

## TALLER CIENCIA PARA JÓVENES 2011, CIMAT

VISITA A CINVESTAV, IRAPUATO, Viernes 22 de julio de 2011

### PROGRAMA

HORA	ACTIVIDAD
9:30- 12:30	Mecanismo de resistencia 1- PCR
12:30-13:30	Recorrido
13:30-15:00	Comida
15:00-15:45	Mecanismo de resistencia 1- Electroforésis
15:45- 17:00	Mecanismo de resistencia 2- Topoisomerasas
17:00-17:15	Receso
17:15-17:45	Análisis de resultados/preparación de reportes
17:45- 19:00	Exposición de reportes/discusión

### INTRODUCCIÓN

#### *Las Bacterias*

Las *bacterias* son organismos unicelulares pequeñísimos que, debido a su gran capacidad de adaptación, son capaces de vivir en una gran variedad de ambientes. Así, podemos encontrar bacterias en el suelo, en nuestra piel e incluso en lugares tan hostiles como volcanes en el fondo del mar.

La gran mayoría de las bacterias con las que convivimos son inofensivas e incluso benéficas; por ejemplo, muchas de las bacterias que viven en nuestro intestino son necesarias para que podamos digerir correctamente los alimentos. En contraste, hay un pequeño número de especies de bacterias que son responsables de causar enfermedades en humanos.

Las infecciones causadas por bacterias tales como infecciones respiratorias e intestinales son usualmente fáciles de tratar usando *antibióticos* recetados por un médico.

#### *¿Qué son los antibióticos?*

Los antibióticos son sustancias químicas que pueden matar o retrasar el crecimiento de las bacterias. Esto lo logran al interrumpir el funcionamiento normal de la bacteria, por ejemplo al pegarse a proteínas y evitar que estas funcionen correctamente.

Existen muchos tipos de antibióticos que son capaces de matar a las bacterias utilizando diferentes estrategias. Algunos ejemplos de antibióticos son la *Penicilina G*, el *Cloramfenicol* y la *Ampicilina*.

#### *Bacterias resistentes a antibióticos*

Como ya hemos comentado, las bacterias son muy adaptables y pueden resistir muchos tipos diferentes de estrés. Algunas bacterias son resistentes a algunos antibióticos. Para lograr esa resistencia, utilizan uno o más de los siguientes mecanismos para sobrevivir (figura 1):

- 1.- Algunas bacterias tienen genes para producir enzimas que modifican a los antibióticos, haciéndolos inofensivos
- 2.- Algunas bacterias resistentes tienen enzimas modificadas a las que el antibiótico no pueda unirse. (Las *enzimas* son proteínas que catalizan reacciones químicas dentro de la célula.)
- 3.- Por último, algunas bacterias son capaces de “bombear” antibióticos hacia afuera de sus células con gran rapidez.

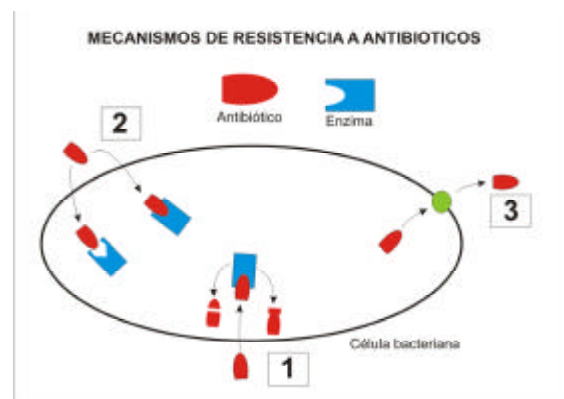


Figura 1

## Actividad I: Mecanismo de resistencia 1- “Proteínas que destruyen antibióticos”

OBJETIVO: Analizaremos el DNA de cultivos bacterianos para identificar si son resistentes o sensibles a antibióticos.

ESTRATEGIA: Mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) buscaremos los genes responsables de otorgar resistencia a 2 antibióticos.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

*"El PCR ha transformado la biología molecular al extender tremendamente la capacidad de identificar, manipular y reproducir DNA. Hace abundante lo que fuera escaso—el material genético requerido para la experimentación."*

Paul Rabinow, “*Making PCR, A Story of Biotechnology*”, University of Chicago Press, 1996

El método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite detectar la presencia de cualquier gen, siempre y cuando conozcamos la secuencia de bases del gen y podamos diseñar “iniciadores” específicos para ese gen. Así pues, si usamos iniciadores específicos para un gen de resistencia a un antibiótico, el PCR “amplifica” muchas veces el gen (o un segmento de este gen), y así podemos detectar la presencia del gen en el DNA. De este modo, podremos determinar si el DNA que estamos analizando proviene de una bacteria sensible o resistente al mismo antibiótico, pues este gen no se detectará en la bacteria sensible pero sí en la resistente (figura 2).

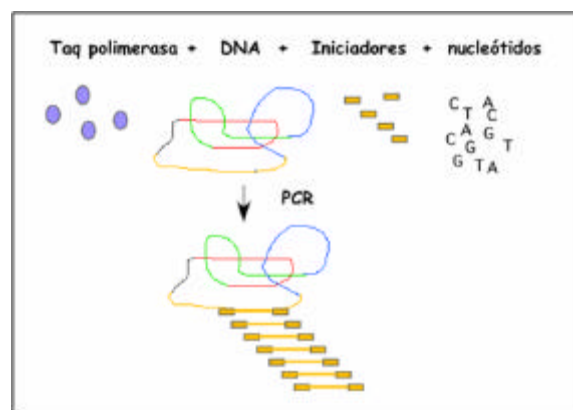


Figura 2. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

¿Cómo se detecta la presencia de un gen en el DNA amplificado? Se utiliza una técnica muy común de la biología molecular, que consiste en separar el DNA en un gel y posteriormente teñir el DNA para poder ver sus componentes directamente. Este es el método de **electroforesis** cuyo procedimiento se describe más adelante.

Para esta práctica recibirán una caja petri con un cultivo de bacterias; ustedes no sabrán si éstas son sensibles o resistentes a antibióticos (por su seguridad el tipo de bacterias con el que trabajamos es completamente inofensivo y no causa ningún tipo de enfermedad). Ustedes deberán realizar lo que se llama un “PCR de colonia” en el que las colonias de bacterias se toman directamente de la caja petri para hacer el PCR y analizar su DNA. Mediante el análisis de sus resultados ustedes podrán determinar si las bacterias en su caja petri son sensibles o resistentes a antibióticos.

### MATERIALES:

- Tubos Eppendorf para PCR
- Mezcla de reacción para PCR Fermentas (en hielo): Taq Polimerasa, Buffer de reacción, MgCl<sub>2</sub>, Nucleótidos.
- Agua desionizada
- Mezcla de iniciadores *Control Positivo*
- Mezcla de iniciadores detectores del gen de resistencia al Antibiótico 1: Kanamicina
- Mezcla de iniciadores detectores del gen de resistencia al Antibiótico 2: Apramicina
- Cultivo bacteriano problema (caja petri con colonias)
- Palillos
- Aparato de PCR (termociclador)

## MÉTODO:

Suspensión de colonia para PCR:

1. En un tubo Eppendorf coloca 40  $\mu\text{l}$  de agua destilada
2. Con la punta de un palillo toma una colonia de bacterias de la caja petri y sumerge la punta del palillo en el agua destilada hasta que el agua en el tubo se ponga turbia.
3. Toma 4 tubos Eppendorf para PCR. Marca tus tubos de la siguiente manera:



4. Coloca la cantidad adecuada de reactivos en cada tubo siguiendo la siguiente tabla:

	Control (+)	Control (-)	Tubo 1	Tubo 2
PCR mix	25 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$
Iniciadores	2 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$		
Iniciadores			2 $\mu\text{l}$	
Iniciador				2 $\mu\text{l}$
DNA templado			1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
Agua	22 $\mu\text{l}$	22 $\mu\text{l}$	22 $\mu\text{l}$	22 $\mu\text{l}$
Volumen total	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$

5. Cuando tus tubos estén listos déjalos en hielo. Cuando las reacciones de todos los equipos estén listas representantes de cada equipo llevarán los tubos al laboratorio Dr. Barona donde se colocarán en el termociclador.
6. En unas horas regresaremos para poner nuestro DNA en geles y poder verlo utilizando la técnica de electroforesis.

