosensible. Por otro lado, *intI* está bajo el control de un promotor inducible y en un plásmido de alto número de copias. Preferentemente, esta construcción incluye P<sub>TetM</sub> como promotor de la toxina, P<sub>CS</sub> como promotor de la antitoxina y P<sub>BAD</sub> como promotor de la integrasa. Esta construcción se introduce preferentemente en *V. cholerae*.

Otra opción es generar una versión del reportero conteniendo una inteína, para tener una versión donde se pueda ejercer más control sobre la toxina, por si es necesario limitar sus efectos en la célula huésped.

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 copias.

Sin embargo, la construcción no se puede utilizar directamente en *Vibrio cholerae* porque esta especie cuenta con un superintegrón que interferiría con el objetivo de

captar casetes de integrones de muestras externas. Por ello, partiendo de la cepa *V. cholerae* N16961 se ha elaborado la cepa *V. cholerae* N16961  $\Delta$ SI a la que se ha delecionado el superintegrón (SI) que contiene su cromosoma 2 para utilizarla como bacteria hospedadora en la que insertar la construcción del reportero ciego. La cepa de

5 *V. cholerae* N16961  $\Delta$ SI se ha depositado 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 CECT30916.

10 El SI de *V. cholerae* es un integrón cromosómico de gran tamaño, que contiene más de 100kb y 170 casetes. Para poder utilizar *V. cholerae* como bacteria hospedadora, ha sido necesario delecionar el SI puesto que este interfería con los intentos de generar una herramienta de captura de casetes. Sin embargo, este proceso de delección estaba

15 dificultado por la presencia de 19 sistemas toxina antitoxina (TA) en el SI, que participan en su estabilización. De hecho, los sistemas TA, por su efecto aditivo, son conocidos estabilizadores de segmentos de ADN, incluido el superintegrón (Fraikin N, *et al.* 2020. *Type II toxin-antitoxin systems: evolution and revolutions. J Bacteriol* 202:e00763-19). Para delecionar el SI se ideó y desarrolló un método de delección secuencial de los

20 sistemas TA, que denominamos SeqDelTA, utilizando la competencia natural de *V. cholerae* y la recombinación homóloga para producir intercambios alélicos. Los sucesivos intercambios se diseñaron de manera que eliminaban la toxina, pero dejaban intacta la antitoxina, asegurando que el evento no era letal para la bacteria.

Otro aspecto de la invención se refiere, por lo tanto, a un método para delecionar el SI

25 de *V. cholerae* que incluye la delección secuencial de los sistemas TA y que incluye los siguientes pasos:

- 1 - preparar una construcción con:
  - una región de homología izquierda (RHI) que es homóloga a un fragmento de ADN de *V. cholerae* comprendido entre *intI*A y el gen de la antitoxina del sistema TA que se
  - 30 quiere eliminar y tiene un tamaño aproximado de 500 bp;
  - una región de homología derecha (RHD) que es homóloga a un fragmento de ADN de *V. cholerae* que comprende el gen completo de la antitoxina del sistema TA que se quiere eliminar y, cuando necesario, la región promotora del gen de la toxina correspondiente, y tiene un tamaño aproximado de 500 bp;
  - 35 - el gen de un marcador selectivo;

y unir estos tres elementos en un único fragmento que tiene el gen del marcador selectivo situado entre la RHI y la RHD;

2 – introducir la construcción obtenida en el paso anterior en la bacteria en la que se quieren eliminar los sistemas TA e inducir el intercambio alélico con el cromosoma de la bacteria;

3 – repetir los pasos 1-2 para todos los sistemas TA que se quieran eliminar con el gen de un marcador selectivo diferente al utilizado en la construcción anterior;

4 - realizar una deleción limpia de los restos de SI que queden en el cromosoma y del último marcador de resistencia, tras el paso 3. Esto se realiza mediante el clonaje, en un plásmido suicida y contraseleccionable, de dos fragmentos de ADN cuya secuencia es homóloga a los dos fragmentos adyacentes al SI; la consecuente introducción del plásmido suicida clonado en la cepa cuyo SI se quiere deleccionar, y la inducción del intercambio alélico entre la construcción del plásmido suicida y el cromosoma de la bacteria.

15

Preferentemente, en el paso 3 se elige la misma RHI que en el paso 1. También preferentemente se seleccionan 3 genes de 3 marcadores selectivos diferentes que se van alternando en las diferentes construcciones sucesivas.

20 Opcionalmente, si la organización del sistema TA lo requiere, puede ser necesario diseñar RHI alternativas y mantener dos marcadores selectivos en reemplazos alélicos consecutivos y, en un siguiente paso eliminar ambos marcadores selectivos.

25 Un aspecto de la invención, por lo tanto, se refiere a una cepa de *V. cholerae* en la que se ha deleccionado el SI. Preferentemente, esta cepa es *V. cholerae* CECT30916.

Otro aspecto de la invención se refiere a una cepa en la que se ha incluido la construcción del reportero ciego. Preferentemente, se refiere a la cepa *V. cholerae* N16961  $\Delta$ SI con la plataforma para captar casetes de integrones, que 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 CECT30917.

35 La invención también se refiere a un método de detección de casetes de integrón a partir

de muestras de ADN utilizando la bacteria hospedadora que contiene la plataforma para captar casetes de integrones y el ADN bajo estudio mediante conjugación.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para la detección de casetes de integrón en muestras de ADN que incluye una cepa de *V. cholerae*  $\Delta$ SI con la plataforma para captar casetes de integrones aquí descrita, preferentemente, como células competentes y siendo la cepa preferida *V. cholerae* CECT30917.

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

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:

**Figura 1. Base de plataforma 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 (*intI*) 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*.

30

**Figura 2. Esquema de la plataforma para la captura de casetes de integrón y su ruido de fondo. A.** Detalles de la plataforma. La construcción *ccdB::attI1::NPU* está clonada en el cromosoma bajo el control del promotor  $P_{TetM}$ . *ccdA* está clonado bajo el control del promotor  $P_{cS}$  en un plásmido, e *intI1* está clonado también en un plásmido bajo el control del promotor  $P_{VanM}$ . **B.** FME del sistema, comparado con la construcción

35



*ccdB::attI1* sin inteína y con la toxina silvestre.

**Figura 3. Esquema de la técnica SeqDeITA.** Para delecionar el SI utilizamos fragmentos construidos por SOE-PCR que incluían un marcador de resistencia (*zeo<sup>R</sup>*, *carb<sup>R</sup>* o *cm<sup>R</sup>*), una RHI y una RHD que deja el gen de la antitoxina (Antitox.) intacto pero elimina el gen de la toxina (Tox.). Las sucesivas delecciones eliminaron el sistema TA y los casetes contenidos entre el sistema TA anterior y el de la delección actual.

**Figura 4. Captura de casetes con la plataforma para la captura de casetes de integrón por conjugación en *V. cholerae*  $\Delta$ SI.** 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::NPU* representa la plataforma y *attI* representa un control similar sin el gen de *ccdB*.

