

Anexos 1

Tesis Doctoral: Estudio de los sideróforos y de las proteínas receptoras producidas por las bacterias patógenas de peces *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*.

Andrea Katherine Valderrama Pereira

1. Lista de Secuencias

SEQ ID NO: 1. Secuencia de nucleótidos del gen *frpA*

>*frpA*

```
atgtacaggaacagttctcgctctccactttcactagctatcttagctgcaaccttgagccctgtttagtgca
gatgaacataatccagaagttacggttatggaaacatgattgtcgaagcaaccaagcagaacatttcattac
aacaggttgatagctcagtgctcatcaaacaggaaaagagcttgagaaagcaggaatccatgaagttaag
gacttagaaaaagccttcctggcctaattgattcaaaccgaggtaacgtacgtatgccaacaccactatac
gtggcgtgagttcacctgattactattctcctaccgtcagcatctatgtcgaatggtgattgcaagacagtgcatctt
aaccagcagttactcaacgtagaacaggttagagctgcttcgagggccgcaagctacgctatatggtggcaa
ttctcagggaggtatcatcaatatcatcacaagaaggcgactgatcaaaccttagcgtctggtggtgctactt
acagcgatcgaagcaaacacttgatgcttcagcggcagttgcgataagcgattcaactacgctgatatagc
gattcgatcattaaagacgaaggtaataatcgtcacattcctagcaaacaccgatgacgtaacgacagtaaa
gacttagcggtagcagctcattcactatctacctcagcagctccctctcgtctgacgttttctgtctcttctgcac
atctagatagccatgaagagtggatttgaccaacaagaatatgataagcgagccaccagccaagacata
cctgaacttaagcgcgtcgtcaatagctatgcactgcatattgactacgacctaggcgcaaccaattaacca
gtattaccgcttaccaaaaccgtaatgtggatcgtaatatatcgggcgtaaatgggtgaagatcagaacacc
ttcagtcaggaagtgcgcgctaacaccaatcagtgatgatcttccgcttgggtggcgggtactatgagcatc
gaaactttgatgtcagtgccgggtgcaacaacgatattgagaccaaaacttatgccttgtttgcaaatgactta
tgccatgaccgatagatcgatttaaccggtgggtgcgcgcatcacgttttctctgaatcagatttggcggca
actcagcatggaggattgacagctatcaatcagataagtccgaaaacggttatctctcctaaagcggcaatagg
ttggcaattaaccagattcaagagatattgcctcactagccagcggctaccgacctggcgggttttagccgg
caccacgaagttctggcgataaaaatggctattcaccagaaaagtcttcaatggtgaattgggatggcgaact
aacttagctgaaaacacggttcgctcagtggggctctgtactggatcgacactaaagatattcagctctacacc
ggaaatccaggttagccaagttcttagaaacatgggcgatgccaaagccgaggcattgagcttgatctcgca
tactaccctaccgacgattgactctgacactgggcgcaacatttggccagctacgctcgaatcgggcaatgat
gggattgaaggtaaaactaccctatgcaccggatacaacagtagtggcaggtatcgaatactacctacca
caatcatggctagatggagagttgtctatcgccaccaatgcacgctacacatctaaaatattctttgacgaaagc
aatactctggcgaagacggttacacacttatcgacttagcagttcaatatgcgatgaatgacaacatctcttcc
gagtgtttagcaacaacctaaccgacaaagagtataccacctatgcctacagcttggtaaacacgcgttcaac
aactatggttcagaacgcgaggtgggtgtaatatgaagctagatggtaa
```

SEQ ID NO: 2. Secuencia de aminoácidos de la proteína FrpA

>FrpA

myrnfsfslsplailaatslpvvsadehnpevtvmetmiveatkqnislqqvdsavlktgkelekagihevkd
ekafpglmqrgrntyanttirgvsspdysptvsiyvdgvlqdsafittqllnveqvellrgpqtlyggnsqggi
iniitkkatdqnlasggvtysdrskqldasaavaisdstyadiairslkdegnirhipsntddandskdfsgtarfh
ylpqqsplavtfsvssahldsheewyltqzeydkratsqdipelkrvnsyalhidydilatqtsitayqnrnvdr
eyiggkwvedqntfsqevrantqfsddlsalvggyehrnfdvsaganndietqtyalfgqmyamtdsidltg
glrasrffsesdfggsawridsyqsdksevispkaaigwqinpdsrvfaslasgyrpggfspaprssgdkn
gyspeksfngelgwrtlnlaentvrfsgalywidtkdiqlytgnpgsqvlrnmgdaqsrgieldlayyptddlltltg
atfgqstfesgndgiegkltlpyapdtvragieyylpqswldgelsiatnarytskiffdesntlaqdytlidlavqy
amndnisfrvsnltdkeytlyaysfgntrfnnygserevgnmklew

SEQ ID NO: 3. Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína recombinante FrpA (rFrpA) en el plásmido pBAD

>peIB-10His-FrpA

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgcccagccggcgatggcccatcacca
tcaccaccaccatcatcatgatgaacataatccagaagttacggttatggaaaccatgattgtcgaagcaa
ccaagcagaacatttcattacaacaggttgatagctcagtgctcatcaaacaggaaaagagcttgagaaag
caggaatccatgaagtaaggacttagaaaaagccttccctggcctaattgattcaaacccgaggtaacgtac
gtatgccaacaccactatacgtggcgtgagttcacctgattactattctcctaccgtcagcatctatgtcgatggtg
tattgcaagacagtgatttctaaccagcagttactcaacgtagaacaggttagagctgcttcgagggccgca
agctacgctatatggtggcaattctcagggaggtatcatcaatatcatcaccaagaaggcgactgatcaaac
ctagcgtctggtggtgtcactacagcgatcgaagcaacaactgatgcttcagcggcagttgcgataagcg
attcaactacgctgataatagcgattcgatcattaaaagacgaaggtaatattcgtcacattcctagcaacaccg
atgacgctaacgacagtaaagacttttagcggtagcgtcagctcattcactatctacctcagcagtcacctctcgctg
tgacgttttctgctcttctgcacatctagatagcatgaagagtggattttgaccaacaagaatatgataagcg
agccaccagccaagacatacctgaacttaagcgcgtcgtcaatagctatgcactgcatattgactacgaccta
ggcgcaaccaattaaccagttaccgcttaccaaaaccgtaattgtggatcgtgaatatatcggcggtaaat
gggtgaagatcagaacacctcagtcaggaagtgcgcgtaaacaccaattcagtgatgatcttccgctttgg
ttggcgggtactatgagcatcgaaaactttgatgtcagtgcggtgcaacaacgatattgagaccaaacttat
gccttgggtgcaaatgacttatgcatgaccgatagatcgatttaaccggtgggtgacgcatcacgtttttct
ctgaatcagattttggcggcaactcagcatggaggattgacagctatcaatcagataagtcgaaaacgttatc
tctcctaaagcggcaataggttgcaaaattaaccagattcaagagattttgcctcactagccagcggctaccg
acctggcggtttagcccggcaccacgaagtctggcgataaaaatggctattcaccagaaaagctttcaatg
gtgaattgggatggcgaactaacttagctgaaaaacacggttcgcttcagtggggctctgtactggatcgacact
aaagatattcagctctacaccgaaatccaggttagccaagttcttagaaacatgggcatgcccgaagccga
ggcattgagctgatctgcatactaccctaccgacgatttgactctgacactgggcgcaacattggccagctct
acgttcgaatcgggcaatgatgggattgaaggtaaacactaccctatgcaccggatacaacagtagtgga
ggatcgaatactaccacaatcatggctagatggagagttgtctatcgccaccaatgcagctacacatc
taaaatattctttgacgaaagcaatactctggcgcaagacggttacacacttatcgacttagcagttcaatatgc
gatgaatgacaacatctcttccgagtgtttagcaacaacctaaccgacaaagagtataccacctatgcctaca
gctttgtaacacgcgttcaacaactatggttcagaacgcgaggtgggtgtaatatgaagctagagtgtaa

SEQ ID NO: 5. Secuencia de aminoácidos de la proteína rFrpA (plásmido pBAD)

