

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

Caracterización molecular de *Vibrio cholerae* NO O1,
a través de análisis de restricción (RFLP).

T E S I S

que para obtener el título de

O C E A N Ó L O G O

presenta

Ana Gabriela Prior Mier y Terán

Ensenada, Baja California, Febrero del 2001.

RESUMEN

Vibrio cholerae es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo que presenta movilidad por flagelos polares. Al igual que otras especies de la familia *Vibrionaceae* se caracteriza por tolerar un amplio intervalo de salinidades, por lo que puede encontrarse en ambientes marinos, estuarinos y dulceacuícolas. *Vibrio cholerae* ha sido causante de fuertes epidemias de colera a lo largo de todo el mundo, causando incluso la muerte de varias personas. Debido a su amplia distribución y a su rápida proliferación ha sido necesario implementar nuevas técnicas basadas en sus propiedades genotípicas que permitan su detección precisa y de manera oportuna. En este trabajo se realizó un análisis de restricción del gen 16S rADN de *Vibrio cholerae* NO 01 y se comparó con *Vibrio parahaemolyticus* y dos especies de *Vibrio* aisladas del medio. Se utilizó como control *Vibrio alginolyticus*, ya que había sido caracterizada con esta técnica anteriormente (García, 1997). Se encontró un patrón de restricción conservado para todas las especies analizadas utilizando tres endonucleasas de restricción diferentes (*Sau3A*, *BstUI*, *MspI*), a excepción de *Vibrio cholerae* NO 01. Este patrón de restricción variable se debe a las variaciones genotípicas del gene 16S rADN de *Vibrio cholerae* NO 01, con respecto a las otras especies analizadas.

Caracterización molecular de *Vibrio cholerae* NO 01,
a través de análisis de restricción (RFLP).

T E S I S

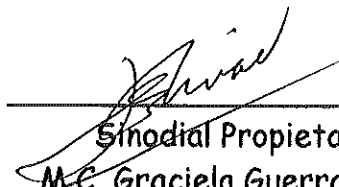
que presenta:

Ana Gabriela Prior Mier y Terán

Aprobada por:



Presidente del Jurado
Dr. Jorge Olmos Soto



Sinodal Propietario
M.C. Graciela Guerra Rivas



Sinodal Propietario
Dr. Jorge De la Rosa Velez

A mi madre...

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Jorge Olmos por compartir sus conocimientos conmigo, por aceptarme en su laboratorio y por toda la paciencia que me tuvo para que se realizara exitosamente no solo este trabajo, sino todo un peldaño en mi formación profesional... por esto y por lo que haya olvidado mencionar Gracias!

A mis sinodales el Dr. Jorge De la Rosa Velez y la M.C Graciela Guerra, por estar siempre disponibles a pesar de mis prisas... por las correcciones y comentarios realizados a este trabajo, que fueron acertados y de gran ayuda.

Al Dr. Leonardo Lizarraga por haberme proporcionado la cepa de *Vibrio cholerae* NO 01.

A todos mis maestros de la carrera. Muy en especial a: Irma Soria, Felipe Correa, Dora Waumman, Reginaldo Durazo, maestro Pinal, Arturo Durazo y Graciela Guerra. A los trabajadores del almacén de Química y en general a la UABC, por haber sido mi universidad.

A mis padres que sin su apoyo la realización de esta tesis así como de toda mi carrera simplemente no hubiera sido posible. A Prior por haberme tirado al ruedo, por creer en mí, por la ayuda económica, pero sobre todo por haber sido mi padre, el mejor de todos los que hay sobre la Tierra (que fortuna me tocó en tenerte!)... A mami Mel por todo el cariño y la dedicación que son ahora la base de una vida llena de felicidad y logros, por apoyarme con el Pablo mientras terminaba el trabajo de laboratorio, por la solidaridad a pesar de mis metidotas de pata, por haber nacido, gracias a ti, a Dios y todo aquel ser que tuva que ver con tu hermosa creación... te amo!

A mi hermano Jero porque fue mi primer deseo hecho realidad, porque también se solidarizó prestandome a mi mamá unos meses mientras terminaba la carrera y la tesis sin objetar jamás nada... Siempre siempre serás luz para mí.

A toda mi familia: mis tíos Paco (e Ibis), Pepe(y Rosa), Pipo(y Lucy), Toño (y Erika) y mis tías Lulú, Lupe (y Mario), Carmen, Rochil (y El tío Ernesto), y a toda su hermosa descendencia por haber estado siempre pendiente de mí, haberme ayudado con lana cuando hacía falta y con palabras de aliento y apapachos en mis pequeños momentos de crisis.