15

## 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 (*attI1*) dentro del gen de la toxina CcdB, del sistema toxina/antitoxina CcdB/A, con el objetivo de usarlo como marcador de lectura ciega 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.

### Ejemplo 1. Construcción del reportero ciego.

Se insertó un sitio *attI1* (SEQ ID NO: 37) de *E.coli* en el gen *ccdB* de *Vibrio fischeri*, generando *ccdB<sub>KO</sub>::attI1* (SEQ ID NO: 38). Esta construcción se sintetizó en IDT (Integrated DNA Technologies, USA) con un codón STOP, y se regeneró su

35

funcionalidad por SOE-PCR (del inglés “Splicing by Overlap Extension” PCR). Esto se hizo amplificando primero dos fragmentos, a partir de SEQ ID NO: 38, 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::attI1* (SEQ ID NO: 39).

5

Del mismo modo, también generamos una versión del reportero conteniendo una inteína, *ccdB::attI1::NPU* (SEQ ID NO: 41) (del fragmento sintetizado en IDT *ccdB<sub>KO</sub>::attI1::NPU* (SEQ ID NO: 40), recurriendo a las parejas de cebadores SEQ ID 5 y 2, y SEQ ID 3 y 6. El fragmento final se amplificó con los cebadores SEQ ID 5 y 6. El objetivo de introducir *NPU* es tener una versión donde tengamos más control sobre la toxina, por si es necesario limitar sus efectos en la célula huésped (López-Igual, R. *et al.* “Engineered toxin–intein antimicrobials can selectively target and kill antibiotic-resistant bacteria in mixed populations.” *Nature Biotechnology*, 2019, 37 (7), pp.755-760). El reportero ciego fue testado en sus diferentes construcciones como se describe en los siguientes ejemplos.

15

### **Ejemplo 2. Elaboración de una plataforma para captar casetes de integrones.**

Para generar la plataforma para captar casetes de integrones, se generó primero un plásmido (pA884) de origen de replicación termosensible, conteniendo *ccdA* bajo el control del promotor P<sub>cS</sub>. El plásmido se construyó mediante la técnica Gibson Assembly (Gibson DG. “Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments.” *Methods Enzymol.* 2011;498:349-61) ensamblando el gen *ccdA* (SEQ ID NO 46) amplificado con los cebadores SEQ ID NO 9 y 10 a partir del plásmido pA202, el P<sub>cS</sub> amplificado con los cebadores SEQ ID NO 11 y 12 a partir del plásmido pA249 y el fragmento del *backbone* amplificado a partir del plásmido pA128 con los cebadores SEQ ID NO 13 y 14. A continuación, con el plásmido pA884 se transformó la cepa *V. cholerae* N16961  $\Delta$ SI, que se describe más adelante y tiene la referencia CECT30916.

20

25

En este ejemplo describimos la construcción de la plataforma que incluye P<sub>Tet<sup>M</sup></sub> *ccdB::attI::NPU* (SEQ ID NO: 42). Se construyó primero un plásmido (pB629) amplificando el fragmento *ccdB::attI::NPU* (SEQ ID NO: 41), sintetizado en IDT como se describe en el ejemplo 1, con los cebadores SEQ ID NO: 15 y 16 y el *backbone* del plásmido pA839 con los cebadores SEQ ID NO: 7 y 8. A continuación, los productos generados se unieron por Gibson Assembly y se electroporaron en la cepa *E. coli*  $\pi$ 3813 (A118) resistente a CcdB.

35

Para clonar en el hospedador final, en este ejemplo la cepa CECT30916 de *V. cholerae* que se describe más adelante, se amplificaron las regiones adyacentes a la zona de la delección del superintegrón del cromosoma 2 de *V. cholerae* CECT30916 para usarlas  
5 como regiones de homología en la inserción de nuestras construcciones. Fueron amplificadas utilizando los cebadores SEQ ID NO 17 y 18, y 19 y 20 y, mediante SOE-PCR, cada una de las regiones de homología se unió a uno de los extremos de la región de interés, P<sub>TetM</sub> *ccdB::attI::NPU* (SEQ ID NO: 42), amplificada con los cebadores SEQ ID 21 y 22 a partir del plásmido pB629.

10

Después de electroporado el pA884, se introdujo el fragmento P<sub>TetM</sub> *ccdB::attI::NPU* en la cepa huésped, *V. cholerae* N16961 ΔSI, por transformación natural, recurriendo al protocolo de Instant Ocean. Brevemente, se inocularon 80 mg de quitina autoclavada (Sigma-Aldrich) con 1 ml de bacteria a una densidad óptica de 1 en agua de mar artificial  
15 (7 g/litro Instant Ocean [Aquarium Systems]) y se incubó estáticamente a 30° C durante 24 h. A continuación, se cambió el sobrenadante por medio fresco y se añadieron 500 ng del producto PCR a transformar. A continuación, se volvió a incubar estáticamente a 30°C durante 24 h. Por último, se plaquearon las células con el marcador de resistencia de la construcción.

20

A continuación, mediante electroporación, se introdujo en la cepa *V. cholerae* CECT30916 el plásmido pB907, que contiene el gen de la integrasa *intI1* (SEQ ID NO 45), generando así la cepa B916, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con número de referencia CECT30917 (Figura 2A).

25

Esta construcción se testó 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 CECT30917 se incubó a 30°C en caldo de cultivo con carbenicilina durante la noche, garantizando la producción de antitoxina y, por lo tanto, la supervivencia de las  
30 bacterias. Al día siguiente, se realizaron diluciones seriadas del cultivo en condiciones de supervivencia (carbenicilina 100 µg/mL, incubando a 30°C para mantener el plásmido termosensible) y en condiciones de muerte (LB con anhidrotetraciclina 100ng/mL, que induce la expresión del P<sub>Tet</sub>, e incubando a 42°C para perder el plásmido termosensible). Obtuvimos una frecuencia de mutantes de escape (FME) de 10<sup>-6</sup> (Figura 2B). Por  
35 mutantes de escape entendemos el “ruido de fondo”, es decir, las bacterias que

sobreviven pero que no han captado ADN en el sitio de integración.

