



Cinvestav
Unidad Irapuato

¿Cómo identificamos bacterias?

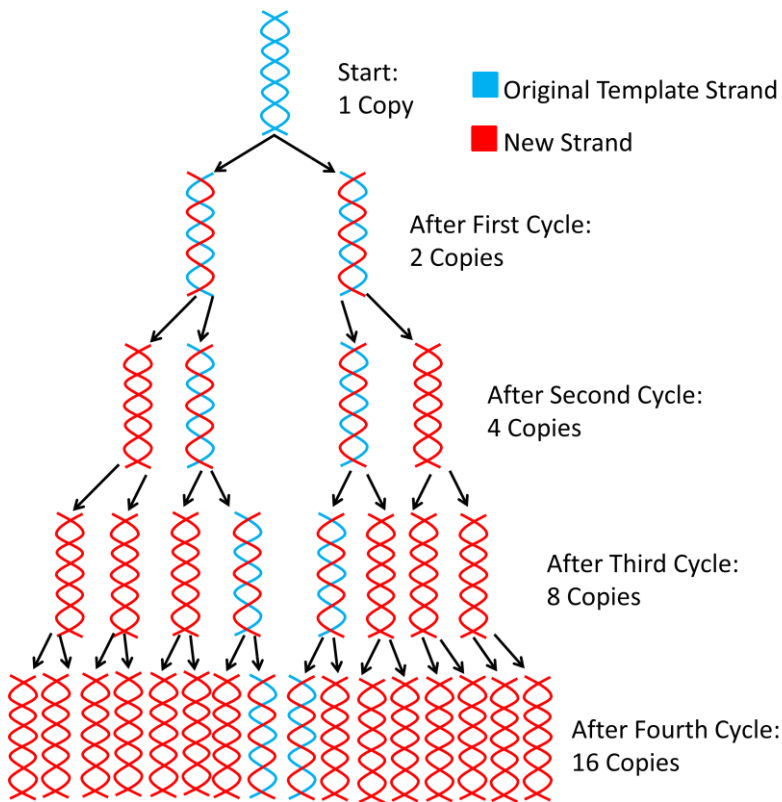
Las **bacterias** son microorganismos unicelulares que miden tan solo unos micrómetros de largo. Son los organismos más abundantes que hay en el planeta encontrándose en todo hábitat de la tierra y además son muy diversas. La salinidad, temperatura, pH, concentración de oxígeno, etc. del ambiente pueden determinar la distribución y abundancia de las diferentes "especies" de **bacterias**. El valle de Cuatrociénegas, Coahuila es un buen modelo para determinar la relación entre diversidad con respecto a las condiciones y recursos, por lo que se ha realizado un muestreo de **bacterias** que nos interesa identificar.

Para identificar **bacterias** de algún ambiente primero tenemos que colectarlas; una vez en el laboratorio rompemos su pared celular y la membrana plasmática para extraer únicamente el **DNA**, que es el material genético de las células y es el que determina las características de los seres vivos. La molécula de **DNA** está formada por compuestos químicos llamados nucleótidos. Existen cuatro tipos de nucleótidos: adenina, timina, citosina y guanina. El **DNA** de una bacteria puede contener hasta 300 millones de nucleótidos. Para identificar **bacterias** solo usamos una pequeña porción del **DNA**, un gen llamado "**16S**" que tan solo tiene 1500 nucleótidos.

Para obtener el gen "16S" utilizamos una técnica de biología molecular llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que nos permite hacer muchas copias de cualquier gen. La reacción de PCR consiste en agregar a un tubo:

1. Una pequeña fracción de DNA
2. DNA polimerasa la molécula encargada de sacar las copias.
3. Dos iniciadores que le indican a la **DNA** polimerasa cual es el fragmento que se va a copiar. Para la identificación de **bacterias** se usan iniciadores específicos para el gen "16S".
4. Nucleótidos que son los ladrillos para construir nuevos fragmentos de

DNA.



Así pues, la reacción de PCR amplificará un millón de veces el gen "16S". ¿Cómo se detecta el gen amplificado? Se utiliza una técnica que consiste en separar el fragmento de DNA en una matriz de gel y posteriormente teñir el DNA para poder verlo directamente. Este es el método de electroforesis cuyo procedimiento se describe más adelante.

¿Para que me sirve tener amplificado el gen "16S" ? Este gen es una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales de modo que si leemos la secuencia de los 1500 nucleótidos, es decir el orden de las adeninas,

AISLAMIENTO DE DNA GENOMICO DE BACTERIAS POR EL METODO QUICK GENE

Materiales:

- cultivo de 24 hrs
- TRIS pH 8
- Lizosima
- Triton 10%
- Etanol 100%
- Agua desionizada
- Rnasa
- Kit QuickGene DNA tissue DT-S
- Palillos

- Tubos eppendorff
- Guantes
- Puntas para micropipetas

Equipo:

- Micropipetas
- Microcentrifuga
- Vortex
- Termoblock
- Quick Gene mini 80

Crece la bacteria en 5 mL de medio a 37°C toda la noche.
Centrifugar 1 mL del cultivo por 10 min.
Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 100 µl de agua, agregar
2 µl de Tris pH 8 y lizosima en un palillo.
Vórtex máxima velocidad por 15 s.
Incubar a 37°C por 30 minutos.
Dar un pulso de microcentrifuga.
Agregar 180 µl de LDT, 20 µl de EDT y 20 µl de triton 100X al 10%.
Vórtex máxima velocidad por 15 s.
Incubar a 65°C por 10 min.
Dar un pulso de microcentrifuga.
Agregar 240 µl de etanol 100%. Vortex máxima velocidad por 15 s. Dar un pulso de microcentrifuga.
Cargar el lisado en las columnas.
Lavar la columna 3 veces con el buffer WDT.
Para resuspender el **DNA** agregar a la columna 30 µl de agua con RNAsa.