### *Electroforesis en gel de agarosa*

El DNA es una molécula cargada negativamente, por lo que en un campo eléctrico será atraída hacia el polo positivo. Las moléculas más grandes se moverán más lentamente que las pequeñas. Un gel de agarosa es simplemente una malla tridimensional en la cual se moverán moléculas de DNA a diferentes velocidades, dependiendo de su tamaño y del campo eléctrico que aplicamos al gel.

## MATERIALES:

- Guantes
- Gel de agarosa
- Equipo de electroforesis
- Micropipeta P20 + puntas amarillas
- Solución Reguladora (buffer)
- Colorante para la muestra
- Marcador de peso molecular de DNA (preparado con colorante)
- Fuente de poder

## MÉTODO:

### 1. Poner muestras de DNA en el gel de agarosa

Prepara tus muestras de DNA añadiendo a cada tubo 7  $\mu\text{l}$  del colorante y coloca 10  $\mu\text{l}$  de cada muestra en los pozos del gel con una micropipeta. Cambia de punta cada vez que cambies de muestra.

El orden de carga en el gel será:

- Control +
- Control -
- Antibiótico 1
- Antibiótico 2
- Marcador de peso molecular

## 2. TAPAR CÁMARA Y CONECTAR A LA FUENTE DE PODER

Cierra la cámara con cuidado y conéctale los cables (rojo con rojo y negro con negro). Conecta los cables a la fuente de poder APAGADA. Prende la fuente de poder y ajusta el voltaje según las instrucciones que recibas (entre 50 y 100 volts). Fíjate en las burbujas del lado del electrodo negro (qué significa?) y observa también que el color azul de los pozos comienza a migrar.

Continúa la electroforesis hasta que el azul llegue a uno o dos centímetros del borde opuesto del gel. Un instructor vigilará la electroforesis y apagará la fuente de poder al alcanzar el corrimiento deseado.

### PREGUNTAS:

1. ¿Consideras que son útiles los métodos moleculares PCR para identificar bacterias resistentes a antibióticos? ¿Porqué?
2. ¿Cuál es la función de los controles positivo y negativo en un experimento?
3. ¿Qué pasaría si mezclas bacterias resistentes y sensibles a un antibiótico y las dejas crecer en medio de cultivo que contenga ese mismo antibiótico?

## ACTIVIDAD II: Mecanismo de resistencia 2- “Proteínas blanco modificadas: Topoisomerasas”

Las *topoisomerasas* son las enzimas responsables de “desenrollar” el DNA para que se pueda llevar a cabo su replicación. Estas enzimas son el blanco de los antibióticos conocidos como *quinolonas*.

Las quinolonas y otros antibióticos derivados de ellas pueden pegarse a las topoisomerasas e impedir su funcionamiento. Esto interrumpe la actividad normal de la célula, causa errores en la replicación y eventualmente lleva a la muerte de las células bacterianas.

El mecanismo más común de resistencia a quinolonas es la alteración de los genes que codifican las topoisomerasas por medio de *mutaciones puntuales* (de un sólo nucleótido). Estos cambios son suficientes para alterar la estructura de las topoisomerasas, de manera que las quinolonas ya no pueden unirse a ellas.

En la actividad de topoisomerasas tú y tu equipo buscarán varias mutaciones puntuales en el gen de una topoisomerasa llamada *Girasa*. Determinarán cuáles mutaciones tienen como consecuencia un cambio de aminoácido y por consiguiente un cambio en la proteína final.

### MÉTODO:

1. Te entregarán hojas donde tendrás fragmentos de la secuencia original del gen que codifica la *Girasa*, así como secuencias con mutaciones puntuales.
2. Identifica las mutaciones en tus secuencias. Utilizando el *código genético* traduce el *codón* (tripleto) correspondiente a tu mutación e identifica si el aminoácido respectivo cambia a un aminoácido distinto (*mutación NO sinónima*) o se mantiene igual (*mutación sinónima*).
3. Localiza tu mutación en la secuencia gigante del gen de la *Girasa* que encontraras en el aula y márcala con una etiqueta con el número de tu equipo. El primer equipo en identificar todas sus mutaciones se lleva un premio!!!!