### **Ejemplo 3. Construcción de la cepa *V. cholerae* $\Delta$ SI.**

Para generar el mutante  $\Delta$ SI de *V. cholerae* N16961 desarrollamos un método que denominamos SeqDelTA y que se representa en la Figura 3. Después de identificar los  
5 sistemas toxina-antitoxina (TA) contenidos en el superintegrón de *V. cholerae* N16961, preparamos construcciones sucesivas diseñadas con regiones de homología y un marcador selectivo. Se diseñó una región de homología izquierda (RHI) que se mantuvo a lo largo del procedimiento. Esta RHI estaba localizada en el gen *catB9* y la  
10 denominamos izquierda por ser la más próxima al gen *int1A* (gen de la integrasa de *V. cholerae*). Para las sucesivas construcciones se diseñó una región de homología derecha (RHD) de manera que hibridara con el gen completo de la antitoxina del sistema TA que se quería eliminar y con una parte del gen de la toxina correspondiente. La denominamos derecha por ser la más alejada del gen *int1A*. De esta manera se  
15 eliminaba la toxina, pero se dejaba intacta la antitoxina, asegurando que el evento no era letal para la bacteria (Figura 3). Como marcador selectivo se utilizaron 3 genes de resistencia a 3 antibióticos distintos (Zeo<sup>R</sup>, Cm<sup>R</sup> y Carb<sup>R</sup>), utilizando en cada construcción sucesiva un gen de resistencia distinto al de la construcción anterior. Cada uno de estos tres fragmentos de cada construcción sucesiva se obtuvo por PCR y,  
20 posteriormente, se unieron por SOE-PCR, colocando el marcador de resistencia entre la RHI y la RHD. Cada construcción sucesiva se fue introduciendo por transformación natural en la cepa de *Vibrio cholerae* resultante de las anteriores eliminaciones de sistemas TA. Esta estrategia permitía eliminar el marcador de resistencia introducido en el paso anterior mientras se avanzaba en la delección de sistemas TA mediante cambios  
25 en la RHD. Cuando fue necesario debido a la orientación y/o el orden de los genes en el sistema TA, se diseñaron RHI alternativas y se mantuvieron dos marcadores de resistencia en reemplazos alélicos consecutivos, antes de que el nuevo paso permitiera eliminar ambos.

30 Como ejemplo del procedimiento seguido en las sucesivas delecciones, para borrar el primer sistema TA (VCA 311-312), utilizando como molde el ADN de *V. cholerae* N16961, amplificamos el gen de resistencia a zeocina con los cebadores SEQ ID NO: 23 y 24, comunes a los 3 marcadores utilizados (zeocina, carbenicilina y cloranfenicol), y que hibridan con la región de homología izquierda amplificada con los cebadores VCA  
35 299 F (SEQ ID NO: 25) y LRHI VCA 300 R (SEQ ID NO: 26), y por el otro lado con la

región de homología derecha amplificada con los cebadores LRHD VCA 311 F (SEQ ID NO: 27) y VCA 312 R (SEQ ID NO: 28). Estos 3 fragmentos se unieron recurriendo a la técnica de SOE-PCR, con los cebadores SEQ ID NO: 25 y 28 y se obtuvo el fragmento SEQ ID NO: 43. El fragmento SEQ ID NO: 43 se introdujo en *V. cholerae* N16961 por transformación natural y el intercambio alélico se produjo por recombinación homóloga dando lugar a la cepa A400 que carece de un sistema TA por interrupción del gen de la toxina, pero mantiene el gen de la antitoxina y tiene como marcador de resistencia Zeo<sup>R</sup>.

Como se ha indicado, cada sistema toxina/antitoxina se deletó siguiendo estos mismos pasos, avanzando de sistema TA en sistema TA en el sentido de alejarse del gen *int1*. Además, después de cada paso, se verificó la delección de la toxina correspondiente mediante PCR a partir de varias colonias y se comprobó fenotípicamente la pérdida del marcador deletado, es decir, el utilizado en la delección del sistema TA anterior.

Como también se ha indicado ya, en algunos casos, la disposición del gen de la toxina y de la antitoxina nos obligaron a dar un paso intermedio. Como ejemplo, se incluye aquí la obtención de la cepa A024.

Para ello, amplificamos el gen de resistencia a zeocina con los cebadores SEQ ID NO: 23 y 24, que hibridan con la región de homología izquierda amplificada con los cebadores VCA 421 F (SEQ ID NO: 29) y LRHI VCA 422 R (SEQ ID NO: 30), y por el otro lado con la región de homología derecha amplificada con los cebadores LRHD VCA 443 F (SEQ ID NO: 31) y VCA 447 R (SEQ ID NO: 32). Estos 3 fragmentos se unieron recurriendo a la técnica de SOE-PCR, con los cebadores SEQ ID NO: 29 y 32 y se obtuvo el fragmento SEQ ID NO: 44. El fragmento SEQ ID NO: 44 se introdujo en *V. cholerae* N16961 por transformación natural y el intercambio alélico se produjo como mencionado anteriormente dando lugar a la cepa A024 que carece del sistema TA que se quería eliminar, tiene como marcador de resistencia Zeo<sup>R</sup> pero mantiene el marcador de resistencia anterior Carb<sup>R</sup>. Ambos marcadores de resistencia se eliminarán con la siguiente construcción.

Una vez deletados todos los sistemas TA obtuvimos la cepa *V. cholerae* A066 que conserva el gen del último marcador selectivo utilizado (en este ejemplo Zeo<sup>R</sup>), el gen *catB9* sobre el que se diseñó la RHI, el primer sistema TA y el inicio del superintegrón

(es decir, *int1A*, *att1A*, y los primeros 8 casetes hasta el del gen *catB9*).

Para conseguir una deleción limpia del superintegrón, se utilizó un plásmido suicida y contraseleccionable (pMP7). La replicación de pMP7 depende de la proteína  $\pi$  celular y codifica el gen de la toxina *ccdB* bajo el control del promotor inducible  $P_{BAD}$ . En el  
5 plásmido pMP7 se clonó la región de interés, en este caso un fragmento que permite la deleción limpia de los posibles restos del superintegrón, incluido el marcador de resistencia a zeocina. Como el plásmido pMP7 no replica en el hospedador, la selección de su marcador de resistencia recupera colonias en las que pMP7 ha recombinado con  
10 la región de interés, introduciendo así una duplicación de esta misma región. Al inducir la expresión de *ccdB*, se seleccionan bacterias que lo hayan perdido por un segundo intercambio alélico entre las dos regiones duplicadas (escindiendo el plásmido pMP7 del cromosoma), bien dando lugar a una deleción limpia, o volviendo al genotipo original.

15 En este ejemplo, la región de interés eran las dos regiones adyacentes al superintegrón, una a cada lado y se partió de la cepa de *V. cholerae* A066 generada tras la deleción del último sistema TA según se describe en este mismo ejemplo. Para proporcionar homología para la sustitución alélica, a partir del ADN de la cepa *V. cholerae* N16961, se amplificaron dos fragmentos, A con los cebadores RHI link pMP7 F (SEQ ID NO: 33)  
20 y LRHI+D R (SEQ ID NO: 34), y B con los cebadores RHD F (SEQ ID NO: 35) y RHD link pMP7 R (SEQ ID NO: 36), uniéndolos por SOE-PCR con los cebadores SEQ ID NO: 33 y 36, dando lugar a un fragmento de 1000 bp sin restos de superintegrón y sin ningún marcador de resistencia. Tanto el fragmento generado, como el plásmido pMP7 fueron digeridos con las enzimas NaeI y HindIII, y se unieron por ligación generando el pA097  
25 que fue electroporado en *E. coli*  $\beta$ 3914 (A116) resistente a CcdB, dando lugar a la cepa A097. A continuación, pA097 se introdujo en *V. cholerae* A066 por conjugación. El ensayo de conjugación se realizó cultivando la cepa donadora (A097) en LB con cloranfenicol 25  $\mu$ g/mL, DAP 0,3 mM y glucosa 1%, y la receptora (*V. cholerae* A066) en LB con zeocina 50  $\mu$ g/mL hasta una DO de 0,6. A continuación, después de lavar los  
30 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 + glucosa 1% y se incubó durante la noche (18 horas)  
35 para que tuvieran lugar la conjugación del pA097. La integración del pA097 en el