A Gina Castro, por haberme recibido en su casa cuando llegué a Ensenada y haberme inscrito en la carrera, a pesar de todas las complicaciones por las que atravesó para lograrlo. A Guillermo Rubio (†) y familia por haberme ayudado a instalarme y a conocer Ensenada, junto con mi tío Leopoldo y su familia.

A mis amigos de la carrera: los del principio, Ruth, Julito, Ulises, Kuan-ti, Mario, Cucho, Kim y Lulú; los del final: Diego, Lucía, Ligeia (Eres una linda!), Gaby M. (Mi hermanita...I love you!), Ethel, Pedro, Chuy, Caco, Quique, Nayeli, Karina (Por la confianza, que siempre me has inspirado y por la que siempre me has tenido); pero sobre todo los que siempre estuvieron conmigo, desde el principio hasta el final...Charro, Alejandro, Alejandra (por ser transparente, por ser mi amiga), Erick, Adrián, Eneas, Mark, Fabiola, Angélica, Benjamín. Sin ellos hubiera sido como 10 veces más difícil todo.

A mis compañeritos del laboratorio, con quien compartí largas, largas horas!, Alex alias Houston y a Faustini por las chelas que me deben (porque sé que algún día me las pagarán), por las correcciones hechas a este trabajo, que fueron de gran ayuda para esta pobre almita inexperta, por su amistad y todo aquello que compartimos. A Rosalía, por haberme enseñado a trabajar en el laboratorio; a Raquel por su amistad (Ah!, pero que rico es el chismell!), a Mauricio por ayudarme en todo lo que necesité referente a su tesis de licenciatura y a los demás con los que tuve oportunidad de compartir el laboratorio: César, Flor, Galdy y Efrén.

A Alejandro por todo el amor, por estos cinco años compartidos, por hacerme sentar cabeza y hacerme chambear más, por soportar mis crisis... por todo.... No creo poder esperarte, pero te deseo lo mejor del mundo!!! (Te amo!)

A Pablo por haber nacido, por su hermosa sonrisa que llena todos mis momentos difíciles de luz y paciencia... por ser mi hijo y darme la oportunidad de demostrar y explotar todas mis otras capacidades además del estudio!... Por estar en este momento aquí sentado tecleándole a la tesis y reclamando a su madre!!!

Al M.C Antonio Trujillo, que sin saberlo cambió mi vida...Gracias!!!

A Jorge ... por Pablo...

CONTENIDO

Descripción:	Páginas
GLOSARIO	X, XI
RESUMEN	I
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 INTRODUCCIÓN	2
1.2 ANTECEDENTES	4-13
1.3 JUSTIFICACIÓN	14
1.4 OBJETIVOS	15
1.4.1 OBJETIVO GENERAL	15
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1 CRECIMIENTO CELULAR	19
2.2 PURIFICACIÓN DE ADN CROMOSOMICO.....	20
2.3 AMPLIFICACIÓN DEL GENE 16S rADN	21
2.4 ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN	22
2.5 CLONACIÓN	24
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
3.1 CRECIMIENTO CELULAR	28
3.2 PURIFICACIÓN DE ADN CROMOSOMICO	31
3.3 AMPLIFICACIÓN DEL GENE 16S rADN	32
3.4 ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN	33
3.5 CONCLUSIONES	37
3.6 PERSPECTIVAS	38
CAPÍTULO 4. BIBLIOGRAFÍA	39
ANEXO A.1 TECNICAS	43
A.2 MEDIOS DE CULTIVO.....	47

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	CONDICIONES DE REACCIÓN PARA LAS DIFERENTES ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	22
2	CONDICIONES DE REACCIÓN DE LA LIGACIÓN.....	24
3	RESULTADOS DEL CRECIMIENTO CELULAR DE LAS CEPAS ANALIZADAS	28

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
1	ESQUEMA DE LA TÉCNICA DE PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA).	9
2	DIAGRAMA DEL RIBOSOMA	11
3	ÁRBOL FILOGENÉTICO BASADO EN SECUENCIAS DEL GENE 16S rADN, QUE MUESTRA LA RELACIÓN ENTRE 50 CEPAS.	13
4	DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA.....	18
5	DIAGRAMA DEL VECTOR DE CLONACIÓN pGEM-T.	25
6	DETECCIÓN DE ADN CROMOSOMAL.....	31
7	DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....	32
8	ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DEL GENE 16S rADN CON LAS ENZIMAS BstUI, MspI y SaU 3A.....	34

**Este trabajo se realizó en el Centro de
Investigación Científica y de Estudios
Superiores de Ensenada (C.I.C.E.S.E), en el
laboratorio de Microbiología Molecular, bajo la
dirección del Dr. Jorge Olmos Soto.**

GLOSARIO

ADN: Acido desoxirribonucleico.