>rFrpA

PeIB

10His

Mkylptaaglll~~aaqpama~~hhhhhhhhhhdehnpevtvmetmiveatkqnislqqvdssvliktgkele
kagihevkdlekafpglmiqtrgnrtyanttirgvsspdyysptvsivydgvlqdsaflltqqllnveqvellrgpqatl
yggnsqggiiniitkkatdqnlasggvtysdrskqldasaavaisdstyadiairslkdegnirhipsntddands
kdfsgtarfhylpqqsplavtfsvssahldsheewyltqqeydkratsqdipelkrvnsyalhidylgatqltsit
ayqnrndreyiggkwvedqntfsqevrantqfsdlsalvggyehrnfdvsaganndietqtyalfgqmt
amtdsidltgglrasrffsesdfggnsawridsyqsksenvispkaaigwqinpdsvfaslasgyrpggfsp
aprssgdngyspeksfngelgwrnlaentvrfsgalywidtkdiqlytgnpgsqvlrnmgdaqsrgeildlay
yptddltiltgatfgqstfesgndgiegkltipyapdtvvgieyylpqswldgelsiatnarytskiffdesntlaqdg
ytlidlavqyamndnisfrvfnltdkeyttyaysfgntrfnnygserevgvnmklew

SEQ ID NO: 5. Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína recombinante FrpA (rFrpA) en el plásmido pET20b(+)

>*peIB-10His-FrpA*

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgcccagccggcgatggccatggat
ccatcaccatcaccaccatcatcatcatgatgaacataatccagaagttacggttatgaaacccatgattg
tcgaagcaaccaagcagaacatttcattacaacagggtgatagctcagtgctcatcaaacaggaaaagag
cttgagaaagcaggaatccatgaagtaaggacttagaaaaagcctccctggcctaattgattcaaacccga
ggtaaccgtacgtatgccaacaccactatacgtggcgtgagttcacctgattactattctcctaccgtcagcatct
atgtcgatggtgtattgcaagacagtgcatcttaaccagcagttactcaacgtagaacaggtagagctgctc
gagggccgcaagctacgctatatggtggcaattctcagggaggtatcatcaatatcatcaccagaaggcga
ctgatcaaaccttagcgtctggtggtgctactacagcgatcgaagcaacaactgatgctcagcggcagtt
gcgataagcgattcaacttacgctgatatagcgattcgatcattaaaagacgaaggaatattcgtcacattcct
agcaacaccgatgacgctaacgacagtaaagacttttagcggtagcagctcgattccactatctacctcagcagt
ccccctcgtgctgacgtttctgtctctctgacacatctagatagccatgaagagtggtattgacccaacaagaa
tatgataagcgagccaccagccaagacatacctgaacttaagcgcgtcgtcaatagctatgactgcatattg
actacgacctagcgcgaaccaattaaccagtattaccgcttaccaaaaccgtaattggtatcgatgaatatac
ggcggtaaatgggtgaagatcagaacaccttcagtcaggaagtgccgctaacaccaattcagtgatgat
ctttccgcttggtggtgactatgagcatcgaactttgatgtcagtgccgggtgcaacaacgatattgaga
cccaacttatgccttgttggtaaatgacttatgcatgaccgatagatcgatttaaccggtgggtgcgcgca
tcacgtttttctctgaatcagattttggcggcaactcagcatggaggattgacagctatcaatcagataagtccg
aaaacgttatctcctaaagcggcaatagggtggcaattaaccagattcaagagattttgctcactagcca
gcggtaccgacctggcggtttagcccggcaccacgaagttctggcgataaaaatggctattcaccagaaa
agtcttcaatggtgaattgggatggcgaactaacttagctgaaaacacgggtcgttcagtggggctctgtactg
gatcgacactaaagatattcagctctacaccggaaatccaggtagccaagttcttagaaacatgggcatgccc
caaagccgaggcattgagctgatctcgatactaccctaccgacgattgactctgacactggcgcaacatt
tgccagctctacgttcgaatcgggcaatgatgggattgaaggtaaaactaccctatgcaccggatacaac
agtagtggcaggtatcgaatactaccatacaatcatggctagatggagagttgtctatcgccaccaatgcac

gctacacatctaaaatattctttgacgaaagcaataactctggcgcaagacggttacacacttatcgacttagcag
ttcaatatgcatgaatgacaacatctcttccgagtggttagcaacaacctaaccgacaaagagtataccacct
atgcctacagcttggaacacgcggttcaacaactatggttcagaacgcgaggtgggtggaatgaagcta
gagtggtaa

SEQ ID NO: 6. Secuencia de aminoácidos de la proteína rFrpA (plásmido pET20b(+))

>rFrpA con 10 histidinas en el N-terminal

PeIB *10His*

Mkylptaaglllaaqpamamdidehnpevtmetmiveatkqnislqqvdssvliktgk
elekagihevkdlekafpglmiaqtrgnrtyanttirgvsspdysptvsivdgvldqsaftqllnveqvellrgp
qatlyggnsqggiiniitkakatdqnlasggvtysdrskqldasaavaidsstyadiairslkdegnirhipsntdda
ndskdfsgtarfhylpqqsplavtfsvssahldsheewyltqqeydkratsqdipelkrvnsyalhidydlatg
ltsitayqnrndreyiggkwvedqntfsqevrantqfsddlsalvggyeyhrnfdvsaganndietqtyalfgq
mtyamtdsidltgglrasrffsesdfggnsawridsyqsdksevispkaaigwqinpdsvfaslasgyrpgg
fspaprssgdkgngyspeksfngelgwrtlaentvrfsgalywidtkdiqlytgnpgsqvlrnmgdaqsgield
layyptddltlglatfgqstfesgndgiegktpyapdttvagieyypqswldgelsiatnarytskiffdesntla
qdgytlidlavqyamndnisfrvsnltdkeyttyaysfgntrfnnygserevgvnmklew

SEQ ID NO: 7. Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína recombinante FrpA (rFrpA) en el plásmido pET20b(+)

>*peIB-6His-FrpA*

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgcccagccggcgatggccatggatat
cgatgaacataatccagaagttacggttatggaaacctgattgctgaagcaaccaagcagaacatttcatta
caacaggtgatagctcagtgctcatcaaaacaggaaaagagcttgagaaagcaggaatccatgaagtaa
ggacttagaaaaagcctccctggcctaattgattcaaaccgaggtaaccgtacgtatgccaacaccactata
cgtggcgtgagttcacctgattactattctcctaccgtcagcatctatgctgatgggtgattgcaagacagtgcat
ctaaccagcagttactcaacgtagaacaggtagagctgcttcgagggccgcaagctacgctatatggtggc
aattctcaggaggatcatcaatatcatcaccaagaaggcgactgatcaaaacctagcgtctggtggtgca
cttacagcgatcgaagcaacaactgatgcttcagcggcagttgcgataagcgattcaacttacgctgatata
gcgattcgatcattaaaagacgaaggaatattcgtcacattcctagcaaacaccgatgacgctaacgacagta
aagacttagcggtagcctcagctcactatctacctcagcagtcctcctcctgctgtgacgtttctgtctctctgc
acatctagatagccatgaagagtggtatttgaccaacaagaatatgataagcgagccaccagccaagaca
tacctgaactaaagcgcgctgcaatagctatgactgcatattgactacgacctaggcgcaaccaattaacc
agtattaccgcttaccaaaaccgtaattgtggatcgtgaatatacggcggtaaatgggtgaagatcagaacac
cttcagtcaggaagtgcgctaacaccaattcagtgatgatcttccgcttgggtggcgggtactatgagcat
cgaaacttgatgctcagtcgggtgcgaacaacgatattgagacccaaactatgccttgggtgcaaatgactt
atgcatgaccgatagatcgatttaaccgggtgggtgctgcgcgatcacgctttctctgaatcagatttggcggc

aactcagcatggaggattgacagctatcaatcagataagtccgaaaacggtatctctcctaaagcggcaatag
ggtggcaaattaaccagattcaagagtattgcctcactagccagcggctaccgacctggcggtttagcccg
gcaccacgaagtctggcgataaaaatggctattcaccagaaaagctttcaatggggaattgggatggcgaa
ctaacttagctgaaaacacggctcagtggggctctgtactggatcgacactaaagatattcagctctaca
ccggaaatccaggtagccaagttcttagaaacatgggcatgccc aaagccgaggcattgagcttgatctcg
catactaccctaccgacgattgactctgacactgggcgcaacattggccagctctacgttcgaatcgggcaat
gatgggattgaaggtaaaacactaccctatgcaccggatacaacagtagtggcaggtatcgaatactaccta
ccacaatcatggctagatggagagttgtctatcgccaccaatgcacgctacacatctaaaatattcttgacgaa
agcaatactctggcgcaagacggttacacacttatcgacttagcagttcaatatgcgatgaatgacaacatctct
ttccgagtgttagcaacaacctaaccgacaaagagtataccacctatgcctacagcttggtaacacgcggttc
aacaactatgggtcagaacgcgaggtgggtgtgaatatgaagctagagtgaagcttgcggccgcactcgag
caccaccaccaccactga