genoma de la receptora A066 se seleccionó lavando el filtro en 5 ml de LB y sembrando diluciones seriadas en placas de Cm (2,5 µg/ml) y glucosa al 1%. Posteriormente, las colonias resistentes a cloranfenicol se cultivaron en medio LB líquido y se sembraron en placas de agar LB suplementadas con arabinosa 0,2% con el fin de expresar *ccdB* y  
5 seleccionar para el segundo intercambio alélico que implica la escisión del pA097. Tras este proceso, secuenciamos mediante Sanger la zona del superintegrón y seleccionamos una colonia que presentaba una delección limpia del superintegrón, generando la cepa B522 que se depositó en la Colección Española de Cultivos Tipo y recibió el número de referencia CECT30916.

10

**Ejemplo 4. Método de detección de casetes de integrón utilizando la cepa de *V. cholerae* que incluye una plataforma para captar casetes de integrones.**

El método de detección de casetes de integrón utilizando la plataforma cuya construcción se indica en los ejemplos anteriores, está basado en un ensayo de  
15 conjugación/recombinación.

En este ejemplo, se utilizó el plásmido suicida pA123 que se basa en 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 (este  
20 plásmido con sitio *attC* emula los casetes de integrón). La cepa donadora de pA123 (A123) conjuga el plásmido que entra en la célula receptora, en este ejemplo la cepa CECT30917, en forma de monohebra. Al ser un plásmido suicida, esto es, un plásmido que necesita una determinada proteína ( $P_i$ ,  $\pi$ ) para su replicación, la cepa receptora, CECT30917 que contiene la plataforma descrita en el ejemplo 2, no puede sostener su  
25 replicación. La única manera de que se mantenga el vector pA123 en las células receptoras es que recombine con el sitio *attI1* contenido en la plataforma de CECT30917. La eficiencia de la captación del casete se mide calculando la frecuencia de recombinación (FR).

30 Para detección de casetes con este método, se cultivó la cepa donadora A123 durante la noche en medio LB suplementado con cloranfenicol 25µg/mL y ácido diaminopimélico (DAP) a 0,3 mM. La cepa receptora CECT30917 (denominada internamente B916) se cultivó durante la noche en medio LB suplementado con zeocina 50 µg/mL, carbenicilina 100 µg/mL, espectinomicina 50 µg/mL y glucosa 1% (para reprimir la expresión de *intI1*)  
35 a 30°C (para asegurar el mantenimiento del plásmido pA884, termosensible, que incluye

el gen de la antitoxina *ccdA* y, por lo tanto, asegurar la supervivencia de la bacteria). Al día siguiente, el cultivo de la cepa donadora se diluyó 1/100 en LB con cloranfenicol y DAP, como se ha indicado más arriba, y la cepa receptora CECT30917 se diluyó 1/100 en LB con los mismos antibióticos mencionados arriba y arabinosa 0,2% (para inducir *int1*) a 30°C (para asegurar el mantenimiento del plásmido pA884). Estos cultivos 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 una proporción de 4:1, centrifugando después 2 min a 7000 rpm, y resuspendiendo en 100 µl 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 µm de tamaño de poro) sobre una placa de Petri con LB + DAP 0,3 mM + arabinosa 0,2% y se incubó durante la noche (18 horas) a 30°C para que tuvieran lugar la conjugación y la recombinación. Al día siguiente, se resuspendieron las células contenidas en la membrana 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 µL 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 µg/mL, carbenicilina 100 µg/mL, espectinomicina 50 µg/mL y glucosa 1% incubando a 30°C. Para contar las bacterias recombinantes por el fenotipo conferido por el plásmido suicida integrado, se sembró en zeocina 50 µg/mL, carbenicilina 100 µg/mL, espectinomicina 50 µg/mL, cloranfenicol 2,5 µg/mL y glucosa 1% mL, incubando a 30°C. Para contar las bacterias recombinantes por supervivencia por inserción dentro de *ccdB*, se sembró en zeocina 50 µg/mL, espectinomicina 50 µg/mL, glucosa 1% y anhidrotetraciclina 100ng/mL incubando a 42°C. La frecuencia de recombinación se calculó como la proporción de unidades formadoras de colonias (UFC) recombinantes, con respecto al número total de UFC receptoras. En este caso, obtuvimos una frecuencia de recombinación (FR) de 10<sup>-2</sup> en el caso de detección por fenotipo, y de 10<sup>-3</sup> en el caso de detección por nuestra plataforma, frecuencias similares al control que solo contiene un *att1* (cepa A980, tabla 3) (Figura 4).

**Tabla 1.** Cebadores utilizados

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>	TCCATAACATCGTTTCTTAT CAAGTAGTTCG	Amplificación de <i>ccdB</i> sin codón STOP
<b>ccdB in frame F</b>	GATAAGAAACGATGTTATGG	Amplificación de <i>ccdB</i> sin



(SEQ ID NO: 3)	AGCAGCAACG	codón STOP
pBAD BamHI XbaI R (SEQ ID NO: 4)	TGCAGGTCTGACTCTAGAGG AT	Amplificación de <i>ccdB</i> sin codón STOP
ccdB int pBAD F (SEQ ID NO: 5)	CGTTTTTTTTGGGCTAGC	Amplificación de <i>ccdB</i> sin codón STOP
ccdB int pBAD R (SEQ ID NO: 6)	GATCCATCAGGCAACGACG G	Amplificación de <i>ccdB</i> sin codón STOP
bb Marionette F (SEQ ID NO: 7)	CAAATTCCAGAAAAGAGGC C	Amplificación del <i>backbone</i> del plásmido pA215 y pA839
bb Marionette R (SEQ ID NO: 8)	CTAGTATTTCCCCTCTTTCT C	Amplificación del <i>backbone</i> del plásmido pA215 y pA839
ccdA Pc F (SEQ ID NO: 9)	GCTCACGCAACTGGTCCAG ATTTTTTTGGGCTAGCAGGA G	Amplificación de <i>ccdA</i> para clonar en pKOBEG
ccdA pKOBEG R (SEQ ID NO: 10)	TCATCGCCATTGCTCCCCAA AACAGCCAAGCTTGCATGC C	Amplificación de <i>ccdA</i> para clonar en pKOBEG
Pc pKOBEG F (SEQ ID NO: 11)	GACGGCTACATCATTCACTT ACCGTGGAAACGGATGAAG G	Amplificación de P <sub>CS</sub> para clonar en pKOBEG
Pc ccdA R (SEQ ID NO: 12)	CTCCTGCTAGCCCCAAAAAA TCTGGACCAGTTGCGTGAG C	Amplificación de P <sub>CS</sub> para clonar en pKOBEG
bb pKOBEG F (SEQ ID NO: 13)	TTGGGGAGCAATGGCGATG A	Amplificación del <i>backbone</i> del plásmido pA129
bb pKOBEG Δprom R (SEQ ID NO: 14)	AAGTGAATGATGTAGCCGT C	Amplificación del <i>backbone</i> del plásmido sin promotor pA129
ccdB pVanM F II (SEQ ID NO: 15)	AGAAAGAGGGGAAATACTA GATGTCTCAATTTACGCTAT A	Amplificación de <i>ccdB::attI1</i> para clonar en pTet <sub>M</sub>
ccdB pVanM R II (SEQ ID NO: 16)	GGCCTCTTTTCTGGAATTTG GGTAAATGCCAGTGATTAA	Amplificación de <i>ccdB::attI1</i> para clonar en pTet <sub>M</sub>
RHE ΔSI F (SEQ ID NO: 17)	GGAGAGACATAATGCCTCG C	Amplificación de la región de homología izquierda de la zona de la delección del SI en <i>V. cholerae</i> ΔSI
RHE ΔSI R (SEQ ID NO: 18)	CATGGGTTCTTTGCGAAATC	Amplificación de la región de homología izquierda de la zona de la delección del SI en <i>V. cholerae</i> ΔSI
RHD ΔSI F (SEQ ID NO: 19)	ACAGCTTGAGTAAGTGTCG C	Amplificación de la región de homología derecha de la zona de la delección del SI en <i>V. cholerae</i> ΔSI
RHD ΔSI R (SEQ ID NO: 20)	AGTAAACAGCGCAGTATCG C	Amplificación de la región de homología derecha de la zona de la delección del