PCR con oligonucleótidos 16S a partir de DNA obtenido de cultivos

En 1983, el bioquímico Kary Mullis desarrolló la técnica de Biología Molecular que desde entonces ha revolucionado la investigación biológica y médica, lo que le llevó a recibir el premio Nobel de Química de 1993. Esta técnica, denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) transformó a la Biología Molecular en una herramienta multidisciplinaria. Muchas de las técnicas de Biología Molecular usadas antes de la invención de la PCR para amplificar fragmentos de **DNA** consumían mucho tiempo y requerían un alto nivel de especialización técnica.

La PCR es una técnica que replica enzimáticamente al **DNA** *in vitro*, permitiendo que una pequeña cantidad de moléculas de **DNA** (molde o

templado) sean amplificadas selectivamente de manera exponencial. Una de las principales razones por las cuales la PCR es una herramienta tan poderosa es su simplicidad y especificidad.

El primer paso crítico es la selección del ácido nucleico a partir del cual se amplificará la secuencia de interés; a este ácido nucleico se le llama molde o templado. Por lo general, la PCR está diseñada para permitir la amplificación selectiva de una secuencia específica de **DNA** blanco. El siguiente punto a considerar es la selección de primers, pues para amplificar selectivamente una secuencia de **DNA**, es necesaria cierta información previa de esa secuencia blanco para diseñar dos primers de unos 18 a 25 nucleótidos de largo, que son específicos complementarios a las secuencias que flanquean a la secuencia blanco. Para reducir la posibilidad de que los primers se enlacen en otros sitios del **DNA** que no sean los deseados, es necesario tomar en cuenta varias consideraciones en su diseño:

- Composición de bases. El contenido de GC debe ser de 40 a 60% con una distribución uniforme de los 4 nucleótidos A, T, C y G.
- Temperatura de fusión (T_m). Los valores de T_m calculados para los dos primers usados juntos no debe variar en más de 5 °C.
- Secuencias terminales 3'. No deben ser secuencias complementarias a alguna región del otro primer utilizado en la misma reacción.
- Secuencias autocomplementarias. Deben evitarse repeticiones invertidas o cualquier secuencia autocomplementaria de más de 3 pb de largo.

La PCR estándar consiste en una serie de ciclos de 3 reacciones sucesivas:

A) Desnaturalización. Se ajusta a una temperatura de 93 a 95 °C para el **DNA** genómico.

B) Alineamiento (annealing). A temperatura variable (entre 45 a 65 °C) de acuerdo con la T_m de los primers (por lo regular la temperatura de alineamiento se ajusta a 5 °C menos respecto a la T_m calculada). En esta fase los dos primers se hibridan con sus respectivas secuencias complementarias en el molde.

C) Síntesis o polimerización. De manera característica alrededor de 70 a 75 °C (temperatura óptima a la cual trabaja la enzima). La **DNA** polimerasa empleada es termoestable, por lo que no se afecta por los pasos de desnaturalización.

Las cadenas recién sintetizadas pueden servir a su vez como moldes para la síntesis del nuevo **DNA**, lo que da lugar a una reacción en cadena con un incremento exponencial del producto.

La PCR tuvo gran impacto en 4 áreas principales de la Biología Molecular: el mapeo de genes, la clonación, la secuenciación de **DNA** y la detección de genes. La PCR es ahora utilizada como una herramienta de diagnóstico médico de enfermedades infecciosas o para detectar mutaciones específicas que pueden causar enfermedades genéticas, en las investigaciones criminales para identificar a los sospechosos a nivel molecular, en pruebas de paternidad y en la secuenciación del genoma humano, por mencionar algunos usos.

Materiales

- Primer directo: 16S forward: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
- Primer reverso: 16S reverse: TACGGYTACCTTGTACGACTT
- Taq **DNA** polimerasa

Equipo

- Termociclador

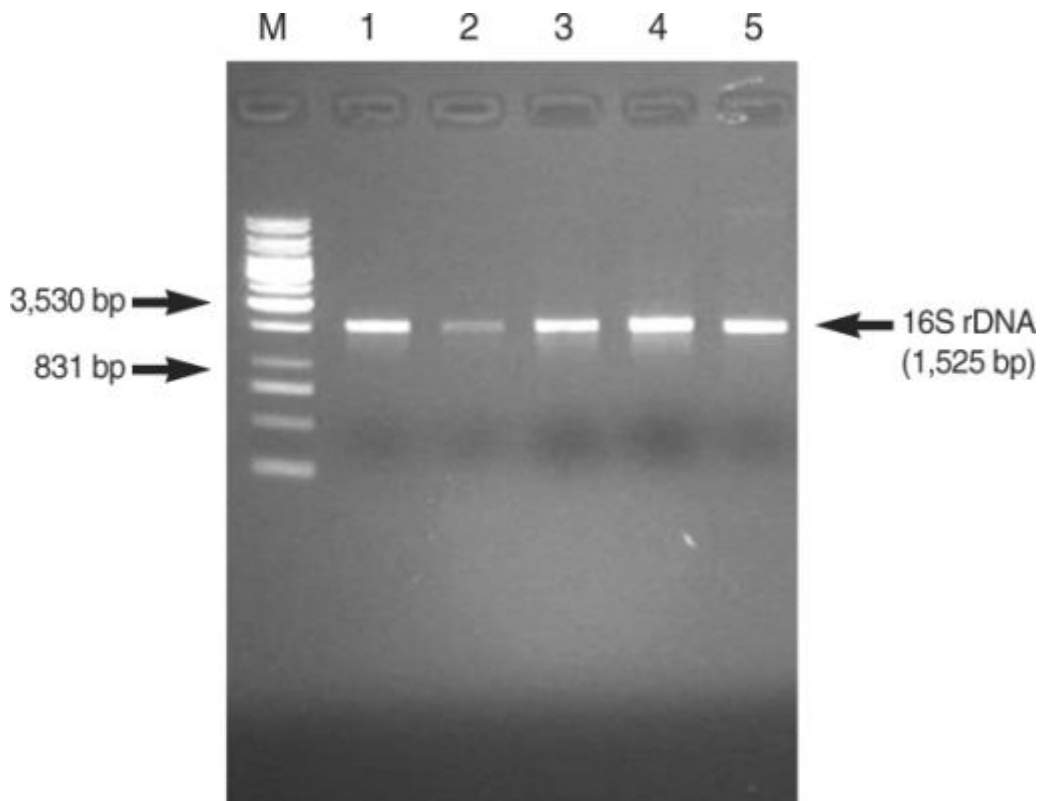
1) Colocar en el tubo de PCR :