ADN polimerasa: Es una enzima que sintetiza una cadena "hija" de ADN (en dirección 5'-3'). Está involucrada tanto en replicación como en reparación.

Anaerobio facultativo: Se refiere a un organismo aerobio que puede crecer si las condiciones de oxígeno disminuyen e incluso bajo condiciones totalmente anaerobias.

ARN: Acido riboinucleico.

ARNasa: Es una enzima cuyo sustrato es el ARN.

Bacilo: Bacteria en forma de bastoncito.

Cepas: Crecimiento de bacterias a partir de una célula en común.

Cromosoma: Es una unidad discreta del genoma que contiene muchos genes. Cada cromosoma consiste de moléculas largas de ADN duplex.

Clona: Describe un gran número de células o moléculas idénticas con una simple célula o molécula ancestral.

Desnaturalización: Describe la conversión de ADN o ARN de doble cadena a un estado de cadena sencilla; esta separación se da generalmente por calentamiento.

En el caso de las proteínas se refiere al cambio de conformación que la convierte de una forma activa a una inactiva.

dNTP's: desoxirribonucleótidos (A,T,G,C)

Endonucleasas: Rompen enlaces dentro de una cadena nucleotídica.

Enzimas de restricción: Son enzimas que reconocen secuencias específicas cortas de ADN no metilado y rompe la doble cadena.

Eubacteria: Taxón que comprende a la mayoría de las procariotas.

Fenotipo: Se refiere a la apariencia u otras características de los organismos, resultado de la interacción de su constitución genética y el medio ambiente.

Flagelos: Prolongaciones delgadas que son utilizadas para el movimiento celular.

Gen: (cistrón) Unidad biológica de información genética, que se autorreproduce y localiza en una posición definida en un cromosoma determinado.

Genotipo: Es la constitución genética de un organismo.

Iniciador: Es una secuencia corta que se aparea con una cadena de ADN y provee un extremo 3' libre, para que la ADN polimerasa inicie la cadena de desoxiribonucleotidos.

Lisis: Rompimiento de la pared celular de las bacterias que provoca su muerte y la liberación de su material celular.

Marcador de ADN: Es un fragmento de ADN cuyo tamaño es conocido y se usa en electroforesis.

PCR (Pilymerase chain reaction): Describe la técnica en la cual se utilizan ciclos de desnaturalización, alineamiento de iniciadores y de extensión con la ADN polimerasa, usados para amplificar un número de copias de un ADN molde alrededor de 10^6 veces.

Plásmido: Es una unidad autónoma de ADN circular y extracelular que tiene la capacidad de autorreplicarse.

Plásmidos multicopia: Están presentes en bacterias en cantidades mayores a uno por cromosoma.

Polimorfismo: Se refiere a las variaciones en los genomas de una misma población que pueden afectar los patrones de restricción.

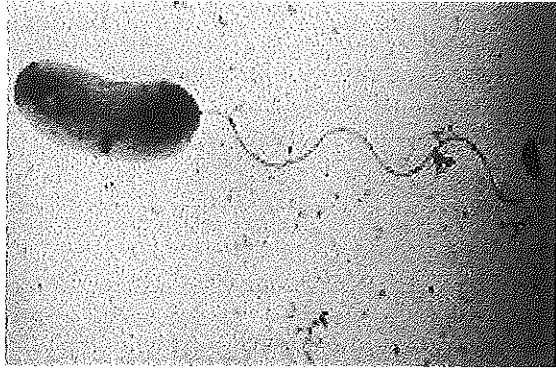
rARN: Acido ribonucleico ribosomal.

16S rARN: Gene que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal.

Ribosomas: Granulos diminutos, compuestos de ácido ribonucleico y proteína. Lugar en el que se lleva a cabo la síntesis de proteínas

RFLP (Restriction fragment length polymorphism): Es un método que se basa en diferencias de los patrones de restricción, debidas a diferencias genotípicas.

Vector de clonación: Es un plásmido o fago que es usado para insertar un material genético extraño, con el fin de poder producir más material o más proteína.



