



Universidad
de Guanajuato

CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA

“Universidad de Guanajuato: 80 años de ser la Universidad Pública del Estado”.
“2025, a 200 años de la instalación del Primer Congreso Constituyente de Guanajuato”
“30 años de autonomía universitaria, un legado de responsabilidad y libertad”

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

“DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE *Lactococcus lactis* PARA LA DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes*”

TESIS

QUE PRESENTA

AMERICA SELENE GAONA MENDOZA

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN BIOCIENCIAS

DIRECTOR DE TESIS

DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS

DR. JULIO ARMANDO MASSANGE SÁNCHEZ

Irapuato, Gto., Julio de 2025.



Universidad
de Guanajuato

CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA

"Universidad de Guanajuato: 80 años de ser la Universidad Pública del Estado".
"2025, a 200 años de la instalación del Primer Congreso Constituyente de Guanajuato"
"30 años de autonomía universitaria, un legado de responsabilidad y libertad"

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

DIRECCIÓN

Oficio: DICIVA/0399/2025.

Asunto: TEMA DE TRABAJO.

C.

DR. JUAN ANTONIO RAMÍREZ VÁZQUEZ,
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA,
P R E S E N T E.

En relación al trabajo de titulación de la C. AMERICA SELENE GAONA MENDOZA, me permito comunicar a Usted que el tema señalado fue:

"DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE *Lactococcus lactis* PARA LA DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes*"

Y que dicho trabajo ha sido totalmente elaborado y cuenta con mi aprobación.

Asimismo, me permito proponer a:

DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO
DR. JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA
DR. CÉSAR OZUNA LÓPEZ
DR. CÉSAR CARDONA FÉLIX

Para que junto conmigo integren el Jurado.

A T E N T A M E N T E
"LA VERDAD OS HARA LIBRES"
Irapuato, Gto., 27 de Junio de 2025.

DIRECTOR DE TESIS

DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ



Universidad
de Guanajuato

CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA

"Universidad de Guanajuato: 80 años de ser la Universidad Pública del Estado".
"2025, a 200 años de la instalación del Primer Congreso Constituyente de Guanajuato"
"30 años de autonomía universitaria, un legado de responsabilidad y libertad"

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

DIRECCIÓN

Oficio: DICIVA/0400/2025.

Asunto: REVISIÓN DE TESIS.

Irapuato, Gto., 25 de Junio de 2025.

C.

DR. JUAN ANTONIO RAMÍREZ VÁZQUEZ
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA,
P R E S E N T E.

Habiendo revisado la Tesis de la Pasante C. AMERICA SELENE GAONA MENDOZA,

Titulada:

"DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE *Lactococcus lactis* PARA LA DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes*"

Damos nuestra aprobación para la impresión de la misma.

DIRECTOR

DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ

SINODAL

DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO

SINODAL

DR. JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA

SINODAL

DR. CÉSAR OZUNA LÓPEZ

SINODAL

DR. CÉSAR CARDONA FÉLIX



“Universidad de Guanajuato: 80 años de ser la Universidad Pública del Estado”.
“2025, a 200 años de la instalación del Primer Congreso Constituyente de Guanajuato”
“30 años de autonomía universitaria, un legado de responsabilidad y libertad”

DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA

C.
DR. JUAN ANTONIO RAMÍREZ VÁZQUEZ,
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA VIDA
CAMPUS IRAPUATO - SALAMANCA,
P R E S E N T E.

En relación al trabajo de titulación de la C. AMERICA SELENE GAONA MENDOZA nos permitimos comunicar a Usted que el trabajo de Tesis: “DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE *Lactococcus lactis* PARA LA DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes*”, que fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Luz Edith Casados Vázquez profesor de la División de Ciencias de la Vida y la Co-Dirección del Dr. Julio Armando Massange Sánchez, ha sido terminado. El escrito fue revisado por la Dra. María Cristina del Rincón Castro, el Dr. José Eleazar Barboza Corona, el Dr. César Ozuna López, y el Dr. César Cardona Félix y se autorizó la impresión y empastado del mismo.

Así mismo, nos permitimos proponer para la integración del Jurado a los Señores;

| | |
|---------------------------------------|------------|
| DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO | PRESIDENTE |
| DR. JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA | SECRETARIO |
| DR. CÉSAR OZUNA LÓPEZ | VOCAL |
| DR. CÉSAR CARDONA FÉLIX | VOCAL |
| DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ | VOCAL |

A T E N T A M E N T E
“LA VERDAD OS HARA LIBRES”
Irapuato, Gto., 2 de Julio de 2025.

DIRECTOR

DRA. LUZ EDITH CASADOS VÁZQUEZ

REVISOR

DRA. MARÍA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO

REVISOR

DR. CÉSAR OZUNA LÓPEZ

REVISOR

DR. JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA

REVISOR

DR. CÉSAR CARDONA FÉLIX.



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO

Universidad de Guanajuato

División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca

Doctorado

**“DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE *Lactococcus lactis* PARA LA
DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes*”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

DOCTORA EN BIOCENCIAS

Presenta

M.C. America Selene Gaona Mendoza

Dirigido por:

Dra. Luz Edith Casados Vázquez

Dr. Julio Armando Massange Sánchez

Universidad de Guanajuato

Irapuato, Gto.

25 de julio de 2025

México

RESUMEN

Listeria monocytogenes (Lm), es un patógeno transmitido por los alimentos causante de la listeriosis, una enfermedad cuya baja incidencia contrasta con sus altas tasas de hospitalización y mortalidad en la población de riesgo, por lo que la detección oportuna es primordial. En este estudio, el objetivo fue diseñar un biosensor microbiano de células completas de *Lactococcus lactis*, capaz de detectar la presencia del patógeno. La estructura del biosensor se basó en el sistema Agr de Lm, que consta de un receptor de histidina quinasa (AgrC) que reconoce la molécula de comunicación AIP, un elemento regulador (AgrA), y el promotor inducible por AIP (PII), que regula al gen informador (*mCherry*). Se generaron siete variantes del biosensor cuyos cambios radican en el uso de genes optimizados o no, y en el uso de RBS nativos de Lm o de *L. lactis*. Se determinó que, para la expresión de una proteína reportera que generara cambio colorimétrico visible, era necesaria la optimización de codones para su reconocimiento por parte del huésped, contrario a los genes *agrC*, *agrA* en los que no se observó visualmente, un aumento en su expresión respecto a los genes nativos. Los ensayos realizados para la detección del péptido AIP proveniente de sobrenadantes y biopelículas de Lm, así como los generados de manera sintética (AIP1 y AIP2) no generaron una respuesta colorimétrica ni de inmunodetección del reportero en *L. lactis*, con la cual se pudiera comprobar el funcionamiento de los circuitos genéticos. Por lo que se sugiere el profundizar en el conocimiento sobre la estructura, concentración y estabilidad del AIP y la expresión de proteínas funcionales por el huésped. No obstante, este diseño cuenta con los componentes necesarios para la detección del patógeno, por lo que su mejoramiento representa una base sólida para su aplicación como herramienta de detección.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 6 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 12 |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 13 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 14 |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA | 17 |
| 2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> | 17 |
| 2.1.1. Patogénesis..... | 17 |
| 2.1.2. Persistencia en el procesamiento de alimentos..... | 19 |
| 2.1.3. Formación de biopelículas | 21 |
| 2.2. Comunicación bacteriana en <i>L. monocytogenes</i> | 22 |
| 2.2.1. Sistema de dos componentes AgrC/AgrA..... | 22 |
| 2.3. Métodos de detección de <i>L. monocytogenes</i> | 24 |
| 2.3.1. Ensayos fenotípicos | 24 |
| 2.3.2. Ensayos moleculares | 25 |
| 2.3.3. Métodos de tipificación..... | 26 |
| 2.3.4. Biosensores..... | 27 |
| 2.4. Biosensores microbianos de células enteras para la detección de patógenos alimentarios | 28 |
| 2.5. <i>Lactococcus lactis</i> como fabrica celular | 29 |
| 2.5.1. Sistema de inducción por nisina (NICE)..... | 30 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 32 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 33 |
| 5. OBJETIVO GENERAL | 33 |
| 6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 33 |

| | |
|---|----|
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS | 34 |
| 7.1. Cepas bacterianas | 34 |
| 7.2. Expresión de los genes reporteros <i>gfp</i> , <i>rfp</i> y <i>mCherry</i> en <i>L. lactis</i> a través del sistema NICE | 34 |
| 7.2.1. Optimización de codones..... | 34 |
| 7.2.2. Obtención de los genes reporteros <i>gfp</i> , <i>rfp</i> y <i>mCherry</i> | 35 |
| 7.2.3. Obtención del vector de clonación pNZ8149 | 36 |
| 7.2.4. Clonación de los genes reporteros en <i>L. lactis</i> | 36 |
| 7.2.5. Estandarización de parámetros de inducción para la expresión de proteínas en <i>L. lactis</i> mediante el sistema NICE..... | 37 |
| 7.2.6. Reacción en cadena polimerizada de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)..... | 38 |
| 7.2.7. Inmunodetección de GFP por Westernblot | 39 |
| 7.3. Expresión de los genes <i>agrC</i> , <i>agrA</i> en <i>Lactococcus lactis</i> NZ3900..... | 40 |
| 7.3.1. Diseño de la construcción pNisA- <i>agrCA</i> | 40 |
| 7.3.2. Diseño de la construcción pNisA- <i>agrCAO</i> | 40 |
| 7.3.3. Diseño de la construcción pNisA- <i>agrC</i> -linker-sfGFP (Bs) | 42 |
| 7.3.4. Ensamblaje del circuito genético del biosensor | 43 |
| 7.3.5. Generación de variantes del biosensor | 44 |
| 7.3.6. Inmunodetección de AgrA en <i>L. lactis</i> | 46 |
| 7.3.7. Detección por fluorescencia de AgrC | 46 |
| 7.4. Evaluación de la funcionalidad del biosensor | 47 |
| 7.4.1. Expresión del sistema Agr en cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> a través de la formación de biopelículas | 47 |
| 7.4.2. Efecto del AIP1 sobre la formación de biopelículas en cepas de <i>Listeria</i> | 47 |

| | |
|--|----|
| 7.4.3. Determinación de la expresión del sistema Agr de Lm ATCC15313 y Lm ATCC19115 en cultivo líquido | 48 |
| 7.4.4. Determinación de la concentración y tiempo óptimos para la expresión del sistema Agr en células biosensoras | 49 |
| 7.4.5. Detección de AIP proveniente de biopelículas..... | 50 |
| 7.4.6. Detección de AIPs sintéticos y proveniente de sobrenadante | 51 |
| 8. RESULTADOS | 53 |
| 8.1. Evaluación de los genes fluorescentes <i>gfp</i> , <i>rfp</i> , <i>mCherry</i> para su expresión en <i>L. lactis</i> | 53 |
| 8.1.1. Sesgo y optimización de codones | 53 |
| 8.1.2. Generación de las construcciones pNisA-gfp, pNisA-rfp, pNisA-mCherry y pNisA-mCherryO | 55 |
| 8.1.3. Expresión de las proteínas fluorescentes en <i>L. lactis</i> | 56 |
| 8.1.4. Expresión de genes fluorescentes en <i>L. lactis</i> | 58 |
| 8.1.5. Detección de la proteína GFP..... | 58 |
| 8.2. Evaluación de la expresión de los genes <i>agrC</i> , <i>agrA</i> en <i>L. lactis</i> | 59 |
| 8.2.1. Clonación de los genes <i>agrC</i> , <i>agrA</i> silvestres en <i>L. lactis</i> | 59 |
| 8.2.2. Clonación de los genes <i>agrC</i> , <i>agrA</i> optimizados en <i>L. lactis</i> | 60 |
| 8.2.3. Expresión de las proteínas AgrC y AgrA silvestres y optimizadas en <i>L. lactis</i> | 62 |
| 8.3. Ensamble del circuito genético del biosensor | 64 |
| 8.3.1. Selección del tiempo de inducción y concentración de nisina óptimos para la expresión del elemento de reconocimiento..... | 64 |
| 8.3.2. Generación de variantes del biosensor B1 | 66 |
| 8.4. Expresión del sistema Agr en cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> | 69 |
| 8.4.1. Formación de biopelículas | 69 |

| | |
|--|-----|
| 8.4.2. Efecto del AIP1 en la formación de biopelículas de <i>Listeria</i> | 70 |
| 8.4.3. Expresión del sistema Agr de Lm ATCC15313 y Lm ATCC19115 en cultivo líquido | 71 |
| 8.5. Evaluación de la funcionalidad del biosensor | 72 |
| 8.5.1. Detección de AIP en biopelículas | 72 |
| 8.5.2. Detección de AIPs sintéticos y de sobrenadante..... | 72 |
| 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 74 |
| 9.1. <i>Lactococcus lactis</i> reconoce y expresa elementos genéticos provenientes de <i>Listeria monocytogenes</i> | 75 |
| 9.2. Los niveles de expresión de proteínas heterólogas en <i>L. lactis</i> se relacionan con la función final que tienen en el sistema | 79 |
| 9.3. Viabilidad de la expresión de proteínas de membrana en <i>L. lactis</i> | 80 |
| 9.4. Problemas de funcionalidad del biosensor | 81 |
| 10. CONCLUSIONES | 83 |
| 12. ANEXOS..... | 85 |
| Anexo 1. Producción y purificación de proteínas para generar anticuerpos para Western blot | 85 |
| Anexo 2. Producción y purificación de mRFP para generar anticuerpos para Western blot | 91 |
| 13. PROTOCOLOS GENERALES..... | 92 |
| Protocolo 1. Extracción DNA genómico | 92 |
| Protocolo 2. Extracción de DNA plasmídico <i>Lactococcus lactis</i> | 94 |
| Protocolo 3. Preparación de células electrocompetentes de <i>Lactococcus lactis</i> ... | 96 |
| Protocolo 4. Extracción de DNA plasmídico por CTAB | 98 |
| Protocolo 5. Preparación de células electrocompetentes de <i>Escherichia coli</i> | 99 |
| Protocolo 6. Extracción de RNA | 101 |

| | |
|--|-----|
| Protocolo 7. Westernblot para proteínas no visualizadas por tinción..... | 104 |
| 13. REFERENCIAS..... | 108 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema de la infección por <i>Listeria monocytogenes</i> | 19 |
| Figura 2. Esquema del sistema de comunicación de autoinducción Agr de Lm ... | 23 |
| Figura 3. . Ensamble de los genes reporteros <i>gfp</i> , <i>rfp</i> y <i>mCherry</i> en <i>L. lactis</i> | 56 |
| Figura 4. Expresión de la proteína mCherryO en <i>L. lactis</i> | 56 |
| Figura 5. Perfil proteico de pNisA-gfp, pNisA-rfp, pNisA-mCherry y pNisA-mCherryO. | 57 |
| Figura 6. Expresión relativa de <i>gfp</i> , <i>rfp</i> y <i>mCherry</i> en <i>L. lactis</i> | 58 |
| Figura 7. Evaluación del perfil proteico por SDS-PAGE y WB de pNisA-gfp. | 59 |
| Figura 10. Estrategia de ensamble y clonación del sistema de dos componentes AgrC/AgrA en <i>L. lactis</i> | 60 |
| Figura 11. Estrategia de ensamble de pNisA-agrCAO por Gibson | 61 |
| Figura 12. Evaluación de los genes <i>agrC</i> y <i>agrA</i> silvestres y optimizados a nivel transcripcional y traduccional..... | 63 |
| Figura 13. Ensamble del biosensor completo de <i>L. lactis</i> | 64 |
| Figura 14. Esquema de los biosensores y sus modificaciones. | 68 |
| Figura 8. Estrategia de clonación de <i>agrC</i> y <i>agrA</i> en pColdI..... | 88 |
| Figura 9. Purificación de las proteínas AgrA y AgrC por afinidad a níquel..... | 90 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Prevalencia de Lm aislada de productos lácteos y alimentos perecederos. | 20 |
| Tabla 2. Ejemplos de biosensores desarrollados en los últimos años para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en el sector alimentario. | 27 |
| Tabla 3. Oligonucleótidos para la amplificación de los genes reporteros. | 35 |
| Tabla 4. Parámetros evaluados para estandarizar condiciones óptimas para la expresión de proteínas en <i>L. lactis</i> | 37 |
| Tabla 5. Oligonucleótidos para la amplificación de los genes fluorescentes mediante RT-qPCR. | 39 |
| Tabla 6. Oligonucleótidos para la clonación de los genes sintéticos <i>agrC</i> , <i>agrA</i> en <i>L. lactis</i> | 42 |
| Tabla 7. Oligonucleótidos para la construcción pNisA- <i>agrC</i> -linker-sfgfp (Bs). | 43 |
| Tabla 8. Oligonucleótidos para la generación del biosensor B1 y B1SO mediante ensamble de Gibson. | 44 |
| Tabla 9. Deleciones y mutaciones en las secuencias de los biosensores B2, B3 y B4. | 44 |
| Tabla 10. Oligonucleótidos para la clonación | 45 |
| Tabla 11. Diseño factorial mixto para la interacción Biosensor-AIP. | 52 |
| Tabla 12. Evaluación de la adaptación de los genes fluorescentes en <i>L. lactis</i> | 53 |
| Tabla 13. Análisis del uso de codones por la cepa <i>L. lactis</i> para la expresión de proteínas fluorescentes. | 54 |
| Tabla 14. Parámetros de adaptación de los genes del sistema de dos componentes <i>AgrC/AgrA</i> en <i>L. lactis</i> | 61 |
| Tabla 15. Análisis del uso de codones por la cepa <i>L. lactis</i> para la expresión de las proteínas <i>AgrC</i> , <i>AgrA</i> | 77 |
| Tabla 16. Oligonucleótidos para las construcciones pColdI- <i>AgrC</i> , pColdI- Δ N-term <i>AgrC</i> y pColdI- <i>AgrA</i> | 85 |
| Tabla 17. Oligonucleótidos para la construcción pColdI-mrfp/ PstI-EcoRI. | 91 |
| Tabla 18. Componentes de gel de poliacrilamida al 12%. | 104 |

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el tema de la inocuidad alimentaria es de gran relevancia para el consumidor, pues la presencia constante de patógenos alimentarios como bacterias, parásitos y virus ocasionan las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Soni et al., 2018). Particularmente, la bacteria *Listeria monocytogenes* (Lm), agente etiológico de la listeriosis, a pesar de presentar baja incidencia, las tasas de hospitalización (90%) y mortalidad (20-30%) que genera son más elevadas si se compara con otros patógenos alimentarios. La población que es más vulnerable frente a la listeriosis comprende a mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos y personas inmunodeprimidas, en los que puede provocar complicaciones severas como abortos, septicemia, meningitis, meningoencefalitis o incluso la muerte (European Food Safety [EFSA], 2017; Soni et al., 2015; World Health Organization [WHO], 2018).

Debido al riesgo que representa, contar con herramientas confiables para el monitoreo continuo, rápido y sensible en puntos críticos durante el procesamiento de alimentos es una tarea indispensable para el sector alimentario. Con el creciente avance de la biología molecular, se han diseñado y mejorado técnicas que permiten la detección oportuna de patógenos alimentarios como Lm. En este sentido, los biosensores son herramientas que se caracterizan por una detección rápida, específica y en tiempo real (Thakur & Ragavan, 2013; Poghosian et al., 2019; Ali et al., 2020). Entre los diversos tipos de biosensores, se encuentran los biosensores microbianos de células completas (WCMB), cuyo principio se basa en la combinación de un elemento de reconocimiento biológico con un elemento transductor que le permite convertir la interacción del sistema con una molécula objetivo en una señal medible, la cual puede ser de tipo óptica, electroquímica o piezoeléctrica (Moraskie et al., 2021; Gaona-Mendoza et al., 2024). El diseño de estos biosensores requiere de biopartes genéticas (genes receptores, genes informadores, promotores, replicones y marcadores de selección) para la

generación de circuitos genéticos que se integran y expresan adecuadamente en un hospedero microbiano, principalmente bacterias (Bereza-Malcolm et al., 2015).

Ln cuenta con un sistema de QS denominado Agr que participa en la formación de biopelículas y activación de factores de virulencia. Este sistema es mediado por un péptido autoinductor (AIP), que es la molécula de señalización que permite interacción célula-célula (Riedel et al., 2009). De acuerdo con investigaciones previas (Lubkowitz, et al., 2018; Wu, et al., 2021), este tipo de sistemas, puede ser aprovechado para el diseño de biosensores microbianos, en los que las células biosensoras reconocen a la molécula de señalización y traducen su presencia en una señal cuantitativa o cualitativa generada por la expresión de genes informadores.

Considerando el potencial que ofrecen los biosensores basados en QS, el presente trabajo se diseñó y caracterizó un biosensor microbiano de células completas basado en *Lactococcus lactis* como herramienta de detección in situ de *Listeria monocytogenes*, utilizando el sistema Agr como plataforma de reconocimiento del AIP del patógeno. El circuito genético construido denominado pNisA-agrCA-Pil-mCherryO, integra los genes *agrC* y *agrA* bajo el control del promotor inducible por nisina (pNisA), acoplado al gen reportero *mCherry* regulado por el promotor Pil, activado por la presencia de AIP. Este diseño tiene como objetivo generar una señal visible como indicativo de la presencia del patógeno.

Como parte del desarrollo del biosensor, se generaron siete variantes del circuito genético, utilizando genes con secuencia optimizada y no optimizada y empleando variaciones en los RBS para los genes *agrC*, *agrA* y *mCherry*. Se logró la expresión de las proteínas AgrA y mCherry, componentes clave de los módulos de reconocimiento y transducción, respectivamente. Se determinó que la concentración óptima del inductor nisina para la expresión del elemento de reconocimiento (basado en la expresión de AgrA), es de 40 ng/mL, sin afectar el crecimiento de *L. lactis*. Por otra parte, se seleccionó la proteína mCherry con secuencia optimizada para el diseño del elemento de transducción, proteína que generó cambio colorimétrico en *L. lactis*.

No obstante, los ensayos realizados para la detección del péptido AIP sintético, así como sobrenadantes y biopelículas de Lm, no generaron una respuesta colorimétrica ni de inmunodetección que reflejara la expresión del gen informador, bajo las condiciones evaluadas. Estos resultados muestran la necesidad de optimizar factores como la concentración y estabilidad del péptido AIP, así como comprobar que los genes del circuito genético sean reconocidos correctamente por *L. lactis* para la obtención de proteínas plegadas adecuadamente, o en su caso, insertadas en la membrana.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes (Lm) es un patógeno intracelular facultativo causante de listeriosis, que se distribuye en diferentes ambientes de la naturaleza, ya sea en suelo o bien en una célula eucariota (Vera, *et al.*, 2013). Se trata de un bacilo corto, no esporulado, móvil, anaerobio facultativo; es un organismo positivo para catalasa negativo para oxidasa (NOM 1995). Además, puede crecer en un amplio rango de temperatura (-18 °C a 45 °C), siendo el óptimo de 37 °C, y de pH (4.0 a 9.6), a niveles de actividad del agua (aw) tan bajos como 0.90, y tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Ferreira *et al.*, 2014; Buchanan *et al.*, 2017). La caracterización de las cepas de Lm es necesaria para determinar su potencial de virulencia, y favorecer su vigilancia y seguimiento epidemiológico. Considerando los antígenos somáticos (O) y flagelar (H), estas cepas pueden ser clasificadas en 13 serotipos distintos (Laksanalamai *et al.*, 2014), de los cuales los serotipos 1/2 a, 1/2b y 4b, son responsables de más de 90% de los casos de listeriosis en humanos (Dhama *et al.*, 2015; Bergholz *et al.*, 2018).

2.1.1. Patogénesis

Debido a la amplia distribución de Lm, la contaminación de alimentos frescos durante el cultivo y procesamiento representa una amenaza para la salud humana y animal. Respecto a la listeriosis en humanos puede generar cuadros clínicos graves como septicemia, meningitis, gastroenteritis, y encefalitis. Como se mencionó anteriormente, las complicaciones de salud más graves se presentan en la población vulnerable donde alcanza tasas de mortalidad del 20-30% (Gandra *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020).

La listeriosis afecta la salud humana de forma invasiva o no invasiva (Auvolat & Besse, 2016). La forma gastrointestinal no invasiva se caracteriza por síntomas como fiebre, dolor muscular, náuseas y diarrea. Los síntomas de la forma

invasiva son mucho más graves, ya que, al extenderse al sistema nervioso central, puede provocar meningitis, rigidez de cuello, confusión, pérdida del equilibrio, convulsiones y listeriosis ocular. La listeriosis invasiva es dominante entre las poblaciones inmunodeprimidas, como las mujeres embarazadas, las personas mayores de 65 años, los recién nacidos y los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Zhao et al., 2014). En las mujeres embarazadas, las manifestaciones de la enfermedad incluyen aborto espontáneo, muerte fetal, septicemia perinatal y meningitis en recién nacidos (Bobade et al., 2016).

Lm es capaz de atravesar las barreras fisiológicas intestinal, hematoencefálica e incluso la placentaria presentes en los seres humanos una vez realizada la ingesta del alimento contaminado (figura 1) (Radoshevich & Cossart, 2018). Cuando Lm cruza la barrera intestinal, ésta es absorbida a través del lumen intestinal, después, atraviesa las células epiteliales, una vez internalizada, la bacteria inicia su replicación, si el sistema inmune no controla la infección, esta se multiplicará hasta el grado de diseminarse tanto al torrente sanguíneo como a los ganglios linfáticos. Posterior a su ingreso al torrente sanguíneo, esta se dirige principalmente al hígado y al bazo, ya que tiene la capacidad de invadir células epiteliales y replicarse intracelularmente, incluyendo dentro de macrófagos. Si después de esta barrera, aun no es controlada la infección mediante una respuesta inmune innata, la bacteria continúa replicándose y puede reingresar al torrente sanguíneo dirigiéndose hacia el cerebro, y en el caso de mujeres embarazadas, a la placenta, lo que trae consigo, infecciones sistémicas letales (Camejo et al., 2011). La característica principal de Lm que le permite evitar la respuesta inmune es su capacidad de replicarse dentro de las células infectadas, es decir en el citosol y el diseminarse a través de múltiples células (Pamer, 2004).

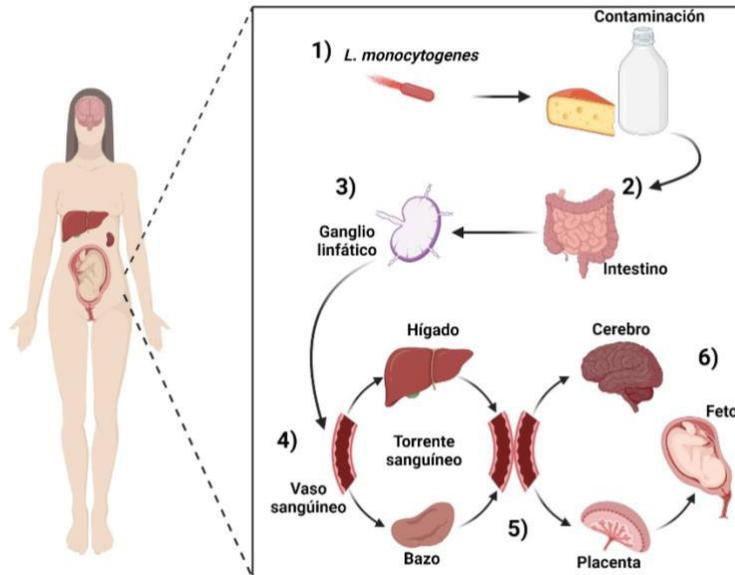


Figura 1. Esquema de la infección por *Listeria monocytogenes* (Lm) en humanos. Después de la ingestión de alimentos contaminados (1), Lm puede atravesar la barrera intestinal (2) y propagarse al torrente sanguíneo a través de los ganglios linfáticos (3) para diseminarse a los tejidos objetivo, como el hígado y el bazo (4). En personas inmunocomprometidas, puede atravesar la barrera hematoencefálica o la barrera fetoplacentaria (5) y causar meningitis, sepsis, parto prematuro o aborto potencialmente letales (6). Basado en lo reportado por Radoshevich & Cossart (2018).

2.1.2. Persistencia en el procesamiento de alimentos

La contaminación por Lm se presenta en el agua, el suelo, el ensilado, las frutas, las verduras y muestras de alimentos como productos lácteos (leche no pasteurizada y queso blando), carne y mariscos crudos o cocidos (Alhogail et al., 2016). En el caso de los alimentos procesados, esta contaminación puede ocurrir durante su procesamiento, envasado y distribución. Actualmente, la mayoría de los brotes se deben al consumo de productos lácteos, ya que *Lm* es un agente causante de mastitis en vacas lecheras, lo que puede conducir a la contaminación de leche excretada por vacas enfermas (ShamLoo et al., 2019). *Lm* ocupa un lugar importante como patógeno microbiológico asociado con leche y sus derivados (Jakobsen et al., 2011) ya que son el vehículo por el cual múltiples brotes de *Lm* se han desarrollado a nivel mundial (tabla 1) y representan hasta el 6% de los alimentos

causantes de brotes de *Lm* (Ahmed & Shimamoto, 2014), atribuyéndose el 39.1% a la leche, 53.1 % al queso y 7.8 % a otros productos lácteos (Claeys et al., 2013).

Tabla 1. Prevalencia de *Lm* aislada de productos lácteos y alimentos perecederos.

| Año | País | Número de casos | Tipo de alimento | Serovar <i>Lm</i> | Métodos de aislamiento | Método de identificación | Referencias |
|------|----------------|-----------------|------------------------------------|-------------------|------------------------|--------------------------|------------------------------|
| 2001 | México | 162 | Leche cruda | 1-4b | FDA | Tipificación de fagos | (Carlos et al., 2001) |
| 2002 | Suecia | 588 | Silo de leche cruda | 1.2a | ISO | Test CAMP | (Waak et al., 2002) |
| 2004 | Italia | 96 | Queso Gorgonzola | 1.2a | USDA | Test CAMP | (Carminati et al., 2004) |
| 2005 | Japón | 15 | Queso casero | 1.2b | FDA | PFGE | (Makino et al., 2005) |
| 2005 | Portugal | 29 | Queso suave | 4b 1.2b 1.2a | USDA | Tipificación de fagos | (Pintado et al., 2005) |
| 2008 | Turquía | 13 | Queso blanco | | FDA | Test CAMP | (Arslan et al., 2008) |
| 2009 | Líbano | 24 | Alimentos a base de lácteos | | | PCR | (Harakeh et al., 2009) |
| 2011 | México | 18 | Queso fresco mexicano | | FDA | Test CAMP | (Torres-Vitela et al., 2011) |
| 2011 | Turquía | 34 | Quesos semi maduros | | FDA | Test CAMP | (Gruner et al., 2011) |
| 2014 | Nigeria | 14 | Leche cruda | | FDA | PCR | (Usman et al., 2016) |
| 2016 | Estados Unidos | 28 | Helados | | FDA | PCR | (NCEZID, 2022) |
| 2023 | Estados Unidos | 19 | Verduras de hojas verdes | | FDA | PCR | (NCEZID, 2023) |
| 2023 | Estados Unidos | 10 | Melocotones, nectarinas y ciruelas | | FDA | PCR | (NCEZID, 2023) |

FDA: Food and Drug Administration, **IDF:** International Dairy Federation, **ISO:** International Organization for Standardization, **USDA:** United States Department of Agriculture, **Test CAMP:** Test bioquímico (Christie-Atkinson-Munch-Peterson), **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa. **PFGE:** electroforesis en gel de campo pulsado. Tomado de SamLoo *et al.* (2019).