Muestra de DNA	1 μ l
Buffer de PCR 10x	2.5 μ l
dNTP's	2 μ l
Primer directo	1 μ l
Primer reverso	1 μ l
Agua	μ l
Reacción total	25 μ l

2) Programar el termociclador con las condiciones de amplificación necesarias, siguiendo como guía la Tabla mostrada a continuación

Fase	No. ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	94 °C	3 min
Desnaturalización	25 a 35	94 °C	30 s
Alineamiento		Depende de la T _m de los <i>primers</i>	30 s
Polimerización		72 °C	1 min por c/kb a amplificar ^s
Extensión final	1	72 °C	7 min
		4 °C	∞

3) Analizar el resultado del PCR en electroforesis horizontal en geles de agarosa



- Tubos de PCR de 0.2 mL
- Tubos de 1.5 mL estériles
- Muestra de **DNA** molde
- Agua Milli-QTM estéril
- Buffer de PCR 10x con MgCl₂ 15mM
- Mezcla de dNTP's (a una concentración de 10 mM de cada uno: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

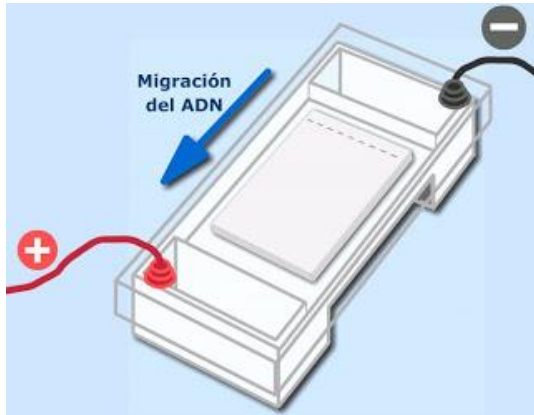
Separación de DNA por electroforesis horizontal en geles de agarosa

La electroforesis es el proceso de movimiento de moléculas cargadas en una solución al aplicar un campo eléctrico. Debido a que las moléculas en un campo eléctrico se mueven a una velocidad dependiente de su carga, forma y tamaño, la electroforesis se ha desarrollado ampliamente para la separación de diversas biomoléculas. Debido a que es una herramienta analítica simple y relativamente rápida, se utiliza para el análisis y la purificación de moléculas grandes como proteínas y ácidos nucleicos o de moléculas pequeñas como azúcares, aminoácidos, péptidos y nucleótidos.

La electroforesis de macromoléculas se realiza normalmente aplicando un volumen pequeño de la muestra en una matriz porosa. Bajo la influencia del voltaje aplicado, las diferentes moléculas presentes en la muestra se moverán a través de la matriz a diferentes velocidades. Al final se podrá observar la separación de las moléculas detectadas como bandas en distintas posiciones dentro de la matriz. La matriz puede estar compuesta por diferentes materiales como papel, acetato de celulosa, agarosa o poliacrilamida.

En la unidad de electroforesis, el gel se encuentra colocado entre dos cámaras que contienen buffer. La conexión eléctrica entre las dos cámaras es a través del gel. Debido a que los ácidos nucleicos tienen carga negativa, los pozos para muestras deben colocarse del lado del electrodo negativo para que estos migren hacia el lado positivo.

Los ácidos nucleicos son comúnmente separados en geles de agarosa. La agarosa es un polisacárido altamente purificado, derivado del agar. La



La velocidad de migración del **DNA** en matrices de agarosa está determinada por los siguientes factores:

-Tamaño molecular del **DNA**. Las moléculas más grandes migran más lentamente por que su fricción de arrastre es mayor y porque se mueven a través de los poros del gel con mayor

dificultad que las moléculas pequeñas.

- Forma o conformación del **DNA**. El **DNA** súper-enrollado migra más rápido que el **DNA** lineal.

-Concentración de agarosa. Al disminuir la concentración de agarosa, los poros del gel son más grandes y las moléculas migrarán con mayor velocidad.

-Voltaje aplicado. Con voltajes bajos, la velocidad de migración de los fragmentos de **DNA** es proporcional al voltaje aplicado.

-Buffer de electroforesis. La movilidad electroforética del **DNA** es influenciada por la composición y la fuerza iónica del buffer de electroforesis. En ausencia de iones (agua desionizada) la conductividad eléctrica es mínima y el **DNA** migra lentamente. En un buffer con una fuerza iónica demasiado alta, la conductividad eléctrica es muy buena, aún con voltajes moderados y se generan grandes cantidades de calor, lo que podría fundir el gel y desnaturalizar el **DNA**.