		SI en <i>V. cholerae</i> $\Delta$ SI
<b>PVanM <math>\Delta</math>SI F</b> (SEQ ID NO: 21)	GATTTGCGCAAAGAACCCATG GTCTGACGCTCAGTGGAAC G	Amplificación de P <sub>TetM</sub> <i>ccdB::att1::NPU</i> para clonar en el cromosoma de <i>V. cholerae</i> $\Delta$ SI
<b>PVanM <math>\Delta</math>SI R</b> (SEQ ID NO: 3422)	GCGACACTTACTCAAGCTGT TCAGTGAGCGAGGAAGCAC C	Amplificación de P <sub>TetM</sub> <i>ccdB::att1::NPU</i> para clonar en el cromosoma de <i>V. cholerae</i> $\Delta$ SI
<b>3083</b> (SEQ ID NO: 23)	TCTAGGGCGGCGGATTGT C	Amplificación de marcador de resistencia ( <i>zeo</i> <sup>R</sup> , <i>carb</i> <sup>R</sup> o <i>cm</i> <sup>R</sup> ) para SeqDeITA
<b>3327</b> (SEQ ID NO: 24)	TGCAATTGTGCGGCACGTAA G	Amplificación de marcador de resistencia ( <i>zeo</i> <sup>R</sup> , <i>carb</i> <sup>R</sup> o <i>cm</i> <sup>R</sup> ) para SeqDeITA
<b>VCA 299 F</b> (SEQ ID NO: 25)	GGGCGTTAGAGCTTTATTG G	Amplificación de la región de homología izquierda común a la mayoría de deleciones de SeqDeITA
<b>LRHI VCA 300 R</b> (SEQ ID NO: 26)	GACAAATCCGCCGCCCTAG AGAGCTTTATTTACTCGGAC G	Amplificación de la región de homología izquierda común a la mayoría de deleciones de SeqDeITA
<b>LRHD VCA 311 F</b> (SEQ ID NO: 27)	CTTACGTGCCGACAATTGCA GGTAAACGCTCAATCAAAG G	Amplificación de la región de homología derecha de la primera deleción ( $\Delta$ VCA300-311)
<b>VCA 312 R</b> (SEQ ID NO: 28)	CTTTATTACGACAGCCATCG C	Amplificación de la región de homología derecha de la primera deleción ( $\Delta$ VCA300-311)
<b>VCA 421 F</b> (SEQ ID NO: 29)	GGTGATGCGACTCAAAAAG C	Amplificación de la región de homología izquierda de la novena deleción ( $\Delta$ VCA300-391 + VCA422-444)
<b>LRHI VCA 422 R</b> (SEQ ID NO: 30)	GACAAATCCGCCGCCCTAG ATTGTAACGCTAGAGGTGA CC	Amplificación de la región de homología izquierda de la novena deleción ( $\Delta$ VCA300-391 + VCA422-444)
<b>LRHD VCA 443 F</b> (SEQ ID NO: 31)	CTTACGTGCCGACAATTGCA TTGAACTGCTGTTGGAGTG G	Amplificación de la región de homología derecha de la novena deleción ( $\Delta$ VCA300-391 + VCA422-444)
<b>VCA 447 R</b> (SEQ ID NO: 32)	ATCGAGGGAAACGCATAAC C	Amplificación de la región de homología derecha de la novena deleción ( $\Delta$ VCA300-391 + VCA422-444)
<b>RHI link pMP7 F</b>	TCTGCGAGGCTGGCCGGCG	Amplificación de la región

<b>(SEQ ID NO: 33)</b>	TCCGTCAGCTGCGTCCAAACG	de homología izquierda de la delección final limpia ( $\Delta$ SI)
<b>LRHI+D R (SEQ ID NO: 34)</b>	GCGACACTTACTCAAGCTGT CATGGGTTCTTTGCGAAATC	Amplificación de la región de homología izquierda de la delección final limpia ( $\Delta$ SI)
<b>RHD F (SEQ ID NO: 35)</b>	ACAGCTTGAGTAAGTGTCGC	Amplificación de la región de homología derecha de la delección final limpia ( $\Delta$ SI)
<b>RHD link pMP7 R (SEQ ID NO: 36)</b>	TCAAGCTTATCGATACCGTC ATTTGCTTTATGACTCGCGC	Amplificación de la región de homología derecha de la delección final limpia ( $\Delta$ SI)

**Tabla 2.** Plásmidos utilizados y generados

Nombre	Descripción	Propiedades	Referencia
<b>pA097</b>	pMP7:: $\Delta$ <i>intI</i> <i>attI</i> A	<i>ori</i> <sub>V<sub>R6</sub>KY</sub> , <i>ori</i> <sub>T<sub>RP4</sub></sub> ; [Cm <sup>R</sup> ]	Esta invención
<b>pA123</b>	pSW23T:: <i>attC</i> <sub>aadA7</sub>	<i>ori</i> <sub>V<sub>R6</sub>KY</sub> , <i>ori</i> <sub>T<sub>RP4</sub></sub> ; [Cm <sup>R</sup> ]	PMID: 27496283
<b>pA128</b>	pKOBEG Carb <sup>R</sup>	<i>ori</i> <sub>pSC101</sub> ; [Carb <sup>R</sup> ]	PMID: 13129645
<b>pA202</b>	pBAD18:: <i>ccdA</i>	<i>ori</i> <sub>ColE1</sub> ; [Carb <sup>R</sup> ]	Colección del laboratorio
<b>pA249</b>	pMBA1	<i>ori</i> <sub>p15A</sub> ; [Zeo <sup>R</sup> ]	Colección del laboratorio
<b>pA839</b>	pTet Marionette	<i>ori</i> <sub>p15A</sub> ; [Km <sup>R</sup> ]	PMID: 30478458
<b>pA884</b>	pKOBEG::P <sub>cS</sub> <i>ccdA</i>	<i>ori</i> <sub>pSC101</sub> ; [Carb <sup>R</sup> ]	Esta invención
<b>pB629</b>	pTet <sub>M</sub> :: <i>ccdB</i> :: <i>attI</i> 1::NPU	<i>ori</i> <sub>p15A</sub> ; [Km <sup>R</sup> ]	Esta invención
<b>pB907</b>	pBAD18:: <i>intI</i> 1	<i>ori</i> <sub>ColE1</sub> ; [Spec <sup>R</sup> ]	Esta invención