SEQ ID NO: 8. Secuencia de aminoácidos de la proteína rFrpA (plásmido pET20b(+))

>rFrpA con 6 histidinas en el C-terminal

PeIB

MkylIptaaagllllaaqpamamdidehnpevtvmetmiveatkqnislqqvdssvliktgkelekihevk
dleakfpglmiqtrgnrtyanttirgvsspdyysptvsivdgvIqdsafItqllInveqvellrgpqatlyggnsqg
giiniitkkatdqnlasggvtysdrskqldasaavaisdstyadiairslkdegnirhipsntddandskdfsgtarf
hylpqqsplavtfsvssahldsheewyltqqeydkratsqdiPelkrvnsyalhidydIgatqItsitayqnrnv
dreyiggkwvedqntfsqevrantqfsdlsalvggyeyhrnfdsaganndietqyalfgqmtyamtdsidl
tgglrasrffsesdfggnasawridsyqsdksevispkaaigwqinpdsrvfaslasgyrpggfspaprssgdk
ngyspeksfngelgwrtnlaentvrfsgalywidtkdiqlytgnpgsqvlrnmgdaqsrgieldlayyptddltl
gatfgqstfesgndgiegktlpyapdttvagieyylpqswldgelsiatnarytskiffdesntlaqdgylidlavq
yamndnisfrvsnlltdkeytyaysfgntrfnnygserevgnmklewklaaalehhhhh
6His

SEQ ID NO: 9. Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína recombinante FrpA (rFrpA) en el plásmido pET20b(+)

>*peIB-6His-FrpA*

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggctgctgctcctcgctgcccagccggcgatggccatggatat
cgatgaacataatccagaagttacggttatggaaacatgattgctgaagcaaccaagcagaacatttcatta
caacaggtgatagctcagtgctcatcaaaacaggaaaagagcttgagaaagcaggaatccatgaagtaa
ggacttagaaaaagcctccctggcctaataatgattcaaacccgaggtaacctgacgtatgccaacaccactata
cgtggcgtgagttcacctgattactattctcctaccgtcagcatctatgctgatgggtgattgcaagacagtgcat
ctaaccagcagttactcaacgtagaacaggtagagctgcttcgagggccgcaagctacgctatatggggc
aattctcagggaggtatcatcaatatcatccaagaaggcgactgatcaaaacctagcgtctggtgggtgca
cttacagcgatcgaagcaaacacttgatgcttcagcggcagttgcgataagcgattcaacttacgctgatata
gcgattcgatcattaaaagacgaaggtaatattcgtcacattcctagcaaacaccgatgacgctaacgacagta

aagactttagcgggtacagctcgattccactatctacctcagcagcctcctcgcgtgtgacggtttctgtctcttctgc
acatctagatagccatgaagagtggatttgaccaacaagaatatgataagcgagccaccagccaagaca
tacctgaacttaagcgcgctgcaatagctatgactgcatattgactacgacctaggcgcaaccaattaacc
agtattaccgcttaccaaaaccgtaatgtggatcgtaatatatcggcggtaaattgggtgaagatcagaacac
cttcagtcaggaagtgcgctaacaccaattcagtgatgatcttccgcttgggtggcgggtactatgagcat
cgaaactttgatgtcagtgcggtgcgaacggatcccacccatcaccaccacaacgatattgagacccaa
acttatgccttgttggcaaatgacttatgcatgaccgatagatcgatttaaccgggtgggtgcgcatcacg
tttttctctgaatcagattttggcggcaactcagcatggaggattgacagctatcaatcagataagtccgaaaac
ggtatctctcctaaagcggcaatagggtggcaattaaccagattcaagagtatttgcctcactagccagcggc
taccgacctggcgggttttagccggcaccacgaagtctggcgataaaaatggctattcaccagaaaagtctt
caatgggtgaattgggatggcgaactaacttagctgaaaacacggttcgttcagtggggctctgtactggatcg
aactaaagatattcagctctacaccggaaatccaggtagccaagttcttagaaacatgggcatgccc
gccgaggcattgagcttgatctgcatactaccctaccgacgatttgactctgacactgggcgcaacatttggcc
agtctacggtcgaatcgggcaatgatgggattgaaggtaaaacactaccctatgcaccggatacaacagtagt
ggcaggatcgaatactaccacaatcatggctagatggagagttgtctatcgccaccaatgcacgctac
acatctaaaatattctttgacgaaagcaatactctggcgaagacggttacacactatcgacttagcagttcaa
tatgcatgaatgacaacatcttccgagtgtttagcaacaacctaaccgacaaagagtataccacctatgc
ctacagcttggtaacacgcggttcaacaactatggttcagaacgcgaggtgggtgtgaatatgaagctagagt
ggtaa

SEQ ID NO: 10. Secuencia de aminoácidos de la proteína rFrpA (plásmido pET20b(+))

>rFrpA con 6 histidinas en el loop 5

PeIB

Mkylptaaglllaaqpamamdidehnpevtmetmiveatkqnislqqvdssvliktgkelekagihevk
dlekaifpqlmiqtrgnrtyanttirgvsspdyysptvsivydgvlqdsaflltqllnveqvellrgpqtlyggnsqg
giiniitkkatdqnlasggvtysdrskqldasaavaisdstyadiairslkdegnirhipsntddandskdfsgtarf
hylpqqsplavtfsvssahldsheewyltqqeydkratsqdipelkrvnsvyahlidydlgatqltsitayqnrnv

6His

dreyiggkwvedqntfsqevrantqfsddlsalvggyehrnfdvsagangshhhhhndietqyalfgqmt
yamtdsidltgglrasrffsesdfggnsawridsyqsdksevispkaaigwqinpdsvfaslasgyrpggfs
paprssgdkngyspeksfngelgwrtlaentvrfsgalywidtkdiqlytgnpgsqvlrnmgdaqsrgieldla
yyptddlltltgatfgqstfesgndgiegkltlpyapdttvagieyylpqswldgelsiatnarytskiffdesntlaqd
gytlidlavqyamndnisfrvsnltdkeytyaysfgntrfnnygserevgnmklew