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos del género *Vibrio* son eubacterias Gram-negativas, que pueden habitar tanto en el medio marino como en ambientes dulceacuícolas o salobres. Generalmente se encuentran asociados a animales acuáticos, ya sea en su superficie corporal o como parte de su contenido intestinal.

El estudio de este género ha tenido gran auge en los últimos años debido a que algunas de sus especies son patógenos oportunistas de peces, lo que provoca grandes pérdidas en acuicultura; mientras que otras especies patógenas en humanos han sido responsables de graves epidemias a lo largo de todo el mundo por el consumo de agua y productos pesqueros contaminados. Por lo anterior surge la necesidad de desarrollar un método de detección de especies patógenas rápido y altamente específico.

El uso de secuencias de rADN que codifican para las subunidades 5S, 16S y 23S del ribosoma, ha sido muy utilizado en los últimos años ya que presenta regiones variables y regiones conservadas, dependiendo de cada grupo de bacterias. Sin embargo la variación observada entre genes 16S

rADN puede ser muy poca, cuando los microorganismos que pertenecen a un grupo están estrechamente relacionados (Barry, 1991; Braun-Howland, 1993; Martinez, 1994).

En el presente trabajo se realizó un análisis de restricción (RFLP) del gen 16S rADN de *V. cholerae* NO 01, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, así como de dos especies aisladas de Ejido Eréndira B.C., utilizando tres endonucleasas de restricción: *Bst*UI, *Msp*I y *Sau*3A, para poder identificar cepas de *Vibrio cholerae* NO 01 a través de un patrón de restricción específico.

ANTECEDENTES

La familia *Vibrionaceae* es uno de los grupos más importantes de bacterias en el ambiente marino, debido a que sus miembros generalmente predominan en la flora bacteriana de la columna de agua, fitoplancton y peces. Un ejemplo claro de esto, es un estudio realizado en el Océano Pacífico Oeste, en el que se encontró que cerca del 80% de la población bacteriana en aguas superficiales pertenecía a esta familia (Kita-Tsukamoto *et al*, 1993).

Los microorganismos que pertenecen a la familia *Vibrionaceae* son eubacterias Gram-negativas con forma de bacilo que presentan movilidad por flagelos polares y bajo ciertas condiciones de cultivo sintetizan flagelos laterales adicionales. No son formadores de esporas, son quimiorganótrofos y anaerobios facultativos. Esta familia esta compuesta por cuatro géneros: *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* (Baumann, 1986).

El género *Vibrio* se caracteriza por tolerar un amplio intervalo de salinidades; por lo que, aunque generalmente habita en ambientes marinos y estuarinos también pueden encontrarse en agua dulce (Baumann, 1986). Las especies de este género crecen a una temperatura entre los 18 y 25 °C.

Utilizan D-glucosa, D-fructosa, maltosa y glicerol como principal fuente de carbono y energía; sales de amonio como fuente de nitrógeno y sales de sodio, para estimular su crecimiento (García, 1997).

Muchas especies de este género son patógenas en humanos así como de vertebrados e invertebrados marinos (Baumann, 1986). El estudio de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahemolyticus* se ha incrementado notablemente debido a que son causantes de gastroenteritis en humanos y en casos graves pueden llegar a provocar la muerte. En diferentes partes del mundo, se han reportado epidemias de cólera debido al consumo de agua y productos pesqueros contaminados, lo que hace de gran importancia su detección oportuna.

Vibrio cholerae es causante de cólera, la cual es una enfermedad que se caracteriza por diarrea, vómito y dolores musculares. Para causar dichos síntomas, una cepa de *Vibrio cholerae* debe expresar la enterotoxina, un factor de colonización y un elemento global regulatorio (Shangkuan *et al*, 1997). Las dos enterotoxinas mayores que puede contener *V. cholerae* son: la toxina (CT), que está presente en todas las cepas epidémicas O1 y NO O1 y la enterotoxina estable al calor (NAG-ST) codificada por el gen *stn* y que se

encuentra en algunas cepas NO 01 asociadas con casos de gastroenteritis. Otra toxina termoestable que es muy similar a ésta última es la toxina O1-ST, codificada por el gene *sto* y se encuentra en ciertas cepas de *V. cholerae* O1 (Vicente *et al*, 1997).