**Tabla 3.** Cepas utilizadas y generadas

Nombre	Descripción	Referencia
<b>A024</b>	<i>V. cholerae</i> N16961 $\Delta$ VCA300-391 + VCA422-444	Esta invención
<b>A066</b>	<i>V. cholerae</i> N16961 $\Delta$ VCA300-VCA505	Esta invención
<b>A097</b>	<i>E. coli</i> $\beta$ 3914 /pMP7 $\Delta$ <i>intI</i> A <i>attI</i> A	Esta invención
<b>A116</b>	<i>E. coli</i> $\beta$ 3914 donadora para conjugación (F-) RP4-2-Tc::Mu $\Delta$ <i>dapA</i> ::( <i>erm-pir</i> ) [Km <sup>R</sup> Em <sup>R</sup> resistente a CcdB (B410gyrA462zei::Tn10)	Colección del laboratorio
<b>A118</b>	<i>E. coli</i> $\pi$ 3813 resistente a CcdB (B410gyrA462zei::Tn10)	PMID: 15748991
<b>A123</b>	<i>E. coli</i> $\beta$ 2163 donadora para conjugación (F-) RP4-2-Tc::Mu $\Delta$ <i>dapA</i> ::( <i>erm-pir</i> ) [Km <sup>R</sup> Em <sup>R</sup> ] /pSW23T:: <i>attC</i> <i>aadA</i> 7	PMID: 15748991

<b>A400</b>	<i>V. cholerae</i> N16961 $\Delta$ VCA300-311	Esta invención
<b>A980</b>	<i>V. cholerae</i> N16961 $\Delta$ SI::attI1 /pBAD::intI1	Esta invención
<b>B522</b>	<i>V. cholerae</i> N16961 $\Delta$ SI	Esta invención CECT30916
<b>B916</b>	<i>V. cholerae</i> N16961 $\Delta$ SI::P <sub>Tet<sup>M</sup></sub> ccdB::attI1::NPU /pKOBEG::ccdA /pBAD::intI1	Esta invención CECT30917

## REIVINDICACIONES

1. Método para delecionar el superintegrón (SI) del cromosoma 2 de *Vibrio cholerae* mediante la delección secuencial de los sistemas toxina/antitoxina (TA) que incluye los siguientes pasos:
- 5
- 1 - preparar una construcción con:
- una región de homología izquierda (RHI) que es homóloga a un fragmento de ADN de *V. cholerae* comprendido entre *intl* y el gen de la antitoxina del sistema TA que se quiere eliminar y tiene un tamaño aproximado de 500 bp;
  - 10 - una región de homología derecha (RHD) que es homóloga a un fragmento de ADN de *V. cholerae* que comprende el gen completo de la antitoxina del sistema TA que se quiere eliminar y, opcionalmente, la región promotora de la toxina correspondiente, y tiene un tamaño aproximado de 500 bp;
  - el gen de un marcador selectivo;
- 15 y unir estos tres elementos en un único fragmento que tiene el gen del marcador selectivo situado entre la RHI y la RHD;
- 2 – introducir la construcción obtenida en la bacteria en la que se quieren eliminar los sistemas TA e inducir el intercambio alélico con el cromosoma de la bacteria;
- 3 – repetir los pasos 1-2 para todos los sistemas TA que se quieran eliminar con el gen de un marcador selectivo diferente al utilizado en la construcción anterior;
- 20 4 - realizar una delección limpia de los restos de SI que queden en el cromosoma y del último marcador de resistencia, tras el paso 3.
2. Método para delecionar el SI del cromosoma 2 de *V. cholerae* según la reivindicación 1 donde, en el paso 3, se selecciona la misma RHI que en el paso 1.
- 25
3. Método para delecionar el SI de *V. cholerae* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que se seleccionan 3 genes de 3 marcadores selectivos diferentes y se van alternando en las construcciones sucesivas.
- 30
4. Método para delecionar el SI de *V. cholerae* según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que incluye la utilización de una RHI diferente a la definida en el paso 1 y el mantenimiento de dos marcadores selectivos en reemplazos alélicos consecutivos.
- 35 5. Cepa de *V. cholerae* caracterizada porque se le ha delecionado el SI de su

cromosoma 2 (cepa *V. cholerae*  $\Delta$ SI).

6. Cepa de *V. cholerae*  $\Delta$ SI depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con la referencia CECT30916.

5

7. Cepa de *V. cholerae* según cualquiera de las reivindicaciones 5-6 que incluye una 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,

10 - el gen de la antitoxina de la toxina de dicho sistema toxina/antitoxina,

- el gen de la integrasa *intl*,

donde el sitio de integración *attI* está insertado en el gen de la toxina sin modificar la funcionalidad de la proteína y donde el gen que codifica la toxina y tiene el sitio de integración *attI* insertado está incluido en el cromosoma de la cepa de *V. cholerae* o

15 bacteria hospedadora, el gen que codifica la antitoxina está incluido en un plásmido, y el gen *intl* está incluido en un plásmido.

8. Cepa de *V. cholerae* según la reivindicación 7 en la que el sitio de integración es *attI1*.

20 9. Cepa de *V. cholerae* según cualquiera de las reivindicaciones 7-8 en la que el sistema toxina/antitoxina incluido en la plataforma para captar casetes de integrones es el sistema *ccdB/ccdA*.

10. Cepa de *V. cholerae* según la reivindicación 9 en la que el gen *ccdB* con el sitio de integración *attI* incluido en la plataforma para captar casetes de integrones se corresponde con la secuencia SEQ ID NO: 39.

11. Cepa de *V. cholerae* según cualquiera de las reivindicaciones 7-9 en la que el gen de la toxina incluido en la plataforma para captar casetes de integrones incluye el gen *NPU* de una inteína a continuación del sitio de integración *attI*.

12. Cepa de *V. cholerae* según la reivindicación 11 en la que el gen *ccdB* con el sitio de integración *attI* y la inteína *NPU* insertados, incluido en la plataforma para captar casetes de integrones, se corresponde con la secuencia SEQ ID NO: 41.