La fuerza fundamental del movimiento por electroforesis es el voltaje aplicado al sistema. La velocidad de las moléculas es directamente proporcional al gradiente de voltaje.

Durante la electroforesis, el voltaje y la corriente son proporcionados por una fuente de poder y electrodos. El buffer y el gel actúan como resistencia.

Algunos de los problemas más comunes cuando se separan ácidos nucleicos por electroforesis en geles de agarosa son:

-Bandas poco definidas. Puede ocurrir cuando la agarosa no polimeriza adecuadamente, causando que los pozos estén mal formados (presencia de burbujas o tiempo de polimerización insuficiente); también puede deberse a

que el gel se haya preparado con agua y no con buffer, o bien, a que se hayan cargado grandes cantidades de **DNA** en el pozo. La degradación del **DNA** también se observa como un "barrido" a lo largo de todo el carril, debido a la presencia de fragmentos más cortos de diferentes longitudes.

- Ausencia de bandas. Puede deberse a que la muestra se haya salido del gel por corrimiento excesivo o porque los cables fueron colocados incorrectamente en sus electrodos respectivos. También puede ocurrir cuando se cargan cantidades inferiores al límite de detección.

-Bandas tenues. Este problema se puede presentar si la muestra no ingresa completamente al pozo, o bien si el pozo fue perforado accidentalmente con la punta de la micropipeta al cargar la muestra. También puede deberse a una tinción incorrecta.

-Separación insuficiente de las bandas. Ocurre por corrimiento insuficiente o porcentaje de agarosa incorrecto.

Materiales

-Agarosa grado Biología Molecular

-Buffer TAE 1X

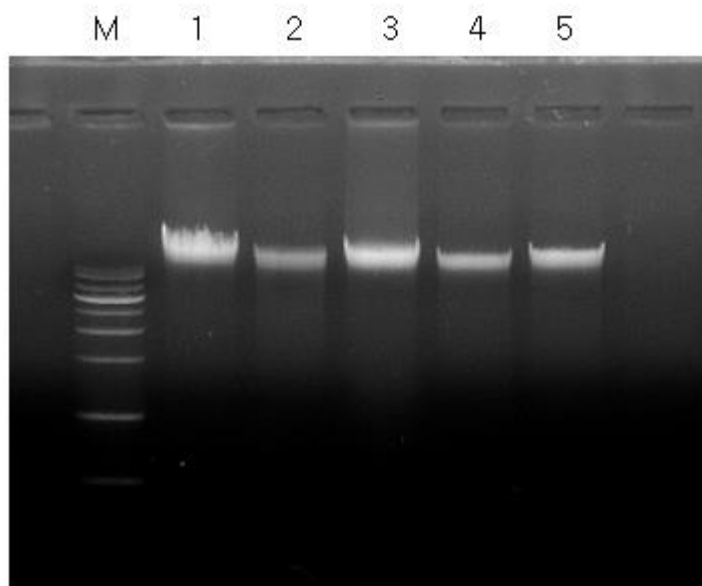
-Buffer de carga 5X

-Muestras de **DNA**

-Marcadores de peso molecular

- Gel Green

Equipo



- Cámara de electroforesis horizontal

- Fuente de poder

1) Limpiar y secar las charolas de preparación de geles y los peines con agua destilada y ensamblarlos. Colocar las charolas en una superficie horizontal y nivelada.

2) Acomodar los peines en cada charola a 0.5 -1.0 mm del fondo de ellas.

3) Preparar, en una botella

una solución de agarosa al 1% (p/v) y, en otra al buffer TAE 1X, disolver la agarosa calentando las mezclas en horno de microondas. No apretar las tapas de las botellas. Verificar que la agarosa esté completamente disuelta por medio de agitación.

4) Dejar enfriar las soluciones de agarosa por debajo de 60 °C.

5) Verter la agarosa tibia en cada charola nivelada y esperar a que solidifique.

6) Remover cuidadosamente los peines y montar los geles con cada charola en las cámaras de electroforesis.

7) Verter el buffer TAE 1X en las cámaras hasta cubrir el gel (1 mm por encima del gel).

8) En un trozo de Parafilm mezclar las muestras de **DNA** y los marcadores de peso molecular con el buffer de carga 5X

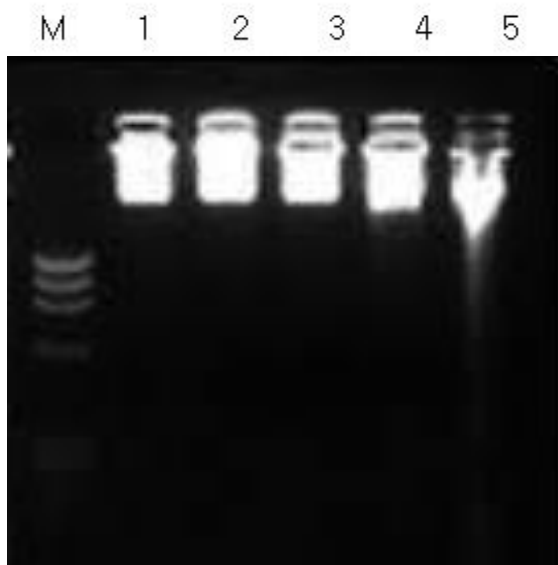
10) Utilizando la micropipeta, cargar lentamente las muestras. No tocar el fondo del pozo con la punta para evitar perforar el gel. Evitar burbujear con la micropipeta mientras se coloca la muestra para que ésta no se salga del pozo.

11) Cerrar las cámaras de electroforesis y aplicar una corriente de 85 V. Si la cámara se coloca

adecuadamente, se observará la formación de burbujas en los electrodos.

12) Cuando el color naranja haya migrado lo suficiente ($\frac{3}{4}$ partes del gel), apagar la fuente de poder y sacar el gel de la cámara.

13) Observar el resultado en el transiluminador de luz ultravioleta. La luz UV es mutagénica, por lo que su exposición debe ser mínima y empleando siempre protección para cara, ojos y manos.



Análisis de resultados

Especifica el tamaño de los Productos amplificados:

¿Qué esperas observar en el control sin **DNA**?

¿Qué esperas observar en el control con **DNA** e iniciadores 16S?

¿Cómo se secuencia el DNA?



La reacción de secuenciación es comparable a una reacción de PCR donde se replica **DNA**. La mezcla de reacción incluye el **DNA** molde (templado), nucleótidos, **DNA** polimerasa modificada (variante de la *Taq* polimerasa) y un oligonucleótido o premer (20-30 nt de longitud) que puede hibridar en una de las cadenas del templado de **DNA**.

La reacción inicia con la separación de las cadenas de **DNA**.

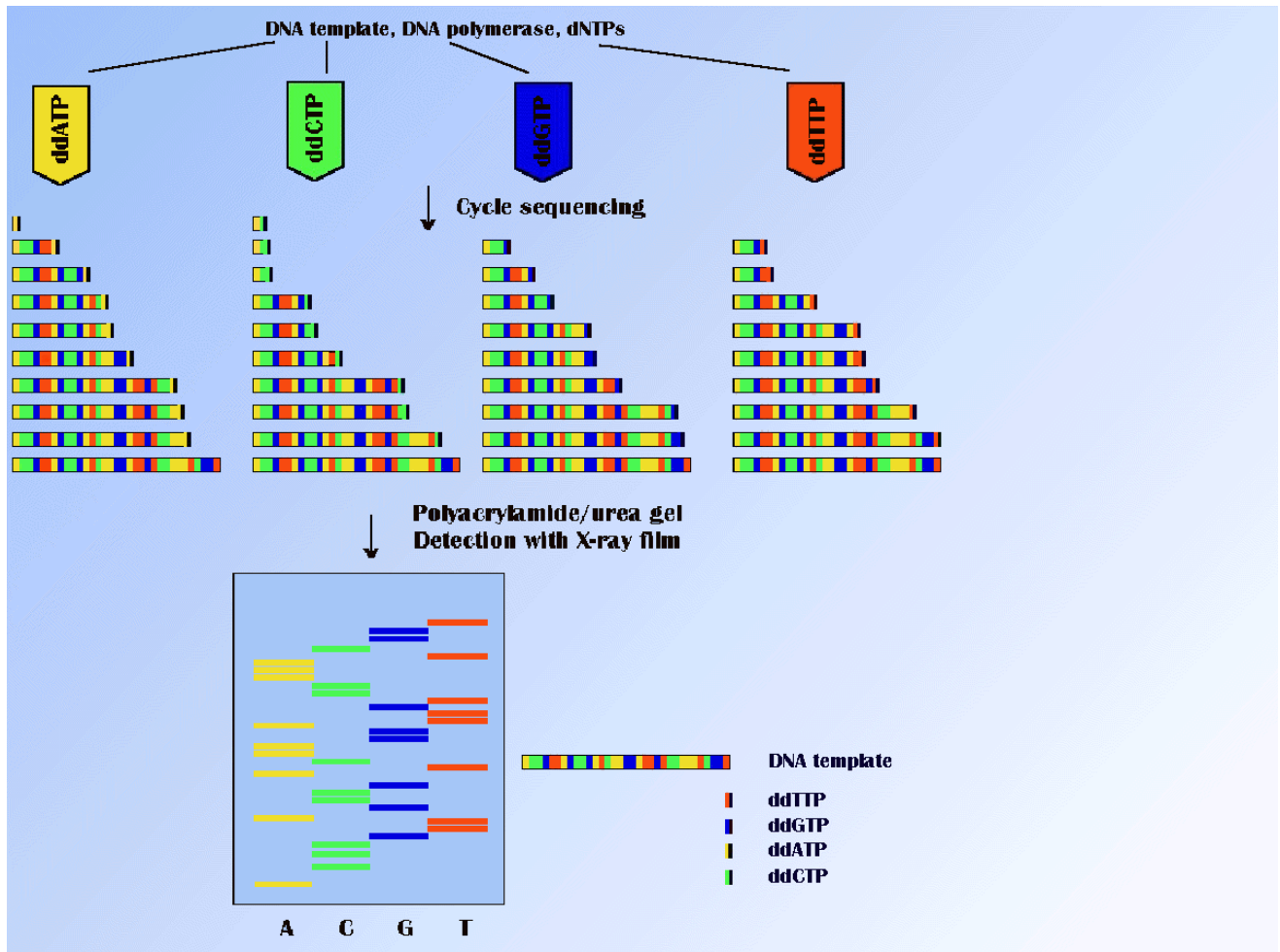
Posteriormente el oligonucleótido se alinea al templado y la **DNA** polimerasa inicia la síntesis de la cadena complementaria. Este ciclo se repite hasta la obtención de varias copias.

Dideoxinucleótidos: En la reacción de secuenciación se introducen además dideoxiribonucleótidos (nucleótidos similares a los que presenta el **DNA** excepto que carece de grupos hidroxilo en el Carbono 3'), que al introducirse en la cadena en vía de síntesis provocan que se detenga la polimerización. Esto produce cadenas de distintos tamaños, dependiendo de dónde se introducen, e indican el punto preciso donde se ubica cada uno de los 4 diferentes nucleótidos.

Los dideoxynucleótidos están marcados con un fluoróforo que es diferente para cada base, emitiendo una señal específica cuando se excita con un láser (A= verde, T= rojo, C= azul y G= amarillo).

Duplicación de una cadena de **DNA en presencia de dideoxi-T:** La mayor parte del tiempo cuando se requiere una timina (T) para hacer la nueva hebra, la enzima podrá adicionar una T normal y no hay problema, la síntesis continuará. Sin embargo, 5% de las veces la enzima adicionará un dideoxi-T y la hebra no puede ser elongada o extendida. Ésta eventualmente se separa de la enzima y la síntesis de la hebra terminará. De esta manera, todas las copias terminarán con una T, pero cada vez que la enzima sintetice una nueva

hebra el lugar donde la síntesis se detenga será al azar. Produciéndose así millones de cadenas de tamaño variable. Esto mismo ocurre para cada uno de los dideoxinucleótidos.





Relación entre las especies Charles Darwin. Libro de notas.

“Reconstrucción filogenética e identificación bacterias”

1ª Parte

Posiblemente la imagen de la relación entre especies de Charles Darwin de su libro de notas B sea una de las imágenes clásicas de una reconstrucción filogenética. En esta se representa el sistema de ramificación de descendencia donde se comparte un antepasado, los organismos más antiguos se encuentran en la parte inferior y sus descendientes se ramifican en forma irregular. Las líneas con un final transversal son especies o linajes existentes y los que no representan especies extintas. Dando pie en el libro del origen de las especies a lo que conocemos como evolución

biológica.

La evolución es un proceso continuo de cambio heredable a través del tiempo que genera diversidad a partir de un ancestro común y actúa por selección natural. De esta se clasifica en dos: Evolución a pequeña escala, que representa cambios en la frecuencia génica de una población entre una generación y la siguiente, es decir abuelos hijos y nietos fig. R2; Evolución a gran escala, descendencia de especies diferentes a partir de un antepasado común después de muchas generaciones, como mariposas, abejas y escarabajos Fig. R3.

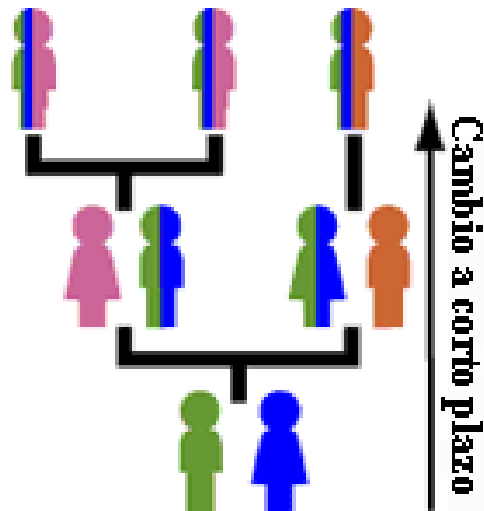


Fig. R2. Evolución a pequeña escala, que representa cambios en la frecuencia génica de una población entre una generación y la siguiente, es decir abuelos hijos y nietos fig. R2

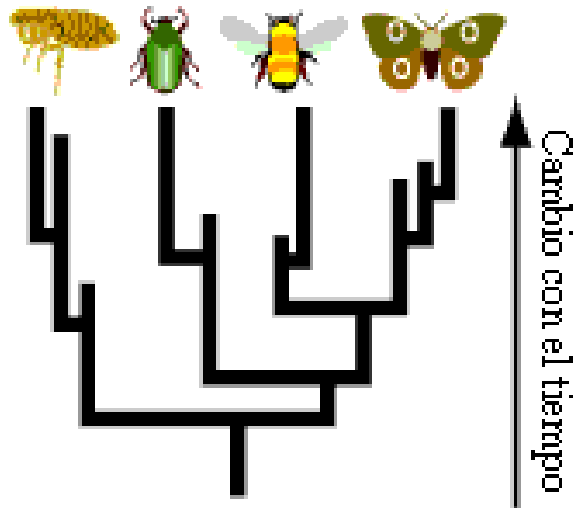


Fig. R3. Evolución a gran escala, descendencia de especies diferentes a partir de un antepasado común después de muchas generaciones, como mariposas, abejas y escarabajos Fig. R3.

La evolución nos ayuda a entender la historia de la vida, considerando que toda la vida de la Tierra comparte un antepasado común.

¿Cómo hacemos una reconstrucción filogenética y para que me sirve?

Lo primero es observar las características de los organismos y ordenarlas en forma de las características que más se comparte a las que suelen ser más raras Fig R4.

	¿Vertebras?	¿Esqueleto óseo?	¿Cuatro extremidades?	¿Hueso simfisiaco?	¿León?	¿Dos dedos por dedo?
Tiburones y parientes	SÍ	no	no	no	no	no
Peces óseos	SÍ	SÍ	no	no	no	no
Anfibios	SÍ	SÍ	SÍ	no	no	no
Primates	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	no
Roedores y conejos	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	no
Cocodrilos y parientes	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	no	SÍ
Dinosaurios y aves	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	no	SÍ

Fig. R4 Características del grupo de los vertebrados.

Las características más comunes siempre constituyen la base de los arboles filogenéticos, conforme se van perdiendo estas características se sigue la estructura hacia la parte superior del árbol, con concluyendo con las características para cada organismo Fig R5.