Durante el transcurso del 2025, la FDA emitió un comunicado sobre la investigación en curso de un brote de listeriosis en Estados Unidos y el retiro del mercado de alimentos listos para consumir, como sándwiches y refrigerios. Hasta ese momento se habían reportado 10 hospitalizaciones. Adicionalmente, se confirmó un total de 30 casos asociados al consumo de batidos suplementados y 16 de un producto final no identificado durante el periodo de diciembre de 2024 a abril de 2025 (Food and Drug Administration, s.f.).

A diferencia de EE. UU., donde se realiza un seguimiento riguroso, en México no existen estadísticas epidemiológicas referentes a este patógeno, ya que no es una enfermedad de notificación obligatoria, lo cual limita el conocimiento sobre la prevalencia de Lm en el país. Informes puntuales, como el de Guel-García, et al. (2024), reportan la presencia del patógeno en el 5.6% de las muestras analizadas, siendo recurrente en carne de res, pollo y queso.

No obstante, en diversas Normas Oficiales Mexicanas como la NOM-243-SSA1, 2010 (productos lácteos), la NOM-194-SSA1-2004 (cárnicos procesados), y la NOM-159-SSA1-1996 (productos de la pesca congelados) se estipula la ausencia obligatoria del patógeno en alimentos para el consumo. Por ello, su detección oportuna es de carácter prioritario para la industria alimentaria.

2.1.3. Formación de biopelículas

La formación de biopelículas se debe al crecimiento sésil de Lm; consisten en comunidades microbianas que pueden adherirse a superficies de origen abiótico o biótico y se encuentran rodeadas de sustancias poliméricas extracelulares. Representa la principal causa de persistencia y resistencia del patógeno al estrés puesto que son capaces de soportar agentes desinfectantes y de limpieza e incluso altas temperaturas (Lynch et al., 2021, Jiang et al., 2022) y, por lo tanto, son más difíciles de erradicar en comparación con las células que tienen un crecimiento planctónico, es decir, que flotan libremente en el ambiente (Chen et al., 2019).

El desarrollo y maduración de la biopelícula requiere mecanismos celulares complejos en los que interviene la comunicación célula-célula (Lee & Wang, 2020), es decir, mecanismos de Quorum sensing.

2.2. Comunicación bacteriana en *L. monocytogenes*

El quórum sensing está estrechamente vinculado con la densidad celular de una población bacteriana. Regula la formación de biopelículas y la activación de factores de virulencia mediante la liberación de moléculas activas o autoinductores que funcionan como señales y son reconocidas por la misma bacteria (Tu, et al., 2025). Las bacterias gramnegativas utilizan predominantemente moléculas de homoserina lactonas (HSL) (Garmyn et al., 2009), mientras que en las bacterias grampositivas los autoinductores suelen ser péptidos cortos (lineales o cíclicos) procesados por una proteína transmembrana y otras proteasas (Dunny & Leonard, 1997; Haque et al., 2019). Una vez secretados, estos autoinductores se acumulan e interactúan con un sistema de dos componentes. La señal se transloca desde el exterior a un regulador citoplasmático a través de una cascada de fosforilación después de la unión del autoinductor al sensor histidina quinasa (Garmyn et al., 2012).

2.2.1. Sistema de dos componentes AgrC/AgrA

Hasta ahora, para la especie *Listeria monocytogenes*, se han descrito dos sistemas de QS, LuxS y Agr (Kannan et al., 2020; Bejder et al., 2024). Particularmente, el sistema Agr se describió para *Staphylococcus aureus* (Novick & Geisinger, 2008). El mecanismo regulatorio AgrC/AgrA pertenece a un sistema de autoinducción que responde a la presencia de péptidos autoinductores (Lee & Wang, 2020; Banerji, et al., 2022).

El sistema Agr está constituido por cuatro genes (figura 2), cotranscritos en un operón (*agrB*, *agrD*, *agrC*, *agrA*), que codifican cuatro proteínas; *agrB* sintetiza

una peptidasa unida a la membrana que escinde, procesa y exporta el prepéptido derivado del gen *agrD* en el extremo C-terminal, cataliza la formación de un anillo de tiolactona con una cisteína central y, en combinación con la señal peptidasa Sps (Roux et al., 2014), efectúa la exportación y liberación del péptido autoinductor activo (AIP). Al igual que en otros sistemas de QS, la alta densidad celular, incrementa la concentración del autoinductor (AIP) en el medio, lo que conlleva a la activación de la expresión de factores de virulencia (Quave et al., 2008) a través del sistema de dos componentes AgrC/AgrA que consta de un receptor histidina quinasa (AgrC) y un regulador de respuesta transcripcional (AgrA), ejerciendo efectos reguladores sobre los sustratos objetivo e induciendo su propia producción (autorregulación positiva) (Riedel et al., 2009; Gandra et al., 2019). La expresión del operón está dirigida por el promotor PII, río arriba del gen *agrB*, y está sujeta a una autorregulación a través de AgrA. El sistema de manera activa regula los genes que codifican las adhesinas necesarias para la formación de biopelículas (Lee & Wang, 2020).

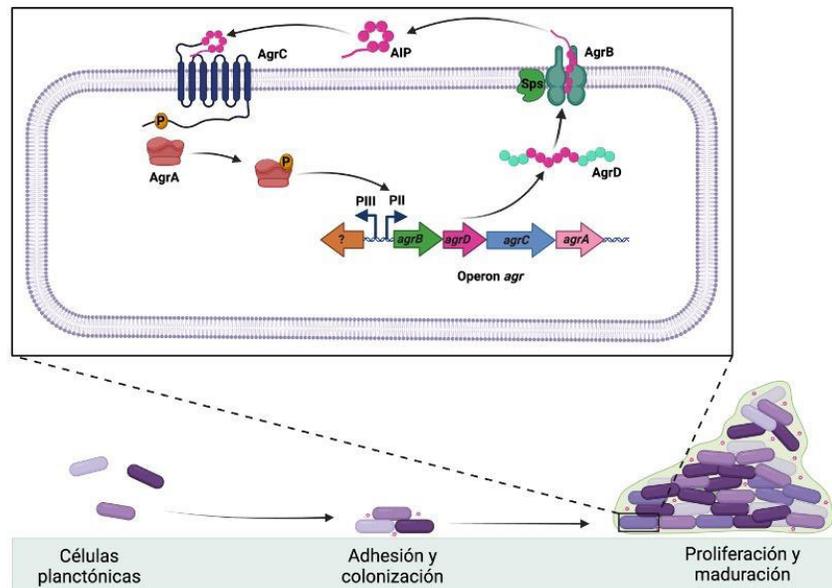


Figura 2. Esquema del sistema de comunicación de autoinducción Agr de *Lm*. El transcrito regulado por el promotor PII, es un operón de cuatro genes; *agrD* procesa un péptido autoinductor cíclico (AIP) secretado por AgrB y Sps. De manera general, el primer paso para la activación del sistema Agr, se basa en la unión del péptido autoinductor (AIP) a la parte extracelular del receptor ArC quien se autofosforila por el cambio en su conformación inducido por el AIP, lo que permite la conexión con el regulador de respuesta AgrA. AgrA, regula la expresión del sistema Agr, a través de la regulación del promotor PII. Basado en lo descrito por Kavanaugh et al., 2007; Painter et al., 2014; Quave y Horswill, 2014.

En el caso de *S. aureus*, los genes diana del sistema Agr están regulados directamente por AgrA o por un RNAIII regulador transcrito en la dirección opuesta al promotor P3 adyacente a PII (Thoendel et al., 2011). Los componentes RNAIII y AgrA, regulan la transcripción de alrededor de 200 genes involucrados en factores de virulencia (O'Rourke et al., 2014). Pero en *Lm*, a pesar de amplios enfoques bioinformáticos o perfiles transcripcionales, no se ha identificado un RNAIII regulador (Mandin et al., 2007; Toledo-Arana et al., 2009; Mellin y Cossart, 2012; Wurtzel et al., 2012). Esto sugiere que en *Lm* los genes diana están regulados por AgrA y otros reguladores transcripcionales afectados por la regulación dependiente de AgrA. Sin embargo, no se puede excluir que el AIP se transmita a través de otro sistema de dos componentes además de AgrCA.

2.3. Métodos de detección de *L. monocytogenes*

La detección de *Lm* se puede realizar mediante métodos tradicionales con medios selectivos, ensayos fenotípicos, ensayos moleculares, así como ensayos serológicos y métodos de tipificación. La aplicación de cada método depende del presupuesto de la industria y del tiempo requerido para la detección del patógeno.

2.3.1. Ensayos fenotípicos

El uso de medios de cultivo selectivos se considera como método tradicional para la detección de patógenos y sigue siendo popular para confirmar la presencia de *Lm*. Los medios de cultivo se basan en la capacidad que presenta *Lm* para hemolizar glóbulos rojos de oveja o caballo, o bien, hacer el ambiente ácido mediante la descomposición de D-xilosa, L-ramnosa, K-metil-D-manosido y D-manitol. La prueba no puede diferenciar entre *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*. Por lo tanto, al seguir esta técnica, es necesario el uso de discos de β -lisina. Otra desventaja, es que la fermentación de diferentes azúcares podría usarse para la identificación de especies no hemolíticas. Aunque los métodos bioquímicos son

útiles para la identificación de bacterias, tienen algunos resultados falsos y ambiguos (ShamLoo et al., 2019).

Por otra parte, las técnicas de inmunoensayo pueden utilizarse para detectar algunos componentes estructurales de Lm como flagelos, toxina LLO y proteína p60. Estas técnicas incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) del tipo sándwich, competitivo y marcado con fluorescencia, ensayo de aglutinación de látex y ensayo inmunofluorescente ligado a enzimas (ELFA). Todas estas técnicas necesitan grandes cantidades de muestras y son caras de llevar a cabo ya que requieren equipos especializados (Gasnov & Hughes, 2005).

2.3.2. Ensayos moleculares

Las técnicas moleculares ofrecen mayor sensibilidad y especificidad del patógeno ya que permiten seleccionar genes únicos que no se ven afectados por variaciones naturales en cada especie de bacteria, aumentando la precisión del diagnóstico. Técnicas tradicionales como PCR de punto final, RT-PCR y PCR en tiempo real se clasifican en este grupo, en las que es común la amplificación de genes específicos para Lm como *inlB* (internalina B), *hlyA* (listeriolisina O), *iap* (proteína asociada a la invasión), *prfA* (proteína reguladora para la activación del grupo de virulencia) y el rRNA 16S (ShamLoo et al., 2019). A pesar de la sensibilidad y rapidez que presenta, no todos los laboratorios de análisis cuentan con el equipo necesario para controlar las temperaturas de amplificación, es decir termocicladores. En contraste con la PCR, en las amplificaciones isotérmicas existe una amplificación del DNA, pero utilizando una temperatura fija, para lo cual no se requiere del uso de equipos especializados (Wang, et al., 2015). Se ha desarrollado un método de LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) para la detección de cepas de Lm con un límite de detección de 1 pg de ADN/tubo y 100 UFC/reacción en tan solo 60 min, teniendo una sensibilidad y especificidad del 96.7 y 100%, respectivamente (Wang et al., 2012).

Algunas de las principales desventajas de estas técnicas es que no pueden distinguir entre *Listeria* viable e inactivada y pueden verse afectadas por compuestos presentes en la matriz, incluso, el método de extracción de la plantilla de DNA o RNA afecta en la reacción final (Carballo-Uicab et al., 2025).

2.3.3. Métodos de tipificación

Dentro de esta clasificación se encuentran los métodos serológicos, la tipificación de fagos y técnicas electroforéticas. Los métodos serológicos se basan en los 13 serotipos de *Listeria* (Seeliger & Jones, 1986) cabe resaltar que estos métodos tienen menos sensibilidad y deben ser seguidos por otros métodos moleculares (ShamLoo et al., 2019).

La tipificación por fagos se basa en la sensibilidad de las cepas de Lm a algunos fagos definidos que se dirigen a antígenos específicos en las células de *Listeria*, produciendo la lisis celular. A continuación, se caracteriza el tipo de fago de cada aislado basándose en su sensibilidad. Este ensayo es una prueba confiable para distinguir cepas de *Listeria* (Loessner, 1991).

Por otra parte, los métodos electroforéticos como la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) y la electroforesis en gel de campo de pulso (PFGE) son métodos eficaces y con un estándar de oro para la tipificación de cepas patógenas de *Listeria*. Mientras MLEE se basa en los diferentes patrones de migración de aminoácidos en carga electrostática variable que refleja la variación alélica de los genes que codifican estas secuencias de aminoácidos (Thomas et al., 2012), PFGE corta el DNA de la bacteria en varios trozos mediante enzimas de restricción. Los fragmentos de DNA producen patrones de bandas únicos en un gel de agarosa. Luego, Lm se clasifica en diferentes subtipos (pulsotipos) de acuerdo con patrones de PFGE definidos (Abdollahzadeh et al., 2016).

2.3.4. Biosensores

Los biosensores representan una herramienta de gran interés para la detección rápida y en tiempo real de patógenos. El biosensor consta de una biomolécula (como enzimas, anticuerpos, células vivas o ácidos nucleicos, anticuerpos recombinantes, aptámeros, ligandos combinatorios, catalizadores sintéticos, etc.) que interactúan con el analito diana, y la señal obtenida indica la presencia o ausencia de éste en una muestra dada (Soni et al., 2018). Las señales utilizadas con más frecuencia incluyen transductores electroquímicos (Cesewski & Johnson, 2020), ópticos (Wang et al., 2024) termométricos (Zhou et al., 2020), piezoeléctricos (Syam et al., 2012), magnéticos (Xue, et al., 2018), etc. Debido al interés que representa Lm para el sector alimentario y la salud pública, se han diseñado una amplia gama de biosensores para su detección (tabla 2).

Tabla 2. Ejemplos de biosensores desarrollados en los últimos años para la detección de *L. monocytogenes* en el sector alimentario.

| Tipo de biosensor | Principio de detección | Señal de salida | Sensibilidad | Tiempo de detección | Fuente |
|-------------------|---|-----------------|--|---------------------|----------------------|
| Aptasensor | Aptámeros del gen <i>hlyA</i> marcados con NH ₂ y acoplados a nanopartículas de oro | Colorimétrica | 100 UFC/mL | 90 min | (Du et al., 2024b) |
| Aptasensor | Uso de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ @MIL-100(Fe) funcionalizadas con aptámeros | Colorimétrica | 14 UFC/mL | No especificado | (Du et al., 2024a) |
| Óptico | RAA combinada con CRISPR/Cas12a del gen <i>hlyA</i> | Fluorescencia | 350 UFC/mL | 25-35 min | (Yang et al., 2024) |
| Óptico | Amplificación del gen <i>hlyA</i> por CRISPR/Cas12a con microamplificación | Fluorescencia | 4.4 UFC/g | 25 min | (Xiao et al., 2023) |
| Magnético | LAMP combinada con CRISPR/Cas12a y nanopartículas magnéticas funcionalizadas | Fluorescencia | 1 UFC/mL en cultivos puros | No especificado | (Lee et al., 2023) |
| Óptico | Infección por el fago A500: <i>nluc</i> Δ LCR, productor de luciferasa, de células de Lm; posterior a la lisis celular y adición de sustrato se genera luminiscencia | Luminiscencia | 1 a 107 UFC/25 g | 19 h | (Meile et al., 2020) |
| Electroquímico | RAA combinada con CRISPR/Cas12a para detectar DNA de Lm | Fluorescencia | 940 UFC/g en muestras de espiga 26 UFC/mL en cultivos puros | 2 h | (Li et al., 2021) |

| | | | | | |
|-----------------------|--|-------------------------------------|------------|-----------------|------------------------|
| Piezoeléctrico | Aptasensor basado en QCM integrado con sistema de preconcentración magnética | Cambios de frecuencia de resonancia | 148 UFC/mL | No especificado | (Beyazit et al., 2024) |
|-----------------------|--|-------------------------------------|------------|-----------------|------------------------|

UFC. Unidades Formadoras de Colonias. **Gen *hlyA*.** Gen de la listeriolosina O (LLO). **RAA.** Amplificación asistida por recombinasa. **LAMP.** Amplificación isotérmica mediada por bucle. **QCM.** Microbalanza de cristal de cuarzo.

2.4. Biosensores microbianos de células enteras para la detección de patógenos alimentarios

Los biosensores microbianos de células completas (WCMB), son definidos como células vivas modificadas genéticamente a través de la incorporación de circuitos genéticos en su genoma o mediante plásmidos que le permiten detectar un analito objetivo (Bertels et al., 2012; Lim et al., 2015; Gaona-Mendoza et al., 2024). La especificidad y sensibilidad de detección se debe principalmente a dos elementos: el primero, un elemento de reconocimiento que interactúa con el analito y el segundo, un elemento transductor capaz de cambiar la señal generada entre el analito-biosensor en una detectable y medible (Moraskie, et al., 2021).

Si bien, existe una amplia variedad de WCMB diseñados, la mayoría tienen como objetivo detectar compuestos químicos, especialmente contaminantes ambientales (Wynn, et al., 2018; He et al., 2022), y solo una pequeña parte se han diseñado con el propósito de detectar patógenos alimentarios. Existen dos ejemplos relevantes en el diseño de WCMB destinados a la detección de patógenos alimentarios y presentes en agua debido a la sensibilidad y/o especificidad que presentan.

Lubkowitz y colaboradores (2018) desarrollaron circuitos genéticos que fueron incorporados en células de *Lactobacillus reuteri* DSM20016 para generar un biosensor capaz de detectar la molécula señal AIP-I de *Staphylococcus aureus*, patógeno importante en el sector salud y alimentario. Su diseño se basó en la expresión heteróloga del sistema Agr, nativo de *S. aureus*, por *L. reuteri*, para la interacción de las células biosensoras con la molécula de señalización AIP-I, lo cual, a su vez, activó la expresión del gen *gusA*, que expresa glucuronidasa, regulado por

el promotor P3 (inducible por AIP-I). Esto permitió una detección de niveles de AIP-I de hasta 10^{-9} M en los primeros 30 min de exposición, generando un cambio colorimétrico como respuesta.

Wu y colaboradores (2021) lograron diseñar células recombinantes de *E. coli* que detectaron la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia pseudomallei*, patógenos contaminantes del agua. Como fundamento, el sistema de QS QscR, nativo de ambos patógenos, reconoce la molécula de señalización N-acilhomoserina lactona (3-hidroxi AHL), por lo que, una vez integrado en *E. coli*, esta bacteria pudo detectar hasta 10^{-9} M de AHL generando una señal de fluorescencia (expresión de eGFP) como respuesta positiva ante la presencia de los patógenos.

2.5. *Lactococcus lactis* como fabrica celular

El género *Lactococcus* está conformado por siete especies, de las que podemos mencionar a *Lactococcus lactis*, quien se caracteriza por su importancia en la industria alimentaria para la producción de productos lácteos como crema, quesos frescos y semi-duros debido a que tiene la capacidad de sintetizar enzimas y metabolitos que aportan aroma, textura sabor al producto terminado (Achigar & Pianzzola, 2014).

Es una bacteria grampositiva intestinal no colonizadora, anaerobia facultativa, en forma de coco de entre 0.5 y 1.5 μm y homoláctica (Duwat *et al.*, 2001). Forma parte del grupo de las bacterias ácido-lácticas (BAL), mediante su metabolismo de hexosas genera como producto L-ácido láctico (van de Guchte, Kok, & Venema, 1992). Debido a sus propiedades probióticas, ausencia de cuerpos de inclusión y endotoxinas fue designada como GRAS (Generally Recognized As Safe) lo que implica un uso seguro en la industria alimentaria (Samar *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2017). Además de su aplicación en la industria alimentaria, *L. lactis* es comúnmente utilizada en biología molecular por su selección diversa de clonación y vectores de expresión inducibles, hasta el grado de ser tan importante como

sistemas de expresión bacterianos de *Escherichia coli*, *Sachaccaromyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis* (Song et al., 2017).

2.5.1. Sistema de inducción por nisina (NICE)

El sistema de expresión más exitoso en *L. lactis* es el sistema de nisina, también llamado “nisin-controlled gene expression system” o sistema NICE, en donde la expresión de genes es regulada por el péptido nisina. La biosíntesis de la nisina involucra la participación del promotor *pNisA*, el cual presenta la característica de expresarse de manera constitutiva, es decir, de forma independiente a la nisina. Por lo que, permitió el desarrollo del sistema NICE. Este sistema ha llegado a convertirse en una de las herramientas más exitosas para la expresión regulada de genes heterólogos en bacterias grampositivas.

En el sistema NICE (figura 3), la nisina madura interactúa con el receptor de membrana, NisK (1), autofosforilandose (2). Este fosfato es transferido al regulador, NisR (3) promoviendo la unión de la RNA polimerasa al promotor *pNisA* (4). Lo anterior, permite la transcripción del o los genes que se encuentren delante del promotor lo que deriva en la expresión de una o varias proteínas de interés (5) (Hernandez de Rojas, 2005; MoBiTec, 2015; Olejnik et al., 2013).

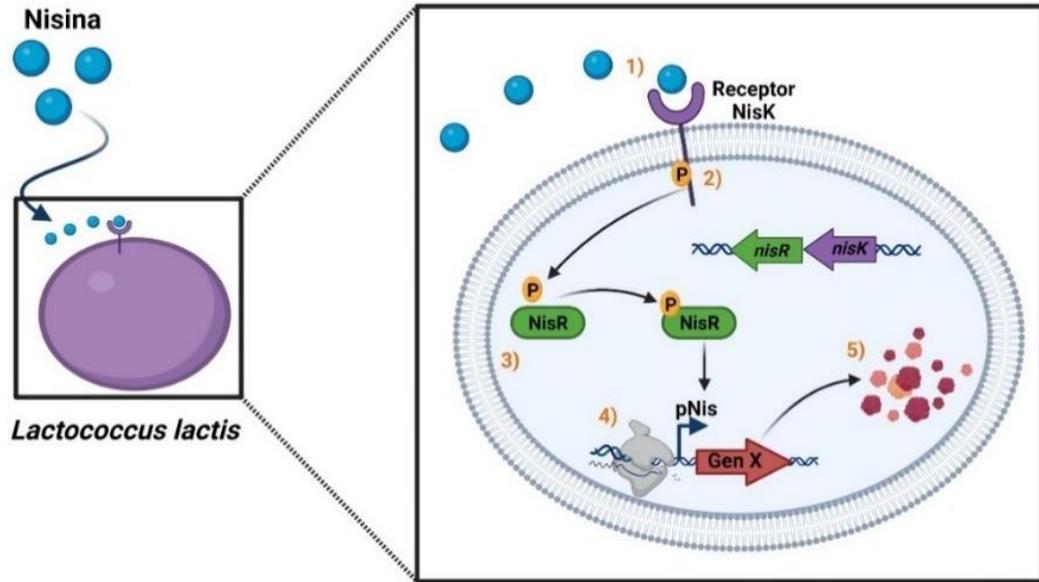


Figura 3. Esquema de sistema NICE. Tomada de Hernández de Rojas (2005), con modificaciones. La nisina madura interactúa con el receptor de membrana, NisK (1), autofosforilándose (2). Este fosfato es transferido al regulador, NisR (3) promoviendo la unión de la RNAPolimerasa al promotor *pNisA* (4). Lo anterior, permite la transcripción del o los genes que se encuentran delante del promotor lo que deriva en la expresión de una o varias proteínas de interés (5).

El mecanismo de autoinducción de la nisina para la expresión génica ha sido ampliamente utilizado en biología molecular; a partir del aislamiento de los genes de transducción de señales *nisK* y *nisR* para su inserción en el cromosoma bacteriano de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (nisina-negativa), dio como resultado la cepa NZ9000 (MoBiTec, 2015). De esta manera, cuando un gen de interés quiere ser expresado, éste se coloca río abajo del promotor inducible *pNisA* en un plásmido [por ejemplo, pNZ8149) o en el cromosoma; la expresión de ese gen puede ser inducida por la adición de nisina a concentraciones subinhibidoras al medio de cultivo. Dependiendo de la presencia o ausencia de las señales de dirección correspondientes, la proteína se expresa en el citoplasma, en la membrana o se secreta en el medio.

3. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades transmitidas por los alimentos se consideran un problema comunitario mundial (Apruzzese et al., 2019). En el caso particular de *Listeria monocytogenes* (*Lm*), su importancia radica en la gravedad de la infección, por lo que la detección oportuna es relevante a fin de garantizar la seguridad de los alimentos y la prevención de brotes de listeriosis. Con relación a lo anterior, nuevas técnicas y herramientas de detección se han ido desarrollando en los últimos años, siendo los biosensores microbianos de células completas (WCMB) herramientas de gran interés debido a la versatilidad y rentabilidad que presentan con respecto a las técnicas analíticas convencionales (Soni et al., 2018). Si bien, el desarrollo de WCMB basados en Quorum Sensing ya ha permitido la detección de patógenos de importancia alimentaria y del sector salud, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia pseudomallei*, el aprovechamiento de estos sistemas ha sido limitado.

En este contexto, no se han reportado WCMB que detecten a *Listeria monocytogenes* a través de la molécula de señalización AIP del sistema de QS Agr. Este trabajo sienta las bases del desarrollo de circuitos genéticos integrados en *Lactococcus lactis* para la generación de células recombinantes que detecten al AIP específico de *Lm*. Debido a que la sensibilidad del biosensor depende en gran medida del diseño del circuito genético, el sistema Agr funge como elemento de reconocimiento, mientras que el elemento transductor está basado en la expresión de proteínas reporteras fluorescentes, lo que permitirá una lectura visual ante la presencia del patógeno dando como resultado el desarrollo de una herramienta que contribuya en el fortalecimiento de la seguridad alimentaria.

4. HIPÓTESIS

La expresión del sistema Agr en *Lactococcus lactis* permitirá la detección del péptido autoinductor AIP de *Listeria monocytogenes*, esta interacción desencadenará la activación del promotor PII y por consiguiente la expresión de un gen reportero que emitirá una señal óptica como respuesta a la detección del patógeno.

5. OBJETIVO GENERAL

Generar un biosensor bacteriano de *Lactococcus lactis* que detecte la presencia del patógeno *Listeria monocytogenes* mediante la co-expresión del sistema de dos componentes Agr y una proteína reportera.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar el gen reportero (*gfp*, *rfp* o *mCherry*) que conformará al módulo transductor del biosensor.
2. Expresar los genes *agrC* y *agrA* de *Lm* ATCC15313 en *L. lactis* NZ3900.
3. Generar un circuito genético constituido por el elemento de reconocimiento (pNisA-*agrC/agrA*) y transductor (PII-gen reportero) en *L. lactis* NZ3900.
4. Evaluar la funcionalidad del biosensor de *L. lactis* para detectar el AIP de *Listeria monocytogenes*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cepas bacterianas

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* cepa NZ3900 (NICE®) es crecida en medio M17 (Difco TM BD, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) a 30 °C como cultivo en reposo. Las construcciones genéticas que conforman al elemento de reconocimiento y al elemento reportero se diseñan en el vector pNZ8149, y se propagan en *L. lactis* NZ3900 a 30 °C en medio Elliker con lactosa al 0.5% (MoBiTec, 2015).

Las cepas de *Listeria monocytogenes* y *L. innocua* fueron crecidos en Infusión Cerebro-Corazón (BHI) o LB (Luria-Bertani), según fuera el caso, a una temperatura de 37 °C y con agitación constante (200 rpm) (Kocot & Olszewska, 2017).

El gen *mCherry* fue obtenido del plásmido pLys M1/viob-link-mcherry (Benchling, *gfp* fue obtenido del plásmido pGlo (BIO-RAD), *sfgfp* (Bs) se obtuvo de la bioparte BBa_1746916 y *rfp* se obtuvo de la bioparte BBa_J04450 (iGEM, 2005). Los genes sintéticos *mCherry*, *agrC* y *agrA* fueron sintetizados por la empresa T4 Oligo® (Guanajuato, México).

7.2. Expresión de los genes reporteros *gfp*, *rfp* y *mCherry* en *L. lactis* a través del sistema NICE

7.2.1. Optimización de codones

Las secuencias de los genes fluorescentes fueron analizadas mediante la herramienta en línea OPTIMIZER (Puigbo et al., 2007) considerando parámetros como ENc (número efectivo de codones), CAI (índice de adaptación de codones) y el % GC, se determinó si era posible su expresión en *L. lactis*. Para generar

secuencias adaptables de un gen reportero en *L. lactis* se utilizó la herramienta en línea GenSmart™ Codon Optimization. En particular, la secuencia optimizada del gen *mCherry*, designada *mCherryO*, fue considerada para su síntesis.

7.2.2. Obtención de los genes reporteros *gfp*, *rfp* y *mCherry*

Los genes *gfp*, *rfp* y *mCherry* se amplificaron mediante PCR con Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific™, EP0401) y con pares de oligonucleótidos específicos para cada uno (tabla 3). La PCR se llevó a cabo en un termociclador C1,000™ Touch (Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones: una incubación a 95 °C por 2 min para desnaturalizar completamente la plantilla y activar la enzima, 30 ciclos que comprendían las etapas de desnaturalización a 95 °C por 30 s; alineamiento a 55 °C por 30 s; extensión a 72 °C por 42, 49 y 43 s para *gfp*, *rfp* y *mCherry*, respectivamente) y una extensión final de 72 °C, 5 min. La amplificación fue confirmada por electroforesis (120 V) en geles de agarosa al 1 % (p/v). Los productos de PCR se purificaron con el kit FavorPrep™ Gel/PCR purification Mini kit (FAVORGEN®), una vez purificados se digirieron con la enzima PstI (New England Biolabs, R0140S) durante 1 h a 37 °C, posteriormente se purificaron con el kit FavorPrep™ Gel/PCR purification Mini kit y se cuantificaron con un espectrofotómetro (Nanodrop LITE, ThermoScientific).

Tabla 3. Oligonucleótidos para la amplificación de los genes reporteros.

| Oligonucleótido | Secuencia del oligonucleótido (5'-3') |
|------------------|---------------------------------------|
| RBS-RFP-Fw/Pstl | AACTGCAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGGCTTC |
| RBS-Term-Rv/Pstl | AACTGCAGAGAGCGTTCACCGACAA |
| mCherry-Fw/Pstl | AACTGCAGATGGTGAGCAAGGGCGAG |
| mCherry-Rv/Pstl | AACTGCAGTTAGGTGGAGTGGCGGCC |
| mCherryO-Fw/Pstl | CAAAACTGCAGATGGTTTCTAAAGGCGA |
| mCherryO-Rv/Pstl | CAAAACTGCAGTTACTTGTAAGTTCATCCATC |
| GFP-Fw/Pstl | CAAAACTGCAGATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTTT |
| GFP-Rv/Pstl | CAAAACTGCAGTTATTTGTAGAGCTCATCCAT |

7.2.3. Obtención del vector de clonación pNZ8149

Un cultivo de 5mL de *L. lactis*/pNZ8149 se incubó durante 16 h a 30 °C. Posteriormente, se extrajo DNA plasmídico acorde a las indicaciones que se señalan en el manual NICE de MoBiTec (2015) (Protocolo 2). El DNA plasmídico fue digerido con la enzima PstI, durante 1 h a 37 °C y desfosforilado con fosfatasa alcalina CIP (New England Biolabs, M0525S) por 1 h adicional a 37 °C. Después, se purificó y cuantificó el contenido de DNA con un espectrofotómetro.

7.2.4. Clonación de los genes reporteros en *L. lactis*

pNZ8149 digerido y purificado fue ligado a *gfp*, *rfp*, *mCherry* y *mCherryO* con la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs, M0202S) a una temperatura de 16 °C durante un periodo de 16 h. Las concentraciones de fragmento y vector fueron calculadas con la herramienta en línea NeBicalculator en una concentración 3:1 inserto:vector.