35

13. Cepa de *V. cholerae* según cualquiera de las reivindicaciones 7-12 en la que la plataforma para captar casetes de integrones incluye el gen de la antitoxina en un plásmido.
- 5 14. Cepa de *V. cholerae* según cualquiera de las reivindicaciones 7-13 en la que la plataforma para captar casetes de integrones incluye el gen de la integrasa *intl* en un plásmido.
15. Cepa de *V. cholerae* según la reivindicación 14 en la que el plásmido donde está  
10 incluido el gen *intl* es de alto número de copias.
16. Cepa de *V. cholerae* según cualquiera de las reivindicaciones 7-15 en la que los promotores del gen de la toxina y del gen *intl* incluidos en la plataforma para captar casetes de integrones son promotores inducibles y el promotor del gen de la antitoxina  
15 incluido en la plataforma para captar casetes de integrones es un promotor constitutivo.
17. Cepa de *V. cholerae* según la reivindicación 16 en la que el promotor del gen de la toxina es P<sub>Tet<sup>M</sup></sub>, el promotor del gen *intl* es P<sub>BAD</sub> y el promotor del gen de la antitoxina es P<sub>CS</sub>.  
20
18. Cepa de *V. cholerae* según cualquiera de las reivindicaciones 7-17 en la que el gen de la integrasa es *intl1*.
19. Cepa de *V. cholerae* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con la  
25 referencia CECT30917.
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 de *V. cholerae* definida en cualquiera de las reivindicaciones 7-19 en condiciones que  
30 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 plataforma para captar casetes de integrones incluida en la bacteria hospedadora.
21. Kit para la detección de casetes de integrón en muestras de ADN que incluye  
35 cualquiera de las bacterias definidas en las reivindicaciones 7-19.

22. Kit para la detección de casetes de integrón en muestras de ADN según la reivindicación 21 en el que las bacterias son células competentes.



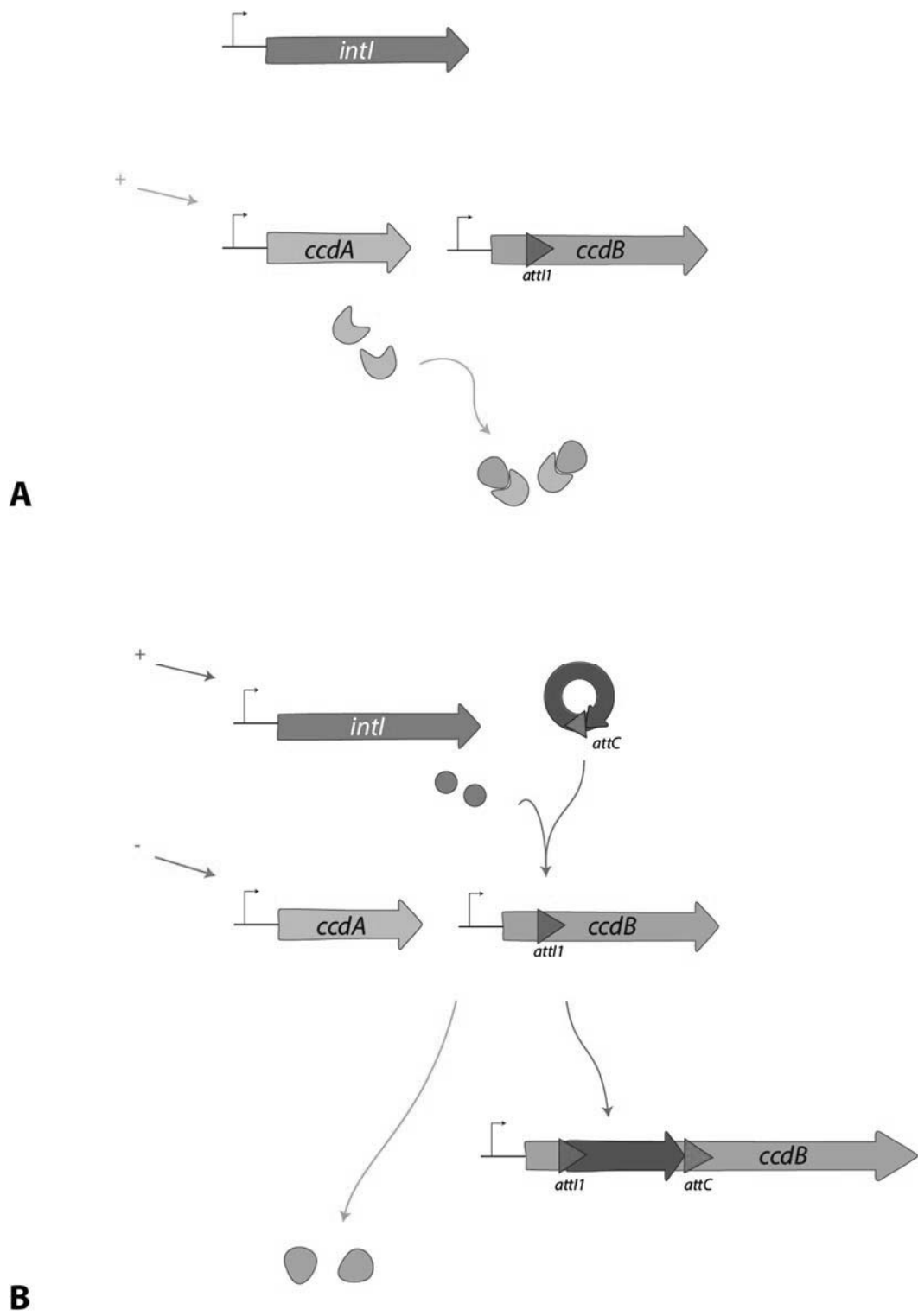
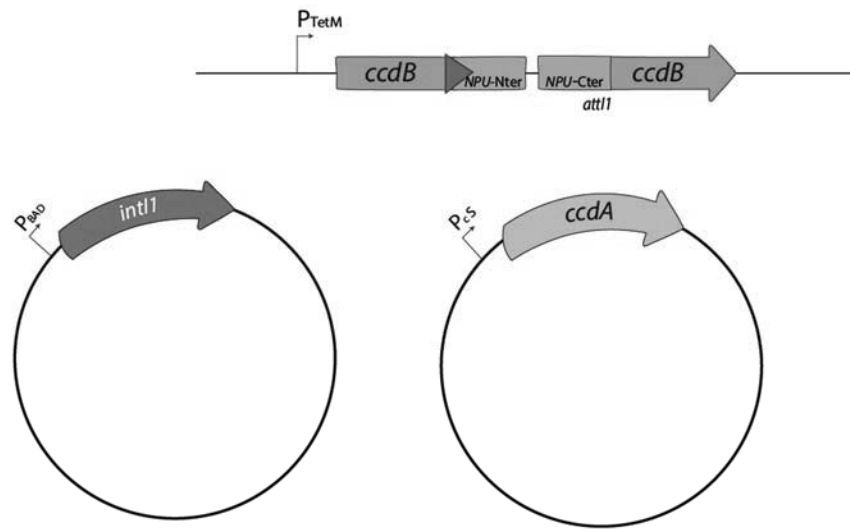
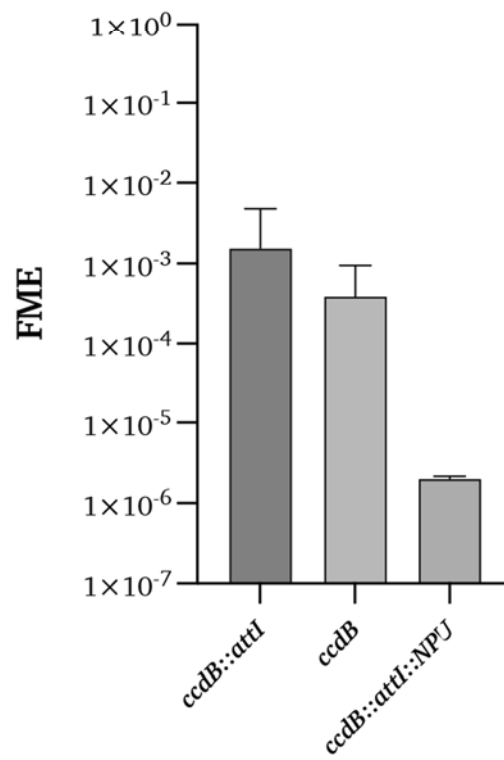