Vibrio cholerae incluye cepas tanto patógenas como no patógenas, que varían en el contenido del gen que da la virulencia. Esta bacteria contiene una amplia variedad de cepas y biotipos, genes de transferencia y captación para toxinas, factores de colonización, resistencia a antibióticos, polisacáridos capsulares que proveen resistencia a cloro y nuevos antígenos de superficie (Heidelberg *et al*, 2000).

Por otro lado, los estudios señalan que esta bacteria es fuertemente influenciada por el ciclo de nutrientes en el medio ambiente marino. Hay todavía mucho que aprender sobre la ecología acuática y la historia natural de *Vibrio cholerae* incluida su existencia autóctona (nativa) en endémicos locales durante temporadas libres de cólera y períodos inter-epidémicos, cuyos factores ambientales afectan el habitat de esta especie. El organismo entra además en un estado "viable pero no cultivable" bajo ciertas condiciones (Heidelberg *et al*, 2000).

El genoma de *Vibrio cholerae* consiste de dos cromosomas circulares. El cromosoma más largo (Cromosoma I), contiene principalmente genes dedicados a funciones celulares esenciales. El cromosoma I contiene todos los operones del ARN ribosomal. Se sugiere que el cromosoma II fue originalmente un megaplásmido capturado por una especie de *Vibrio* ancestral. En el cromosoma II están representados principalmente genes involucrados con el transporte de azúcar, iones metálicos y aniones, en el metabolismo de azúcares y energía, en señales traduccionales de dos componentes y en reparación de ADN (Waldor *et al*, 2000).

Las técnicas más comunes en la identificación de bacterias son las pruebas bioquímicas y las inmunológicas, las cuales están basadas en sus propiedades fenotípicas. La principal desventaja en la aplicación de dichas técnicas es que son tardadas y poco precisas (Barry, 1991; Braun-Howland, 1993; García, 1997; Martínez, 1994), por lo que ha sido necesario desarrollar un método basado en sus propiedades genotípicas, el cual sea rápido, altamente específico y fácilmente reproducible.

Los métodos basados en análisis genómicos son en general rápidos y precisos (Martínez, 1994). En particular, para las muestras aisladas del

medio natural es más aplicable el estudio de relaciones filogenéticas comparando análisis de secuencias de rARN, que la utilización de "kits" comerciales que contienen diversos sustratos para el diagnóstico (Braun-Howland, 1993).

De las técnicas moleculares, la más común en la detección de bacterias *in situ* es el uso de sondas marcadas con fluorescencia (Braun-Howland, 1993); sin embargo para aquellas cepas viables pero no cultivables ha sido necesario desarrollar nuevas técnicas, tales como la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), la cual amplifica exponencialmente un gen específico, a partir de una pequeña cantidad de ADN (Figura 1) (Karunasagar, 1995).

Por otro lado, el análisis de patrones de restricción es una técnica sencilla, que consiste en hacer reaccionar un fragmento de ADN con una endonucleasa de restricción. Dicha reacción al ser analizada por electroforesis da como resultado una serie de bandas o fragmentos de ADN que varían en tamaño y cantidad dependiendo de su secuencia. Este análisis se puede realizar con todo el genoma, lo que resulta impráctico debido a la cantidad de bandas que se obtienen, lo que dificulta la interpretación de los