El producto de ligación se propagó en células electrocompetentes de *L. lactis* mediante electroporación (protocolo 3). Las colonias crecidas fueron evaluadas para asegurar la presencia de cada construcción generada: pNisA-*gfp*, pNisA-*rfp*, pNisA-*mCherry* y pNisA-*mCherryO*. Para ello se extrajo, DNA plasmídico y se realizó una digestión enzimática con PstI. Se consideraron colonias positivas aquellas que liberaban dos bandas, correspondientes pNZ8149 (2550 pb) y al gen, es decir 690, 812 y 711 pb para *gfp*, *rfp* y *mCherry*, respectivamente. Fue necesario evaluar el sentido transcripcional mediante PCR, utilizando los pares de oligonucleótidos pNisA-Fw y el oligonucleótido reverso de cada gen.

7.2.5. Estandarización de parámetros de inducción para la expresión de proteínas en *L. lactis* mediante el sistema NICE

Considerando la construcción pNisA-mCherryO se establecieron los parámetros óptimos de inducción del sistema NICE como tiempo de inducción, control de pH y concentración del inductor (tabla 4).

Tabla 4. Parámetros evaluados para estandarizar condiciones óptimas para la expresión de proteínas en *L. lactis*.

| Parámetro | Rango para evaluar* |
|------------------------------------|------------------------------------|
| Concentración del inductor (ng/mL) | 0, 10, 40, 80, 200 |
| Tiempo de inducción (h) | 3, 4, 6, 12, 16, 24 |
| pH** | Controlado (6-6.7) y sin controlar |

*Datos basados en ensayos anteriores propios.

**El pH se controló con la adición de NaOH 5 M durante el tiempo de inducción.

Un precultivo de *L. lactis* en 5 mL de M17 con lactosa al 0.5% fue crecido por 16 h a 30 °C. Como control se utilizó la cepa nativa de *L. lactis* y *L. lactis*/pNZ8149; bajo las mismas condiciones, fueron crecidas hasta una O.D.₆₀₀ de 0.4. Posteriormente, se llevó a cabo una inducción con las diferentes concentraciones de nisina durante 24 h. Las células bacterianas inducidas se recolectaron y centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min, posteriormente se lavaron y resuspendieron en buffer de Urea 5 M pH 7.6 y se colocaron en un baño de hielo para someterse a ultrasonidos de potencia (Disruptor de células ultrasónicas, BIOBASE, China). Los parámetros del programa de sonicación utilizados fueron: amplitud al 40%, tiempo de proceso de 4 min, con pulsos de encendido y apagado de 9 s cada uno. Una vez finalizado el rompimiento de las células, se recolectó el sobrenadante mediante centrifugación a 10,000 rpm por 3 min. El perfil proteico de los sobrenadantes se evaluó mediante SDS-PAGE utilizando geles Tris-Glicina al 12% siguiendo el protocolo descrito por Schägger (2006) (protocolo 7). Se realizó una tinción con azul de Coomassie (50% metanol, 10% ácido acético, 40% agua

destilada y 0.05% p/v de azul de Coomassie) esperando una banda de 26.7 kDa correspondiente a la proteína mCherry.

Para los siguientes ensayos, las cepas recombinantes de *L. lactis* pNisA-gfp, pNisA-rfp, pNisA-mCherry y pNisA-mCherryO fueron inducidas con la concentración de inductor con la que de manera cualitativa se observó una mayor coloración del pellet celular por la producción de mCherry, es decir, 80 ng/mL de nisina. El proceso de inducción, sonicado y electroforesis se llevó acorde a lo descrito anteriormente, considerando el tiempo y pH óptimo para la inducción. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie para observar bandas de 26.8, 25.4 y 26.7 kDa para las proteínas GFP, RFP y mCherry, respectivamente.

7.2.6. Reacción en cadena polimerizada de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

La extracción de RNA total se realizó con el reactivo de aislamiento de RNA TRIzol Reagent (ABP Biosciences FP312.) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (protocolo 7). Seguido de ello, se realizó una RT-qPCR por triplicado para cada muestra en un sistema de PCR en tiempo real CFX Connect™ (Bio-Rad). La mezcla maestra se preparó usando 4 ng/ μ L de RNA total transcrito de forma inversa; 5 μ L SYBR® Green Supermix (BIO-RAD); 1 μ L del oligonucleótido Forward y 1 μ L del reverso a 1 μ M; 1 μ L de agua tratada con DEPC. Los oligonucleótidos para cada gen (tabla 5) se diseñaron utilizando el software en línea Primer3web 4.1.0 (Untergasser, *et al.*, 2012). El programa de ciclos térmicos en Bio-Rad CFX Manager 2.1 (Bio-Rad, EE. UU.) fue: Una etapa de desnaturalización a 95 °C durante 3 min; una etapa de amplificación y cuantificación repetido 40 \times (95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min); y una etapa de curva de fusión (60–95 °C). Se realizó una prueba de Tukey para el ANOVA con un valor de $p \leq 0.05$ utilizando el software SPSS Statistics (IBM Corp., Armonk, Nueva York).

La expresión génica relativa se calculó utilizando el método de umbral de ciclo comparativo (Livak & Schmittgen, 2001). El nivel de expresión de cada gen se

normalizó frente al nivel de expresión promedio del gen de referencia 16S rRNA (número del gen en la base de datos) de *L. lactis*. El cambio en la expresión de los genes objetivo en cada tratamiento se calculó mediante la siguiente ecuación: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = (\text{gen objetivo Ct} - \text{genes de referencia Ct promedio})_{\text{tratamiento}} - (\text{gen objetivo Ct} - \text{genes de referencia Ct promedio})_{\text{control}}$ (Castrillón-Arbeláez et al., 2012). Los valores informados son la media de tres repeticiones \pm SD de un experimento representativo.

Tabla 5. Oligonucleótidos para la amplificación de los genes fluorescentes mediante RT-qPCR.

| Nombre del gen | Oligonucleótido Forward (5'-3') | Oligonucleótido Reverso (5'-3') |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <i>gfp</i> | ATGGTGTTC AATGCTTTTCCCG | TCGAGTTTGTGTCCGAGAATGT |
| <i>rfp</i> | ATCGAAGGTGAAGGTGAAGGTC | GTTCCCATTTGAAACCTTCCGG |
| <i>mCherry</i> | GCCATCATCAAGGAGTTCATGC | AAGGACAGCTTCAAGTAGTCGG |
| <i>mCherry-O</i> | AAGCAAGTTCGGAGCGTATGTA | TATAGGCACCCGGAAGTTGAAC |
| <i>16S rRNA</i> | TTTAAACAAGCACTGACCGAGC | CGCAATATTCGTGGTCCTAAGC |

7.2.7. Inmunodetección de GFP por Westernblot

Se realizó una electroforesis en gel de acrilamida al 12 % (SDS-PAGE) con extractos de proteína de pNisA-gfp. Las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF; Bio-Rad, 1620177) para llevar a cabo un Western blot (WB) siguiendo el protocolo descrito por Abraham-Juárez, M. J. (2019) con modificaciones (protocolo 7), que consiste en la transferencia semiseca de la proteína, bloqueo e incubación con anticuerpo primario anti-GFP policlonal de ratón en una relación 1:1 000. La proteína GFP se detectó mediante quimioluminiscencia con anticuerpo secundario conjugado con HRP (Horseradish Peroxidase) en relación 1:4 000.

7.3. Expresión de los genes *agrC*, *agrA* en *Lactococcus lactis* NZ3900

7.3.1. Diseño de la construcción pNisA-*agrCA*

Como primer paso, se llevó a cabo la extracción de DNA genómico (protocolo 1) de *Listeria monocytogenes* ATCC15313 mediante el método de Kutchma y colaboradores (1998). Del DNA genómico se amplificaron los genes *agrC* y *agrA* con la DNA polimerasa de alta fidelidad Q5[®] (NEB, M0491) y los oligonucleótidos *agrCA*-Fw/PstI y *agrCA*-Rv/PstI. Las condiciones en la PCR fueron: 98 °C durante 30 s; seguido de 30 ciclos de 10 s a 98 °C y 30 s a 55 °C; amplificación a 72 °C durante 32 s; y una extensión final de 72 °C durante 5 min. El producto de PCR se purificó y digirió con la enzima PstI durante 1 h a 37 °C, posteriormente se purificó nuevamente y se cuantificó para llevar a cabo la ligación de inserto: vector, y propagación en células de *L. lactis*.

Las colonias recombinantes fueron evaluadas para asegurar la presencia de la construcción pNisA-*agrCA* mediante digestión enzimática con PstI, siendo positivas aquellas que liberaban dos bandas; es decir, el vector pNZ8149 (2550 pb) y los genes *agrCA* (2043 pb). Fue necesario evaluar el sentido transcripcional mediante PCR, utilizando los pares de oligonucleótidos *pNis*-Fw/*agrCA*-Rv y *pNis*-Fw/*agrCA*-Fw. Las condiciones en la PCR fueron: 98 °C durante 30 s; seguido de 30 ciclos de 10 s a 98 °C y 30 s a 55 °C; amplificación a 72 °C durante 45 s; y una extensión final de 72 °C durante 5 min.

7.3.2. Diseño de la construcción pNisA-*agrCAO*

Las secuencias de los genes *agrC* y *agrA* de *Lm* fueron analizadas y optimizadas considerando los parámetros evaluados en la sección 7.2.1, para su posterior síntesis por la empresa T4 Oligo[®] (Guanajuato, México). *agrC* y *agrA*, son genes en tándem, separados por una secuencia corta de pares de bases y un RBS, por lo tanto, para el diseño de los genes sintéticos estas secuencias no se modificaron.

Los oligonucleótidos utilizados para la clonación de los genes sintéticos fueron diseñados con la herramienta en línea NEBuilder® Assembly tool, versión 2.10.1 (tabla 7). Los genes *agrC* y *agrA* fueron amplificados con la Q5 polimerasa y el par de oligonucleótidos *agrCA_fwd*-Gibson y *agrCA_rev*-Gibson. Las condiciones en la PCR fueron: 98 °C durante 30 s; seguido de 30 ciclos de 10 s a 98 °C y 30 s a 65 °C; amplificación a 72 °C durante 1 min 2 s; y una extensión final de 72 °C durante 2 min. Por otra parte, pNZ8149 también fue amplificado por PCR, bajo las condiciones anteriores, con una temperatura de extensión de 68 °C y un tiempo de amplificación de 1 min 17 s. Los productos de PCR se purificaron y almacenaron a -20 °C para su posterior uso.

El vector pNZ8149 fue tratado con la enzima Fast Digest DpnI para eliminar el DNA molde. A continuación, se realizó una purificación del vector y se cuantificó la concentración de DNA para calcular la cantidad de vector e inserto necesarios para su ensamblaje en una relación 1:3 (pNZ8149: *agrCA*) utilizando el kit Gibson Assembly® Master mix (NEB, #E2611S/L).

Con los oligonucleótidos *agrA_O-Fw* y *RBS-agrA_O/Rv* se aumentó el número de copias de DNA ligado en el ensamblaje de Gibson mediante una PCR con la Q5 polimerasa. Previo a la PCR, el oligonucleótido reverso se fosforiló en el extremo 5' con la enzima T4 polinucleótido quinasa PNK (Thermo Scientific™, EK0031) siguiendo las indicaciones del proveedor: 5 µl de oligonucleótido reverso 100 mM, fueron adicionados a la mezcla de reacción para la fosforilación (2 µl 10X reaction buffer A, 2 µl ATP 10 mM, 1 µl PNK, 10 µl agua) e incubados a 37 °C durante 20 min, posteriormente PNK fue inactivada a 75 °C por 10 min.

Las condiciones en la PCR fueron: 98 °C durante 30 s; seguido de 30 ciclos de 10 s a 98 °C y 30 s a 59 °C; amplificación a 72 °C durante 50 s; y una extensión final de 72 °C durante 5 min. El producto de PCR se purificó, se ligó y propagó en células electrocompetentes de *L. lactis*.

Tabla 6. Oligonucleótidos para la clonación de los genes sintéticos *agrC*, *agrA* en *L. lactis*

| Oligonucleótido | Secuencia del oligonucleótido (5'-3') |
|--------------------|--|
| pNZ8149_fwd-Gibson | CCATGGGTACTGCAGGCATG |
| pNZ8149_rev-Gibson | TGAGTGCCTCCTTATAATTTATTTTGTAGTTC |
| agrCA_fwd-Gibson | ttataaggaggcactcaATGTTTTCAATTCTTATGGC |
| agrCA_rev-Gibson | ctgcagtacctatggTTAAAGTGAAAGTGATTTAATAAGTTTTG |
| agrA_O-Fw | ATGCTTCCAGTTTTTATTTGTGAAGA |
| RBS-agrA_O/Rv | AAATTCATCACCATTTTTCTACATAATTTCAAGT |

7.3.3. Diseño de la construcción pNisA-agrC-linker-sfGFP (Bs)

Para el monitoreo de la expresión e inserción en membrana de la proteína AgrC, se realizó la construcción genética pNisA-agrC-linker-sfgfp (Bs) por ensamblaje con el kit Gibson Assembly® Master mix. Para ello, se generaron dos fragmentos de DNA a través de PCR. DNA de pNisA-agrCA fue utilizado como molde para amplificar el fragmento 1 de 3849 pb, que corresponde al vector pNZ8149 completo y al gen *agrC* sin su codón de paro (TAG) a través de los oligonucleótidos GibsFw_PstI-pNZ8149 y GibsRv-linker-agrC-sinSTOP (tabla 7), los cuales contiene una secuencia enlazadora GSGSG para su adición en el extremo C-terminal de la proteína AgrC. *sfgfp* se amplificó con los oligonucleótidos GibsFw_linker-sfGFP (Bs) y GibsRv_pNZ8149-PstI-sfGFP (Bs) generando el fragmento 2 (717 pb). Las condiciones de PCR fueron: 98 °C durante 30 s; seguido de 30 ciclos de 10 s a 98 °C y 30 s a 65 °C; amplificación a 72 °C durante 1 min 56 s y 22 s para el fragmento 1 y 2, respectivamente; y una extensión final de 72 °C durante 5 min. Los fragmentos generados se purificaron y cuantificaron. Se utilizó la herramienta en línea NEBcalculator para obtener las concentraciones de DNA necesarias para su ensamblaje. Posteriormente, el producto obtenido se dializó mediante una membrana de corte de 0.22 µm y 3 µL se utilizaron para transformar células electrocompetentes de *L. lactis*.

Tabla 7. Oligonucleótidos para la construcción pNisA-agrC-linker-sfgfp (Bs).

| Oligonucleótido | Secuencia del oligonucleótido (5'-3') |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| GibsFw_PstI-pNZ8149 | CTGCAGGCATGCGGTACCACT |
| GibsRv-linker-agrC-sinSTOP | ACCACTACCACTACCCATAATTTCTAATTC |
| GibsFw_linker-sfGFP(Bs) | gggtagtggttagtggtATGTCAAAGGAGAAGAG |
| GibsRv_pNZ8149-PstI-sfGFP(Bs) | accgcatgcctgcagTACTTATAAAGCTCATCCATG |

Oligonucleótidos diseñados con la herramienta en línea NEBuilder® Assembly tool.

7.3.4. Ensamblaje del circuito genético del biosensor

Las construcciones genéticas pNisA-agrCA y pNisA-agrCAO se utilizaron como molde para generar el biosensor B1SO (pNisA-agrCA-Pll/mCherryO) y B1 (pNisA-agrCAO-Pll/mCherryO), respectivamente. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de pNisA-agrCA y pNisA-agrCAO (vector: 4593 pb), promotor Pll (inserto 1: 244 pb) y RBS-mCherryO (inserto 2: 1025 pb), se muestran en la tabla 9. Las condiciones de PCR con la Q5 polimerasa fueron las mismas para los tres fragmentos a excepción de la temperatura de alineamiento (57 °C, 53 °C y 60 °C, respectivamente) y tiempo de extensión (2 min 18 s, 8 s y 31 s, respectivamente). Una vez generados los 3 fragmentos, éstos fueron purificados y cuantificados para llevar a cabo el ensamblaje con el kit Gibson Assembly® Master mix; se utilizó la herramienta en línea NEBicalculator para obtener las concentraciones de vector: inserto 1: inserto 2 en una relación 1:5:3. El número de copias del biosensor que se ligó se aumentó por PCR con los oligonucleótidos agrA_O-Fw y RBS-agrA_O/Rv mediante una PCR con la Q5 polimerasa. Las condiciones de PCR fueron: 98 °C durante 30 s; seguido de 30 ciclos de 10 s a 98 °C y 30 s a 56 °C; amplificación a 72 °C durante 2 min 54 s; y una extensión final de 72 °C durante 5 min para una amplificación de 5806 pb. El producto de PCR se purificó y ligó, finalmente se propagó en células electrocompetentes de *L. lactis*.

Tabla 8. Oligonucleótidos para la generación del biosensor B1 y B1SO mediante ensamble de Gibson.

| Oligonucleótido | Secuencia |
|-------------------|---|
| pNisA-agrCA_fwd | GTTTCTGAGACGTTTTAGC |
| pNisA-agrCA_rev | GATTTGATTGTTCTATCGAAAG |
| pNisA-agrCAO_fwd | GTTTCTGAGACGTTTTAGC |
| pNisA-agrCAO_rev | GATTTGATTGTTCTATCGAAAG |
| PII_fwd | ttcgatagaacaatcaaatcGTTTTTTTTATGAATAAACTCACTTAAATAAA ATATTAATATG |
| PII_rev | tttagaaacatCTAATTCACCTCCACTAATATTTTAC |
| mCherryO-term_fwd | tgaattagATGGTTTCTAAAGGCGAAG |
| mCherryO-term_rev | ctaaaacgtctcagaaacTAATTTATAAATAAAAAAACCACCTCTAAAAG |

Oligonucleótidos diseñados con la herramienta en línea NEBuilder® Assembly tool

7.3.5. Generación de variantes del biosensor

El biosensor B1 se utilizó para el diseño de variantes nombradas biosensor 2, 3 y 4 (tabla 10). A la secuencia de los biosensores B2 y B4 se adicionaron las bases correspondientes al RBS de *L. lactis* (AAGGAG) y bases espaciadoras entre RBS y ATG del gen *agrA*. Los biosensores B3 y B4 fueron deletados de una región espaciadora de 23 pb ubicada entre el RBS del promotor PII y el ATG de *mCherryO*.

Tabla 9. Deleciones y mutaciones en las secuencias de los biosensores B2, B3 y B4.

| Biosensor | Secuencia <i>agrC-RBS-agrA</i> | Secuencia <i>RBS-mCherryO</i> |
|-----------|-------------------------------------|---|
| 1 | AAAAATGGTGATGAATTT | GAGGTGAATTAGGAAGGAACTACAAAA TAAATTATAAGGAG |
| 2 | AAAAATGGTGATGAATTTAAGGAG GCACTCA | GAGGTGAATTAGGAAGGAACTACAAAA TAAATTATAAGGAG |
| 3 | AAAAATGGTGATGAATTT | GAGGTGAATTAGAAGGAG |
| 4 | AAAAATGGTGATGAATTTAAGGAG GCACTCA | GAGGTGAATTAGAAGGAG |

Las letras rojas indican la adición de pares de bases en la secuencia. Las letras azules indican la conservación de pares de bases en la secuencia del biosensor. AAGGAG. RBS de *L. lactis*.

Para la amplificación y ligación de la secuencia del biosensor, los oligonucleótidos reversos (tabla 11) fueron fosforilados en el extremo 5' (sección 7.3.2). Las secuencias de los oligonucleótidos se describen en la tabla 9, siendo WB2_FW_agrAO y WB2_Rv_RBSagrAO para el biosensor 2, WB2_Fw_RBSLI_mCherryO y WB2_RV_RBSLI_PII para el biosensor 3. El biosensor 4 fue generado a partir del biosensor 2 y utilizando los oligonucleótidos WB2_Fw_RBSLI_mCherryO y WB2_RV_RBSLI_PII. A partir de una PCR con la Q5 polimerasa se generaron las variantes del biosensor 1. Las condiciones de PCR fueron: 98 °C durante 30 s; seguido de 30 ciclos de 10 s a 98 °C y 30 s a 56 °C; amplificación a 72 °C durante 2 min 54 s; y una extensión final de 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR fueron purificados y posteriormente tratados con la enzima DpnI. El producto de PCR se purificó y ligó, finalmente se propagó en células electrocompetentes de *L. lactis*.

Tabla 10. Oligonucleótidos para la clonación

| Oligonucleótido | Secuencia del oligonucleótido (5'-3') |
|-----------------------|--|
| WB2_FW_agrAO | GCACTCAATGCTTCCAGTTTTTATTTGTGAAGA |
| WB2_Rv_RBSagrAO | CTCCTTAAATTCATCACCATTTTTCTACATAATTTCAAGTTC |
| WB2_Fw_RBSLI_mCherryO | AAGGAGGCACTCACCATGG |
| WB2_RV_RBSLI_PII | CTAATTCACCTCCACTAATATTTTACAACG |

Una colonia de cada una de las variantes generadas fue crecida en medio LB/Amp¹⁰⁰/Cam³⁴ a 37 °C durante 16 h, para después extraer DNA plasmídico. El DNA obtenido se mandó secuenciar a la Unidad de Síntesis y secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología-UNAM (Cuernavaca, Morelos, México) para verificar las modificaciones correspondientes en la secuencia de cada variante.

7.3.6. Inmunodetección de AgrA en *L. lactis*

Cultivos de *L. lactis* con las construcciones pNisA-AgrCA, pNisA-AgrCAO, y los diferentes biosensores fueron sometidos a una inducción con nisina en concentraciones de 10, 40 y 80 ng/mL por un periodo de 16 h a un pH en el rango de 6-6.7; las células fueron recolectadas por centrifugación, seguido de 2 lavados con agua destilada estéril y finalmente resuspendidas en buffer de urea 5 M pH 7.6. Después se colocaron en un baño de hielo para someterse a disrupción celular mediante ultrasonidos de potencia. Se realizó una electroforesis en gel de acrilamida al 12% con los extractos de proteína, seguido de una transferencia semiseca a una membrana de PVDF para proseguir con WB, utilizando como anticuerpo primario anti-AgrA policlonal (anexo 1) de manera individual, en una relación 1:500. Como anticuerpo secundario, se utilizó Anti-ratón, conjugado con fosfatasa alcalina (AP).

7.3.7. Detección por fluorescencia de AgrC

L. lactis con la construcción genética pNisA-agrC-linker-sfGFP (Bs), se creció durante 16 h a 30 °C. A 50 mL de M17 suplementado con lactosa 0.5% se adicionaron 2 mL de células, se incubaron a 30 °C hasta alcanzar una O.D. _{600 nm} de 0.4. 25 mL de células se indujeron con nisina a 80 ng/mL por un periodo de 16 h a un pH en el rango de 6-6.7 y 30 °C. Las células se observaron a través de un microscopio óptico (ZEISS, Axio Imager) con un filtro para fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 470–490 nm y emisión 510–530 nm.

7.4. Evaluación de la funcionalidad del biosensor

7.4.1. Expresión del sistema Agr en cepas de *Listeria monocytogenes* a través de la formación de biopelículas

Para corroborar que *Listeria monocytogenes* estaba expresando el sistema Agr, se llevó a cabo la generación de biopelículas para posteriormente detectar a la proteína AgrA. Siguiendo el protocolo de West y colaboradores (2023) con algunas modificaciones, las cepas de *Listeria monocytogenes* ATCC15313, ATCC19115, LUX y *L. innocua* ATCC33090, fueron utilizadas para este ensayo. Un precultivo de cada cepa fue crecido en BHI a 37 °C durante 16 h. 5 mL de medio LB se inocularon considerando una dilución 1:100, en una caja de Petri de 8.5 cm de diámetro, el cultivo se incubó a 37 °C, sin agitación, durante 24, 48, 72 y 96 h. Seguido de ello, el medio fue retirado y la biopelícula formada en el fondo se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril y se recolectó para su posterior centrifugación a 13 000 rpm durante 3 min. El pellet se resuspendió en 200 µL de Buffer de Urea 5 M pH 7.8. y se sonicó por 2 min a 40% de amplitud, 9 s ON y 9 s OFF. El lisado se preparó para su análisis por WB utilizando el anticuerpo primario anti-AgrA en una relación 1:500, siguiendo la metodología de la sección 7.3.6. Estos ensayos fueron realizados utilizando tres réplicas biológicas y cuatro réplicas técnicas.

7.4.2. Efecto del AIP1 sobre la formación de biopelículas en cepas de *Listeria*

Una manera rápida de evaluar si el péptido sintético es reconocido por el sistema Agr de Lm es adicionarlo a cultivos de la bacteria, esperando como resultado un aumento en la formación de biopelícula debido a su importancia en el desarrollo y maduración de ésta. Para este ensayo se utilizó como inductor el AIP1 con secuencia de aminoácidos A(CFMFV) (West, et al., 2023; Bejder, et al., 2024).

Cultivos de *Lm* ATCC15313, ATCC19115, Lux y *L. innocua* ATCC33090, fueron crecidos en BHI a 37 °C, 200 rpm, por un periodo de 16 h. Posteriormente el cultivo se diluyó en relación 1:100 en medio LB fresco. Siguiendo la metodología de West y colaboradores (2023), 198 µL de cultivo se adicionaron por triplicado en una placa de 96 pocillos. Se adicionaron 2 µL del péptido sintético partiendo de una solución stock para una concentración final de 10⁻⁷ M y 10⁻⁸ M. Como controles, se utilizó medio LB estéril y triplicados de cada cultivo bacteriano sin el AIP1. La placa se incubó a 37 °C por 24 h. Las células planctónicas recuperaron y almacenaron a -20 °C para su posterior uso, mientras que la biopelícula formada se lavó con agua destilada estéril para eliminar las células planctónicas restantes. Se añadieron 200 µL de metanol para fijar la biopelícula a la placa, se incubó 10 min y posterior a retirar el metanol, se secó a temperatura ambiente. Se añadieron 200 µL de una solución de cristal violeta al 0.1% y se dejó en reposo por 10 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se secó. Posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada de manera suave, se secó 10 min y se adicionaron 200 µL de ácido acético al 33%, se homogeneizó e incubó 10 min más a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó una lectura a 595 nm de longitud, los datos se normalizaron respecto al control LB.

7.4.3. Determinación de la expresión del sistema Agr de *Lm* ATCC15313 y *Lm* ATCC19115 en cultivo líquido

De acuerdo con resultados previos, para este ensayo se evaluaron únicamente las cepas de *L. monocytogenes* ATCC15313 (no hemolítica) y ATCC19115 (hemolítica). Cultivos nocturnos de *Lm* se utilizaron para inocular medio BHI fresco en relación 1:100. Estos fueron incubados a 37 °C a 200 rpm. Se recolectaron alícuotas de 5 mL al alcanzar una O.D. _{600 nm} de 0.6, 0.8 y 1.0 que corresponden a la fase logarítmica de la bacteria y a las 24 h de crecimiento correspondiente a la fase estacionaria tardía, en donde se ha reportado una mayor acumulación de AIP (West, et al., 2023; Bejder, et al., 2024). El pellet fue recuperado por centrifugación a 4000 rpm, 15 min a 4 °C y el sobrenadante posterior a su

filtración por una membrana de 0.22 μm se mantuvo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior liofilización.

El tratamiento de pellet se llevó a cabo siguiendo la metodología reportada por Lopes-Luz y colaboradores (2023). El pellet se resuspendió en 100 μL de buffer de lisis (50 mM Tris HCl pH 8, 300 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 2 mg/mL lisozima), se incubó por 30 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ para permitir la degradación de la pared celular, Después se sonicó 2 min cada suspensión a una amplitud de 40 %, 9 s ON y 9 s OFF. El lisado se utilizó para inmunodetección de la proteína AgrA. Para ello, 10 μL del lisado se mezclaron con 10 μL de Buffer Laemmly 2X. Las muestras se hirvieron por 5 min y se cargaron 20 μL en geles de poliacrilamida al 12 %. Se siguió el protocolo de WB descrito anteriormente.

7.4.4. Determinación de la concentración y tiempo óptimos para la expresión del sistema Agr en células biosensoras

Los biosensores B1 (optimizado) y B1SO (sin optimizar) fueron utilizados para evaluar el efecto de la concentración de nisina sobre el crecimiento celular y para determinar el tiempo mínimo en el que se expresa el sistema Agr.

Partiendo de un cultivo de 16 h se inoculó medio fresco M17 suplementado con lactosa al 0.5 %. Se utilizó una microplaca de 96 pocillos para llevar a cabo una cinética de crecimiento. Se utilizaron 12 pocillos para tener triplicados por biosensor y por concentración de nisina, y en cada uno se agregaron 200 μL . La placa se incubó a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y sin agitación en un lector multimodal (Synergy™ HTX). Al alcanzar una O.D. $_{600\text{ nm}}$ de 0.4, el cultivo restante se indujo con nisina (1 mg/mL) quedando a las concentraciones finales de 10, 40 y 80 ng/mL. Se realizaron lecturas de densidad óptica cada 30 min por un periodo total de 24 h.

A la par, alícuotas de 25 mL inducidas con nisina a una concentración final de 80 ng/mL fueron recolectadas cada 3 h por un periodo de 24 h. Las células se recuperaron por centrifugación a 4000 rpm por 10 min. El pellet fue tratado para

llevar a cabo la detección de la proteína AgrA siguiendo el protocolo para WB (protocolo 7).

7.4.5. Detección de AIP proveniente de biopelículas

Una vez que se corroboró la expresión de la proteína AgrA como control del sistema Agr, en Lm y en las células biosensores B1 y B1SO. El ensayo de detección de AIP se realizó a través de la generación de biopelículas, en sobrenadantes concentrados e induciendo con AIPs sintéticos.

La generación de biopelículas se realizó conforme a lo descrito en la sección 7.4.1. Solo se consideró un tiempo de 24 h para la formación de la biopelícula y utilizando la celda de Lm ATCC15313. Posteriormente se realizaron los lavados correspondientes con agua estéril y se llevó a cabo la preparación de las células sensoras.

Cultivos de *L. lactis* B1 y B1SO fueron cultivados a 30 °C por 16 h. Posterior a ello, se llevó a cabo el proceso de inducción con una concentración final de nisina de 40 ng/mL. Los cultivos fueron inducidos por un periodo de 6 h. Posteriormente se recuperó el pellet mediante centrifugación a 4000 rpm a 4 °C por 10 min. Las células se lavaron con agua destilada para eliminar exceso de nisina, se centrifugaron a 4000 rpm a 4 °C por 10 min. Las células se resuspendieron en el mismo volumen inicial con medio M17 suplementado con 0.5% de lactosa. Alícuotas de 10 mL de cultivo fueron adicionados a las biopelículas e incubadas durante 16 h a 30 °C. Posteriormente se centrifugó 10 min a 4000 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 µL de Buffer de lisis. Se sonicó durante 2 min a 40% de amplitud, 9 s ON, 9 s OFF. La muestra se trató para ser utilizada en análisis por WB, utilizando como anticuerpo primario anti-mRFP en una relación 1:500.

7.4.6. Detección de AIPs sintéticos y proveniente de sobrenadante

Alícuotas de 5 mL del sobrenadante de Lm ATCC15313 obtenidos a una O.D. $_{600\text{ nm}}$ de 0.6, 0.8, 1.0 y 24 h (consultar sección 7.4.3) fueron congelados durante 24 h y posteriormente liofilizados por 24 h. Para reconstituir el liofilizado, se siguió parte de la metodología descrita por West y colaboradores (2023). Cada liofilizado se resuspendió en 500 mL de agua destilada estéril para tener un stock concentrado a 10 X. Los liofilizados reconstituidos que se obtuvieron en las primeras 8 h se mezclaron (O.D. $_{600\text{ nm}}$ 0.6, 0.8, 1.0) para tener una sola solución stock mientras que el sobrenadante de 24 h se evaluó de manera individual, se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

AIP1 y AIP2 fueron resuspendidos en DMSO puro para obtener una solución madre 10 mM, estos se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en oscuridad.