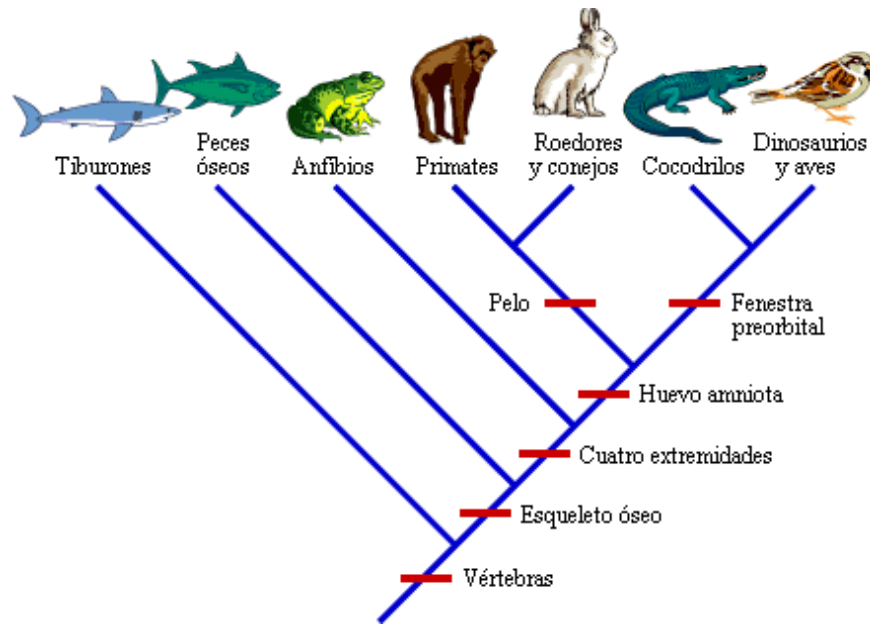
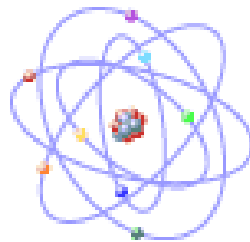
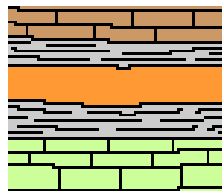


Fig. 5. Reconstrucción filogenética de los vertebrados
¿Cómo sabemos cuando paso?

1. Datación radiométrica se basa en la descomposición de vida media de los elementos radiactivos para permitir a los científicos a las rocas y materiales actualizados directamente.



2. Estratigrafía proporciona una secuencia de acontecimientos de los que las fechas relativas pueden ser extrapolados.



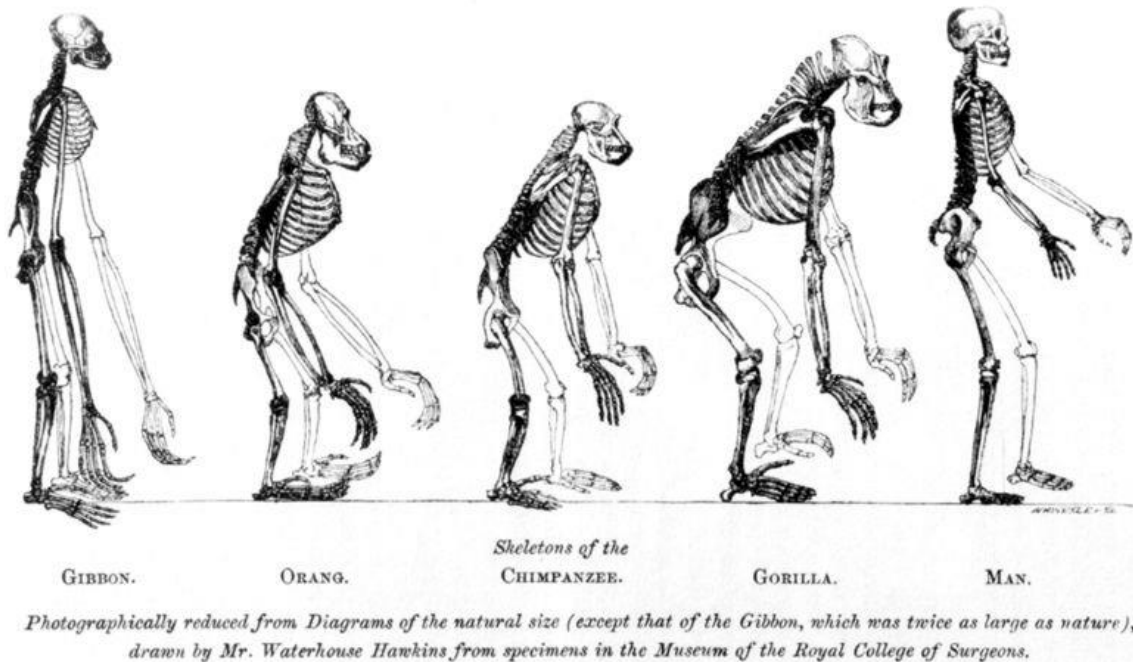
3. Los relojes moleculares permiten a los científicos a utilizar la cantidad de diferencias genéticas entre organismos para extrapolar hacia atrás para calcular las fechas.



Un reloj molecular puede ser el DNA mitocondrial (mtDNA)

Esta molécula está presente en eucariotas, incluyendo organismos extintos. Permite dilucidar las relaciones evolutivas entre las especies. El DNA mitocondrial es importante en estudios de antropología que permite saber en qué periodos fueron domesticadas ciertas plantas y animales por distintas culturas, además de poder diferenciar entre distintas poblaciones étnicas. En biología el DNA mitocondrial es empleado para poder diferenciar entre poblaciones de animales, plantas o incluso de humanos estableciendo los periodos de especiación o la simbiosis entre cada uno de los organismos.