SEQ ID NO: 11. Secuencia de nucleótidos del gen *fstA*

>*fstA*

atgftaaagccccatctgttgcatcctgcagcgctcgcccatccccctctggcacaaccgfttcccgcttttctt
gaacaagctgggctggccgcacgtctggccattctggccggtgtcagtgccacactgtctcggcctggcc
ccatcggcgcaggcacaatccccggagctgtcggtcacgaccacaaaaagcctcagtatccccggctggctc
tctggcccaggcgtcaagaccttctcgtccgagacaggtatcagcctggatctc gatgataaaacatgcaa
gggatgaccagccccgggctggcaggccaatacagtccccccagggtctggccctctgttgagtggctcac
gatctggtggccgagcctgctgggagaaggacactacaaggtcgcgacaagccggggctcagtgccgatg
aggctatggtggtgcaagggcgccagacctatgccggtggccagggtggcctctgacagtcgggtcggattgct
tggcaacaagcacttcatggatacccccttcaacaccgtcagctacacagaagaatacatagagaacgagc
aggcccaggatatcggctccctcgcaggtgccaccaatgcatccatctatgtcggagcaaacgcagcatctt
cgagaccttcatatgctggctcagcaccacggccagtgacatgacctcaacggttgatcggcatggcgc
ccaacatgctcagttcagccgagatggccgagcgggtcagctgctcaagggcccgtccgtgttctcaacg
gcatgccgcccagacggcagcgtggggggcagcatcaataatgcccaaacgcgcccggcaaggatcctct
ggccaaggtgaccgccacctatgaatcagacgggctcggcggtgcatctggatctgggtcggcgttctgg
ggaagaaaaacagtggggggtgcgcttcaatggcgtctaccgcatggtgacaccccgtcaatgaccagc
agcacaagatggagctgacttccattggcctcagctggcgcaacgagcgggcccgcctccctc gatctct
atcggcaacatgaagaggtggatgggtcaactactcagcatctcctccatgccagcactgtcaccagct
gcccacagccaaaaagggcgactattcactggctccggcctggcctacacatcaatgacaccagggca
gcccgtattcgggggggagttcagctgaccgactcgtgacggccttggccgatggggccagcgagaggg
gggatacagagccctgatcaccgcaataccctgctcaacaatgcgggggacatcaacgccatggccattc
gctccgaacgggacggcaccacacgctcggggaagccggtctcgggggaacctcggcacgggcccctg
tcgatcacgcctggtcactggctgccacgcactacacctcggagctcagcttcaaggatcgc atgtatcccaa
acacacaatcaccaactatgaccacctcgattttggctcggccccgatcagagcggttttggcgcagtgacgt
ccagcagcgacgccaagctggaaagtgtcgcctggtggacacctctcctcctggacggggacctgcagt
ggacagtcggcgccagacatcagacggtggagagcaccacactatggcgccagcggcgcgacacctccc
actatgacgagagccggctctcggcagccaccgccatcctggtcaaggtaggggatgacctctcctctacac
caactacatagaggggctgggcccagggggcacggcgcccaccacggcgagcaatgcgggtgaaatcat
gaagccctaccagaccaagcagtatgaggtcggcgccaagctggatctgggtcagttcggccacacactga
gcctgttccagatagccaaaccgagcgcctacacggatccggtcagcaatgtctatgggggtctacggtgac
agcgcaaccgggggattgagtgggatctgtttggcgagctgactccggaactgcgcctgctggggggagcct
cctatacccaggccgaactgaccaaggccctcaacaaggccaatgaaggcaaccaggcgaccgggggtgc
ccaaagtgatggccaagtggggctggaatacgaacctcggccctgcccgggctcacgctgaccggcaat
accagtttgcggcaagcgtatgtcaccgatgacaaccgcatgtcgtctccccctacaccacctcgcacct
gggggcccgtacaccaccaagattgccaccaaggaggtgacgggtacgagcctcgggtcaaaacctcacc
aatcatgcctactggctcggctcctggagcgggtggcaacggcagcggactgtccggcggactgggttctccac
gtaccttcttctgtccacctcactggcattctga

SEQ ID NO: 12. Secuencia de aminoácidos de la proteína FstA

>FstA

Mlkphllhpaalahpplaqtvsrfslnklgvaarlailagvsgtlllglapsaaqaspelsvtttkslsipagslaqalk
tfssetgisldlddktmqgmtspglagqysppqglalllsghdlvaepageghykvrrqagvsadevmvqgr
qtyaggqvadsrvllgnkhfmdtpfntvsyteeyieneqaqdigslagatnasiyvpskrsifetfymrgfstt
asdmftngligmapnmrsstemaervdvlkgpsvllngmppdgsvggsinimpkragkdplakvtatyes
dglggvhldlgrffgeekqwgvrngvyrdgtdpvnqqhkmeltsigldwrnerarasldlyrqheevdgvn
yfsissiasvtqlptakkdyslapawaytindraavrgefldtdsltafaawgqreggyralitnllnagdin
amairserdgtqrsgeaglrnlgtpvdhawsaathytselsfkdrmypkhitnydhldfsgsapdqsgfga
vtssdaklesvalvdtlsfldgdlqwtvgarhqtvestnygasgaqtsydesrlspatavkvrddlslytnyie
glgqgggtapttasnageimkpyqtkyevgakldlgqfahltslfqiakpsaytdpvsnvgyvygeqnrngiew
dlfgeltpelrllggasytqaeltkalkanegnqatgvpkvmaklgleydlaalpglltntqfvgkryvtddnrm
slsptytfdlgaryttkiatkevtvasvqnltnhaywlgswsgngsglsgglgsprtfllstslaf

SEQ ID NO: 13. Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína recombinante FstA (rFstA) en el plásmido pET20b(+)

>peIB-6His-FrpA

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgtgcccagccggcgatggccatggatat
cggaattaattcggatccgaattcgcaatccccggagctgtcggtcacgaccacaaaaagcctcagtatcccc
gctggctctctggcccaggcgtcaagacctctcgtccgagacaggtatcagcctggatctcgatgataaaac
catgcaagggatgaccagccccgggctggcaggccaatacagtccccccagggtctggccctctgttgag
tggtcacgatctggtggccgagcctgcggggagaaggacactacaaggttcgccgacaagccggggtcagtg
ccgatgaggtcatggtggtgcaagggcgccagacctatgccggtggccaggtggcctctgacagtcgggtcg
gattgcttggaacaagcactcatggatacccccttcaacaccgtcagctacacagaagaatacatagagaa
cgagcaggcccaggatatacggctccctcgcaggtgccaccaatgcatccatctatgtgccgagcaaacgca
gcatctcgagaccttcatatgctggttccagcaccacggccagtgacatgacctcaacggtttgatcggca
tggcgcccaacatgctgagttcagaccgagatggccgagcgggtcagctgctcaagggcccgtccgtgttc
tcaacggcatgccgcccagaccgagcgtggggggcagcatcaataatgcccacacgcccggcaagg
atcctctggccaaggtgaccgccacctatgaatcagacgggctcggcggcgtgcatctggatctgggtcgccg
tttcggggaagaaaaacagtggggggtgcttcaatggcgtctaccgcatggtgacaccccggtaatga
ccagcagcacaagatggagctgacttccattggcctcgactggcgcaacgagcgggcccgcctccctcgc
atctctatcggcaacatgaagaggtggatggggcaactactcagcatctcctccatgccagcactgtcacc
cagctgcccacagccaaaaggcgactattcactggctccggcctgggacctacacatcaatgacaccag
ggcagccgtattgccccgggagttcgacctgaccgactcgtgacggcctttgccgatggggccagcag
aggggggatacagagccctgatccccgcaataccctgctcaacaatgccccgggacatcaacgccatggc
cattcgtccgaacgggacggcaccacaacgctcggggaagccggtctgccccgcaacctcggcacggg
ccctgtcgatcacgctggtcactggctgccacgactacacctcggagctcagcttaaggatcgatgtatc
ccaaacacacaatcaccaactatgaccacctcaagcttcatcaccatcaccaccagatgttggtcggcccc
cgatcagagcggttttggcgagtgactccagcagcagccaagctggaaagtgcgcccctggggaca
ccctctcctcctggagcggggacctgagtgagcagtcggcgccagacatcagacgggtggagagcaccac

tatggcgccagcggcgcgacacctcccactatgacgagagccggctctcgccagccaccgcatcctggt
caaggtacgggatgacctctccctctacaccaactacatagaggggctgggcccaggggggacggcgccc
accacggcgagcaatgcgggtgaaatcatgaagccctaccagaccaagcagtatgaggtcggcgccaag
ctggatctgggtcagttcgccacacactgagcctgttccagatagccaaaccgagcgcctacacggatccg
gtcagcaatgtctatggggctacgggtgaacagcgcaaccgggggattgagtgggatctgtttggcgagctga
ctccggaactgcgctgctggggggagcctcctatacccaggccgaactgaccaaggccctcaacaaggc
caatgaaggcaaccaggcgaccgggggtgccaaagtgatggccaagttggggctggaatacgacctgcc
gccctgcccgggctcacgctgaccggcaatacccagttgtcggcaagcgctatgtaccgatgacaaccgc
atgtcgctctccccctacaccacctcgacctggggggcccgtacaccaccaagattgccaccaaggagggtg
acggtacgagcctcgggtgcaaaacctcaccaatcatgcctactggctcggctcctggagcgggtggcaacggc
agcggactgtccggcggactgggttctccacgtacctcctctgtccacctactggcattctga

SEQ ID NO: 14. Secuencia de aminoácidos de la proteína rFstA (plásmido pET20b(+))

>rFstA con 6 histidinas en el loop 5

PeIB

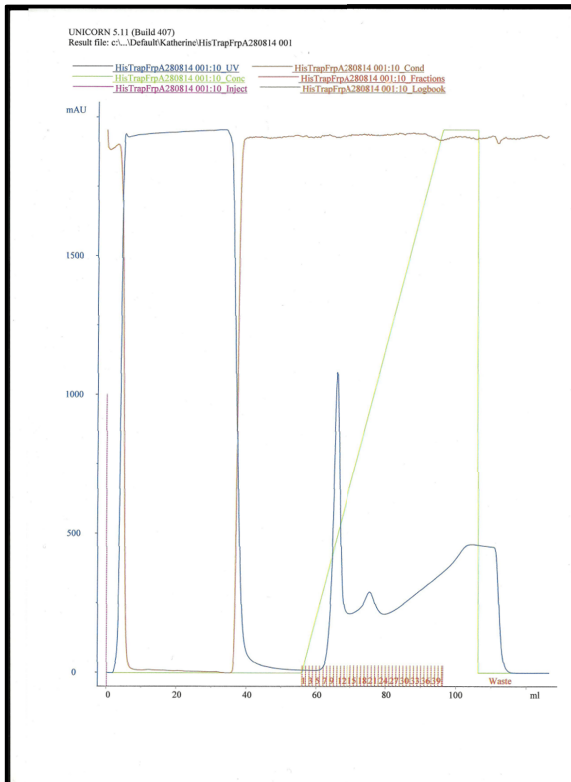
MkylIptaaaglllIaaqpamamdiginsdpnsqspelsvttklsipagslaqalktfssetgislddddktmq
gmtspglagqysppqglalllsghdlvaepageghykvrrqagvsadevmvqgrqtyaggqvasdsrvgl
lgnkhfmdtpfntvsyteeieneqaqdigslagatnasiyvpskrsifetfymrgfsttasdmtnflgmapn
mrsstemaervdvlgpsvllngmppdgsvglsvsinimpkrakgdplakvtatyesdglggvhlldlgrfgee
kqwgvrngvyrdgdtpvndqqhkmeltsigldwrnerarasldlyrqheevdgvnyfsissiasvtqlptakk
gdyslapawaytindraavrgefldtdsltafaawgqreggyralitrntllnnagdinamairserdgtqrsge

6His

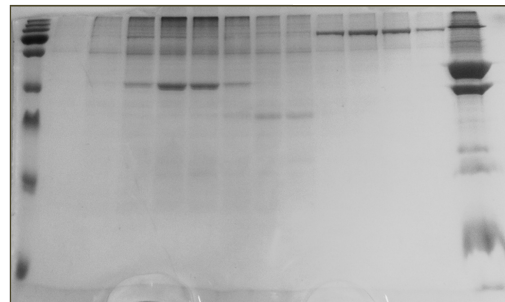
aglrgnlgtpvdhawslaathytselsfkdrmypkhtitnydhklhhhhhhdfgsapdqsgfgavtsssdak
lesvalvdtlsfldgdlqwtvgarhqtvestnygasgaqtshydesrlspatavkvrddlslytnyieglgggta
pttasnageimkpyqtkqyevgakldlgqfahtlsifqiakpsaytdpvsnvgyvygeqrnrriegwldfgeltpe
lrllggasytqaeltkalkanegnqatgvpkvmaklgleydlaalpgltitgntqfvkgkryvtddnrmslspytffd
lgaryttkiatkevtvrasvqnltnhaywlgswsgngsglsgglgsprtfllstslaf

3. Cromatogramas de la purificación 10His-rFrpA, cuando se usó el sistema pBAD y la cepa BL21CodonPlus

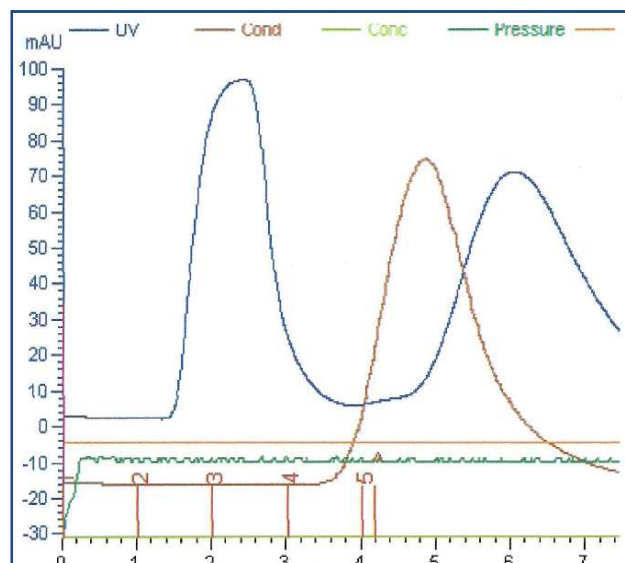
Cromatografía de afinidad usando una columna HisTrap de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences). Tampones: Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, imidazol 20 mM y OPOE al 1 % y Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, y OPOE al 1 %.



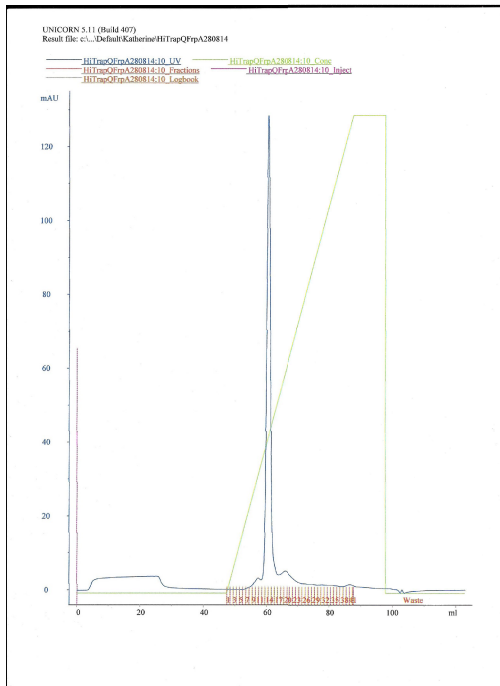
Fracciones 7-22 y eluído



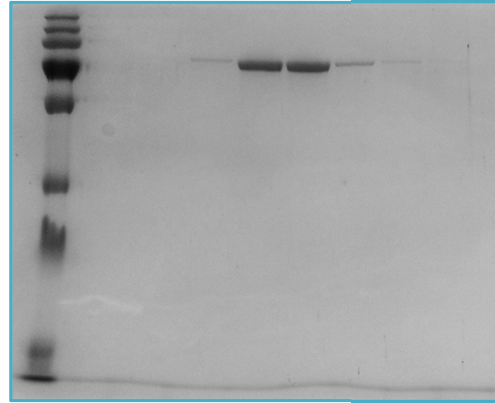
- Desalting usando una columna HiTrap Desalting (GE Healthcare Life Sciences) y tampón Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y OPOE al 1 %.



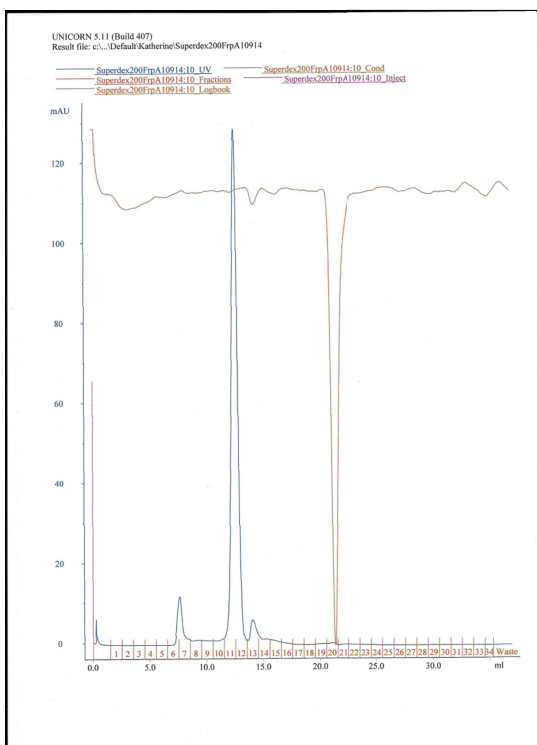
- Cromatografía de intercambio iónico usando una columna HiTrap Q XL de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences). rFrpA se eluyó usando gradiente lineal de NaCl entre 0 y 1 M en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y OPOE 1 %.



Fracciones 10-20



- Cromatografía de filtración en gel usando una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) y tampón Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, y OPOE al 1 %.

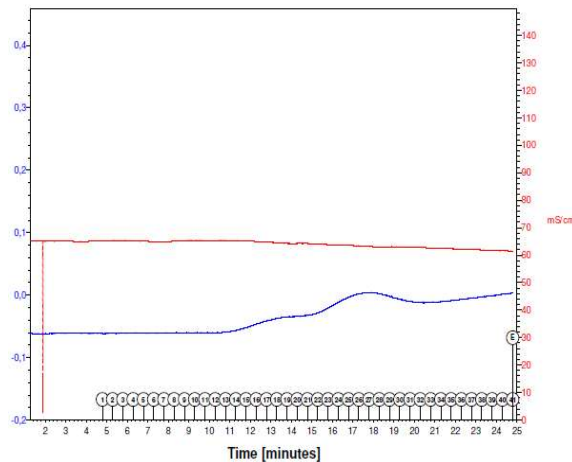


Fracciones 10-17

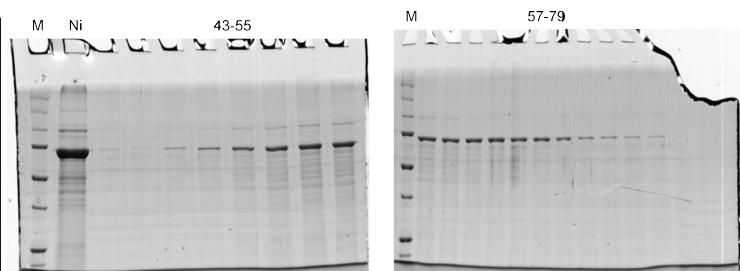
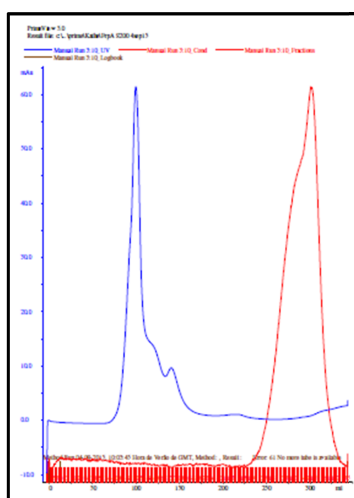


4. Cromatogramas de la purificación 10His-rFrpA, cuando se usó el sistema pET20b(+) y la cepa BL21 (DE3)

- Ejemplo del cromatograma obtenido en la separación en la resina de afinidad de las muestras de ensayo de expresión de rFrpA (plásmido pET20b(+)). Se usó una columna HisTrap de 5 mL equilibrada con Tris-HCl 50 mM pH 8.0 NaCl 0.5 M, imidazol 20 mM y OPOE al 1 %. rFrpA se eluyó con un gradiente lineal desde 20 hasta 500 mM de imidazol en Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M y OPOE al 1 %.

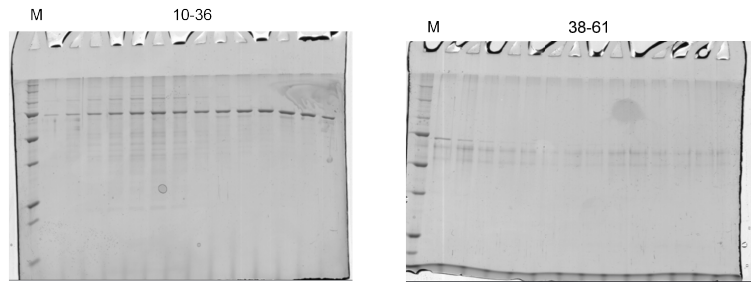
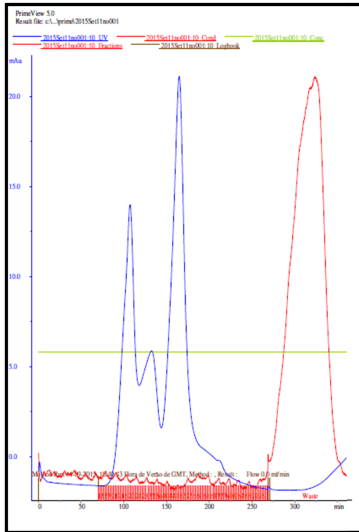


- Cromatografía de filtración en gel usando una columna HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare Life Sciences) con el tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM y LDAO al 0.05 %. Medio de cultivo TB, 25 °C durante 30 h. Detergente de solubilización de membranas OPOE al 7 %.



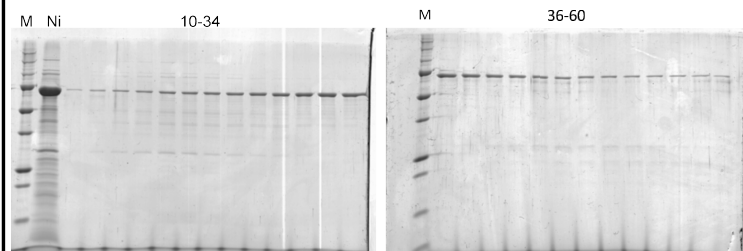
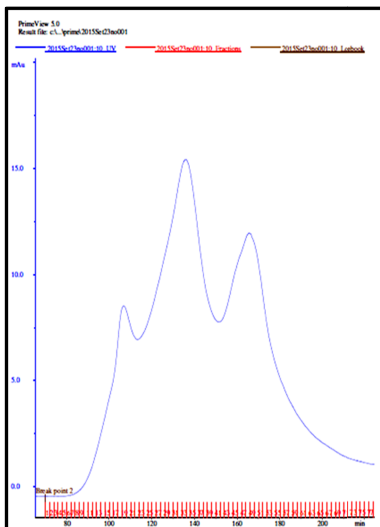
Grupo 1 (Fracciones 48-57): 4 mL a 0.61 mg/mL (NanoDrop)
Grupo 2 (Fracciones 58-70): 1.5 mL a 0.72 mg/mL (NanoDrop)
Grupo 1 concentrado: 0.16 mL a 1.26 mg/mL (NanoDrop)
Grupo 2 concentrado: 0.40 mL a 2.12 mg/mL (NanoDrop)

- Cromatografía de filtración en gel usando una columna HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare Life Sciences) con el tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM y LDAO al 0.1 %. Medio de cultivo TB, 25 °C durante 30 h. Detergente de solubilización de membranas OPOE al 7 %.



Fracciones 10-26: Agregados
 Grupo 3 (Fracciones 27-34): 0.80 mL a 0.93 mg/mL (BCA) ó 0.28 mg/mL (NanoDrop)
 Grupo 3 concentrado: X mL 0.81 mg/mL (NanoDrop)

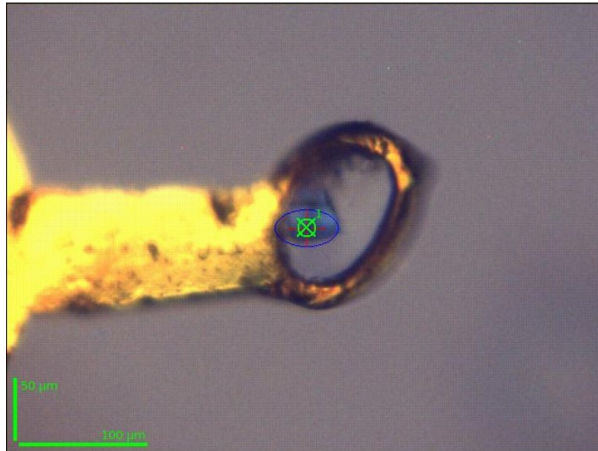
- Cromatografía de filtración en gel usando una columna HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare Life Sciences) con el tampón Tris-HCl 25 mM pH 8.0, NaCl 350 mM y LDAO al 0.1 %. Medio de cultivo TB, 25 °C durante 30 h. Detergente de solubilización de membranas Elugent al 5 %.



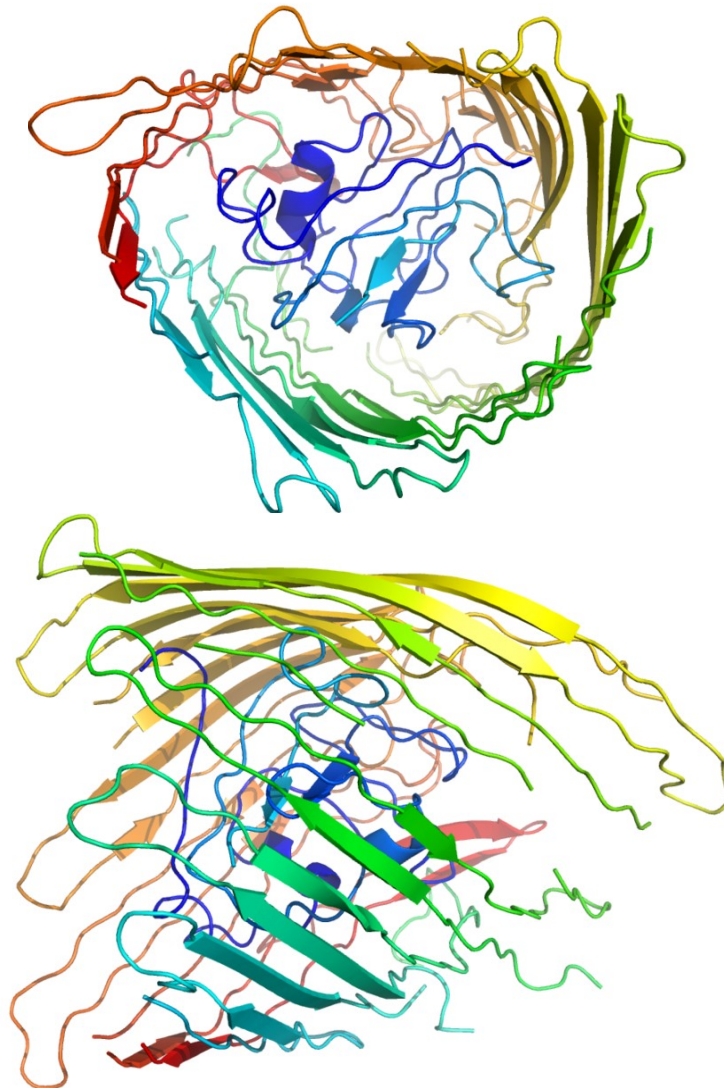
Grupo 4 (Fracciones 30-38): 0.26 mL a 2.83 mg/mL (NanoDrop)
 Grupo 5 (Fracciones 47-54): 0.37 mL a 1.1 mg/mL (NanoDrop)

5. Cristalografía de Rayos X de rFrpA

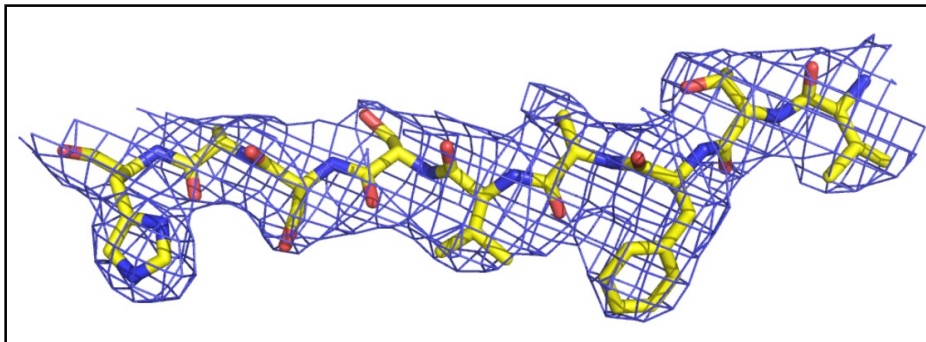
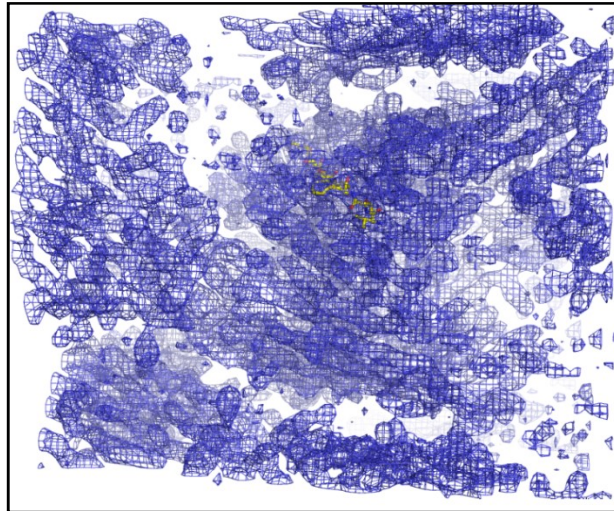
- Cristal 5 de rFpA en el loop.



- Modelo preliminar de la estructura de rFrpA

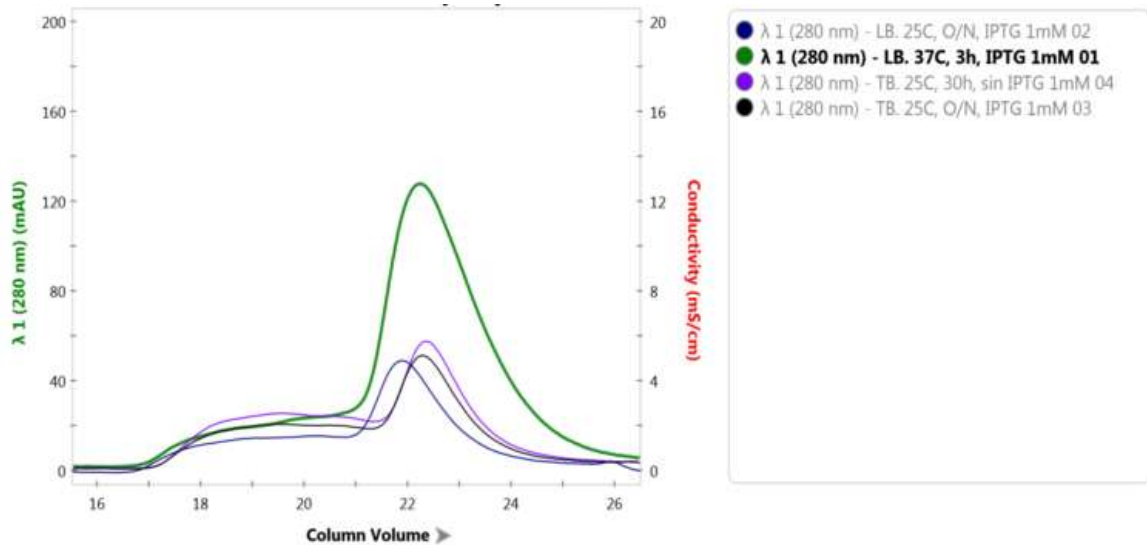


- Mapa de densidad electrónica de rFrpA y ajuste del modelo preliminar de la estructura rFrpA al mapa de densidad electrónica

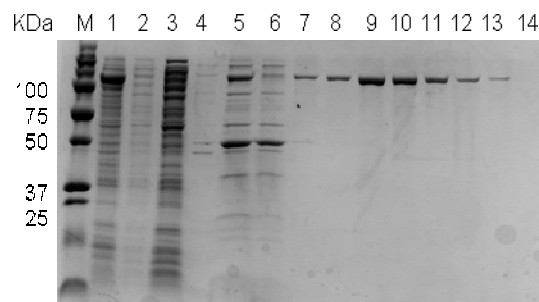


6. Cromatogramas de la purificación de rFstA

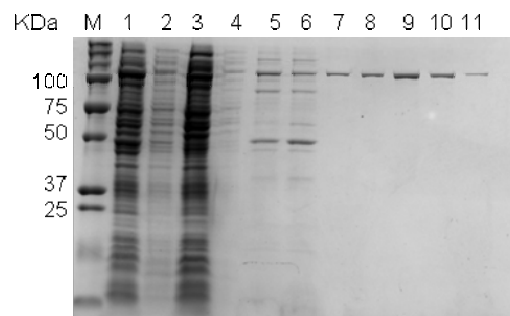
- Comparación de los Cromatografía de la cromatografía de afinidad De las diferentes condiciones de cultivo estudiadas para la expresión de rFstA. Se usó una columna HisTrap de 1 mL (GE Healthcare Life Sciences). Tampones: Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, imidazol 20 mM y Elugent al 0.25 % y Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, y Elugent al 0.25 %.