Fig. 1



**A**



**B**

**Fig. 2**

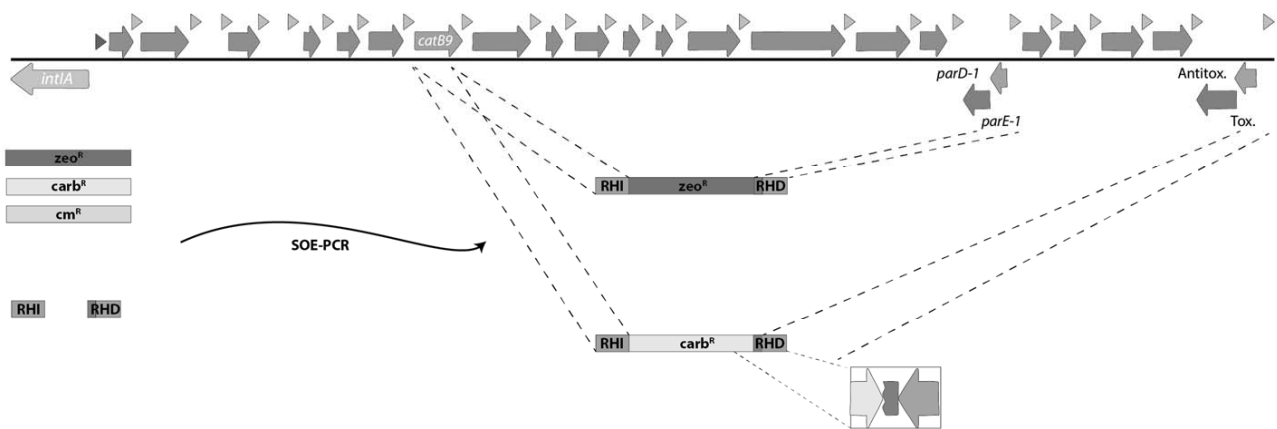


Fig. 3

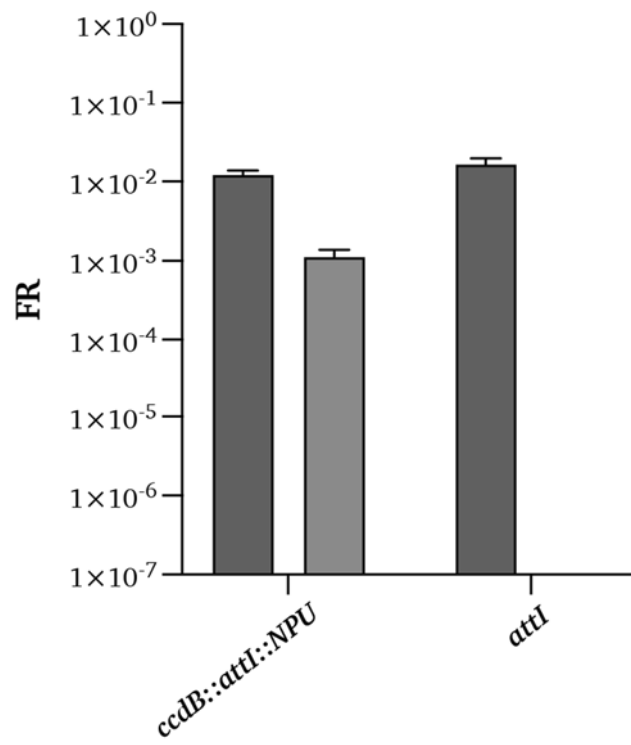


Fig. 4



- ②① N.º solicitud: 202330947  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.11.2023  
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RAPA, RITA A. et al., "Deletion of integron-associated gene cassettes impact on the surface properties of <i>Vibrio rotiferianus</i> DAT722.". PloS one. Marzo 2013, Vol. 8, N° 3, artículo n° e58430, ISSN 1932-6203 (Electronic), <DOI: doi: 10.1371/journal.pone.0058430>. todo el documento.	1-22
A	VAL, MARIE-EVE et al., "Genome engineering in <i>Vibrio cholerae</i> : a feasible approach to address biological issues." PLoS genetics. Enero 2012, Vol. 8, N° 1, artículo n° e1002472, ISSN 1553-7404 (Electronic), <DOI: doi: 10.1371/journal.pgen.1002472>. todo el documento.	1-22
A	EGILL, RICHARD et al., "Cassette recombination dynamics within chromosomal integrons are regulated by toxin-antitoxin systems." bioRxiv 2022.08.03.502626, 22/06/2023 [en línea][recuperado el 07/05/2024]. , <DOI: https://doi.org/10.1101/2022.08.03.502626>. todo el documento.	1-22
A	IQBAL, NAEEM et al., "Comprehensive functional analysis of the 18 <i>Vibrio cholerae</i> N16961 toxin-antitoxin systems substantiates their role in stabilizing the superintegron." Journal of Bacteriology. Junio 2015, Vol. 197, N° 13, páginas 2150 - 2159, ISSN 1098-5530 (Electronic), <DOI: doi:10.1128/JB.00108-15>. todo el documento.	1-22
A	KRIN, EVELYNE et al., "Systematic transcriptome analysis allows the identification of new type I and type II Toxin/Antitoxin systems located in the superintegron of <i>Vibrio cholerae</i> ". Research in Microbiology. Enero-febrero 2023, Vol. 174, N° 1-2, artículo n°: 103997, ISSN 1769-7123 (Electronic), <DOI: doi: 10.1016/j.resmic.2022.103997>. todo el documento.	1-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe  
14.05.2024

Examinador  
M. Hernández Cuéllar

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N1/20** (2006.01)

**C12N1/21** (2006.01)

**C12N15/11** (2006.01)

**C12N15/63** (2006.01)

**C12R1/63** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS