

Taller Ciencia para Jóvenes CIMAT 2012 – Bachillerato

Visita al CINVESTAV - Irapuato. 19 julio, 2012.

Introducción

Las bacterias son los organismos más abundantes que hay en el planeta, encontrándose en todo hábitat de la tierra. Existe gran diversidad y factores abióticos del ambiente (salinidad, temperatura, pH, etc.) como bióticos (otros organismos) influyen en 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.

La estabilidad de un ecosistema y sus condiciones de nutrientes pueden estudiarse mediante el seguimiento de las bacterias que allí habitan. En el caso de Cuatrociénegas, Coahuila, damos seguimiento al sistema de agua llamado Churince, y del cual tomamos muestras de agua y sedimento en distintas épocas del año, para saber si hay o no variaciones estacionales. Llevamos a cabo un conteo directo de las colonias que crecen sobre diferentes medios y purificamos algunas de ellas para identificarlas.

Para identificar bacterias nos basamos en una pequeña porción del DNA, un gen llamado “16S ribosomal” de 1500 pares de bases (nucleótidos). Este segmento de DNA se secuencía para conocer el orden de cada uno de sus bases y poder comparar esta secuencia con las secuencias de otras bacterias en las bases de datos. Podemos conocer la identidad de la bacteria por el parecido entre las secuencias de DNA de sus genes “16S ribosomal”.

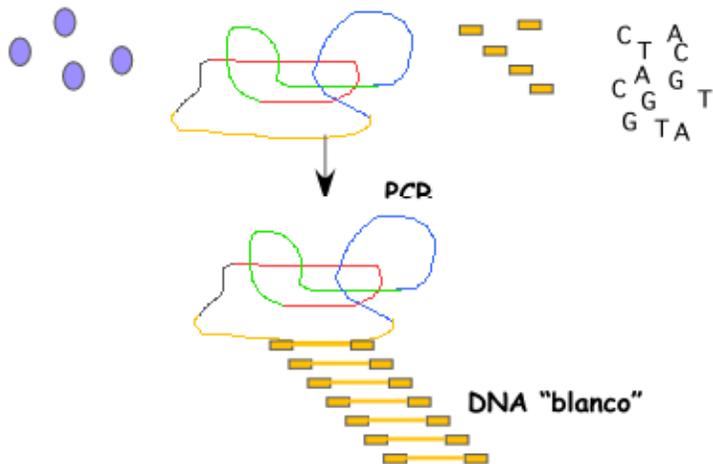
Para obtener copias del gen “16S ribosomal” y poderlas secuenciar, utilizamos una técnica de biología molecular llamada [reacción en cadena de la polimerasa](#) (PCR, por sus siglas en inglés) que nos permite obtener numerosas copias de cualquier gen que elijamos, en base a un juego de “iniciadores” de DNA con secuencia complementaria al gen de interés.

La reacción de PCR se lleva a cabo de la siguiente manera:

A un tubo Eppendorf pequeño se le agrega:

- 1) Una pequeña cantidad de DNA
- 2) DNA polimerasa, la enzima que sintetiza las cadenas de DNA
- 3) Dos iniciadores, que ubican el sitio de iniciación de la síntesis por parte de la polimerasa. Para la identificación de bacterias se usan iniciadores específicos para el gen “16S”.
- 4) Nucleótidos que son requeridos para la síntesis de las cadenas de DNA.

Taq polimerasa + DNA + Iniciadores + nucleótidos



Así pues, la reacción de PCR amplificará un millón de veces el gen "16S". ¿Cómo se detecta al gen amplificado? Se utiliza una técnica que consiste en separar el fragmento de DNA en una matriz de gel y posteriormente se tiñe 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 ribosomal" ? Este gen es una molécula conservada, presente en todas las bacterias de modo que si conocemos la secuencia de los 1500 nucleótidos, y comparamos estas secuencias, en amplias bases de datos que existen para el "16S", podemos obtener información taxonómica.

Para esta práctica recibirán muestras de bacterias de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Ustedes deberán realizar la extracción de DNA y el PCR, y mediante análisis bioinformaticos podrán determinar la clasificación taxonómica del aislado.

Medio de cultivo

Medio Marino (para 1 litro)

- A 800 mL de H₂O desionizada agregar las siguientes soluciones
 - 30 mL de Sulfato de sodio
 - 30 mL de Cloruro de calcio
 - 30 mL de Cloruro de potasio
 - 30 mL de Carbonato de sodio
 - 30 mL de Citrato ferrico
 - 30 mL de Cloruro de sodio
 - 20 mL de Sulfato de magnesio 2M
 - 5 mL de la solución stock de sales
 - 5 gr de Peptona
 - 1 gr de extracto de levadura
 - *20 gr de Agar bacteriologico si es medio solido

Esterilizar 20 minutos

Para preparar la soluciones:

- 1 gr de Sulfato de sodio a 30 mL de H₂O desionizada
- 0.4 gr de Cloruro de calcio a 30 mL de H₂O desionizada
- 0.2 gr de Cloruro de potasio a 30 mL de H₂O desionizada
- 0.1 gr de Carbonato de sodio a 30 mL de H₂O desionizada
- 0.1 gr de Citrato ferrico a 30 mL de H₂O desionizada
- 5 gr de Cloruro de sodio a 30 mL de H₂O desionizada

Para preparar la solución stock de sales :

- A 500 mL de H₂O desionizada agregar
 - 8 gr de Bromuro de potasio
 - 2.2 gr de Ácido bórico
 - 2.4 gr de Fluoruro de sodio
 - 1.6 gr de Nitrato de amonio
 - 8 gr de Fosfato de sodio dibasico

Materiales:

Agua y todos los reactivos requeridos para el medio
Vasos de precipitado y probetas
Cajas Petri

Equipo

Balanza
Agitador magnético
Autoclave u olla express
De ser posible, campana de flujo laminar o bien mecheros y un cuarto donde no haya corriente de aire

Aislamiento de DNA de Bacteria (método Quick Gene)

- Crecer aislados en 3 ml de medio marino toda la noche a 37°C
- Centrifugar 1 mL de cultivo a 13,000 r.p.m. por 5 min.
- Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 500 µl de agua
- Centrifugar a 13,000 r.p.m. por 5 min.
- Agregar 50 µl de lisozima 20 mg/ µl, incubar 37°C por media hora.
- Agregar perlitas de vidrio y dar vortex a maxima velocidad por 10 minutos.
- Calentar la muestra a 99°C por 10 minutos.
- Centrifugar a 13,000 r.p.m. por 5 min.
- Cambiar el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Analizar el DNA.

Electroforesis en gel de agarosa

Si aplicamos una corriente podemos generar un campo eléctrico en el cual se mueva un cuerpo cargado. El DNA es una molécula cargada negativamente, por lo que en un campo eléctrico sera atraída hacia el polo positivo. Si pongo moléculas de diferente tamaño dentro de una red tridimensional, las moléculas más grandes se moverán más lentamente que las pequeñas. Un gel de agarosa es simplemente una malla tridimensional por la cual se moverán moléculas de DNA a diferente velocidad, dependiendo de su tamaño y del campo eléctrico.

Materiales

- guantes
- solución de gel de agarosa
- equipo de electroforesis: "peines", cámara, cables
- micropipeta de 20 µL + puntas amarillas
- regulador Tris Acetato EDTA (TAE)
- colorante para la muestra
- marcador de peso molecular de DNA (preparado con colorante)
- fuente de poder

1. Preparación de gel de agarosa

Prepar el molde de vaciado para la agarosa (no olvides el peine)

Añadir suavemente la agarosa caliente (¡cuidado!)

Espera unos minutos a que solidifique

Quita las barreras del extremo del gel y ponerlo en la cámara de electroforesis

Añadir el regulador TAE de modo que cubra completamente el gel pero apenas rebase unos milímetros la superficie del gel

Sacar con cuidado el peine

2. Poner muestras de DNA en el gel de agarosa

Prepara tus muestras de DNA añadiendo a cada tubo 5 ul del colorante y colocar 4 ul de cada muestra en los pozos del gel con una micropipeta. Cambiar de punta cada vez que se cambie de muestra.

3. Tapar cámara y conectar a la fuente de poder

Cerrar la cámara con cuidado y conectarle los cables (rojo con rojo y negro con negro). Conecta los cables a la fuente de poder APAGADA. Prender la fuente de poder y ajustar el voltaje (entre 50 y 100 volts).

Continúa la electroforesis hasta que el colorante llegue a uno o dos centímetros del borde opuesto del gel.

4. Fotografía del gel

El gel se lleva a una cámara oscura y se pone sobre un transiluminador de luz azul.

Reacción en cadena de la polimerasa

- Tubos Eppendorf para PCR

- PCR Mix (Contiene nucleótidos, taq polimerasa, regulador , Mg)

- Mezcla de iniciadores 16S:

16S forward: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

16S reverse: TACGGYTACCTTGTTACGACTT

- DNA de un aislado bacteriano

Protocolo

1. Marcar tubos Eppendorff (de los chiquitos para PCR) de la siguiente manera:
Control – (quiere decir control negativo, no se le añade DNA)

Bacteria1

2. Preparar la siguiente mezcla en cada tubo marcado .Hay que mantenerlo en hielo.

	Control -	Bacteria (1)
PCR Mix	25 µl	25 µl
DNA (1)	-	1 µl
Agua desionizada	1 µl	0 µl

3. Colocar los tubos en el termociclador y poner el siguiente programa:

- (1) 94°C 5 min
 - (2) 94°C 30 seg
 - (3) 48°C 30 seg
 - (4) 72°C 1 min
- 30 ciclos (pasos 2 a 4 se repiten)
72°C 5 min
4°C

4. Retira los tubos del termociclador y mantén en hielo

Análisis de resultados por Electroforesis en gel de agarosa

El orden de carga en el gel será:

Control -

Bacteria 1

Marcador de peso molecular

Cargar 3 µl de colorante y 5 µl del producto de PCR

Tamaño del productos amplificado: _____

"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."

Limpieza productos de PCR usando las columnas QIAquick

1. Agregar 200 µl de buffer PB a la reacción de PCR y mezclar por pipeteo.
2. Colocar la mezcla en la columna.
3. Centrifugar 1 min a 13,000 rpm.
4. Lavar con .75 mL de buffer PE .
5. Centrifugar 1 min a 13,000 rpm.
6. Tirar los residuos y centrifugar nuevamente 1 min a 13,000 rpm.
7. Agregar 30 µl de buffer EB y centrifugar 1 min a 13,000 rpm.
8. Cuantificar la muestra.

Secuenciación

Este procedimiento se llevará a cabo en Langebio. Tardará varios días por lo que tu resultado se te enviará por correo electrónico.

Análisis de las secuencias de DNA 16S