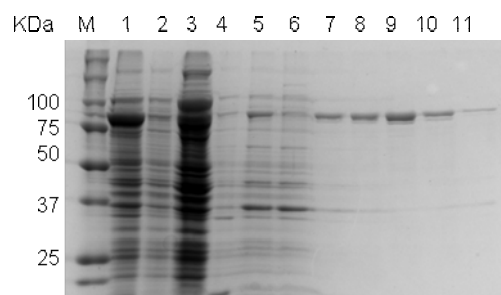
Cepa: *E. coli* BL21(DE3) con pET-Loop6His-FstA. Condiciones de cultivo: medio LB, 37 °C e inducción con IPTG durante 3 h (Curva verde en el cromatograma).



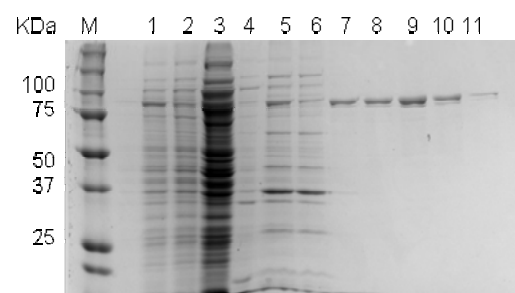
Cepa: *E. coli* BL21(DE3) con pET-Loop6His-FstA. Condiciones de cultivo: medio LB, 25 °C e inducción con IPTG durante 16 h (Curva azul en el cromatograma).



Cepa: *E. coli* BL21(DE3) con pET-Loop6His-FstA. Condiciones de cultivo: medio TB, 25 °C e inducción con IPTG durante 16 h (Curva azul en el cromatograma).



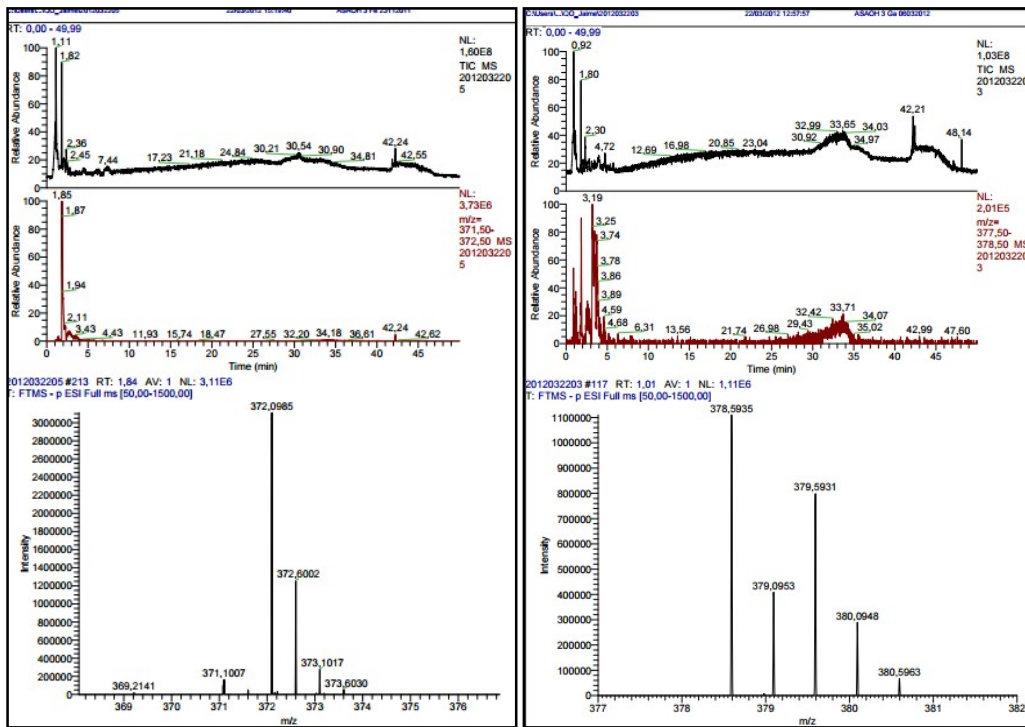
Cepa: *E. coli* BL21(DE3) con pET-Loop6His-FstA. Condiciones de cultivo: medio TB, 25 °C, sin inducir y crecimiento durante 30 h (Curva azul en el cromatograma).



7. HPLC-ESIMS de las Amonabactinas

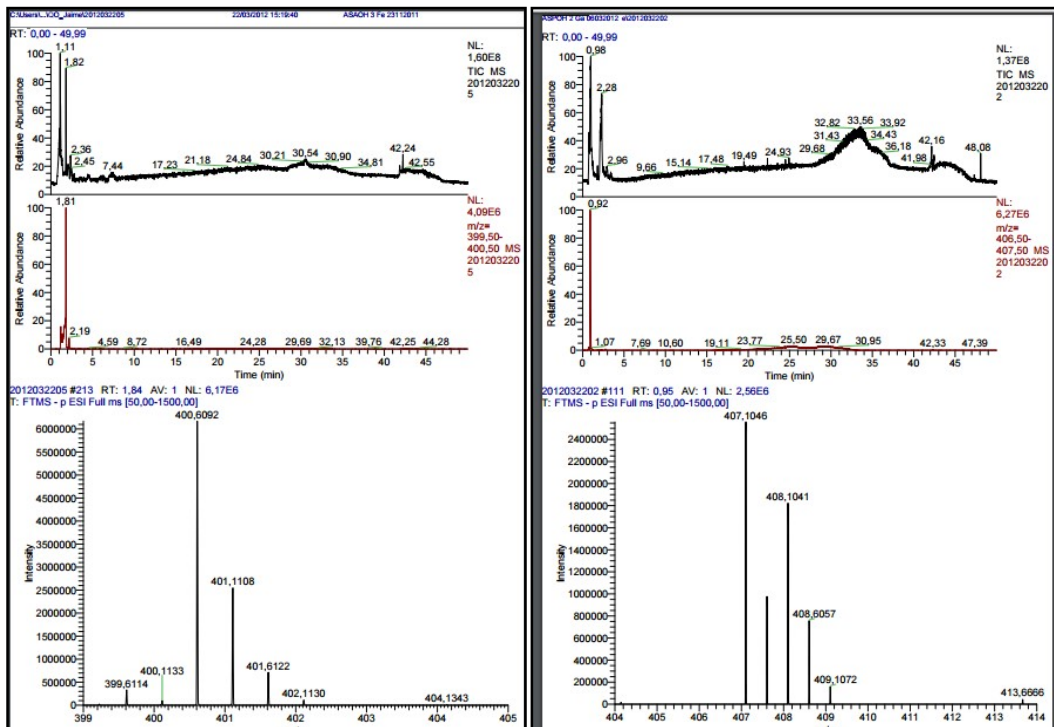
- Complejo Amo P 693-Fe(III)

Complejo Amo P 693-Ga(III)



- Complejo Amo P 750-Fe(III)

Complejo Amo P 750-Ga(III)



- Complejo Amo T 732-Fe(III)

Complejo Amo T 789-Fe(III)