Para este ensayo solo se trabajó con células del biosensor B1SO. Partiendo de un precultivo de 16 h, se inoculó medio M17 suplementado con 0.5 % de lactosa. Al alcanzar una O.D. $_{600\text{ nm}}$ de 0.4 se indujo con nisina para una concentración final de 40 ng/mL por un periodo de 6 h. Las células inducidas se prepararon para los ensayos siguientes (sección 7.4.6). A alícuotas de 25 mL de cultivo se adicionaron concentraciones de AIP en el rango de 1 nM hasta 5 μM , mientras que los liofilizados se adicionaron en concentraciones de 0.006 X a 0.05 X (tabla 11). Para este ensayo se consideraron tres réplicas biológicas y una réplica técnica. Las células se incubaron a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 h. Seguido de ello, se recuperó el pellet y este fue tratado para su uso en WB, para determinar la expresión de la proteína mCherry, utilizando el anticuerpo primario mRFP (anexo 2) en una relación 1:500. Como controles del ensayo se realizó PCR, para comprobar la presencia del circuito genético del biosensor y WB para asegurar que si se estaba expresando la proteína AgrA.

Tabla 11. Diseño factorial mixto para la interacción Biosensor-AIP.

| Tratamiento | Descripción | Concentración* | | | | | | | |
|-------------|------------------|----------------|---------|---------|---------|--------|--------|-----------|-----------|
| A | AIP1 M(CFMFV) | 0 | 1 nM | 10 nM | 50 nM | 100 nM | 500 nM | 1 μ M | 5 μ M |
| B | AIP 2 A(CFMFV) | | | | | | | | |
| C | Liofilizado 8 h | 0 | 0.006 X | 0.012 X | 0.025 X | 0.05 X | | | |
| D | Liofilizado 24 h | | | | | | | | |

* Las concentraciones de AIP se estimaron en base a estudios previos (Keizers *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2021).

8. RESULTADOS

8.1. Evaluación de los genes fluorescentes *gfp*, *rfp*, *mCherry* para su expresión en *L. lactis*

8.1.1. Sesgo y optimización de codones

La expresión de proteínas recombinantes provenientes de organismos estrechamente relacionados casi siempre es posible, por el contrario, cuando la secuencia del gen que quiere ser expresado contiene codones que el huésped rara vez utiliza, la síntesis de la proteína puede ser baja y poco confiable, es decir, puede presentar un plegamiento incorrecto en su estructura final y con ello se ve afectada su actividad, siendo una limitación de la expresión de proteínas heterólogas. En este sentido, el uso de codones sinónimo es una estrategia que permite generar secuencias genéticas optimizadas que pueden ser reconocidas por la maquinaria de transcripción del hospedero dando lugar a la expresión adecuada de las proteínas de interés. En este estudio se determinaron parámetros como el índice de adaptación de codones (CAI), el número eficiente de codones (ENc) y el porcentaje de GC (% GC) de los genes fluorescentes *gfp*, *rfp* y *mCherry* para evaluar la probabilidad de que puedan ser expresados en *L. lactis* (tabla 14). *gfp*, *rfp* y *mCherry*, presenta un valor de CAI por debajo de 0.5, si se considera como óptimo un valor de 1, se puede inferir la baja traducción del mRNA en proteína.

Tabla 12. Evaluación de la adaptación de los genes fluorescentes en *L. lactis*.

| GEN | Secuencia original | | | | Secuencia optimizada para <i>L. lactis</i> | | | |
|----------------|--------------------|-----|------|------|--|-----|------|------|
| | CAI | ENc | % GC | % AT | CAI | ENc | % GC | % AT |
| <i>gfp</i> | 0.497 | 48 | 41.4 | 58.6 | 0.566 | 50 | 35.8 | 64.2 |
| <i>rfp</i> | 0.335 | 21 | 50.3 | 49.7 | 0.548 | 51 | 38.8 | 61.2 |
| <i>mCherry</i> | 0.13 | 23 | 62.7 | 37.3 | 0.563 | 49 | 37.6 | 62.4 |

CAI: Índice de adaptación de codones. Mide la eficiencia de la traducción del ARNm en proteína (Sharp & Li, 1987). El valor CAI es un número entre 0 y 1. **ENc:** Número Efectivo de Codones. El valor de ENc es un número entre 20 y 61. **% GC:** porcentaje de G+C. **% AT:** Porcentaje A+T.

Tabla 13. Análisis del uso de codones por la cepa *L. lactis* para la expresión de proteínas fluorescentes.

| Aminoácido | Codón | % Uso de codones | | | | | | |
|------------|-------|--|----------|------------|----------|------------|----------|------------|
| | | Cepas de <i>L. lactis</i> ^a | GFP | | RFP | | mCherry | |
| | | | Original | Optimizado | Original | Optimizado | Original | Optimizado |
| Ala | GCG | 11.0 | 0.0 | 12.5 | 0.0 | 8.3 | 27.3 | 9.1 |
| | GCA | 31.6 | 20.0 | 37.5 | 0.0 | 33.3 | 18.2 | 36.4 |
| | GCT | 41.5 | 60.0 | 25.0 | 100.0 | 41.7 | 18.2 | 45.5 |
| | GCC | 16.0 | 20.0 | 25.0 | 0.0 | 16.7 | 36.4 | 9.1 |
| Arg | AGG | 4.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | AGA | 22.2 | 0.0 | 28.6 | 0.0 | 22.2 | 50.0 | 25.0 |
| | CGG | 6.1 | 14.3 | 0.0 | 0.0 | 11.1 | 0.0 | 0.0 |
| | CGA | 15.4 | 0.0 | 14.3 | 0.0 | 11.1 | 25.0 | 12.5 |
| | CGT | 40.5 | 57.1 | 42.9 | 100.0 | 44.4 | 25.0 | 50.0 |
| | CGC | 11.8 | 28.6 | 14.3 | 0.0 | 11.1 | 0.0 | 12.5 |
| Asn | AAT | 79.0 | 38.5 | 84.6 | 50.0 | 75.0 | 57.1 | 85.7 |
| | AAC | 21.0 | 61.5 | 15.4 | 50.0 | 25.0 | 42.9 | 14.3 |
| Asp | GAT | 72.7 | 66.7 | 72.2 | 0.0 | 71.4 | 78.6 | 71.4 |
| | GAC | 27.3 | 33.3 | 27.8 | 100.0 | 28.6 | 21.4 | 28.6 |
| Cys | TGT | 77.3 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | TGC | 22.7 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Gln | CAG | 16.5 | 14.3 | 14.3 | 87.5 | 12.5 | 37.5 | 12.5 |
| | CAA | 83.5 | 85.7 | 85.7 | 12.5 | 87.5 | 62.5 | 87.5 |
| Glu | GAG | 17.9 | 31.3 | 18.8 | 13.6 | 18.2 | 25.0 | 16.7 |
| | GAA | 82.1 | 68.8 | 81.3 | 86.4 | 81.8 | 75.0 | 83.3 |
| Gly | GGG | 12.4 | 13.6 | 9.1 | 0.0 | 13.0 | 28.0 | 12.0 |
| | GGA | 37.8 | 40.9 | 36.4 | 0.0 | 39.1 | 28.0 | 40.0 |
| | GGT | 37.0 | 31.8 | 40.9 | 100.0 | 39.1 | 16.0 | 36.0 |
| | GGC | 12.6 | 13.6 | 13.6 | 0.0 | 8.7 | 28.0 | 12.0 |
| His | CAT | 74.7 | 50.0 | 80.0 | 0.0 | 80.0 | 33.3 | 83.3 |
| | CAC | 25.3 | 50.0 | 20.0 | 100.0 | 20.0 | 66.7 | 16.7 |
| Ile | ATA | 11.3 | 8.3 | 16.7 | 0.0 | 11.1 | 50.0 | 11.1 |
| | ATT | 68.2 | 66.7 | 66.7 | 0.0 | 66.7 | 10.0 | 77.8 |
| | ATC | 20.5 | 25.0 | 16.7 | 100.0 | 22.2 | 40.0 | 11.1 |
| Leu | TTG | 21.3 | 0.0 | 21.1 | 0.0 | 20.0 | 46.2 | 23.1 |
| | TTA | 31.6 | 15.8 | 36.8 | 0.0 | 40.0 | 7.7 | 30.8 |
| | CTG | 5.9 | 5.3 | 5.3 | 100.0 | 10.0 | 0.0 | 7.7 |
| | CTA | 7.7 | 10.5 | 5.3 | 0.0 | 10.0 | 0.0 | 7.7 |
| | CTT | 25.6 | 52.6 | 26.3 | 0.0 | 10.0 | 46.2 | 23.1 |
| | CTC | 7.9 | 15.8 | 5.3 | 0.0 | 10.0 | 0.0 | 7.7 |
| Met | ATG | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Lys | AAG | 17.2 | 30.0 | 15.0 | 0.0 | 13.6 | 37.5 | 16.7 |
| | AAA | 82.8 | 70.0 | 85.0 | 100.0 | 86.4 | 62.5 | 83.3 |
| Phe | TTT | 75.5 | 58.3 | 75.0 | 0.0 | 80.0 | 50.0 | 80.0 |
| | TTC | 24.5 | 41.7 | 25.0 | 100.0 | 20.0 | 50.0 | 20.0 |
| Pro | CCG | 8.7 | 10.0 | 0.0 | 100.0 | 8.3 | 16.7 | 8.3 |
| | CCA | 46.5 | 50.0 | 50.0 | 0.0 | 50.0 | 41.7 | 50.0 |
| | CCT | 36.4 | 20.0 | 40.0 | 0.0 | 41.7 | 41.7 | 33.3 |
| | CCC | 8.4 | 20.0 | 10.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 8.3 |
| Ser | AGT | 22.3 | 16.7 | 25.0 | 0.0 | 25.0 | 8.3 | 25.0 |
| | AGC | 9.0 | 8.3 | 8.3 | 0.0 | 0.0 | 66.7 | 8.3 |
| | TCG | 5.6 | 16.7 | 8.3 | 0.0 | 8.3 | 0.0 | 8.3 |
| | TCA | 33.0 | 8.3 | 33.3 | 0.0 | 33.3 | 8.3 | 33.3 |
| | TCT | 25.4 | 33.3 | 25.0 | 0.0 | 25.0 | 16.7 | 25.0 |
| | TCC | 4.7 | 16.7 | 0.0 | 100.0 | 8.3 | 0.0 | 0.0 |
| Thr | ACG | 11.8 | 12.5 | 12.5 | 0.0 | 7.1 | 33.3 | 8.3 |
| | ACA | 39.2 | 25.0 | 37.5 | 0.0 | 42.9 | 25.0 | 41.7 |
| | ACT | 36.5 | 50.0 | 37.5 | 0.0 | 35.7 | 16.7 | 41.7 |
| | ACC | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 100.0 | 14.3 | 25.0 | 8.3 |
| Trp | UGG | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |

| % Uso de codones | | | | | | | | |
|------------------|-------|--|----------|------------|----------|------------|----------|------------|
| Aminoácido | Codón | Cepas de <i>L. lactis</i> ^a | GFP | | RFP | | mCherry | |
| | | | Original | Optimizado | Original | Optimizado | Original | Optimizado |
| Tyr | TAT | 78.2 | 40.0 | 81.8 | 0.0 | 81.8 | 58.3 | 75.0 |
| | TAC | 21.8 | 60.0 | 18.2 | 100.0 | 18.2 | 41.7 | 25.0 |
| Val | GTG | 13.5 | 0.0 | 12.5 | 0.0 | 7.1 | 40.0 | 13.3 |
| | GTA | 19.7 | 18.8 | 18.8 | 0.0 | 21.4 | 20.0 | 20.0 |
| | GTT | 48.5 | 43.8 | 50.0 | 100.0 | 57.1 | 20.0 | 53.3 |
| | GTC | 18.3 | 37.5 | 18.8 | 0.0 | 14.3 | 20.0 | 13.3 |
| STOP | TGA | 19.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | TAG | 12.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | TAA | 69.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |

^a. Estos datos fueron publicados por Dupuis & Moineau (2010) y representan las medias para tres cepas de *L. lactis*.

Aunado a ello, se realizó un análisis de los codones originales de los genes fluorescentes y al compararlos con los codones preferentes por *L. lactis*, se identificó que el gen *rfp* utilizado en este estudio es un gen sintético diseñado para su expresión en otro organismo, ya que muestra un sesgo en el uso de codones para cada aminoácido, siendo algunos de ellos, tripletes que raramente se utilizan por *L. lactis* (tabla 15). En el caso del gen *gfp* se presenta una mayor probabilidad de expresión eficiente en *L. lactis* con respecto a *rfp* y *mCherry*, ya que los codones de 15 de los 20 aminoácidos podrían ser utilizados por *L. lactis*, lo que indica una mayor probabilidad de expresión.

8.1.2. Generación de las construcciones pNisA-gfp, pNisA-rfp, pNisA-mCherry y pNisA-mCherryO

Una vez transformadas células electrocompetentes de *L. lactis* con cada uno de los genes reporteros a través del vector pNZ8149, se realizó una búsqueda de aquellas clonas que tuvieran el gen en el sentido transcripcional correcto. Las células recombinantes positivas después de digestión enzimática con PstI liberaron dos bandas correspondientes al vector (2550 pb) y al gen; ~760 pb para *gfp*, ~820 pb para *rfp*, ~683 pb para *mCherry* y 711 pb para *mCherryO*. Mediante PCR se corroboró el sentido transcripcional en dirección 5' a 3'. De las clonas, utilizando los pares de oligonucleótidos pNisA-Fw/gfp-Rv, pNisA-Fw/rfp-Rv, pNisA-Fw/mCherry-Rv pNisA-Fw/mCherry-O-Rv (figura 3).

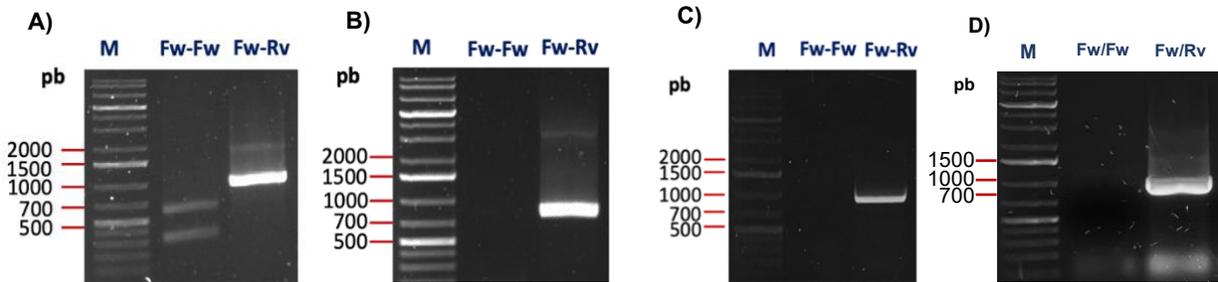


Figura 3. Ensamble de los genes reporteros *gfp*, *rfp* y *mCherry* en *L. lactis*. **pb:** pares de bases. **Fw-Fw:** amplificación del gen reportero en antisentido. **Fw-Rv:** Amplificación del gen en sentido transcripcional correcto. **A)** Comprobación del sentido transcripcional correcto del gen *gfp* por PCR obteniendo una amplificación de ~943 pb con los oligonucleótidos *pNisA-Fw* / *gfp-Rv*. **B)** Comprobación del sentido transcripcional correcto del gen *rfp* por PCR obteniendo una amplificación de ~1003 pb con los oligonucleótidos *pNisA-Fw* / *rfp-Rv*. **C)** Comprobación del sentido transcripcional correcto del gen *mCherry* por PCR obteniendo una amplificación de ~866 pb con los oligonucleótidos *pNisA-Fw* / *mCherry-Rv*. **D)** Comprobación del sentido transcripcional correcto del gen *mCherry-O* por PCR obteniendo una amplificación de ~893 pb con los oligonucleótidos *pNisA-Fw* / *mCherryO-Rv*.

8.1.3. Expresión de las proteínas fluorescentes en *L. lactis*

La construcción *pNisA-mCherryO* permitió estandarizar parámetros óptimos de expresión siendo éstos un rango de pH de 6-6.5, 16 h de incubación posteriores a la inducción, una O.D. _{600 nm} de 0.4 antes de la inducción y 80 ng/ mL de nisina como inductor. Posteriormente se evaluó el perfil proteico mediante geles SDS-PAGE al 17% teñidos con Coomassie (figura 4).

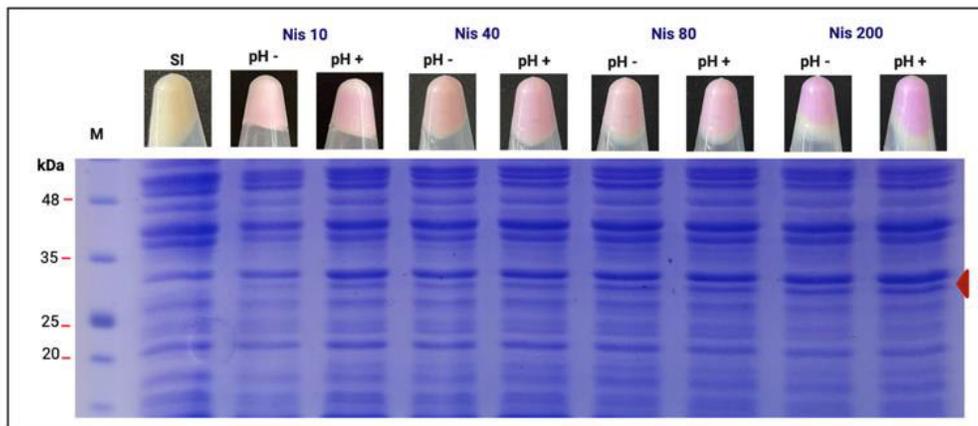


Figura 4. Expresión de la proteína *mCherryO* en *L. lactis*. **SI:** Sin inducir. **Nis 10, 40, 80 y 200:** Concentración de nisina en ng/ml. **pH-:** Inducción sin control de pH. **pH+:** Inducción controlando pH entre 6.4-6.7. **M.** Marcador de peso molecular. **kDa:** Kilodaltons. **La flecha roja** indica la banda de la proteína *mCherry* de 26.7 kDa.

Después de la inducción, alícuotas de pNisA-gfp, pNisA-rfp, pNisA-mCherry y pNisA-mCherryO se corrieron en geles SDS-PAGE para visualizar las proteínas recombinantes. Sólo se detectó la banda correspondientemente a la proteína mCherry optimizada de 26.72 kDa. No hubo diferencia entre las bandas de las cepas recombinantes antes y después de la inducción (figura 5 a), por lo tanto, la expresión de las proteínas podría ser muy baja e incluso nula. Este resultado fue reforzado al exponer los extractos celulares a luz UV y no observar fluorescencia; como control positivo, se utilizaron extractos de *E. coli* que expresaban GFP, mCherry y RFP (figura 5 b).

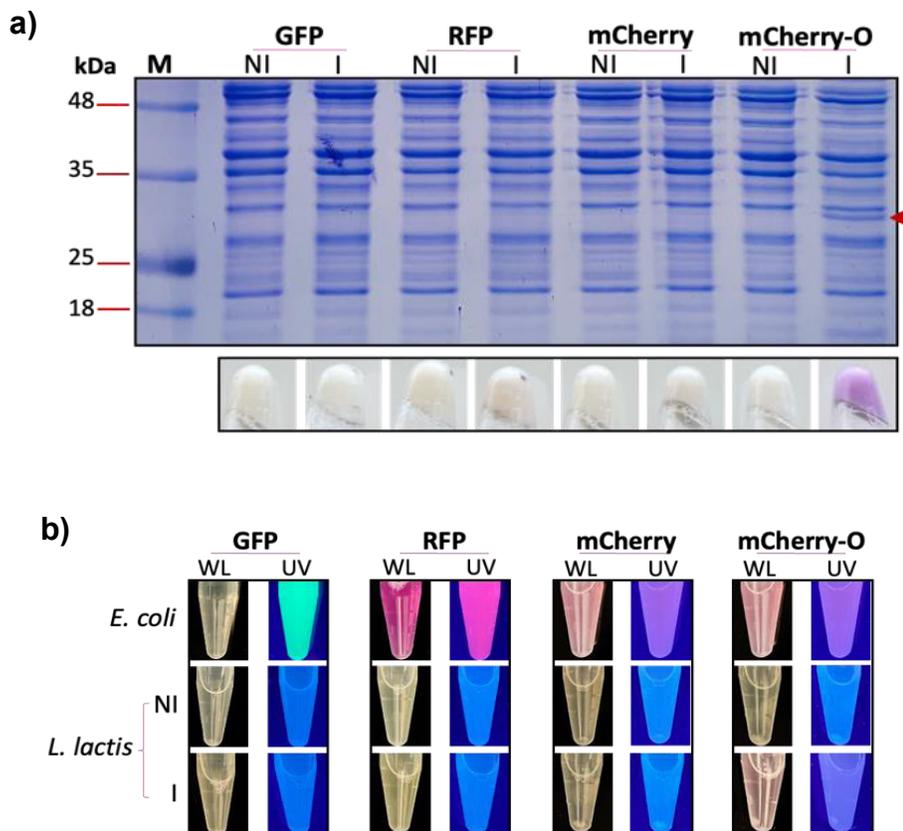


Figura 5. Perfil proteico de las construcciones pNisA-gfp, pNisA-rfp, pNisA-mCherry y pNisA-mCherryO mediante SDS-PAGE y exposición a luz UV. **NI:** no inducido. **I:** inducido con 80 ng/ml de nisina. **M:** marcador de peso molecular. **kDa:** kiloDaltons. **WL:** luz blanca. **UV:** luz ultravioleta. **La flecha roja** indica la banda de la proteína mCherry de 26.7 kDa.

8.1.4. Expresión de genes fluorescentes en *L. lactis*

Para determinar en qué nivel se ve afectada la expresión, se midió el mRNA mediante RT-qPCR en cepas inducidas con diferentes concentraciones de nisina que van de 0 a 200 ng/mL. Se determinó que las tres proteínas fluorescentes son transcritas por el hospedero obteniendo valores mayores de expresión relativa al inducir con 80 ng/mL de nisina. El gen *gfp* presentó la mayor expresión génica (650 unidades de expresión relativa), mientras que *rfp* presenta la menor expresión de mRNA, siendo un valor hasta diez veces menor que el de los otros considerando la concentración óptima del inductor. Por su parte, *mcherry* no optimizado alcanzó niveles de expresión relativos de ~200 unidades, mientras que *mcherryO* presenta valores de casi 500 unidades (figura 6).

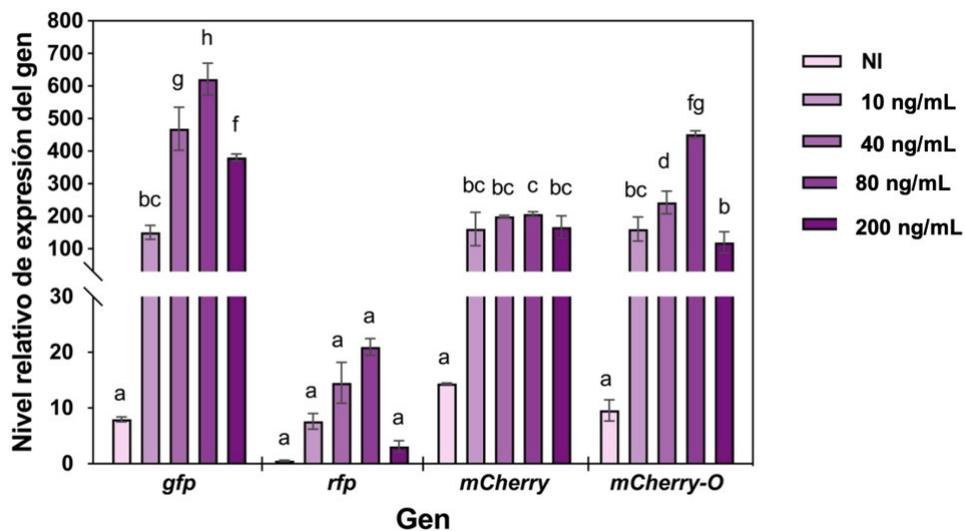


Figura 6. Expresión relativa de *gfp*, *rfp* y *mCherry* en *L. lactis* posterior a la inducción con nisina. **NI:** No inducido. **I:** Inducido. **10, 40, 80 y 200 ng/mL:** concentración del inductor (nisina). Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre el control (NI) y las inducciones con nisina (N=3, *P<0.05).

8.1.5. Detección de la proteína GFP

Cuando la proteína de interés se produce en baja concentración en ocasiones no es posible identificar la banda correspondiente a la proteína mediante SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie o con tinción de plata, es necesario el uso de técnicas con mayor especificidad y sensibilidad como WB, técnica que se

basa en la detección específica de la proteína diana a través de la unión a anticuerpos marcados radioactiva o químicamente. Anteriormente, se menciona que el gen *gfp* mostró la expresión genética relativa más alta al inducirse con 80 ng/mL de nisina, sin embargo, mediante SDS-PAGE no fue detectada. Por lo que posterior al SDS-PAGE se realizó una transferencia Western usando anticuerpos anti-GFP, revelando una banda de 27 kDa correspondiente a la proteína GFP. Se consideró como control positivo, GFP proveniente de *E. coli*. Ambas muestras no fueron visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie, pero si por Westernblot (figura 7), resaltando que la proteína control es notablemente más fuerte, lo que confirma que *L. lactis* produce GFP en una concentración muy baja y, por lo tanto, no puede ser utilizada como reportero en el biosensor, al igual que RFP y mCherry.

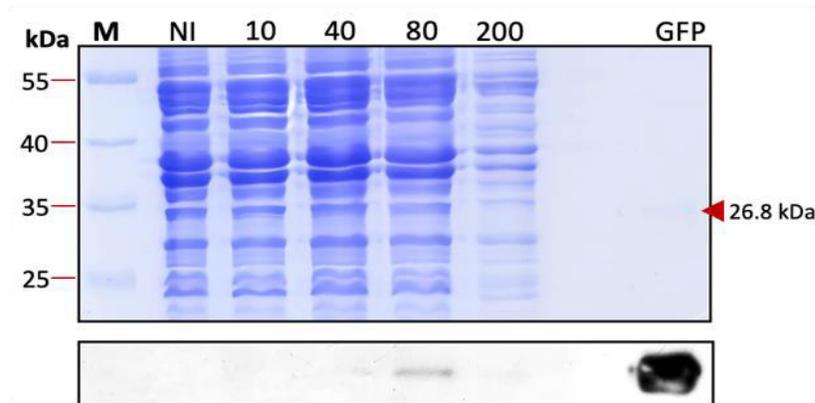


Figura 7. Evaluación del perfil proteico por SDS-PAGE y Westernblot de *pNisA-gfp*. **M:** Marcador. **+**: Control positivo. **10, 40, 80, 200:** Inducción con 10, 40, 80 y 200 ng/ml de nisina. **La flecha roja** indica la banda de la proteína GFP de 26.8 kDa.

8.2. Evaluación de la expresión de los genes *agrC*, *agrA* en *L. lactis*

8.2.1. Clonación de los genes *agrC*, *agrA* silvestres en *L. lactis*

A partir de la ligación de los genes *agrC* y *agrA* en pNZ8149 (figura 8 a), fue posible obtener células recombinantes de *L. lactis* que contenían ambos genes, regulados por el promotor inducible *pNisA* (figura 8 b). Para comprobar que los

genes fueron clonados en el sentido transcripcional correcto debido a que únicamente se utilizó un sitio de restricción (PstI), se llevó a cabo una PCR del DNA plasmídico extraído de las clonas positivas, en donde al utilizar el par de oligonucleótidos pNisA-Fw/agrCA-Rv se obtuvo un amplicón de ~2216 pb (figura 8 c), mientras que al utilizar los oligonucleótidos pNisA-Fw/agrCA-Fw (control negativo) no hubo amplificación.

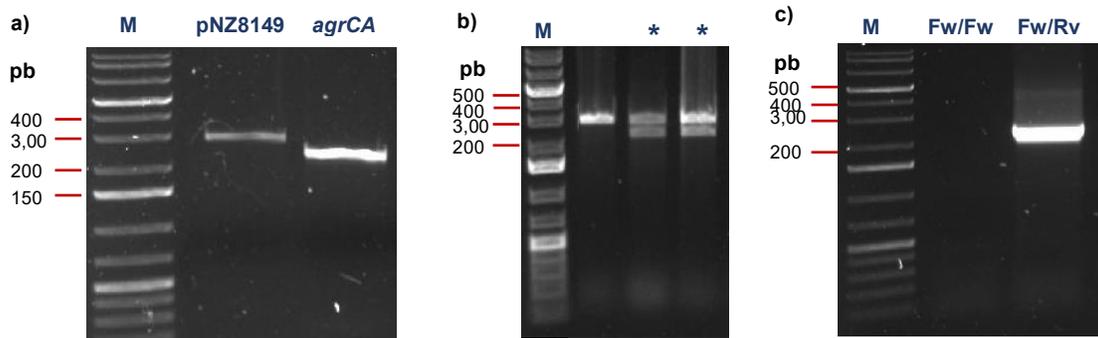


Figura 8. Estrategia de ensamble y clonación del sistema de dos componentes AgrC/AgrA en *L. lactis*. **a)** Vector y fragmento, listos para ligar. **b)** DNA plasmídico de clonas positivas de *L. lactis* digerido con la enzima PstI, liberando dos bandas con pesos de ~ 2550 (Vector) y ~2043 pb que (genes *agrC* y *agrA*). **c)** PCR para comprobar el sentido transcripcional. Amplificación del promotor *pNisA* al gen *agrA* de ~2216 pb. **M.** Marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb plus). **pNZ8149.** Vector de clonación. *. DNA de colonias positivas digerido con la enzima PstI. **Fw/Fw.** Amplificación control realizada con los oligonucleótidos pNisA-Fw/PstI y agrCA-Fw/PstI. **Fw/Rv.** Amplificación realizada con los oligonucleótidos pNisA-Fw/PstI y agrCA-Rv/PstI.

8.2.2. Clonación de los genes *agrC*, *agrA* optimizados en *L. lactis*

Lactococcus lactis es uno de los organismos grampositivos mejor caracterizados para la expresión de proteínas recombinantes pero su rendimiento depende en gran medida de su relación con el organismo donante. A pesar de que *L. monocytogenes* y *L. lactis* son bacterias grampositivas y de bajo contenido de GC (Wagner & McLauchlin, 2008; Laroute et al., 2017), el análisis de las secuencias genéticas *agrC*, *agrA* determinó menos del 50 % de probabilidad de expresión, por lo tanto, fue necesaria la generación de genes sintéticos con secuencias adaptadas a *L. lactis* (tabla 14).

Tabla 14. Parámetros de adaptación de los genes del sistema de dos componentes AgrC/AgrA en *L. lactis*.

| GEN | Secuencia original | | | | Secuencia optimizada para <i>L. lactis</i> | | | |
|-------------|--------------------|-----|------|------|--|-----|------|------|
| | CAI | ENc | % GC | % AT | CAI | ENc | % GC | % AT |
| <i>agrC</i> | 0.435 | 21 | 50.3 | 49.7 | 1 | 21 | 33.6 | 76.4 |
| <i>agrA</i> | 0.392 | 50 | 35.3 | 64.7 | 1 | 21 | 27.3 | 76.7 |

CAI: Índice de adaptación de codones. Mide la eficiencia de la traducción del ARNm en proteína (Sharp & Li, 1987). El valor CAI es un número entre 0 y 1. **ENc:** Número Efectivo de Codones. El valor de ENc es un número entre 20 y 61. **% GC:** porcentaje de G+C. **% AT:** Porcentaje A+T.

Mediante ensamble de Gibson, el fragmento *agrCAO* fue ligado al vector pNZ8149 (figura 9 a). Posterior a la ligación inserto-vector, el DNA se utilizó como molde para aumentar el número de copias ligadas mediante PCR, puesto que con la ligación directa no se pudieron obtener clonas que tuvieran los genes *agrC*, *agrA*. Una vez confirmada la amplificación completa de la construcción (figura 9 b), se obtuvieron clonas positivas de *L. lactis*, siendo estas de un peso de 4095 pb, de las se amplificaron diferentes partes de la construcción (figura 9 c).

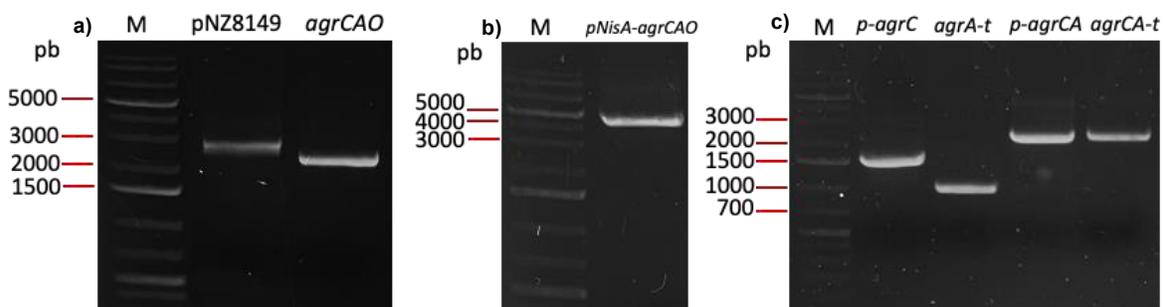


Figura 9. Estrategia de ensamble de pNisA-agrCAO por Gibson. **a)** Vector (pNZ8149) y fragmento listo para ligar (*agrCAO*). **b)** Amplificación por PCR de la construcción completa pNZ8149-*agrCAO* (5806 pb). **c)** Confirmación de clona de *L. lactis* con la construcción completa del biosensor mediante PCR. **M:** marcador de peso molecular. **pb:** pares de bases. **p-agrC:** amplificación del promotor pNisA y gen *agrC* (1493 pb). **agrA-t** (973 pb): amplificación del gen *agrA* al terminador. **p-agrCA:** amplificación del promotor pNisA y genes *agrC*, *agrA* (2298 pb). **agrCA-t:** amplificación de genes *agrC*, *agrA* al terminador (2287 pb).

8.2.3. Expresión de las proteínas AgrC y AgrA silvestres y optimizadas en *L. lactis*

Después de la inducción de pNisA-agrCA y pNisA-agrCAO con nisina a 80 ng/mL, por RT-PCR se determinó que *L. lactis* si está llevando a cabo el proceso de transcripción tanto de *agrC* y *agrA* silvestres (figura 10 a) y optimizados (figura 10 b). En el caso de los genes silvestres, de acuerdo con los parámetros CAI ENc y % GC (tabla 13) había baja probabilidad de expresión de éstos por *L. lactis*. En el caso particular de los genes *agrC* y *agrA* optimizados, se esperaba obtener una sobreproducción de ambas proteínas puesto que, para ello, se realizó un sesgo al 100% en el uso de codones, seleccionando el codón que tiene un mayor porcentaje de distribución en *L. lactis*.

El siguiente paso fue confirmar la síntesis de las proteínas utilizando inmunodetección por Western blot o fluorescencia mediante microscopía, según fuera el caso. La expresión del regulador de respuesta transcripcional AgrA por *L. lactis* se determinó mediante inmunodetección con el anticuerpo anti-AgrA policlonal (figura 10 c), lo cual indica el reconocimiento de los codones del gen silvestre y con secuencia optimizada por la maquinaria transcripcional de *L. lactis*.

AgrC, al ser una proteína insertada en la membrana y por su carácter hidrofóbico no se pudo detectar por inmunodetección (datos no mostrados) puesto que el anticuerpo primario Anti-AgrC se generó solo de la parte soluble (pCold- Δ Nterm-AgrC). Por lo tanto, células de *L. lactis* con la construcción genética pNisA-agrC-linker-sfgfp (Bs) fueron utilizadas para verificar la expresión de AgrC en el sistema sensor, esto, a través de la síntesis de una proteína quimérica conformada por AgrC-sfGFP. Una vez obtenidos los cultivos inducidos con nisina a 80 ng/mL, se observó al microscopio y mediante fluorescencia se determinó la expresión de la proteína quimérica (figura 10 d). Las imágenes muestran contraste de fase (izquierda) y fluorescencia (derecha) con un objetivo de 100X. En las células sin inducir (panel superior) no se observa señal fluorescente. En contraste, la cepa inducida (panel inferior) muestra fluorescencia verde lo que evidencia la expresión activa de la proteína quimérica AgrC-linker-sfGFP bajo el control del sistema NICE.

La fluorescencia confirma la expresión funcional de sfGFP fusionada a AgrC, sin embargo, no se determinó si la proteína se encuentra localizada en la membrana o en el citoplasma, pero es un primer acercamiento para asegurar la expresión de las proteínas del elemento de reconocimiento del biosensor.

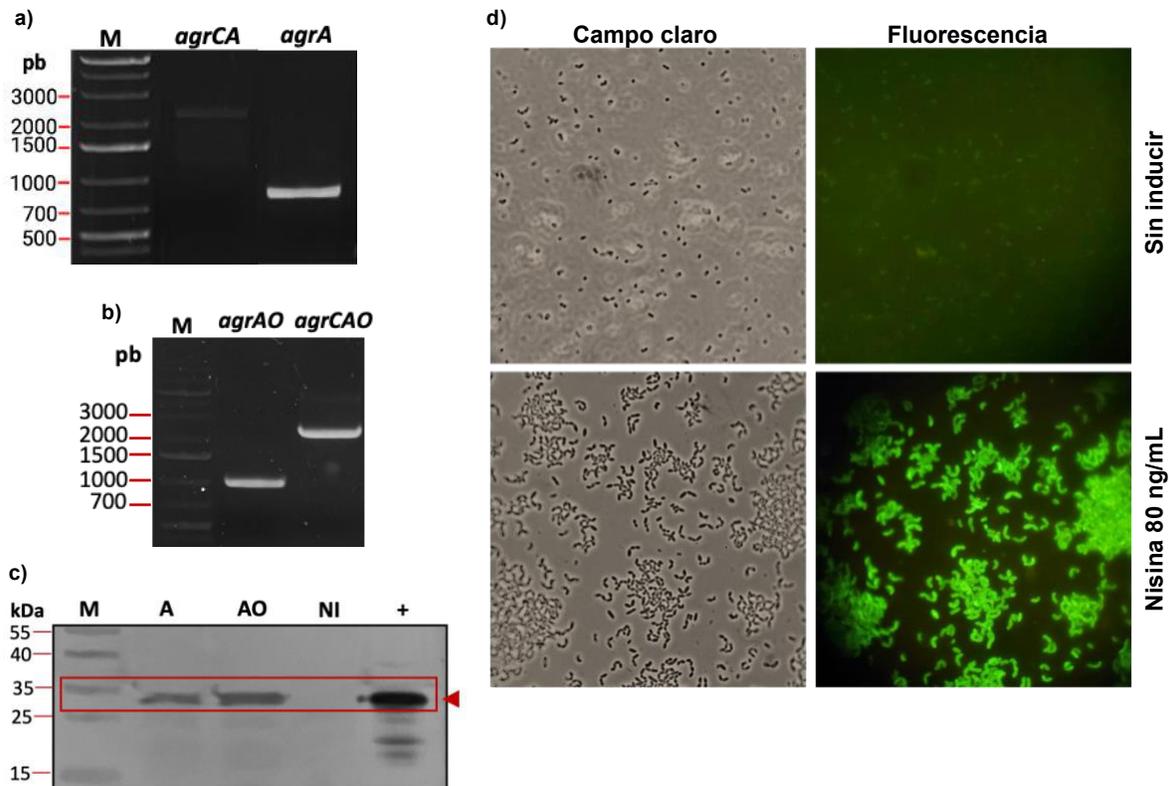


Figura 10. Evaluación de los genes *agrC* y *agrA* silvestres y optimizados a nivel transcripcional y traduccional. **a)** RT-PCR de los genes *agrC* y *agrA* silvestres. **b)** RT-PCR de los genes *agrC* y *agrA* optimizados. **c)** Western Blot de la proteína AgrA. **M.** Marcador de peso molecular. **pb.** Pares de bases. **kDa.** kiloDalton. **agrCA, agrCAO.** Amplificación de ambos genes silvestres u optimizados (2043 pb). **agrA, agrAO.** Amplificación *agrA* silvestre u optimizada (729 pb). **+**. Proteína AgrA pura. **-.** Extracto proteico de *L. lactis* silvestre. **A.** Proteína no optimizada. **AO.** Proteína optimizada. La flecha roja indica el tamaño de la banda que se quiere detectar (28.5 kDa). **c)** Análisis por microscopía de fluorescencia de *L. lactis* pNisA-*agrC*-linker-sfGFP(Bs), sin inducción (arriba) e inducida (abajo), observadas en contraste de fases (izquierda) y fluorescencia (derecha).

8.3. Ensamble del circuito genético del biosensor

Una vez obtenidas las construcciones pNisA-agrCAO y pNisA-agrCA, se lograron clonar el promotor *P_{II}* y el gen *mCherryO*, obteniendo con ello el circuito del biosensor completo con genes *agrC*, *agrA* optimizados denominado B1 (figura 11 a) y el biosensor con genes *agrC*, *agrA* nativos de Lm denominado B1SO (figura 11 b).

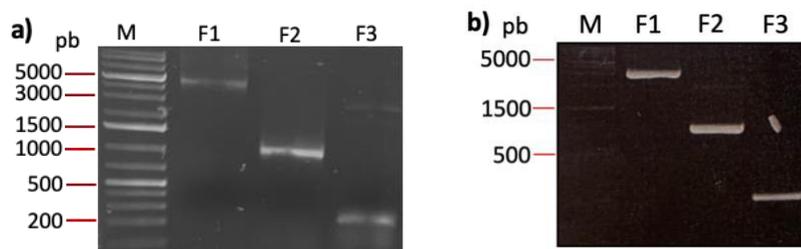


Figura 11. Ensamble completo de los biosensores B1SO y B1. **a)** Amplificación de los elementos del biosensor B1. **b)** Amplificación de los elementos del biosensor B1SO. **M.** Marcador de peso molecular. **pb:** pares de bases. **F1.** pNZ8149-agrCA o pNZ8149-agrCAO (2043 pb). **F2.** mCherryO (711 pb). **F3.** PII (223 pb).

8.3.1. Selección del tiempo de inducción y concentración de nisina óptimos para la expresión del elemento de reconocimiento

En los siguientes ensayos se determinó la concentración óptima de nisina para expresar el sistema Agr, basado en la expresión de AgrA, es decir, aquella concentración con la que se pudiera obtener la proteína y que no afectara de manera negativa en el crecimiento de *L. lactis*, aunado al tiempo mínimo en que se detecta AgrA con la finalidad de tener células viables posterior a la primer inducción y listas para sensar al AIP de Lm.

A partir de la cinética de crecimiento realizada por un periodo de 24 h (figura 12 a), se pudo determinar que tanto para B1 y B1SO la concentración de nisina de 80 ng/mL tiene un efecto negativo en el crecimiento celular, a pesar de que en los ensayos realizados para la expresión de proteínas fluorescentes en *L. lactis* esta concentración resulto ser mejor, una vez ensamblado y evaluado el biosensor

completo, la concentración de 40 ng/mL es preferible, para mantener células funcionales para la segunda inducción, es decir la detección de AIP y posterior expresión de la proteína reportera. A la par, una vez que las células biosensoras fueron inducidas por un periodo de 16 h con concentraciones de nisina de 10, 40 y 80 ng/mL mediante inmunodetección se comprobó la expresión de la proteína AgrA en ambos biosensores, sin embargo, para B1 las concentraciones de nisina de 10 y 40 ng/mL produjeron una cantidad de proteína mucho menor respecto a la de B1SO, en las que la producción de la proteína fue casi constante en cualquiera de las 3 concentraciones de nisina. Cuando B1 se indujo con 80 ng/mL de nisina, la producción de AgrA fue muy similar a la de B1SO (figura 12 b), sin embargo, fue la concentración que tuvo un efecto más negativo en las células biosensoras, lo cual pudo deberse meramente al efecto que presenta este factor regulador para la maquinaria de *L. lactis*.

Por otra parte, mediante inmunodetección de las muestras tomadas cada 3 h por 24 h, se pudo determinar que la producción de AgrA comienza desde las 3 h post inducción del sistema NICE (datos no mostrados), su expresión se mantiene constante durante las 24 h evaluadas tanto para B1 como B1SO. A partir de la sexta hora post inducción, la banda correspondiente a AgrA, se detecta con mayor facilidad (figura 15 c), por lo que se estableció como hora óptima para la recolección de células y su posterior tratamiento para ensayos de detección de AIP.

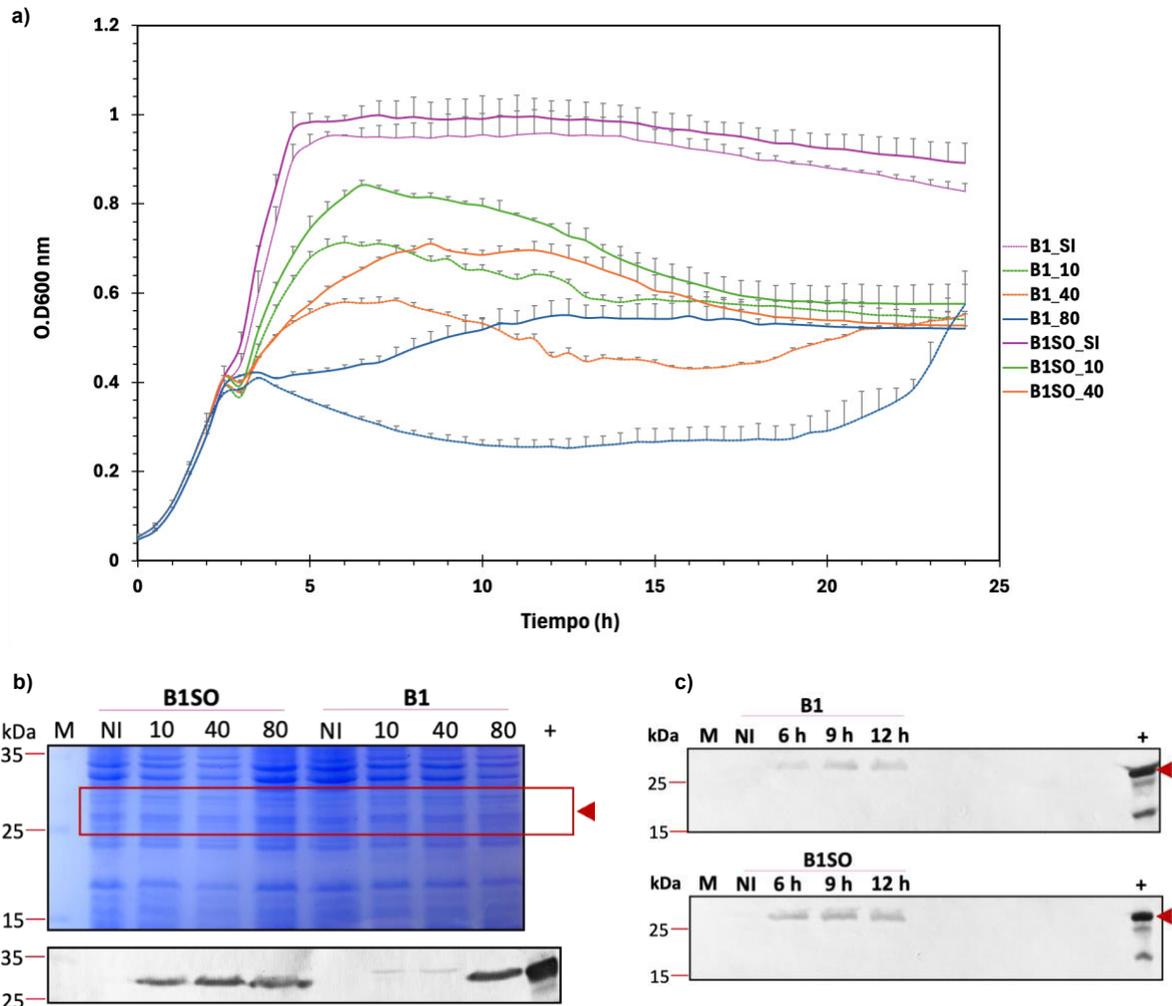


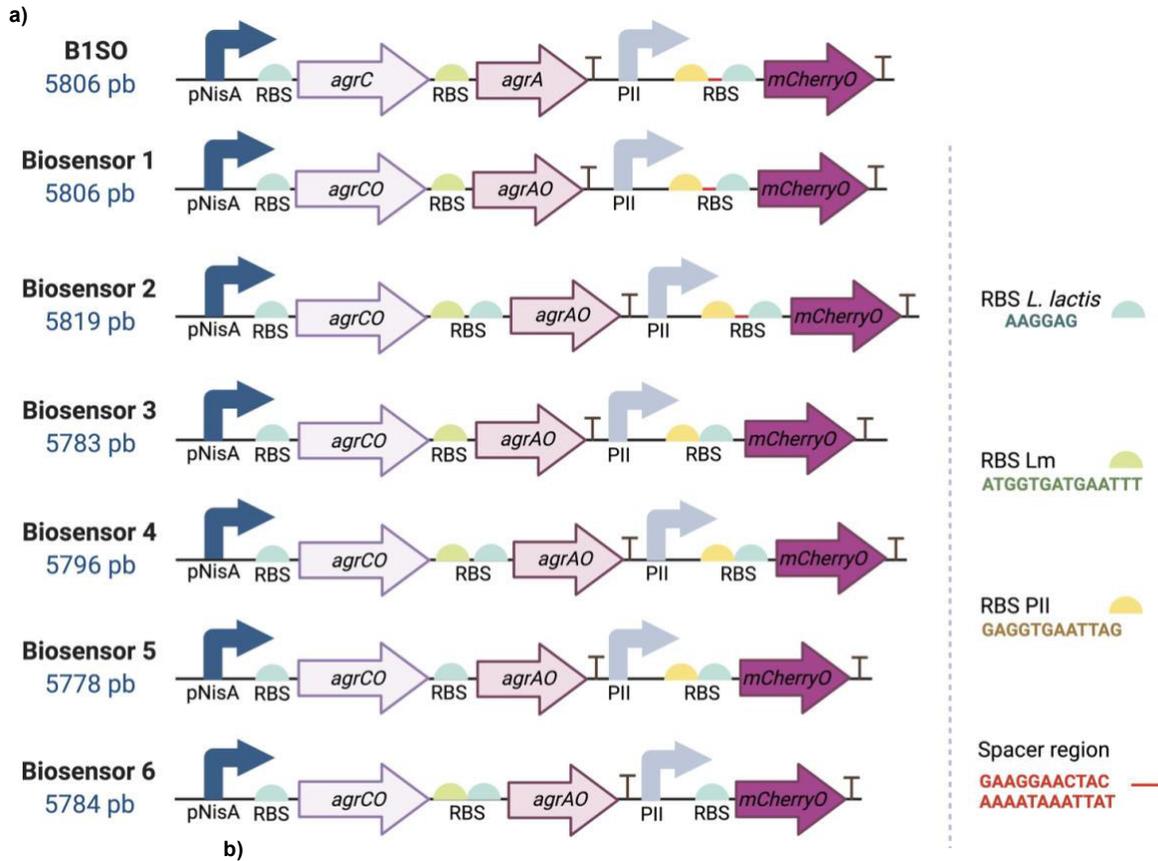
Figura 12. Evaluación del efecto de la concentración del inductor (Nisina) sobre el crecimiento de *L. lactis* y la expresión del sistema Agr. **a)** Cinética de crecimiento de las células biosensoras B1SO y B1 inducidas con nisina. **b)** Westernblot de la proteína AgrA de las células biosensoras B1SO y B1 posterior a 16 h de inducción con nisina. **c)** Inmunodetección de AgrA de B1 y B1SO a las 6, 9 12 h post inducción. **B1SO.** Biosensor de *L. lactis* con genes *agrC*, *agrA* nativos de *Lm*. **B1.** Biosensor de *L. lactis* con genes *agrC*, *agrA* con secuencia optimizada. **M.** marcador de peso molecular. **NI:** No inducido. **10, 40, 80.** concentraciones de nisina (ng/μL) utilizadas para la expresión del sistema Agr. **+**. AgrA proveniente de extracto proteico de *E. coli*.

8.3.2. Generación de variantes del biosensor B1

Partiendo del DNA secuenciado del biosensor B1, se realizaron diferentes versiones de este, modificando principalmente la región intergénica que se encuentra entre *agrC* y *agrA*, así como el RBS localizado río arriba de *agrA*, debido a que fueron secuencias no modificadas en cuanto al cambio de codones, y en el caso del RBS, en ocasiones, no suele ser reconocido por la bacteria huésped, lo

cual podría influir en la baja o nula expresión de la proteína que regula. En la figura 14 a, se representan los cambios realizados a la secuencia del biosensor, los cuales se confirmaron por secuenciación, hasta el momento se han diseñado los biosensores del 1 al 6, quedando pendiente el biosensor 7 únicamente.

Los 6 biosensores generados fueron inducidos con nisina a 80 ng/mL por un periodo de 16 h. Posteriormente los extractos celulares fueron evaluados mediante WB para determinar si la proteína AgrA era expresada en *L. lactis*. Debido a que anteriormente, el gen *agrA* silvestre fue detectado por esta técnica, se consideró como control para el ensayo. Como resultado, en ninguno de los biosensores generados se observó la presencia de la banda correspondiente a la proteína AgrA, ni siquiera en aquellos en los que se cambió el RBS por uno nativo de *L. Lactis* (figura 13 b).



b)

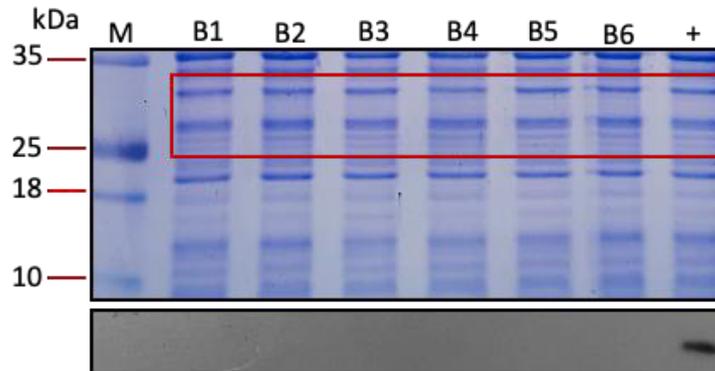


Figura 13. a) Esquema de los biosensores y sus modificaciones. Cada biosensor está conformado por el sistema de dos componentes, AgrC/AgrA de Lm, regulado por el promotor pNisA, un RBS nativo de *L. lactis* río arriba de *agrC* y una secuencia terminadora río arriba del promotor PII de Lm, el cual regula al gen *mCherryO*. Las modificaciones realizadas se localizan entre el promotor PII y el ATG del gen fluorescente. **b)** Detección de la proteína AgrA en *L. lactis* por SDS-PAGE y WB. **kDa:** kilo Daltons. **M:** marcador de peso molecular. **B1S0.** Representación del circuito genético del biosensor que contiene los genes *agrC*, *agrA* nativos de Lm. **B1, B2, B3, B4, B5, B6:** Extractos celulares de las células biosensoras 1 al 6. **+:** Extracto celular de *L. lactis* pNisA-*agrCA*.

8.4. Expresión del sistema Agr en cepas de *Listeria monocytogenes*

8.4.1. Formación de biopelículas

El sistema Agr es un sistema de comunicación celular altamente conservado en el género *Listeria* al igual que el péptido AIP codificado por *agrD*, cuya secuencia es la misma para especies diferentes de *Listeria* como *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, entre otras (Zetzmann et al, 2016).

En este estudio, posterior a la generación de biopelículas, mediante un ensayo de inmunodetección de la proteína AgrA, no se pudo observar una banda correspondiente a esta en ninguna de las cepas de Lm evaluadas, siendo *L. monocytogenes* ATCC15313, Lm 19115, Lm Lux y *L. innocua* ATCC33090 (figura 14). Hasta el momento, no hay algún ensayo de inmunodetección con el que se pueda comparar la intensidad de la banda correspondiente a la proteína AgrA nativa de Lm, pero si se ha observado la expresión de factores de virulencia como la internalina A o internalina B, en las que el nivel de expresión depende de la cepa evaluada y el efecto que tiene el cambio de condiciones de crecimiento en la expresión de algunas proteínas (Lathrop, Banada, & Bhunia, 2008), incluyendo a las del sistema AgrA (Autret et al., 2003) motivo por el que en este primer ensayo no se observó la presencia de la proteína objetivo.



Figura 14. Detección de la proteína Agr por Western blot de biopelículas provenientes de cepas de *Listeria*. **kDa.** Kilodaltons. **M.** Marcador de peso molecular. **+**. Control positivo de AgrA. La flecha roja indica la banda correspondiente a AgrA.

8.4.2. Efecto del AIP1 en la formación de biopelículas de *Listeria*

La expresión del sistema Agr aumenta conforme hay una acumulación de AIP en el medio y con ello, un aumento en la formación de biopelícula (Riedel et al., 2009). Los estudios que se han enfocado en dilucidar la estructura del AIP nativo, han diseñado diversas estructuras del AIP para generar moléculas sintéticas y con ello, evaluar si son reconocidas por el sistema de dos componentes AgrC/AgrA, además se han identificado estructuras que tiene un efecto negativo en la expresión de dicho sistema (Zetzmann et al, 2016; West et al., 2023; Bejder, et al., 2024). Para este ensayo se utilizó como inductor el AIP1 con secuencia de aminoácidos A(CFMFV) (West, et al., 2023) con la finalidad de saber si será útil para los siguientes ensayos de funcionalidad del biosensor. Posterior a la inducción de las cepas de *Listeria* con 10^{-7} (100 nM) y 10^{-6} M (1 μ M) de AIP1 por un periodo de 24 h, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre las células no inducidas respecto a las inducidas (figura 15), salvo en la cepa de Lm ATCC19115, en donde hubo una disminución en la formación de biopelícula al adicionar AIP1 en concentración de 1 μ M. La investigación más actual sobre la estructura del AIP de Lm, es la realizada por Bejder y colaboradores en 2024. En este estudio, se menciona que estos péptidos son moléculas altamente inestables y pueden sufrir una rápida reordenación de su estructura de acuerdo con las condiciones en las que se encuentre el péptido, lo que influye en una rápida degradación de la molécula y en su reconocimiento.

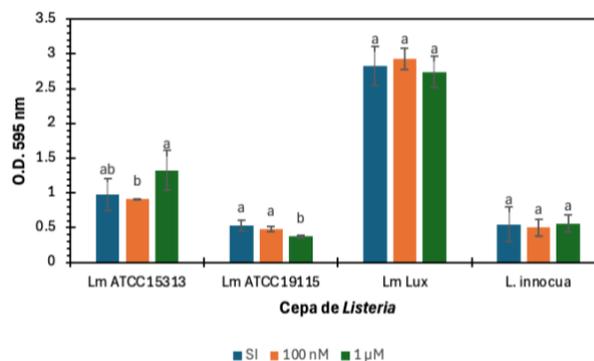


Figura 15. Efecto del péptido AIP1 en la formación de biopelícula de cepas de *Listeria*. Las letras sobre las barras indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$), entre tratamiento. Comparación de medias por el método de Tukey. **SI.** Sin inducir. **100 nM, 1 μ M.** Concentración de AIP adicionada a cultivo de Lm.

8.4.3. Expresión del sistema Agr de Lm ATCC15313 y Lm ATCC19115 en cultivo líquido

Debido a que no se pudo detectar la proteína AgrA durante la formación de biopelículas, se decidió utilizar cultivos líquidos para su evaluación. Como cepas objetivo, solo se trabajó con Lm ATCC15313, de la cual proviene el sistema Agr ensamblado en *L. lactis*, y Lm ATCC19115, cepa hemolítica que, a diferencia de la primera, no se han hecho modificaciones en genes de de virulencia. Posterior a la recolección de alícuotas a durante la fase de crecimiento logarítmica media (O.D. _{600 nm} 0.6), logarítmica tardía (O.D. _{600 nm} 0.8), estacionaría temprana (O.D. _{600 nm} 1.0) y a las 24 h de crecimiento (estacionaría tardía). Se logró identificar a la proteína AgrA mediante inmunodetección para la cepa Lm ATCC15313, mientras que bajo las condiciones evaluadas no fue posible observar la banda correspondiente a AgrA en Lm ATCC19115 (figura 16).

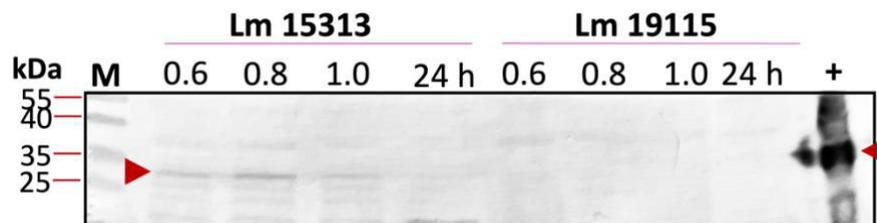


Figura 16. Inmunodetección de AgrA en cepas de *Listeria monocytogenes* crecidas en cultivo. **0.6, 0.8, 1.0.** O.D. _{600 nm} a la que se evaluó la expresión de AgrA. **24 h.** Muestra evaluada a las 24 h de crecimiento. **+**. Control positivo de AgrA expresada en *E. coli*. **kDa.** Kilodaltons. **M.** Marcador de peso molecular. Las flechas rojas indican la banda correspondiente a AgrA.

8.5. Evaluación de la funcionalidad del biosensor

8.5.1. Detección de AIP en biopelículas

Posterior a la incubación de las células biosensoras de B1 y B1SO con las biopelículas de *Lm* ATCC15313, una vez que se recolectaron las células biosensoras mediante centrifugación, no se observó cambio de color en estas debida a la expresión de mCherry (figura 17), una vez realizada la detección de mCherry mediante Western blot. Tampoco hubo banda correspondiente a la proteína. Resultado que indica que el biosensor no se activó, la concentración de AIP en biopelícula fue muy baja, o bien, las moléculas del autoinductor quedaron atrapadas en la biopelícula que quedó adherida a la biopelícula.

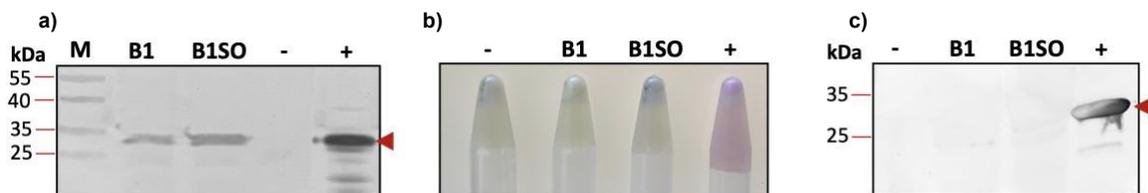


Figura 17. Ensayo de detección de AIP en biopelículas con células biosensoras de B1 y B1SO. **a)** Monitoreo de la expresión del sistema Agr a través de la inmunodetección de AgrA, posterior a la inducción con nisina 40 ng/mL. **b)** Detección visual de coloración de las células biosensoras posterior a la incubación en biopelículas de *Lm*. **c)** Western Blot de la proteína mCherry posterior a la incubación en biopelículas de *Lm*. **kDa.** KiloDaltons. **M.** Marcador de peso molecular. **B1.** Biosensor con genes *agrC*, *agrA* con secuencia nativa de *Lm*. **B1SO.** Biosensor con genes *agrC*, *agrA* con secuencia optimizada. **-.** Células de *L. lactis* con el vector pNZ8149. **+**. Células de *L. lactis* con la construcción pNisA-*agrCA* para a) y células de *L. lactis* que expresan la proteína mCherry para b) y c).

8.5.2. Detección de AIPs sintéticos y de sobrenadante

Alícuotas de 5 mL del sobrenadante de *Lm* ATCC15313 obtenidos a una O.D. $_{600\text{ nm}}$ de 0.6, 0.8, 1.0 y 24 h y concentradas 10 veces fueron utilizados para evaluar la funcionalidad del biosensor B1SO. Los liofilizados obtenidos en la fase logarítmica y estacionaria temprana (O.D. $_{600\text{ nm}}$ 0.6, 0.8, 1.0) se mezclaron, teniendo 2 tratamientos a evaluar con el liofilizado de 24 h.

Posterior a la inducción de las células biosensoras, no se observó cambio colorimétrico comparado con las células de control positivo pNisA-mCherryO (figura 18). Mediante inmunodetección, tampoco se observó una banda diferencial correspondiente a mCherryO entre las células inducidas y las no inducidas o solo inducidas (SI) con nisina (Nis).

Existen tres posibles eventos que pudieran estar afectando el funcionamiento del biosensor: 1) hasta el momento no se ha detectado la expresión de AgrC en *L. lactis* por lo que la posibilidad de que no se esté expresando no ha sido descartada; 2) A pesar de que la proteína AgrA en Lm ya fue detectada, no se ha confirmado la expresión del péptido AIP nativo de Lm ATCC15313; y 3) La estructura de los péptidos sintéticos están basados en lo reportado por West y colaboradores en 2023, para finales de 2024 Bejder y colaboradores sugieren una estructura de un pentámero.

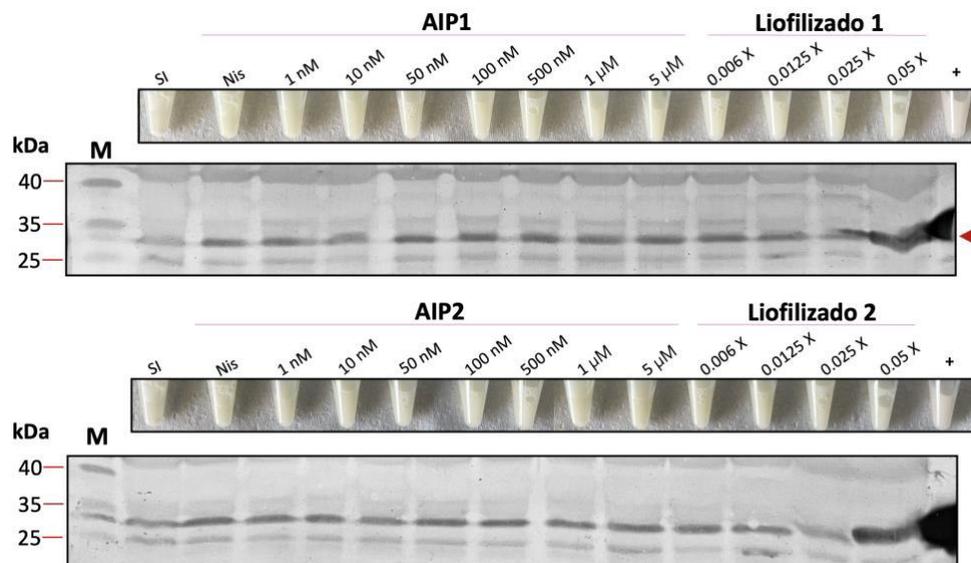


Figura 18. Inmunodetección de la proteína mCherry del biosensor B1SO post-inducción con péptidos sintéticos y liofilizados de Lm. **kDa.** KiloDaltons. **M.** Marcador de peso molecular. **AIP1.** Péptido sintético M(CFMFV). **AIP2.** Péptido sintético A(CFMFV). **Liofilizado 1.** Liofilizado 10 X de muestras de fase logarítmica y estacionaria temprana. **Liofilizado 2.** Liofilizado 10 X de las 24 h de crecimiento.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

L. lactis es una bacteria grampositiva, que al igual que *E. coli* es popular por su uso como fábrica celular para la expresión de proteínas heterólogas con aplicación biotecnológica y terapéutica (Frelet-Barrand, 2022). Es necesario enfatizar que la expresión de genes de otros organismos en este huésped depende del uso de codones y de la distribución de codones raramente utilizados. En ocasiones, el trabajar con sistemas de expresión heterólogos, genera una sobreproducción de proteínas, pero estas pueden ser inactivas o bien, no tener la capacidad de sintetizarlas (Smith, 1996). Parte importante de este problema se relaciona con el uso de codones propio del organismo huésped, lo que ayuda a controlar la traducción para producir proteínas funcionalmente intactas (Takeuchi, 2021). La optimización de codones puede definirse como la ingeniería en el diseño de genes, funciona cambiando codones raramente utilizados por el organismo huésped (codones raros) por un triplete sinónimo sin alterar las secuencias de aminoácidos, mejorando la eficiencia con la que un codón es traducido por el ribosoma y con ello, la producción de proteína heteróloga (Gaspar et al., 2012; Hia & Takeuchi, 2021). Por lo tanto, es una estrategia que ha ganado gran interés para mejorar la producción de proteínas heterólogas.

En este estudio, durante el desarrollo del biosensor para la detección de Lm, se presentaron problemas por parte de *L. lactis* para la producción de proteínas que conforman al circuito genético del biosensor, es decir, el sistema AgrC/AgrA que interactuaría con la molécula diana (AIP) de Lm, y la proteína fluorescente que generaría la señal informadora. Tras la evaluación de parámetros como CAI, ENc y % GC, se determinó que las secuencias genéticas de estos tres genes están conformadas por codones que, en ocasiones, son de baja frecuencia en el genoma de *L. lactis* (tabla 15), lo que a su vez se relaciona con la disponibilidad de tRNA que interactúa con estos, puesto que al ser considerados como codones raros, es decir de baja frecuencia, la disponibilidad de tRNA puede verse limitada y con ello afectar la capacidad de producción de la proteína objetivo.

Por ello, se decidió llevar a cabo una optimización de codones de los tres genes del biosensor. Primero, se llevó a cabo la optimización del gen informador *mCherry*, en la que la distribución de codones se basó en el uso del 70% del codón que se presenta con mayor frecuencia en *L. lactis*, por ejemplo, existen 3 codones que codifican para la isoleucina (Ile), de los cuales ATT se presenta en el genoma de *L. lactis* en un 68.2%, por lo tanto, existe una mayor abundancia de este tRNA, la secuencia original de *mCherry* utiliza este codón solo en un 10%, por lo tanto al llevar a cabo la optimización, se reemplazaron los otros tripletes por este que es más abundante, hasta un 77.8% de recurrencia, dejando una distribución del 22.2% de los codones ATA y ATC para que codifiquen en también para Ile. Una vez que se comprobó que la optimización al 70% de la secuencia de *mCherry* permitió la producción de la proteína por la maquinaria de *L. lactis*, se decidió llevar a cabo la optimización al 100% de los genes *agrC*, *agrA*. Tomando como ejemplo el aminoácido Ile, en el caso de *agrC* y *agrA*, todos los codones ATA y ATC presentes en las secuencias fueron cambiados por su sinónimo ATT. Decisión que fue tomada debido a que, si bien la optimización de *mCherry* al 70% generó la producción de la proteína, los niveles de expresión fueron bajos en comparación con la producción de esta misma proteína en sistemas como *E. coli*.

9.1. *Lactococcus lactis* reconoce y expresa elementos genéticos provenientes de *Listeria monocytogenes*

Entonces, ¿Si no se utilizan genes optimizados *L. lactis* no podrá expresar la proteína de interés?, esta fue una pregunta muy interesante que se presentó durante el desarrollo del biosensor. Hablando específicamente del elemento de reconocimiento (pNisA-*agrCA* y pNisA-*agrCAO*), es importante mencionar que los genes *agrC*, *agrA* se encuentran cotranscritos en tándem y bajo el control de un mismo promotor, por lo que, posterior a la inducción con nisina se activa la transcripción de ambos genes. Teóricamente el observar la presencia de *AgrA* en

el perfil proteico de *L. lactis* implicaría que *agrC* también está siendo transcrito, pues este gen, además de ser el primero en ser reconocido por la RNA polimerasa, también hace uso del RBS nativo de *L. lactis* ubicado río abajo de la secuencia promotora y río arriba del ATG de *agrC*, ya que comparten el mismo transcrito policistrónico al igual que otros sistemas de dos componentes (Frelet-Barrand, 2022).

Un aspecto relevante, es que *agrC* y *agrCO* son precedidos por el RBS propio de *L. lactis* que forma parte del promotor pNisA. En contraste, *agrA* y *agrAO* conservan el RBS nativo de Lm, lo que indica que la maquinaria de traducción de *L. lactis* reconoce y utiliza el RBS del patógeno, lo que sugiere una compatibilidad entre el RBS de Lm y el ribosoma de *L. lactis*. De acuerdo con los resultados de la sección 8.3.2, se observó que la expresión de AgrA proveniente del gen nativo de Lm tuvo una mayor expresión de la proteína, respecto a la proteína proveniente del gen *agrA* con secuencia optimizada para *L. lactis*. Este comportamiento se puede deber por varios factores. El principal factor es la optimización de los codones de *agrC* y *agrA* al 100%, aunque se buscaba mejorar la eficiencia de traducción, la sobre optimización puede afectar la tasa de traducción o bien, provocar la formación de estructuras secundaria en el RNA (Cambray et al., 2018).

Por otra parte, la expresión constante de AgrA con secuencia nativa de Lm al inducir con diferentes concentraciones de nisina sugiere una mayor estabilidad del mRNA, caso contrario del gen optimizado, en el que se observa una expresión de la proteína similar al inducir con la concentración más alta (80 ng/mL), mientras que a concentraciones bajas apenas se detecta la producción de la proteína, lo cual podría deberse a una degradación más rápida del mRNA optimizado.

Goel y colaboradores (1972), informan que debe existir un equilibrio entre el uso de codones óptimos y codones raros, pues esto confiere diferentes tasas de traducción que se ve reflejado en una presión de selección para mantener la abundancia de tRNAs. Fisiológicamente, existe un equilibrio entre la abundancia de tRNA que depende de su demanda, lo cual influye directamente en las tasas de traducción, puesto que puede existir un agotamiento de tRNAs (Zhang, et al., 2010).

Tabla 15. Análisis del uso de codones por la cepa *L. lactis* para la expresión de las proteínas AgrC, AgrA.

| % Uso de codones | | | | | | | | |
|------------------|------------|--|--------------|-----------------------------|--------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Aminoácido | Codón | AgrC | | | AgrA | | mCherry | |
| | | Cepas de <i>L. lactis</i> ^a | Secuencia Lm | Optimizado <i>L. lactis</i> | Secuencia Lm | Optimizado <i>L. lactis</i> | Secuencia <i>E. coli</i> | Optimizado <i>L. lactis</i> |
| Ala | GCG | 11.0 | 40.0 | 0 | 42.9 | 0 | 27.3 | 9.1 |
| | GCA | 31.6 | 24.0 | 0 | 28.6 | 0 | 18.2 | 36.4 |
| | GCT | 41.5 | 24.0 | 100 | 14.3 | 100 | 18.2 | 45.5 |
| | GCC | 16.0 | 12.0 | 0 | 14.3 | 0 | 36.4 | 9.1 |
| Arg | AGG | 4.1 | 0.0 | 0 | 18.2 | 0 | 0.0 | 0.0 |
| | AGA | 22.2 | 45.5 | 0 | 9.1 | 0 | 50.0 | 25.0 |
| | CGG | 6.1 | 9.1 | 0 | 36.4 | 0 | 0.0 | 0.0 |
| | CGA | 15.4 | 18.2 | 0 | 18.2 | 0 | 25.0 | 12.5 |
| | CGT | 40.5 | 18.2 | 100 | 9.1 | 100 | 25.0 | 50.0 |
| | CGC | 11.8 | 9.1 | 0 | 9.1 | 0 | 0.0 | 12.5 |
| Asn | AAT | 79 | 100 | 77.8 | 100 | 76.0 | 57.1 | 85.7 |
| | AAC | 21 | 0 | 22.2 | 0 | 24.0 | 42.9 | 14.3 |
| Asp | GAT | 72.7 | 86.7 | 100 | 65.0 | 100 | 78.6 | 71.4 |
| | GAC | 27.3 | 13.3 | 0 | 35.0 | 0 | 21.4 | 28.6 |
| Cys | TGT | 77.3 | 33.3 | 100 | 75.0 | 100 | 0.0 | 0.0 |
| | TGC | 22.7 | 66.7 | 0 | 25.0 | 0 | 0.0 | 0.0 |
| Gln | CAG | 16.5 | 63.6 | 0 | 50.0 | 0 | 37.5 | 12.5 |
| | CAA | 83.5 | 36.4 | 100 | 50.0 | 100 | 62.5 | 87.5 |
| Glu | GAG | 17.9 | 16.0 | 0 | 26.3 | 0 | 25.0 | 16.7 |
| | GAA | 82.1 | 84.0 | 100 | 73.7 | 100 | 75.0 | 83.3 |
| Gly | GGG | 12.4 | 5.3 | 0 | 20.0 | 0 | 28.0 | 12.0 |
| | GGA | 37.8 | 36.8 | 0 | 10.0 | 0 | 28.0 | 40.0 |
| | GGT | 37.0 | 42.1 | 100 | 60.0 | 100 | 16.0 | 36.0 |
| | GGC | 12.6 | 15.8 | 0 | 10.0 | 0 | 28.0 | 12.0 |
| His | CAT | 74.7 | 80.0 | 100 | 88.9 | 100 | 33.3 | 83.3 |
| | CAC | 25.3 | 20.0 | 0 | 11.1 | 0 | 66.7 | 16.7 |
| Ile | ATA | 11.3 | 22.0 | 0 | 0.0 | 0 | 50.0 | 11.1 |
| | ATT | 68.2 | 69.5 | 100 | 90.5 | 100 | 10.0 | 77.8 |
| | ATC | 20.5 | 8.5 | 0 | 9.5 | 0 | 40.0 | 11.1 |
| Leu | TTG | 21.3 | 31.5 | 0 | 25.0 | 0 | 46.2 | 23.1 |
| | TTA | 31.6 | 35.2 | 0 | 41.7 | 0 | 7.7 | 30.8 |
| | CTG | 5.9 | 5.6 | 0 | 8.3 | 0 | 0.0 | 7.7 |
| | CTA | 7.7 | 9.3 | 0 | 8.3 | 0 | 0.0 | 7.7 |
| | CTT | 25.6 | 18.5 | 100 | 16.7 | 100 | 46.2 | 23.1 |
| | CTC | 7.9 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 7.7 |
| Met | ATG | 100.0 | 100.0 | 100 | 100.0 | 100 | 100.0 | 100.0 |
| Lys | AAG | 17.2 | 26.9 | 0 | 52.4 | 0 | 37.5 | 16.7 |
| | AAA | 82.8 | 73.1 | 100 | 47.6 | 100 | 62.5 | 83.3 |
| Phe | TTT | 75.5 | 87.0 | 100 | 86.7 | 100 | 50.0 | 80.0 |
| | TTC | 24.5 | 13.0 | 0 | 13.3 | 0 | 50.0 | 20.0 |
| Pro | CCG | 8.7 | 40.0 | 0 | 66.7 | 0 | 16.7 | 8.3 |
| | CCA | 46.5 | 40.0 | 100 | 16.7 | 100 | 41.7 | 50.0 |
| | CCT | 36.4 | 20.0 | 0 | 16.7 | 0 | 41.7 | 33.3 |
| | CCC | 8.4 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 8.3 |
| Ser | AGT | 22.3 | 25.0 | 0 | 16.7 | 0 | 8.3 | 25.0 |
| | AGC | 9.0 | 4.2 | 0 | 8.3 | 0 | 66.7 | 8.3 |

| % Uso de codones | | | | | | | | |
|------------------|------------|--|--------------|-----------------------------|--------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Aminoácido | Codón | Cepas de <i>L. lactis</i> ^a | AgrC | | AgrA | | mCherry | |
| | | | Secuencia Lm | Optimizado <i>L. lactis</i> | Secuencia Lm | Optimizado <i>L. lactis</i> | Secuencia <i>E. coli</i> | Optimizado <i>L. lactis</i> |
| | TCG | 5.6 | 20.8 | 0 | 25.0 | 0 | 0.0 | 8.3 |
| | TCA | 33.0 | 25.0 | 100 | 33.3 | 100 | 8.3 | 33.3 |
| | TCT | 25.4 | 20.8 | 0 | 8.3 | 0 | 16.7 | 25.0 |
| | TCC | 4.7 | 4.2 | 0 | 8.3 | 0 | 0.0 | 0.0 |
| Thr | ACG | 11.8 | 31.8 | 0 | 33.3 | 0 | 33.3 | 8.3 |
| | ACA | 39.2 | 27.3 | 0 | 50.0 | 0 | 25.0 | 41.7 |
| | ACT | 36.5 | 27.3 | 100 | 16.7 | 100 | 16.7 | 41.7 |
| | ACC | 12.5 | 13.6 | 0 | 0.0 | 0 | 25.0 | 8.3 |
| Trp | UGG | 100.0 | 100.0 | 100 | 100.0 | 100 | 100.0 | 100.0 |
| Tyr | TAT | 78.2 | 76.5 | 100 | 90.9 | 100 | 58.3 | 75.0 |
| | TAC | 21.8 | 23.5 | 0 | 9.1 | 0 | 41.7 | 25.0 |
| Val | GTG | 13.5 | 11.6 | 0 | 54.5 | 0 | 40.0 | 13.3 |
| | GTA | 19.7 | 27.9 | 0 | 27.3 | 0 | 20.0 | 20.0 |
| | GTT | 48.5 | 55.8 | 100 | 18.2 | 100 | 20.0 | 53.3 |
| | GTC | 18.3 | 4.7 | 0 | 0.0 | 0 | 20.0 | 13.3 |
| STOP | TGA | 19.0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0.0 |
| | TAG | 12.0 | 100.0 | 100 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0.0 |
| | TAA | 69.0 | 0.0 | 0 | 100.0 | 100 | 100.0 | 100.0 |

Por otra parte, debido a que los codones se decodifican a diferentes velocidades, los codones considerados como óptimos para el organismo huésped son codificados a una mayor velocidad y de manera más eficiente en comparación con aquellos considerados como no óptimos o de menor frecuencia (Presnyak, et al., 2015). Debido a que los codones sinónimos se decodifican a diferentes velocidades, los codones se pueden clasificar brevemente en dos categorías, óptimos y no óptimos. En términos generales, los codones óptimos se decodifican más rápido y de manera más eficiente que sus contrapartes no óptimas. Sin embargo, una optimización en el 100% de los codones podría afectar la eficiencia de la traducción, principalmente en la velocidad de iniciación de la traducción, la elongación, así como en el plegamiento de las proteínas y con ello su actividad (Hia & Takeuchi, 2021).

En el caso de las bacterias, se ha determinado que existe un sesgo en el uso de codones raros en el sitio de inicio de la traducción generando una secuencia “rampa” inmediatamente después del codón de inicio, lo cual implica una traducción lenta que conforme avanza va aumentando la velocidad. La función de la rampa es

prevenir el atascamiento ribosomal y la formación de estructuras secundarias (Bentele et al., 2013; Keller et al., 2012). En el caso de los genes *agrC* y *agrA* debido a que las secuencias no cuentan con codones no óptimos, no se puede garantizar la fidelidad de la traducción y el plegamiento adecuado del péptido, dando como resultado proteínas mal plegadas o no funcionales, aunque el problema de estas secuencias puede deberse más al agotamiento de los tRNAs, pues se trata de dos proteínas codificadas en tándem y que además utilizan los mismos codones. Además de que la ausencia de codones raros al inicio de la secuencia no ayuda a prevenir el plegamiento del mRNA en estructuras secundarias.

9.2. Los niveles de expresión de proteínas heterólogas en *L. lactis* se relacionan con la función final que tienen en el sistema

Rieu y colaboradores (2007) observaron que los genes *agrC*, *agrA* presentan niveles de expresión más bajos respecto a los genes *agrB* y *agrD*. Aunque los cuatro genes son transcritos como un solo mensajero, existe diferencia en los niveles de expresión, lo cual puede deberse a la función que tiene cada una de las proteínas sintetizadas.

Una expresión baja de proteína AgrA en *L. lactis* no necesariamente es algo indeseado. Al tratarse de proteínas relacionadas con la activación de factores de virulencia en Lm podrían ser perjudiciales para el crecimiento de *L. lactis* al querer expresarlos de forma heteróloga, por lo tanto, puede ser un evento favorable. Además, al ser un regulador transcripcional, concentraciones mínimas son suficientes para ejercer su función. Por ejemplo, en *Escherichia coli*, se ha observado que los factores de transcripción se producen en concentraciones bajas, siendo suficientes para su función reguladora sin sobrecargar la célula (Bessonova et al., 2019).

Aunque AgrC aún no se ha detectado en este estudio, al ser una proteína que se inserta en la membrana representa mayor complejidad para *L. lactis* pues

debe plegarse e insertarse de manera correcta en la membrana. Cuando se lleva a cabo una sobre expresión de este tipo de proteínas la viabilidad celular puede verse afectada. Por lo que los niveles bajos en la expresión de estos componentes no comprometen el crecimiento de las células biosensoras, algo deseable para mantener la mayor cantidad de células viables para la posterior inducción con AIP.

9.3. Viabilidad de la expresión de proteínas de membrana en *L. lactis*

Debido a la complejidad que presentó el detectar de manera directa a esta quinasa, se optó por utilizar técnicas de fluorescencia para dar seguimiento a la expresión de AgrC mediante el diseño de una proteína quimérica compuesta por la proteína de membrana, un linker flexible de cinco aminoácidos (GSGSG) y la proteína sfGFP como reportero (figura 19).

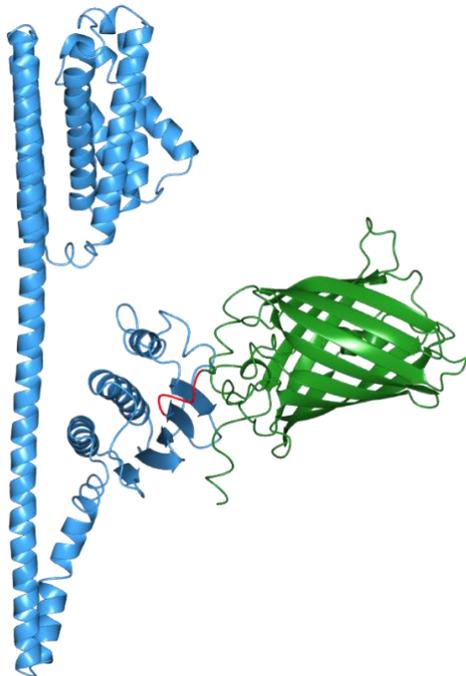


Figura 19. Estructura tridimensional de la proteína quimérica AgrC-linker-sfGFP. En la imagen se muestra el dominio sensor transmembrana y la región citoplasmática de la histidina quinasa AgrC (en azul), fusionado en su extremo C-terminal a la proteína verde fluorescente sfGFP (en verde) mediante un linker flexible de 5 aminoácidos (GSGSG, en rojo). El modelado se realizó utilizando *AlphaFold2* para predicción de estructura y la visualización se realizó con el software CCP4MG.

Con la fluorescencia observada en células de *L. lactis* con la construcción genética pNisA-agrC-linker-sfGFP(Bs) inducidas con nisina puede inferirse que la proteína quimérica AgrC-sfGFP se está produciendo de manera adecuada, considerando que sfGFP se fusionó al extremo C-terminal de AgrC y el correcto plegamiento de sfGFP es consecuencia de una correcta expresión de la proteína de membrana.

Estructuralmente, AgrC cuenta con 6 dominios transmembrana (Autret et al., 2003) y su inserción depende del reconocimiento de sus hélices hidrofóbicas por la maquinaria del huésped. En particular, *L. lactis* cuenta con dos estrategias para inserción de proteínas a la membrana, siendo el complejo de inserción Sec (SecYEG) y el sistema YidC (Ma, et al., 2024). Investigaciones previas en las que se expresa AgrC de *Staphylococcus aureus* como proteína de fusión AgrC-GFP en *E. coli* demuestran que es posible la síntesis de esta histidina quinasa de manera funcional, es decir insertada en la membrana y con actividad quinasa (Wang, et al., 2013).

9.4. Problemas de funcionalidad del biosensor

Como resultados finales, el biosensor desarrollado en *L. lactis* para detectar a *L. monocytogenes* no generó cambio colorimétrico ante la detección del AIP del patógeno. La falta de funcionalidad del sistema se puede atribuir a distintos factores. En primer lugar, aunque la expresión de las proteínas AgrC, AgrA que constituyen al elemento de reconocimiento del biosensor se logró detectar no se realizaron ensayos que comprueben la expresión de proteínas funcionales y activas. En el caso de la proteína AgrA, para que cumpla con su función, necesita estar fosforilada, al igual que AgrC, que posterior a su interacción con AIP ocurre una fosforilación, pero si la proteína no está bien plegada puede que este proceso no se lleve a cabo.

Como segundo punto, un aspecto muy importante y que durante este estudio no se hizo énfasis en él, es en el reconocimiento del promotor PII por parte de la RNA polimerasa de *L. lactis*. Si bien, en el biosensor desarrollado por Lubkowitz y colaboradores (2018) basado en el sistema Agr de *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus reuteri* fue capaz de reconocer al promotor PII, en este caso, se trata de dos bacterias Gram positivas, similar a *L. lactis* y *L. monocytogenes*. No obstante, la eficiencia del promotor puede verse comprometida por diferencias entre la conformación de su secuencia, por ejemplo, las regiones -10 y -35 que permiten el reconocimiento y unión de la RNA polimerasa, al ser diferentes pueden ser menos afines para *L. lactis* (Jin et al., 2019).

Finalmente, los AIPs sintéticos podrían no estar siendo reconocidos por la histidina quinasa (AgrC). Haciendo énfasis en los hallazgos más recientes sobre la estructura del AIP nativo de Lm (Bejder et al., 2024), el AIP que generó mayor efecto en células de Lm, es un pentámero que contiene un anillo de tiolactona de vida muy corta. A comparación con los AIPs antes reportados, en los que se trata de hexapéptidos (Zetzmann et al., 2016; Todd et al., 2017; West, et al., 2023). Además, el péptido con secuencia A(CFMFV) (denominado AIP1 en este estudio) al ser adicionado a cultivos de Lm recombinantes, se generó una inhibición en la señal reportera.

10. CONCLUSIONES

En este estudio se desarrollaron 7 variantes de un biosensor microbiano de células completas basado en *Lactococcus lactis* para detectar a *Listeria monocytogenes* a través de la molécula de señalización AIP.

El diseño del biosensor presentó limitaciones para su aplicación, desde la expresión de proteínas heterólogas, en las que, en algunos casos, como en la expresión de proteínas reporteras, la optimización de codones fue necesaria para poder observar un cambio colorimétrico en las células al aumentar la síntesis proteica.

Parámetros como el índice de adaptación de codones (CAI), número efectivo de codones (ENc) y porcentaje de Guanina-Citosina (% GC), evaluados para los genes *agrC*, *agrA* pronosticaron una baja expresión en *L. lactis*, sin embargo la sobre optimización, es decir una optimización al 100% de los codones afectó negativamente en la síntesis de la proteína, siendo las posibles causas una menor estabilidad del mRNA y mal plegamiento de la cadena peptídica lo que da como resultado proteínas no funcionales.

Finalmente, la falta de respuesta del biosensor ante la adición de AIPs sintéticos, sobrenadantes e interacción con biopelículas de *Listeria monocytogenes*, sugiere problemas adicionales como la incapacidad de los péptidos sintéticos utilizados para activar al sistema Agr, la baja concentración y estabilidad del AIP nativo presente en sobrenadantes y biopelículas o bien, el poco reconocimiento del promotor PII por parte de la maquinaria de transcripción de *L. lactis*.

A pesar de no observar una señal que evidenciara el funcionamiento del biosensor, este proyecto sienta las bases para el estudio a profundidad de cada uno de los elementos del biosensor para poder generar una herramienta funcional para la detección del patógeno alimentario *L. monocytogenes* puesto que fue posible la expresión de las proteínas AgrC y AgrA que comprenden al elemento de

reconocimiento del biosensor, siendo resultados que podrían dirigirse a evaluar la funcionalidad de ambas proteínas.

Con base en estos datos, se puede argumentar que la hipótesis planteada en esta investigación se rechaza: La expresión del sistema Agr en *Lactococcus lactis* permitirá la detección del péptido autoinductor AIP de *Listeria monocytogenes*, esta interacción desencadenará la activación del promotor *P_{II}* y por consiguiente la expresión de un gen reportero que emitirá una señal óptica como respuesta a la detección del patógeno.

Es así como durante el desarrollo de este proyecto se validó parcialmente el funcionamiento del circuito genético que constituye al biosensor desarrollado. Con lo cual se pueden plantear diversos ensayos adicionales que permitan confirmar la fosforilación de las proteínas AgrC, AgrA, la activación del promotor *P_{II}* de manera in vitro, evaluando la integridad de todo el sistema y posteriormente, la detección del péptido AIP de *L. monocytogenes*.

12. ANEXOS

Anexo 1. Producción y purificación de proteínas para generar anticuerpos para Western blot

Para identificar la presencia de las proteínas AgrC, AgrA en *L. lactis* se realizó WB, para lo cual fue necesario producir y purificar ambas proteínas producidas por *E. coli* para la posterior generación de anticuerpos Anti-AgrA y Anti-AgrC. La metodología se basó en la clonación del gen AgrA y el dominio citoplasmático C-terminal (residuos 207 a 431) de AgrC en el vector pColdI entre los sitios de clonación PstI y EcoRI utilizando los oligonucleótidos de la tabla 5. *agrC* y *agrA* de Lm se amplificaron con la Q5 polimerasa bajo las siguientes condiciones de PCR: 98 °C durante 30 s; seguido de 30 ciclos de 10 s a 98 °C y 30 s a 65 °C; amplificación a 72 °C durante 23 y 40 s para *agrA* y *agrC*, respectivamente; y una extensión final de 72 °C durante 5 min para amplificaciones de 729 pb (*agrA*) y 1314 (*agrC*). Los productos de PCR se purificaron con el kit FavorPrepTm Gel/PCR purification Mini kit, una vez purificados se digirieron con las enzimas PstI y EcoRI durante 1 h a 37 °C, posteriormente se realizó una segunda purificación y finalmente se cuantificaron. pColdI se obtuvo de un cultivo de *E. coli* TOP10 que contenía el vector. El DNA plasmídico se obtuvo con el kit E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I, éste fue digerido con las enzimas PstI y EcoRI, purificado y cuantificado.

Tabla 16. Oligonucleótidos para las construcciones pColdI-AgrC, pColdI- Δ N-termAgrC y pColdI-AgrA.

| Oligonucleótido | Secuencia del oligonucleótido (5'-3') |
|--------------------|---|
| Fw_agrC_Lm/EcoRI | CCGGAATTCATGTTTAGTATTTTGATGGCAATTATACAGA |
| Rv_agrC_Lm/PstI | CTCACTGCAGCTACATAATTTCTAATTCTTGAATAACTTC |
| Fw_C-terminal_agrC | GCAACCAACGAACTTAAAGTACAGAATCAG |
| Rv_EcoRI/pCold | GAATTCGGATCCCTCGAGGGTAC |
| Fw_agrA_Lm/EcoRI | CCGGAATTCATGCTACCGGTTTTTATTTGTGAAGATAACA |
| Rv_agrA_Lm/PstI | GACTCTGCAGTTATAAACTCAAGCTTTTAATTAATTTTCGATG |

Se consideró una relación 3:1 inserto: vector para la reacción de ligación, la cual se incubó a 16 °C durante 16 h. El producto de ligación se propagó dializó durante 20 min en membranas de 0.22 µm de corte, éste se utilizó para transformar células electrocompetentes de *E. coli* TOP10 mediante electroporación. En condiciones frías, en una celda de electroporar se adicionaron 3 µL de ligación a 40 µL de células. Se utilizó un electroporador de células *E. coli* Pulser™ (BIORAD) a 2,5 kV de pulso. Posteriormente, se adicionó 1 mL de medio LB y se incubó por 1 h a 37 °C. 100 µL de células transformantes se distribuyeron en placas de agar LB suplementado con Ampicilina y estreptomycin (LB/Amp¹⁰⁰/Str²⁵) para una concentración final de 100 y 25 µg/mL, y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Mediante digestión enzimática con PstI y EcoRI se seleccionaron las colonias positivas, es decir que contenían el vector (pColdI) y el gen (*agrC* o *agrA*) denominadas pColdI-AgrA y pColdI-AgrC. DNA de pColdI-AgrC se utilizó como molde para eliminar el módulo sensor N-terminal (residuos 1 a 206) de AgrC mediante los oligonucleótidos Fw_C-terminal_agrC y Rv_EcoRI/pCold utilizando las condiciones de amplificación para la Q5 polimerasa, con una temperatura de alineamiento de 58 °C y tiempo de extensión de 2 min 32 s (5073 pb). El producto de PCR se purificó y trató con la enzima Fast Digest DpnI (Thermo Scientific, FD1704) para eliminar el DNA molde a 37 °C por 1 h, seguido de una purificación DNA y ligación de este. El producto de ligación se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* TOP10 para generar la construcción genética pColdI-ΔNterm-AgrC.

El DNA obtenido de TOP10 de pColdI-AgrA y pColdI-ΔNterm-AgrC fue utilizado para transformar células electrocompetentes de *E. coli* BL21 Rosseta DE3 siguiendo la metodología de electroporación para *E. coli* TOP10. Las células fueron esparcidas en LB/Amp¹⁰⁰/Cam³⁴. Una colonia de cada construcción fue crecida en LB/Amp¹⁰⁰/Cam³⁴ durante 16 h a 37 °C para inocular 200 mL de medio fresco. Las células se incubaron a una O.D. _{600 nm} de 0.5, seguido de un choque de frío (4 °C) de 15 min y una posterior inducción con Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 M para una concentración final de 0.5 mM durante un periodo de 16 h a 18 °C.

Las células inducidas se recolectaron mediante centrifugación a 4000 rpm por 10 min. El pellet celular se resuspendió en 30 mL de buffer de fosfatos 20 mM (KH_2PO_4 1M, K_2HPO_4 1M) y se colocó en hielo para someterse a ultrasonidos durante 2 min con pulsos de encendido y apagado de 9 s cada uno, a una amplitud al 40%.

La purificación de las proteínas AgrC AgrA se realizó por afinidad a níquel variando los buffers de lavado dependiendo de la hidrofobicidad de la proteína. Para AgrC, el extracto sonicado se centrifugó a 4000 rpm por 10 min, el sobrenadante se recuperó y filtro por una membrana de 0.45 μm , después se inyectó en una columna de His-TrapTM HP (CytivaTM) previamente equilibrada con 5 volúmenes de columna de buffer de fosfatos 20 mM. Luego se realizó un lavado con 5 volúmenes de columna de buffer de lavado 1 (L1: Imidazol 10 mM en buffer de fosfatos 20 mM) seguido de un lavado con 5 volúmenes de columna de buffer de lavado 2 (L2: Imidazol 20 mM en buffer de fosfatos 20 mM) y posteriormente se realizó la elución con 2 volúmenes de buffer de elución (Imidazol 500 mM en buffer de fosfatos 20 mM). Se colectaron todas las fracciones del primer volumen en cada paso de la purificación de AgrC las cuales fueron monitoreadas por SDS-PAGE como se describió anteriormente. Debido a la baja pureza de la proteína, la muestra se filtró por medio de un cartucho estéril para jeringa de 0.22 μm (Thermo Fisher) y se purificó con una columna de exclusión molecular Superdex30 HiLoad 16/60 (GE Healthcare), usando como fase móvil buffer de fosfatos 20 mM pH 7 en un flujo isocrático de 1 mL/min. Las fracciones 18, 19, 20 y 21 exhibieron un aumento en la UV dada por AgrC, lo cual se comprobó al visualizar cada fracción mediante SDS-PAGE. Estas fracciones se mezclaron y cuantificaron por el método de Bradford. Finalmente se ajustó a una concentración de 500 μg de proteína total para ser utilizada en la generación de anticuerpos policlonales en ratones.

En el caso de AgrA, al tratarse de una proteína hidrofóbica, se consideró la metodología descrita en el manual de Cytiva (Cytiva, 2024) para el manejo de cuerpos de inclusión. Las fracciones del primer volumen de cada paso de purificación fueron visualizadas por SDS-PAGE para determinar la pureza de AgrA.

Una vez pura, la proteína se cuantificó por el método de Bradford y finalmente se ajustó a una concentración de 500 µg de proteína total para ser utilizada en la generación de anticuerpos policlonales en ratones.

Los anticuerpos policlonales Anti-AgrC y Anti-AgrA fueron generados por el Laboratorio de Biología Molecular del Desarrollo, del CINVESTAV (UGA, Langebio).

La detección de las proteínas del sistema de dos componentes AgrC/AgrA producidas por *L. lactis* de manera recombinante y de Lm de manera nativa se llevó a cabo mediante Western blot (WB). Para ello, se realizaron las construcciones pColdI-AgrC y pColdI-AgrA (figura 8 b) que permitieron generar los anticuerpos policlonales para cada una en ratón. Particularmente, AgrC al ser una proteína receptora, parte de su estructura se encuentra en la membrana (domino N-terminal), lo que puede complicar el proceso de purificación de la proteína pues es necesario el uso de técnicas como ultra centrifugación para lograr la separación de la membrana y de la proteína de manera adecuada. Por lo tanto, se decidió trabajar únicamente con la parte soluble de la proteína, es decir el domino histidina quinasa ubicado en el periplasma. Para ello, partiendo de la construcción pColdI-agrC, mediante PCR se eliminaron 608 pb de la secuencia de agrC, generando la construcción pColdI-agrCΔ-Nterm (figura 8 c).

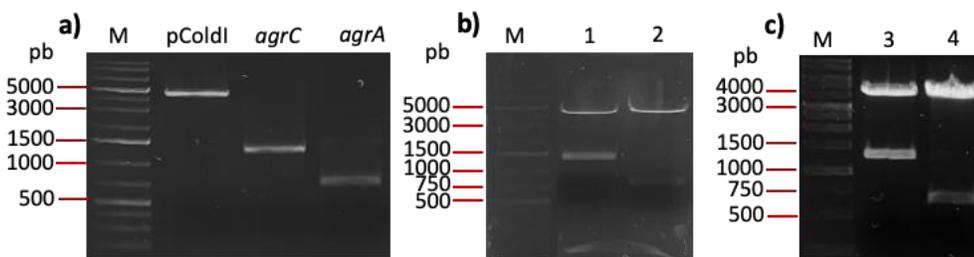


Figura 20. Estrategia de clonación de *agrC* y *agrA* en pColdI. **a)** Vector y genes listos para ligar. **b)** DNA de clonas de *E. coli* con la construcción pColdI-agrC (1, 3) y pColdI-agrA (2) digerido con PstI y EcoRI, las bandas liberadas corresponden al vector (4407 pb) y a los genes *agrC* (1296 pb) y *agrA* (729 pb). **c)** Selección de clonas con la construcción pColdI-agrCΔ-Nterm. El DNA de las clonas positivas (4) liberaron bandas que corresponden al vector pCold-I (4407 pb) y al gen *argC* sin la región ΔNterm (688 pb) tras digestión enzimática con PstI y EcoRI. **M:** marcador de peso molecular. **pb:** pares de bases.

Una vez identificadas las clonas de *E. coli* TOP10 con las construcciones pColdI- Δ Nterm-AgrC y pColdI-AgrA, se transformaron células de *E. coli* BL21 Rosseta y posterior a la inducción con IPTG se identificó la presencia de la banda correspondiente a las proteínas AgrC y AgrA mediante SDS-PAGE (Datos no mostrados). Los extractos bacterianos fueron purificados por afinidad a níquel. En la figura 9 a, se muestra el proceso de purificación monitoreado por SDS-PAGE de la proteína AgrA hasta obtener un menor fondo de proteínas que no corresponden a esta. Para la purificación de la parte soluble de AgrC, posterior a la purificación por columnas de níquel, se obtuvo una mayor concentración de la proteína, sin embargo, la presencia de bandas correspondientes a otras proteínas no permitió su uso directo (figura 9 b). Por lo que fue necesaria una re-purificación mediante exclusión molecular. Como resultado, las fracciones 18, 19, 20 y 21 (representadas por un pico) generaron un cambio en la absorbancia del cromatograma (figura 9 c) y al ser monitoreadas por SDS-PAGE se observó la banda correspondiente a la proteína (figura 9 d) cuya pureza fue suficiente para poder llevar a la generación del anticuerpo.

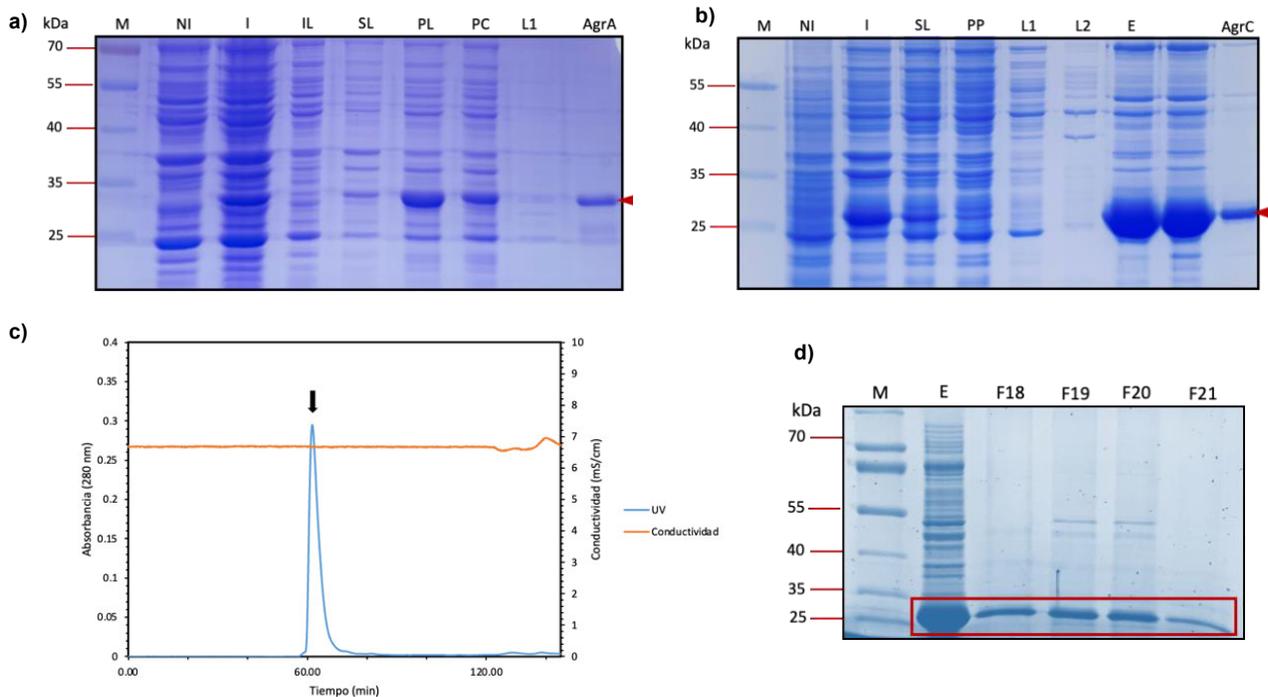


Figura 21. Purificación de las proteínas AgrA y AgrC por afinidad a níquel. **a)** Proceso de purificación de la proteína AgrA monitoreado por SDS-PAGE. **b)** Proceso de purificación de la proteína AgrC monitoreado por SDS-PAGE. **c)** Cromatograma de la purificación por exclusión molecular de la proteína AgrC pretratada, la flecha indica el cambio en la absorbancia que representa a las fracciones en donde se encuentra la proteína pura, correspondiendo a las fracciones 18 a 19. **d)** SDS-PAGE de las fracciones 18 a 21 en donde se encuentra la proteína AgrC. **M:** marcador de peso molecular. **kDa:** kiloDalton. **NI:** no inducido. **I:** Inducido. **IL:** Inducido post-lisis. **SL:** Sobrenadante lisado. **PL:** Pellet lisado. **PC:** pellet pasado por columna de níquel. **L1:** lavado 1 de columna. **L2:** lavado 2 de columna. **E:** Elución. **F18, F19, F20, F21:** Fracciones que contienen a la proteína AgrC pura.

Anexo 2. Producción y purificación de mRFP para generar anticuerpos para Western blot

La funcionalidad del biosensor se determinó mediante cambio colorimétrico y por inmunodetección. Particularmente, para la inmunodetección, se llevó a cabo la expresión y purificación de la proteína mRFP que comparte un 84% de identidad con mCherry, proteína reportera del biosensor. La metodología se basó en la clonación del gen *mrfp* en el vector pColdI entre los sitios de clonación PstI y EcoRI utilizando los oligonucleótidos de la tabla 6. *mrfp* se amplificó con la Q5 polimerasa bajo las siguientes condiciones de PCR: 98 °C durante 30 s; seguido de 30 ciclos de 10 s a 98 °C y 30 s a 60 °C; amplificación a 72 °C durante 11 s y una extensión final de 72 °C durante 5 min para una amplificación de 678 pb. El proceso de purificación y digestión del gen y del vector pColdI, así como la ligación y transformación de células de *E. coli* TOP10 y BL21 Rosseta DE3 se realizó acorde a lo descrito en el anexo 1.

Tabla 17. Oligonucleótidos para la construcción pColdI-mrfp/ PstI-EcoRI.

| Oligonucleótido | Secuencia del oligonucleótido (5'-3') |
|------------------|---------------------------------------|
| Fw_mRFP_Lm/EcoRI | CCGGAATTCATGGCTTCCTCCGAAGACGT |
| Rv_mRFP_Lm/PstI | GACTCTGCAGTTAAGCACCGGTGGAGTGACGAC |

El proceso de producción de la proteína consistió en la inducción con IPTG 0.5 M de células recombinantes de BL21 durante 16 h a 18 °C. El proceso de purificación de la proteína se realizó mediante una purificación por afinidad a níquel. La proteína purificada se ajustó a una concentración de 500 µg de proteína total para ser utilizada en la generación de anticuerpos policlonales en ratones.

13. PROTOCOLOS GENERALES

Protocolo 1. Extracción DNA genómico

1. Crecer 5 mL de cultivo bacteriano toda la noche.
2. Recuperar células centrifugando 1 min a 10,000 rpm.
3. Resuspender pellet en 1 mL de TE 50/20.
4. Centrifugar por 5 min a 13 000 rpm y eliminar el sobrenadante.
5. Resuspender pellet en 1 mL de acetona fría e incubar en hielo por 5 min.
6. Centrifugar por 4 min a 13 000 rpm y eliminar el sobrenadante.
7. Resuspender pellet en 500 µL de TE 50/20 y 10 µL de lisozima (50 mg/mL) e incubar a 37 °C por un periodo de 2 h.
8. Añadir 75 µL de SDS 10% y 125 µL de NaCl 5 M, homogeneizar por inversión e incubar en hielo seco por 3 min seguido de un periodo de incubación a 65 °C (realizar tres repeticiones de este ciclo de cambios de temperatura).
9. Incubar 10 min en hielo.
10. Centrifugar a 13 000 rpm por 5 min. Recuperar sobrenadante y colocar en tubo nuevo.
11. Adicionar 10 µL de RNAsa A e incubar 15 min a 37 °C. Adicionar 10 µL de proteinasa K e incubar a 37 °C por 30 min.
12. Añadir un volumen en relación 1:1:1 de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y homogeneizar por inversión hasta formar una emulsión.
13. Centrifugar 4 min a 13 000 rpm. Transferir fase acuosa superior a un microtubo nuevo y aforar a 1.5 mL con etanol de 96 °C.
14. Incubar a 4 °C toda la noche para una buena precipitación de DNA.
15. Centrifugar a 13 000 rpm por 10 min. Lavar el pellet con etanol al 70%, centrifugar a 13 000 rpm por 10 min.
16. Secar pellet con el tubo invertido a temperatura ambiente.
17. Disolver pellet en 50 µL de agua destilada. Almacenar a -20 °C (Kutchma, et al., 1998).

TE 50/20, 50 mL

| Reactivo | Volumen/gramos | Concentración final |
|-----------------|-----------------------|----------------------------|
| Tris HCl | 302.85 mg | 50 mM |
| EDTA | 292.244 mg | 20 mM |

Ajustar pH a 8 con HCl y aforar a 50 ml con agua destilada.

SDS al 10%, 50 mL

- Pesar 5 g de Dodecil Sulfato de Amonio (SDS).
- Disolver en agua y ajustar a un volumen final de 50 mL de agua.

NaCl 5M, 50 mL

- Pesar 14.61 g de Dodecil Sulfato de Amonio (SDS).
- Disolver en agua y ajustar a un volumen final de 50 mL de agua.

Protocolo 2. Extracción de DNA plasmídico *Lactococcus lactis*

1. Usar 5 mL de cultivo crecido durante toda la noche a 30 °C sin agitación de *L. lactis*.
2. Centrifugar 10 min a 3000-6000 x g.
3. Resuspender pellet en 250 µL de THMS buffer + 10 µL de lisozima 50 mg/mL para una concentración final de 2 mg/mL.
4. Incubar 10 min a 37 °C.
5. Añadir 500 µL de NaOH 0.2 N + SDS 1%. Mezclar cuidadosamente (no vortexear).
6. Incubar en hielo 5 min.
7. Añadir 375 µL de Acetato de potasio 3M pH 5.5, mezclar cuidadosamente.
8. Incubar 5 min en hielo.
9. Centrifugar 5 min a 13 000 rpm.
10. Pasar sobrenadante a tubo de 1.5 mL nuevo.
11. Llenar el tubo con 2-isopropanol.
12. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
13. Centrifugar 10 min a 13 000 rpm.
14. Lavar pellet cuidadosamente con etanol al 70%.
15. Eliminar sobrenadante y secar el pellet con el tubo invertido a temperatura ambiente.
16. Disolver pellet en 50 µL de agua destilada libre de nucleasas (MoBiTec, 2015).

THMS Buffer, 50 mL

| Reactivo | Volumen/gramos | Concentración final |
|-----------------------|----------------|---------------------|
| Tris HCl 1M pH 8 | 1.5 mL | 30 mM |
| MgCl ₂ 1 M | 150 µL | 3 mM |
| Sacarosa | 12.5 g | 25 % |

Acetato de potasio 3 M pH 5.5, 50 mL

- Pesar 14.721 g de acetato de potasio
- Disolver en 40 mL en agua.
- Ajustar pH con aproximadamente 5.1 mL de HCl.
- Mantener a 4 °C.

NaOH 0.2 N + SDS 1%, 50 mL

| Reactivo | Volumen/gramos | Concentración final |
|-----------------|-----------------------|----------------------------|
| NaOH | 400 mg | 0.2 N |
| SDS al 10% | 5 mL | 1% |

Almacenar por un periodo menor a 3 meses.

Protocolo 3. Preparación de células electrocompetentes de *Lactococcus lactis*

1. **Día 1:** Inocular 5 mL de medio G-SGM17B con glicerol de *L. lactis*. Incubar toda la noche a 30 °C, sin agitación.
2. **Día 2:** Inocular 50 mL de medio G-SGM17B con 500 µL de precultivo. Incubar a 30 °C toda la noche, sin agitación.
3. **Día 3:** Añadir 50 mL de cultivo crecido a 400 mL de medio G-SGM17B, crecer hasta una O.D. _{600 nm} de 0.2-0.3 (Aproximadamente 3 h).
4. Centrifugar células por 15 min a 6000 g, 4 °C.
5. Lavar células con 400 mL de sacarosa/glicerol y centrifugar 15 min a 6000 g.
6. Resuspender células en 200 mL de sacarosa/glicerol/EDTA (4 °C). Mantener suspensión en hielo por 15 min. Centrifugar por 15 min a 6000 x g, 4 °C.
7. Lavar células con 100 mL de sacarosa/glicerol y centrifugar 15 min a 6000 g.
8. Resuspender células en 4 mL de sacarosa/glicerol. Distribuir en alícuotas de 100-200 µL. Mantener a -80 °C.

Electroporación de células

9. Usar 40 µL de células y adicionar 3 µL de DNA (500-1,000 ng producto de ligación) previamente dializado en filtro de 0.22 µm, a una celda de electroporación pre-enfriada y mantener en hielo.
10. Electroporar ajustando a los siguientes parámetros: 200 V, 25 µF, 200 Ω, pulso de 4.5- 5 ms. Añadir 1 mL de medio de recuperación. Mantener celda 5 min en hielo e incubar 1-1.5 h a 30 °C.
11. Plaquesear 100 y 900 µL de células en placas de agar M17 suplementado con lactosa 10% para una concentración final de 0.5% (MoBiTec, 2015).
12. Incubar de 24 a 48 h a 30 °C.

G/SGM17B, 450 mL

| Reactivo | Volumen/gramos | Concentración final |
|-----------------|-----------------------|----------------------------|
| M17 | 17.865 g | |
| Glicina | 11.25 g | 2.5 % |
| Sacarosa | 77 g | 0.5 M |
| Glucosa 10% | 22.5 mL | 0.5% |

Esterilizar y adicionar glucosa.

Sacarosa/Glicerol, 500 mL

| Reactivo | Volumen/gramos | Concentración final |
|-----------------|-----------------------|----------------------------|
| Sacarosa | 85.574 g | 0.5 M |
| Glicerol | 50 mL | 10 % |

Aforar a 500 mL con agua destilada.

Sacarosa/Glicerol/EDTA, 200 mL

| Reactivo | Volumen/gramos | Concentración final |
|-----------------|-----------------------|----------------------------|
| Sacarosa | 34.23 g | 0.5 M |
| Glicerol | 20 mL | 10 % |
| EDTA | 2.92 g | 0.05 M |

Aforar a 200 mL con agua destilada.

Medio de recuperación, 1 mL

| Reactivo | Volumen/gramos | Concentración final |
|-----------------------|-----------------------|----------------------------|
| M17B | 970 μ L | |
| Glucosa 10 % | 50 μ L | 0.5 % |
| MgCl ₂ 1 M | 20 μ L | 20 mM |
| CaCl ₂ 1 M | 2 μ L | 2 mM |

Protocolo 4. Extracción de DNA plasmídico por CTAB

1. Usar 5 mL de cultivo crecido durante toda la noche a 37 °C y 200 rpm de *Escherichia coli*. Centrifugar 1 min a 10,000 rpm. Eliminar sobrenadante.
2. Resuspender pellet en 200 µL de STET buffer + 4 µL de lisozima 50 mg/ mL para una concentración final de 1 mg/mL.
3. Incubar 5 min a 37 °C.
4. Hervir 1 min. Centrifugar 10 min a 13 000 rpm.
5. Eliminar pellet formado con un palillo estéril.
6. Agregar 8 µL de CTAB al sobrenadante, mezclar y centrifugar a 13 000 rpm por 5 min.
7. Decantar y resuspender con 300 µL de NaCl 1.2 M.
8. Adicionar 750 µL de etanol absoluto frío.
9. Centrifugar 10 min a 13 000 rpm. Desechar sobrenadante.
10. Lavar pellet con etanol al 70%, vortexear. Centrifugar a 13 000 rpm por 5 min.
11. Eliminar sobrenadante y secar el pellet con el tubo invertido a temperatura ambiente.
12. Disolver pellet en 30 µL de agua destilada libre de nucleasas.

STET Buffer, 50 mL

| Reactivo | Volumen/gramos | Concentración final |
|--------------|----------------|---------------------|
| Tris HCl | 60 .57 g | 10 mM |
| EDTA | 14.612 mg | 1 mM |
| NaCl | 292. 2 mg | 100 mM |
| Triton X-100 | 2.5 mL | 5% |

Aforar a 50 mL con agua destilada.

NaCl 1.2 M, 50 mL

- Pesar 3.5 g de acetato de potasio
- Disolver en 50 mL de agua.

Protocolo 5. Preparación de células electrocompetentes de *Escherichia coli*

1. Partir de un cultivo de *E. coli* de 5 mL en LB suplementado con el antibiótico adecuado, crecido toda la noche a 37 °C y 200 rpm.
2. Adicionar cultivo a 500 mL de LB fresco con el antibiótico correspondiente. Incubar hasta una O.D. _{600 nm} de 0.4-0.6. Mantener el cultivo en hielo por 15 min. A partir de aquí, trabajar en frío.
3. Centrifugar a 4 000 rpm por 20 min, a 4 °C. Eliminar medio.
4. Resuspender pellet con 2 mL de glicerol al 10% frío, lavar con 200 mL de glicerol al 10 %. Centrifugar a 4 000 rpm por 10 min. Decantar.
5. Resuspender la pastilla con 2 mL de glicerol al 10% frío y después con 150 mL de glicerol frío. Centrifugar a 4 000 rpm por 10 min. Decantar.
6. Resuspender la pastilla con 2 mL de glicerol al 10% frío y después con 50 mL de glicerol frío. Centrifugar a 4 000 rpm por 10 min. Decantar.
7. Resuspender en 1.5 mL de glicerol al 10% frío.
8. Hacer alícuotas de 100 µL.

Electroporación de células

1. Usar 50 µL de células y adicionar 3 µL de DNA previamente dializado en filtro de 0.22 µm, a una celda de electroporación pre-enfriada y mantener en hielo.
2. Electroporar ajustando a los siguientes parámetros: 2 V, 25 µF, 200 Ω, pulso de 4.0- 5.0 ms. Añadir 1 mL de medio de LB e incubar 1 h a 37 °C y 200 rpm.
3. Plaquear 100 y 900 µL de células en placas de agar LB suplementado con antibiótico (MoBiTec, 2015).
4. Incubar de 24 h a 37 °C.

Glicerol 10%

- Medir 45 mL de glicerol puro y con agua destilada llevar a un volumen de 450 mL. Esterilizar.

Antibióticos para cepas de *E. coli*

| Cepa de <i>E. coli</i> | Resistencia | Concentración final | Disolvente |
|-------------------------------|--------------------|----------------------------|-------------------|
| TOP10 | Estreptomina | 25 µg/mL | Agua |
| BL21 Rosseta DE3 | Cloranfenicol | 34 µg/mL | Etanol |
| Origami | Estreptomina | 50 µg/mL | Agua |
| | Kanamicina | 25 µg/mL | Agua |
| | Tetraciclina | 12.5 µg/mL | Etanol |
| pLys | Cloranfenicol | 34 µg/mL | Etanol |
| DH10B | Estreptomina | 25 µg/mL | Agua |

Protocolo 6. Extracción de RNA

Lisado y preparación de muestras

1. Usar 5 mL de cultivo crecido durante toda la noche. Centrifugar 1 min a 10,000 rpm.
2. Añadir 1 mL de TRIZol Reagent (ABP Biosciences, FP312), mezclar perfectamente con una punta.
3. Incubar durante 5 minutos para permitir la disociación completa del complejo de nucleoproteínas.
4. Añadir 200 μ L de cloroformo por cada 1 mL de reactivo TRIZol, tapar bien el tubo.
5. Incubar de 2 a 3 minutos.
6. Centrifugar la muestra durante 15 minutos a 12,000 \times g a 4 °C.
7. La mezcla se separa en una interfase inferior de fenol-cloroformo azul y una fase acuosa superior incolora. Transferir la fase acuosa incolora que contiene el ARN a un tubo nuevo inclinándolo a 45° y pipeteando la solución.

Aislamiento de RNA

8. Añadir 500 μ L de isopropanol a la fase acuosa. Incubar durante 10 minutos. Posteriormente centrifugar durante 10 minutos a 12,000 \times g a 4 °C. El precipitado de RNA total forma un sedimento blanco gelatinoso en el fondo del tubo. Desechar el sobrenadante con una micropipeta.

Lavado de RNA

9. Resuspender el sedimento en 1 mL de etanol al 75 %. Nota: El ARN puede conservarse en etanol al 75 % durante al menos un año a -20 °C o una semana a 4 °C.
10. Agitar la muestra brevemente en vórtex y centrifugar durante 5 minutos a 7500 \times g a 4 °C.

11. Desechar el sobrenadante con una micropipeta y secar al aire el tubo invertido durante 5-10 min.

Solubilización de RNA

12. Resuspender el pellet en 30 μ L de agua.
13. Incubar en un baño María a 60 °C por 10 min.
14. Almacenar a -80 °C.

Electroforesis de RNA

15. Dejar equipo de electroforesis con Antibenzil al 10% toda una noche. Lavar con agua destilada.
16. Preparar gel de agarosa 0.8%-formaldehído 1.2%. Equilibrar gel en buffer de corrida 1 X por 30 min.
17. Incubar 4 μ L de RNA con 1 μ L de buffer de carga 5 X a 65 °C por 10 min.
18. Correr gel a 70 V.

Buffer de corrida 10 X, 200 mL

| Reactivo | Volumen/gramos | Concentración final |
|-----------------------|-----------------------|----------------------------|
| MOPS | 8.37 g | 200 mM |
| Acetato de sodio | 1.36 mg | 50 mM |
| EDTA stock 500 mM pH8 | 4 μ L | 10 mM |

Ajustar pH con NaOH 1M (aproximadamente 10 mL) y llevar a 200 mL con agua destilada.

Buffer de corrida 1 X, 200 mL (preparar al momento)

- Agregar 20 mL de buffer de corrida 10 X a 173.4 mL de agua destilada.
- Agregar 6.4 mL de formaldehído 37%.

Buffer de carga 5X

| Reactivo | Volumen/gramos | Concentración final |
|-----------------------|-----------------|---------------------|
| EDTA stock 500 mM pH8 | 8 μ L | |
| Formaldehído 37% | 72 μ L | |
| Glicerol | 200 μ L | |
| Formamida | 308.4 μ L | |
| Buffer de corrida 10X | 400 μ L | |
| Azul de bromofenol | Tomar una asada | |

Aforar a 5 mL con agua destilada.

Gel agarosa 0.8%-formaldehído al 1.2%, 20 mL (preparar al momento)

- Pesar 160 mg de agarosa.
- Agregar 2 mL de buffer de corrida 10 X.
- Llevar a un volumen final de 20 mL.
- Disolver agarosa en microondas.
- Enfriar a 65 °C y agregar 540 μ L de formaldehído 37%.
- Agregar 0.2 μ L de bromuro de etidio.
- Mezclar y formar gel.