Uno de los ejemplos clásicos es el de los homínidos Fig R6. La reconstrucción filogenética nos permite establecer relaciones entre ellos, esto se puede ver en el transcurso de esta práctica, mediante el uso de bases de datos de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, algunas pruebas de datación radiométrica y estratigrafía, además de algunos programas computacionales especializados podemos determinar el tiempo de divergencia de cada uno de los organismos y su relación entre ellos.



¿Cómo identificar un microorganismo?

Empleamos una molécula similar a un Código de barras, Estas son por lo general genes ribosomales como 16S para el caso de **bacterias** y las regiones ITS1 y ITS2 para del caso de eucariotas. Estos son amplificados por Reaccion en Cadena de la Polimerasa (PCR), como se describió en secciones anteriores. Y se manda secuenciar por la técnica de secuenciación automática Sanger descrita de igual forma en secciones anteriores.

El producto de secuenciaciones es un cromatograma como es que se ejemplifica en la figura R7, de este se verifica que la secuencia cumpla con un parámetro de calidad llamado phred en el programa computacional FinchTV, y posteriormente se analiza en la página <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> obteniendo ciertos parámetros con los cuales podremos decidir a qué grupo corresponde nuestro microorganismo y así tener su identificación.

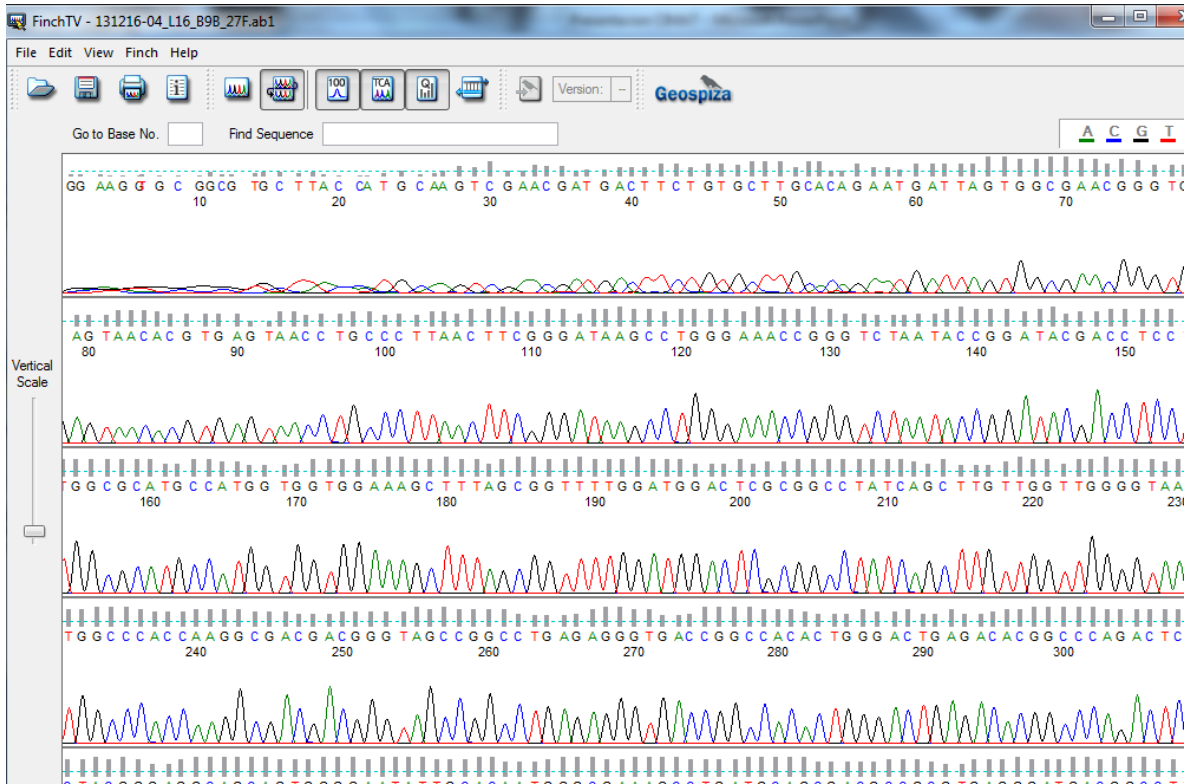


Fig R7 Cromatograma de secuenciación Sanger empleando el programa computacional FinchTV

Preguntas de la práctica

En la práctica se te proporcionaron dos electroferogramas tipo, obtenidos de secuencias de 16S ribosomal de aislados bacterianos de Cuatrociénegas, Coahuila. El objetivo de esta sección, calificar las secuencias que se te proporcionaron. Al final de esta sección responde las preguntas:

1. Dentro del programa FinchTV, deberás visualizar los electroferogramas que se te proporcionaron. ¿Es posible determinar las regiones de baja calidad en la secuencia?
2. ¿Sabes que indican los colores de cada uno de los picos?
3. ¿Aparecen nucleótidos diferentes a T, A, G y C? Si es así ¿Qué quiere decir esto?
4. ¿Por qué el inicio y final de la secuencia son de baja calidad?
5. ¿De qué tamaños son las secuencias proporcionadas?
Secuencia 1: _____
Secuencia 2: _____

2ª Parte

El objetivo de esta sección es identificar la filiación taxonómica del aislado. Los archivos en formato FASTA de tus secuencias se compararan con la base de datos de nucleótidos depositados en la página <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>,

1. De los resultados de tus secuencias, determina ¿cuál es la secuencia a la cual se parece más?

*Busca tus fotos, videos y próximos eventos en:

<https://www.facebook.com/ARGONAUTASirapuato>