Protocolo 7. Westernblot para proteínas no visualizadas por tinción

Preparación de muestras

1. Partir de un cultivo de 25 mL sin inducir o inducido. Recolectar pellet mediante centrifugación 10 min a 6000 rpm.
2. Resuspender pellet en 500 μ L de buffer de lisis.
3. Sonicar 2 min, mantener las muestras en hielo. Los parámetros del programa de sonicación son: amplitud al 40%, tiempo de proceso de 2 min, con pulsos de encendido y apagado de 9 s cada uno.
4. Tomar 80 μ L del lisado y mezclar con 20 μ L de buffer de carga Laemmly 5X.
5. Hervir 5 min.
6. Mantener en hielo.

Preparación de geles SDS-PAGE al 12%

7. Preparar un gel de poliacrilamida al 12% para SDS-PAGE, mezclando los reactivos de la tabla 18 en el orden especificado.

Tabla 18. Componentes de gel de poliacrilamida al 12%.

| SDS-PAGE 12% | Separador | | Concentrador | | |
|--------------------|-----------|------------|--------------|-------------|-------------|
| | Reactivo | 1 gel | 2 geles | 1 gel | 2 geles |
| Agua | | 1.6 mL | 3.3 mL | 1.4 mL | 2.8 mL |
| Tris HCl 1M pH 8.8 | | 1.3 mL | 2.5 mL | --- | --- |
| Tris HCl 1M pH 6.8 | | --- | --- | 250 μ L | 500 μ L |
| Acrilamida 30% | | 2 mL | 4 mL | 330 μ L | 660 μ L |
| SDS 10% | | 50 μ L | 100 μ L | 20 μ L | 40 μ L |
| PSA 10% | | 50 μ L | 100 μ L | 20 μ L | 40 μ L |
| TEMED | | 5 μ L | 10 μ L | 5 μ L | 10 μ L |

8. Cargar 15-20 μ L de muestra por pocillo.
9. Correr gel a 120 V.

Preparación de membrana de transferencia

10. Remover parte concentradora del gel, o bien toda la parte que no se desea transferir.
11. Equilibrar con 50 mL de Buffer de transferencia por 15 min con agitación suave (35 rpm).
12. Cortar membrana de PVDF del tamaño del gel y hacer una pequeña muesca en la parte inferior derecha para identificar el orden de las muestras, y activar en 10 mL de metanol al 100% por 1 min.
13. Tomar membrana activada con pinzas y transferir a buffer de transferencia. Equilibrar por 5 min.

Preparación Westernblot

14. Humedecer 6 piezas de papel de filtro de ~1 mm, en buffer de transferencia.
15. Preparar 2 marcos de acetato delgado (1mm) de la dimensión del ánodo y el cátodo (19.5 cm x 19.5 cm), cortando un orificio rectangular ligeramente más pequeño respecto a las dimensiones del papel filtro.
16. Humedecer ánodo y cátodo con buffer de transferencia para adherir acetatos a placas. No deben quedar charcos.
17. Colocar una cama de 3 piezas de papel filtro humedecido sobre el ánodo (parte inferior). Pasar rodillo para eliminar burbujas.
18. Colocar membrana con pinzas sobre papel y eliminar burbujas con rodillo.
19. Colocar gel con los guantes sobre la membrana y eliminar burbujas.
20. Colocar una segunda cama de papel filtro humedecido sobre el gel y eliminar burbujas con rodillo.
21. Fijar marco de acetato en el cátodo con cinta de papel en cada esquina para evitar que se mueva.
22. Colocar placa sobre el sándwich formado, aplicar presión para insertar cables. Colocar la tapa del equipo.
23. Ajustar potencia a 15 V y correr por 1 h.

24. Tomar membrana con las pinzas y colocar sobre una toalla de papel para secar a temperatura ambiente.
25. Lavar todo el equipo, acetatos y papeles de filtro con agua destilada para eliminar sales.
26. Activar membrana en metanol al 100% por 1 min.
27. Incubar en TBS-T 1X por 5 min a 35 rpm.
28. Eliminar TBS-T 1X e incubar con 15 mL de solución de bloqueo a temperatura ambiente por 1 h a 35 rpm.
29. Lavar membrana con 10 mL TBS-T 1X, dejando en solución por 5 min. Repetir 2 veces más.
30. Incubar membrana toda la noche a 4 °C, con el anticuerpo primario adecuado en relación 1:500 diluido en TBS-T 1X más leche descremada al 1%.
31. Lavar la membrana con TBS-T 1X por 7 min. Repetir 2 veces más.
32. Incubar la membrana por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario antiratón-AP (Alkaline phosphatase) en dilución 1:2000 resuspendido en TBS-T 1X con leche descremada al 1%.
33. Lavar la membrana 2 veces con TBS-T 1X, incubar entre cada lavado por 7 min.

Revelado ANTI-DIG

34. Incubar la membrana en 10 mL de la solución GENIUS III por 5 min a 35 rpm.
35. En un microtubo tapado con aluminio adicionar 300 µL de GENIUS III y mezclar con 6 µL de NT-BCIP (solución de revelado).
36. Cubrir recipiente en donde se hará el revelado con aluminio o realizar revelado en oscuridad. Eliminar solución GENIUS III en donde se incubó la membrana, y sobre esta agregar la solución de revelado.
37. Cubrir por completo la membrana, si no es suficiente, agregar 300 µL más de la solución de revelado.
38. Incubar a temperatura ambiente y en oscuridad hasta revelado deseado. Eliminar solución con papel y desechar a la basura (esta solución es tóxica).

39. Agregar 10 mL de GENIUS IV e incubar por 5 min a 35 rpm.
40. Secar membrana sobre papel.

13. REFERENCIAS

- Abraham-Juárez, M. J. (2019). Western blot in maize. *Bio-Protocol*, 9, e3257–e3257.
- Abdollahzadeh, E., Ojagh, S. M., Hosseini, H., Ghaemi, E. A., Irajian, G., & Heidarloo, M. N. (2016). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood and humans in Iran. *Microbial pathogenesis*, 100, 70-74.
- Ahmed, A. M., & Shimamoto, T. (2014). Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. *International journal of food microbiology*, 168, 57-62.
- Alhogail, S., Suaifan, G. A., & Zourob, M. (2016). Rapid colorimetric sensing platform for the detection of *Listeria monocytogenes* foodborne pathogen. *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 1061-1066.
- Ali, A. A., Altemimi, A. B., Alhelfi, N., & Ibrahim, S. A. (2020). Application of biosensors for detection of pathogenic food bacteria: a review. *Biosensors*, 10(6), 58.
- Apruzzese, I. S., Sanidad, V. S., Leekitcharoenphon, P., Medardus, J. J., & Takeuchi, M. (2019). Investing in food safety for developing countries: opportunities and challenges in applying whole-genome sequencing for food safety management. *Foodborne pathogens and disease*, 16(7), 463-473.
- Autret, N., Raynaud, C., Dubail, I., Berche, P., & Charbit, A. (2003). Identification of the *agr* locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. *Infection and immunity*, 71(8), 4463-4471.
- Aurolat, A., & Besse, N. G. (2016). The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food. *Food microbiology*(53), 135-149.
- Banerji, R., Karkee, A., Kanojiya, P., Patil, A., & Saroj, S. D. (2022). Bacterial communication in the regulation of stress response in *Listeria monocytogenes*. *LWT*, 154, 112703.

- Bejder, B. S., Monda, F., Gless, B. H., Bojer, M. S., Ingmer, H., & Olsen, C. A. (2024). A short-lived peptide signal regulates cell-to-cell communication in *Listeria monocytogenes*. *Communications Biology*, 7(1), 942.
- Bentele, K., Saffert, P., Rauscher, R., Ignatova, Z., & Blüthgen, N. (2013). Efficient translation initiation dictates codon usage at gene start. *Molecular systems biology*, 9(1), 675.
- Bereza-Malcolm, L. T., Mann, G., & Franks, A. E. (2015). Environmental sensing of heavy metals through whole cell microbial biosensors: a synthetic biology approach. *ACS synthetic biology*, 4(5), 535-546.
- Bergholz, T. M., Shah, M. K., Burall, L. S., Rakic-Martinez, M., & Datta, A. R. (2018). Genomic and phenotypic diversity of *Listeria monocytogenes* clonal complexes associated with human listeriosis. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(8), 3475-3485.
- Bertels, F., Merker, H., & Kost, C. (2012). Design and characterization of auxotrophy-based amino acid biosensors. *PLoS One*, 7(7), e41349.
- Bessonova, T. A., Lekontseva, N. V., Shvyreva, U. S., Nikulin, A. D., Tutukina, M. N., & Ozoline, O. N. (2019). Overproduction and purification of the *Escherichia coli* transcription factors “toxic” to a bacterial cell. *Protein Expression and Purification*, 161, 70-77.
- Beyazit, F., Arica, M. Y., Acikgoz-Erkaya, I., Ozalp, C., & Bayramoglu, G. (2024). Quartz crystal microbalance–based aptasensor integrated with magnetic pre-concentration system for detection of *Listeria monocytogenes* in food samples. *Microchimica Acta*, 191(5), 235.
- Bio-Rad. (10 de Agosto de 2023). *pGLO Sequence and Map*. Obtenido de SnapGene:
https://www.snapgene.com/plasmids/fluorescent_protein_genes_and_plasmids/pGLO

- Bobade, S., Warke, S., & Kalorey, D. (2016). Virulence gene profiling and serotyping of *Listeria monocytogenes* from infertility cases of women. *International Journal of Health Sciences and Research*, 6, 440-449.
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food control*, 75, 1-13.
- Cambray, G., Guimaraes, J. C., & Arkin, A. P. (2018). Evaluation of 244 000 synthetic sequences reveals design principles to optimize translation in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology*, 36(10), 1005-1015.
- Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitão, E., Sousa, S., & Cabanes, D. (2011). The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence*, 2(5), 379-394.
- Carballo-Uicab, V. M., Mendoza-Acosta, M. F., Barboza-Pérez, A., Casados-Vázquez, L. E., & Barboza-Corona, J. E. (2025). Fortaleciendo la inocuidad alimentaria en México: Detección de patógenos a través de estrategias innovadoras como la Biología sintética. *Revista del Centro de Investigación de la Universidad la Salle*.
- Castrillón-Arbeláez, P. A., Martínez-Gallardo, N., Arnaut, H. A., Tiessen, A., & Délano-Frier, J. P. (2012). Metabolic and enzymatic changes associated with carbon mobilization, utilization and replenishment triggered in grain amaranth (*Amaranthus cruentus*) in response to partial defoliation by mechanical injury or insect herbivory. *BMC Plant Biology*, 12, 1–22.
- Chen, M., Cheng, J., Pang, R., Zhang, J., Chen, Y., Zeng, H., & Wu, Q. (2019). Rapid detection of *Listeria monocytogenes* sequence type 121 strains using a novel multiplex PCR assay. *LWT*, 116, 108474.
- Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID). (2022). *List of Multistate Foodborne Outbreak Notices*. Retrieved from Centers for Disease Control and

Prevention: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/monocytogenes-06-22/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID). (2023). *Listeria Outbreak Linked to Peaches, Nectarines, and Plums*. Retrieved from Centers for Disease Control and Prevention: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/peaches-11-23/index.html>

Cesewski, E., & Johnson, B. N. (2020). Electrochemical biosensors for pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 159, 112214, 159, 112214.

Claeys, W. L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K. & Herman, L. (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food control*, 31(1), 251-262.

Cytiva. (2024, Noviembre 20). *Tagged proteins*. Retrieved from Cytiva: <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-11495-pdf>

Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Shabbir, M. Z., Barbuddhe, S., Malik, S. V., & Singh, R. K. (2015). Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Veterina Quarterly*, 35(4), 211-235.

Du, J., Li, Z., Liu, K., Guo, J., & Bai, Y. (2024). Colorimetric aptasensor for *Listeria monocytogenes* detection using dual functional Fe₃O₄@ MIL-100 (Fe) with magnetic separation and oxidase-like activities in food samples. *Microchimica Acta*, 191(8), 504.a

Du, J., Guo, J., Liu, J., Huang, Z., Zhao, D., & Bai, Y. (2024). An aptamer magnetic capture based colorimetric method for rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 18(7), 6319-6330.b

Dunny, G., & Leonard, B. (1997). Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology*, 51(1), 527-564.

- Duwat, P., Sourice, S., Cesselin, B., Lamberet, G., Vido, K., Gaudu, P., Gruss, A. (2001). Respiration Capacity of the Fermenting Bacterium *Lactococcus lactis* and Its Positive Effects on Growth and Survival. *Journal of Bacteriology*, 183(15), 4509–4516.
- European Food Safety. (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSa Journal*, 15(22).
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of food protection*, 77(1), 150-170.
- Food and Drug Administration. (s.f.). *Investigations of foodborne illness outbreaks*. Retrieved from U.S. Department of Health and Human Services: <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/investigations-foodborne-illness-outbreaks>
- Frelet-Barrand, A. (2022). *Lactococcus lactis*, an attractive cell factory for the expression of functional membrane proteins. *Biomolecules*, 12(2), 180.

- Gandra, T. K., Volcan, D., Kroning, I. S., Marini, N., de Oliveira, A. C., Bastos, C. P., & da Silva, W. P. (2019). Expression levels of the agr locus and prfA gene during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel and polystyrene during 8 to 48 h of incubation 10 to 37°C. *International journal of food microbiology*, 300, 1-7.
- Gaona-Mendoza, A. S., Mendoza-Acosta, M. F., Massange-Sánchez, J. A., & Casados-Vázquez, L. E. (2024). Principles and challenges of whole cell microbial biosensors in the food industry. *Journal of Food Science*, 89(9), 5255-5269.
- Garmyn, D., Augagneur, Y., Gal, L., Vivant, A. L., & Piveteau, P. (2012). *Listeria monocytogenes* differential transcriptome analysis reveals temperature-dependent Agr regulation and suggests overlaps with other regulons. e43154.
- Garmyn, D., Gal, L., Lemaitre, J., Hartmann, A., & Piveteau, P. (2009). Communication in *Listeria monocytogenes* in silico investigation of peptide-based communication systems in the genome of *Listeria* sp. *Communicative & Integrative Biology*, 2, 371-374.
- Gasanov, U., & Hughes, D. a. (2005). Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol. Rev*, 29, 851-875.
- Gaspar, P., Oliveira, J. L., Frommlet, J., & Santos, M. A. (2012). EuGene: maximizing synthetic gene design for heterologous expression. *Bioinformatics*, 28(20), 2683–2684.
- GenScript. (2002-2023). *GenSmart Codon Optimization*. Retrieved from GenScript: <https://www.genscript.com/tools/gensmart-codon-optimization?page=1>
- Goel, N. S., Rao, G. S., Yčas, M., Bremermann, H. J., & King, L. (1972). A method for calculating codon frequencies in DNA. *Journal of theoretical biology*, 35(3), 399-457.

- Guel-García, P., García De León, F. J., Aguilera-Arreola, G., Mandujano, A., Mireles-Martínez, M., Oliva-Hernández, A., Martínez-Vázquez, A. V. (2024). Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* in Different Raw Food from Reynosa, Tamaulipas, Mexico. *Foods*, 13(11), 1656.
- Haque, S., Yadav, D. K., Bisht, S. C., Yadav, N., Singh, V., Dubey, K. K., & Dar, S. A. (2019). Quorum sensing pathways in Gram-positive and-negative bacteria: potential of their interruption in abating drug resistance. *Journal of Chemotherapy*, 31(4), 161-187.
- He, J., Zhang, X., Qian, Y., Wang, Q., & Bai, Y. (2022). An engineered quorum-sensing-based whole-cell biosensor for active degradation of organophosphates. *Biosensors and Bioelectronics*, 206, 114085.
- Hernandez de Rojas, A. (2005). Lactococina 972: caracterización genética, modo de acción y optimización de la producción en biorreactores. *Universidad de Oviedo*.
- Hia, F., & Takeuchi, O. (2021). The effects of codon bias and optimality on mRNA and protein regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78, 1909-1928.
- Jakobsen, R. A., Heggebø, R., Sunde, E. B., & Skjervheim, M. (2011). *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. *Food Microbiology*, 28(3), 492-496.
- Jiang, X., Jiang, C., Yu, T., Jiang, X., Ren, S., Kang, R., & Qiu, S. (2022). Benzalkonium chloride adaptation increases expression of the Agr system, biofilm formation, and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 856274.
- Jin, L. Q., Jin, W. R., Ma, Z. C., Shen, Q., Cai, X., Liu, Z. Q., & Zheng, Y. G. (2019). Promoter engineering strategies for the overproduction of valuable metabolites in microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 8725-8736.

- Kannan, S., Balakrishnan, J., & Govindasamy, A. (2020). *Listeria monocytogenes*-Amended understanding of its pathogenesis with a complete picture of its membrane vesicles, quorum sensing, biofilm and invasion. *Microbial Pathogenesis*, *149*, 104575.
- Kavanaugh, J. S., Thoendel, M., & Horswill, A. R. (2007). A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing. *Molecular microbiology*, *65*(3), 780-798.
- Keller, T. E., Mis, S. D., Jia, K. E., & Wilke, C. O. (2012). Reduced mRNA secondary-structure stability near the start codon indicates functional genes in prokaryotes. *Genome biology and evolution*, *4*(2), 80-88.
- Kocot, A. M., & Olszewska, M. A. (2017). Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. *LWT-Food Science and Technology*, *84*, 47-57.
- Kroemer, T., & Gallego, A. (2023). *¿Cómo funciona la inducción de IPTG?* Retrieved from Gold Biotechnology: <https://goldbio.com/articles/article/uncionainduccion-IPTG>
- Kruger, N. J. (2009). The Bradford method for protein quantitation. In *The protein protocols handbook* (pp. 17-24).
- Kutchma, A. J., Roberts, M. A., Knaebel, D. B., & Crawford, D. L. (1998). Small-scale isolation of genomic DNA from *Streptomyces* mycelia or spores. *Biotechniques*, *24*(3), 452-457.
- Laksanalamai, P., Huang, B., Sabo, J., Burall, L. S., Zhao, S., Bates, J., & Datta, A. R. (2014). Genomic characterization of novel *Listeria monocytogenes* serotype 4b variant strains. *PloS one*, *9*(2), e89024.
- Laroute, V., Tormo, H., Couderc, C., Mercier-Bonin, M., Le Bourgeois, P., Coccagn-Bousquet, M., & Daveran-Mingot, M. L. (2017). From genome to phenotype: an integrative approach to evaluate the biodiversity of *Lactococcus lactis*. *Microorganisms*, *5*(2), 27.

- Lathrop, A. A., Banada, P. P., & Bhunia, A. K. (2008). Differential expression of InlB and ActA in *Listeria monocytogenes* in selective and nonselective enrichment broths. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(3), 627-639.
- Lee, S. Y., Kim, U., Kim, Y., Lee, S. J., Park, E. Y., & Oh, S. W. (2023). Enhanced detection of *Listeria monocytogenes* using tetraethylenepentamine-functionalized magnetic nanoparticles and LAMP-CRISPR/Cas12a-based biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 1281.
- Lee, Y. J., & Wang, C. (2020). Links between S-adenosylmethionine and Agr-based quorum sensing for biofilm development in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *MicrobiologyOpen*, *9*(5), e1015.
- Li, F., Ye, Q., Chen, M., Zhou, B., Zhang, J., Pang, R., & Wu, Q. (2021). An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for *Listeria monocytogenes* detection. *Biosensors and Bioelectronics*, *179*, 113073.
- Lim, J. W., Lee, J., Lee, S. K., & Kim, T. (2015). Review of Micro/Nanotechnologies for microbial biosensors. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *3*, 61.
- Liu, Y., Sun, W., Sun, T., Gorris, L. G., Wang, X., Liu, B., & Dong, Q. (2020). The prevalence of *Listeria monocytogenes* in meat products in China: A systematic literature review and novel meta-analysis approach. *International journal of food microbiology*, *312*, 108358.
- Loessner, M. J. (1991). Improved procedure for bacteriophage typing of *Listeria* strains and evaluation of new phages. *Applied and environmental microbiology*, *57*(3), 882-884.
- Lopes-Luz, L., Mendonça, M., Fogaça, M. B., Saavedra, D. P., Bentivoglio-Silva, B. G., Conceição, F. R., & Bühner-Sékula, S. (2023). Detection of *Listeria monocytogenes* using an immunochromatographic point of care test based on anti-internalin A and B antibodies and a nano-biotinylated detection complex. *Lwt*, *188*, 115336.

- Lubkowicz, D., Ho, C. L., Hwang, I. Y., Yew, W. S., Lee, Y. S., & Chang, M. W. (2018). Reprogramming probiotic *Lactobacillus reuteri* as a biosensor for *Staphylococcus aureus* derived AIP-I detection. *ACS synthetic biology*, 7(5), 1229-1237.
- Lynch, D., Hill, C., Field, D., & Begley, M. (2021). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by the *Staphylococcus capitis* - Derived bacteriocin capidermicin. *Food Microbiology*, vol. 94, p. 103661.
- Ma, T., Li, X., Montalbán-López, M., Wu, X., Zheng, Z., & Mu, D. (2024). Effect of the Membrane Insertase YidC on the Capacity of *Lactococcus lactis* to Secret Recombinant Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(42), 23320-23332.
- Meile, S., Sarbach, A., Du, J., Schuppler, M., Saez, C., Loessner, M. J., & Kilcher, S. (2020). Engineered reporter phages for rapid bioluminescence-based detection and differentiation of viable *Listeria* cells. *Applied and environmental microbiology*, 86(11), e00442-20.
- MoBiTec. (2015). *Expression System for Lactococcus lactis*. Retrieved from www.mobitec.com/media/datasheets/mobitecgmbh/NICE_Expression_System-Handbook.pdf
- Moraskie, M., Roshid, M. H., O'Connor, G., Dikici, E., Zingg, J. M., Deo, S., & Daunert, S. (2021). Microbial whole-cell biosensors: Current applications, challenges, and future perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, 191, 113359.
- Norma Oficial Mexicana (1995). Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes* (NOM-143-SSA1). Retrieved from <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/143ssa15.html>
- Norma Oficial Mexicana (1996). Bienes y servicios. Bienes y servicios. Huevo, sus productos y derivados. Disposiciones y especificaciones sanitarias (NOM-

159-SSA1-1996). Retrieved from
<https://salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/159ssa16.html>

Norma Oficial Mexicana (2004). B Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos. (NOM-194-SSA1-2004). Retrieved from
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=661587&fecha=18/09/2004#gsc.tab=0

Norma Oficial Mexicana (2010). Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba (NOM-243-SSA1). *Diario Oficial de la Federación*. Retrieved from
<http://dof.gob.mx/normasOficiales/4156/salud2a/salud2a.htm>

Olejnik-Schmidt, A., Gronowalska, A., & Schmidt, M. (2013). The NICE system as a tool for protein expression in *Lactococcus lactis*. *Postepy biochemii*, 59(3), 322–326.

Odle, T. (2005). *Registry of Standar Biological Parts*. Retrieved from iGEM:
http://parts.igem.org/Part:BBa_J04450

O'Rourke, J. P., Daly, S. M., Triplett, K. D., Peabody, D., C. B., & Hall, P. R. (2014). Development of a mimotope vaccine targeting the *Staphylococcus aureus* quorum sensing pathway. *PloS one*, 9(11), e111198.

Painter, K. L., Krishna, A., Wigneshweraraj, S., & Edwards, A. M. (2014). What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia? *Trends in microbiology*, 22(12), 676-685.

Pamer, E. G. (2004). Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature Reviews Immunology*, 4(10), 812-823.

- Presnyak, V., Alhusaini, N., Chen, Y. H., Martin, S., Morris, N., Kline, N., & Coller, J. (2015). Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell*, *160*(6), 1111–1124.
- Poghossian, Arshak, Hanno Geissler, and Michael J. Schöning. Rapid methods and sensors for milk quality monitoring and spoilage detection. *Biosensors and Bioelectronics*, *140* (2019): 111272.
- Puigbo, P., Guzman, E., Romeu, A., & Garcia-Vallve, S. (2007). OPTIMIZER: A web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, *35*, W126–W131.
- Quave, C. L., Plano, L. R., Pantuso, T., & Bennett, B. C. (2008). Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of ethnopharmacology*, *118*(3), 418-428.
- Radoshevich, L., & Cossart, P. (2018). *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(1), 32-46.
- Riedel, C. U., Monk, I. R., Casey, P. G., Waidmann, M. S., Gahan, C. G., & Hill, C. (2009). AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. *Molecular microbiology*, *71*(5), 1177-1189.
- Rieu, A., Weidmann, S., Garmyn, D., Piveteau, P., & Guzzo, J. (2007). Agr system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(19), 6125-6133.
- Roux, A., Todd, D. A., Velázquez, J. V., Cech, N. B., & Sonenshein, A. L. (2014). CodY-mediated regulation of the *Staphylococcus aureus* Agr system integrates nutritional and population density signals. *Journal of bacteriology*, *196*(6), 1184-1196.

- Samar, D., Antunac, N., & Luka, J. (2001). Taxonomy , physiology and growth of Lactococcus of Lactococcus lactis: a review. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 51(1), 35-48.
- Seeliger, H.P.R. & Jones, A. 1986 Genus Listeriu. In Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology eds. Sneath, P.H.A., Mair, N.S. & Sharpe, E. pp. 1235-1245. Baltimore MD: Williams & Wilkins.
- Shamloo, E., Hosseini, H., Moghadam, Z., Larsen, M., Haslberger, A., & Alebouyeh, M. (2019). Importance of Listeria monocytogenes in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iranian journal of veterinary research*, 20(4), 241-253.
- Smith, D. (1996). Problems of translating heterologous genes in expression systems: the role of tRNA. *Biotechnol Prog*, 12(4), 417–422.
- Song, A. A.-L., In, L. L., Lim, S. H., & Rahim, R. A. (2017). A review on Lactococcus lactis: from food to factory. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 55.
- Soni, D. K., Ahmad, R., & Dubey, S. K. (2018). Biosensor for the detection of Listeria monocytogenes: emerging trends. *Critical reviews in microbiology*, 44(5), 590-608.
- Soni, D., Singh, D., & Dubey, S. (2015). Pregnancy-associated human listeriosis: virulence and genotypic analysis of Listeria monocytogenes. *Journal Microbiology*, 53, 653–660.
- Syam, R., Davis, K. J., Pratheesh, M. D., Anoopraj, R., & Joseph, B. S. (2012). Biosensors: a novel approach for pathogen detection. *Vet Scan| Online Veterinary Medical Journal*, 7(1), 102.
- Thakur, M. S., & Ragavan, K. V. (2013). Biosensors in food processing. *Journal of food science and technology*, 50, 625-641.
- Thoendel, M., Kavanaugh, J. S., Flack, C. E., & Horswill, A. R. (2011). Peptide signaling in the staphylococci. *Chemical reviews*, 111(1), 117-151.

- Todd, D. A., Parlet, C. P., Crosby, H. A., Malone, C. L., Heilmann, K. P., Horswill, A. R., & Cech, N. B. (2017). Signal biosynthesis inhibition with ambuic acid as a strategy to target antibiotic-resistant infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(8), 10-1128.
- Tu, Y., Li, H., Huo, J., Gou, L., Wen, X., Yu, X., Li, Y. (2025). Disrupting the bacterial language: quorum quenching and its applications. *Critical Reviews in Microbiology*, *51*, 1-15.
- Usman, U. B., Kwaga, J. K. P., Kabir, J., & Olonitola, O. S. (2016). Isolation and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* from raw milk and milk products in Northern Kaduna State, Nigeria. *J Appl Environ Microbiol*, *4*(3), 46-54.
- van de Guchte, M., Kok, J., & Venema, G. (1992). Gene expression in *Lactococcus lactis*. *FEMS microbiology reviews*, *8*(2), 73–92.
- Vera, A., González, G., Domínguez, M., & Bello, H. (2013). Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Revista chilena de infectología*, *30*(4), 407-416.
- Wagner, M., & McLauchlin, J. (2008). Chapter 1: Biology. In T. & Group, *Handbook of Listeria monocytogenes* (pp. 3-25). CRC Press.
- Wang, L., Li, Y., Chu, J., Xu, Z., & Zhong, Q. (2012). Development and application of a simple loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Listeria monocytogenes* strains. *Molecular biology reports*, *39*, 445-449.
- Wang, L., Quan, C., Liu, B., Xu, Y., Zhao, P., Xiong, W., & Fan, S. (2013). Green fluorescent protein (GFP)-based overexpression screening and characterization of AgrC, a Receptor protein of quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *International journal of molecular sciences*, *14*(9), 18470-18487.

- Wang, Y., Jia, K., & Lin, J. (2024). Optical biosensors for the detection of foodborne pathogens: recent development and future prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 117785.
- Wang, Y., Wang, Y., Ma, A., Li, D., Luo, L., Liu, D., & Ye, C. (2015). The novel multiple inner primers-loop-mediated isothermal amplification (MIP-LAMP) for rapid detection and differentiation of *Listeria monocytogenes*. *Molecules*, 20(12), 21515-21531.
- West, K. H., Ma, S. V., Pensinger, D. A., Tucholski, T., Tiambeng, T. N., Eisenbraun, E. L., Blackwell, H. E. (2023). Characterization of an autoinducing peptide signal reveals highly efficacious synthetic inhibitors and activators of quorum sensing and biofilm formation in *Listeria monocytogenes*. *Biochemistry*, 62(19), 2878-2892.
- World Health Organization (2018, february 20). Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>
- Wu, Y., Wang, C. W., Wang, D., & Wei, N. (2021). A whole-cell biosensor for point-of-care detection of waterborne bacterial pathogens. *ACS synthetic biology*, 10(2), 333-344.
- Wynn, D., Raut, N., Joel, S., Pasini, P., Deo, S. K., & Daunert, S. (2018). Detection of bacterial contamination in food matrices by integration of quorum sensing in a paper-strip test. *Analyst*, 143(19), 4774-4782.
- Xiao, Y., Ren, H., Wang, H., Zou, D., Liu, Y., Li, H., & Lu, S. (2023). A rapid and inexpensive nucleic acid detection platform for *Listeria monocytogenes* based on the CRISPR/Cas12a system. *Talanta*, 259, 124558.
- Xue, L., Zheng, L., Zhang, H., Jin, X., & Lin, J. (2018). An ultrasensitive fluorescent biosensor using high gradient magnetic separation and quantum dots for fast detection of foodborne pathogenic bacteria. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 265, 318-325.

- Yang, Y., Kong, X., Yang, J., Xue, J., Niu, B., & Chen, Q. (2024). Rapid Nucleic Acid Detection of *Listeria monocytogenes* Based on RAA-CRISPR Cas12a System. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(6), 3477.
- Zetzmann, M., Sánchez-Kopper, A., Waidmann, M. S., Blombach, B., & Riedel, C. U. (2016). Identification of the agr peptide of *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in microbiology*, 7, 989.
- Zhang, G., Fedyunin, I., Miekley, O., Valleriani, A., Moura, A., & Ignatova, Z. (2010). Global and local depletion of ternary complex limits translational elongation. *Nucleic acids research*, 38(14), 4778-4787.
- Zhao, X., Lin, C. W., Wang, J., & Oh, D. H. (2014). Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *Journal of microbiology and biotechnology*, 24(3), 297-312.
- Zhou, W., Sun, J., & Li, X. (2020). Low-cost quantitative photothermal genetic detection of pathogens on a paper hybrid device using a thermometer. *Analytical Chemistry*, 92(21), 14830-14837.