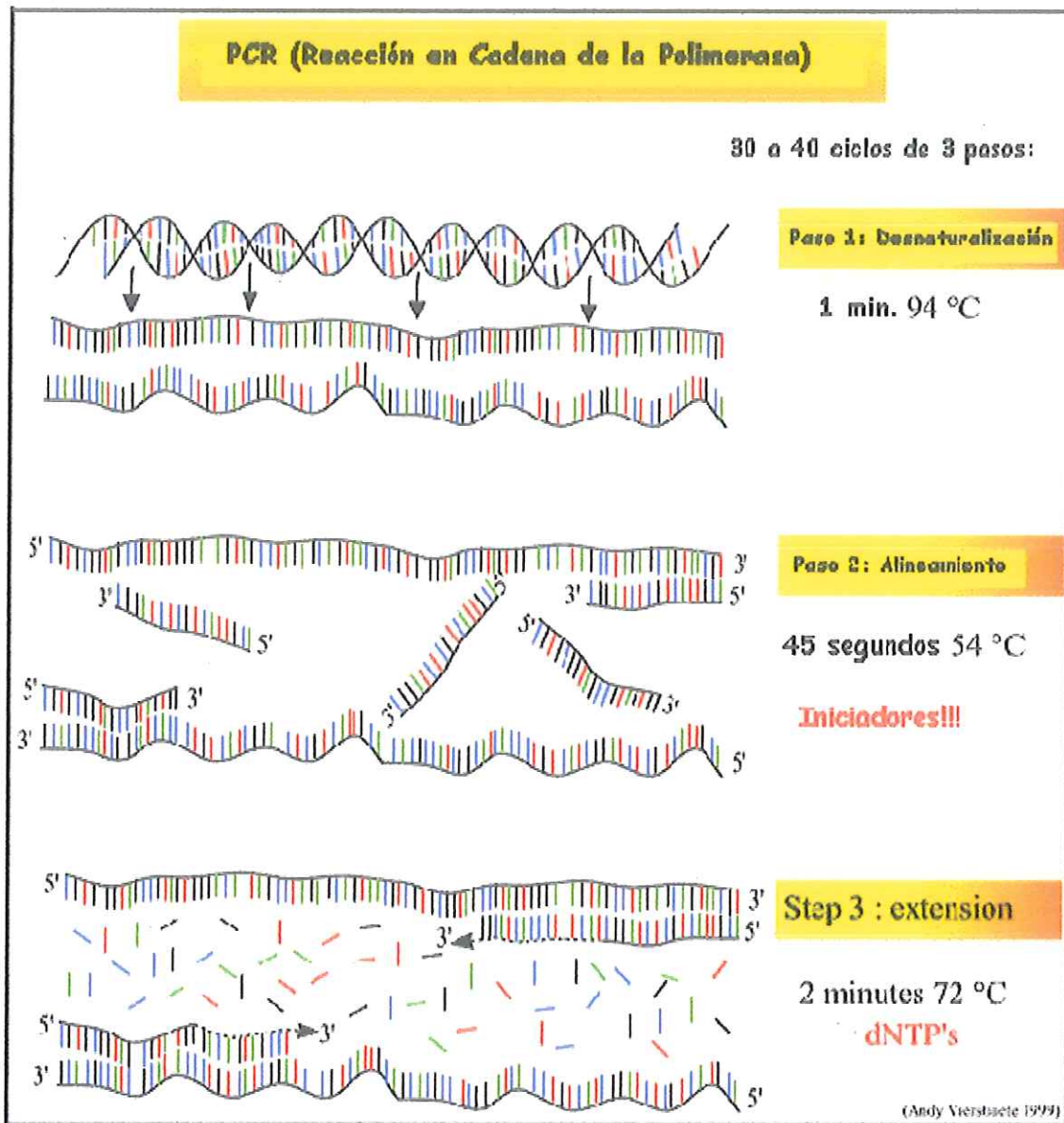


Figura 1. Reacción en cadena de la polimerasa

resultados; o realizarlo en complemento con la técnica de PCR, que dependiendo de la región de ADN que se utilice puede ser muy específico e incluso servir para diferenciar entre especies de un mismo género.

La aplicación de técnicas moleculares en la identificación y detección de microorganismos está bien establecida en la bacteriología de diagnóstico, ya que han sido usadas exitosamente en los últimos años. Sin embargo, es fundamental para la aplicación de estas técnicas definir las secuencias de ADN que identifican a un microorganismo en particular o a un grupo de microorganismos relacionados entre sí (Barry, 1991).

El uso de secuencias de rADN que codifican para las subunidades 5S, 16S y 23S del ribosoma (Figura 2), ha sido muy utilizado en los últimos años ya que presenta regiones variables y regiones conservadas, dependiendo de cada grupo de bacterias. Sin embargo, la variación observada entre genes 16S rADN puede ser muy poca, cuando los microorganismos que pertenecen a un grupo están estrechamente relacionados (Barry, 1991; Braun-Howland, 1993; Martinez, 1994).

En 1993, Kita-Tsukamoto reporta la relación filogenética de 50 cepas diferentes (incluye varias especies de la familia *Vibrionaceae*), mediante la

Ribosomas	rARN	Proteínas
Bacteriano		
50S	23S = 2904 bases	31
70S	5S = 120 bases	
30S	16S = 1542 bases	21
masa: 2.5×10^6 D 66% RNA		
Mamífero		
60S	28S = 4718 bases	
80S	5.8S = 160 bases	49
40S	5S = 120 bases	
masa: 4.2×10^6 D 60% RNA		

Figura 2a) Diagrama de dos ribosomas (de bacteria y de mamífero), que muestra como se disocian en dos subunidades (una grande y una pequeña)

Figura 2b) Esquema de la subunidad 30S, que muestra como cada dominio tiene una ubicación discreta.

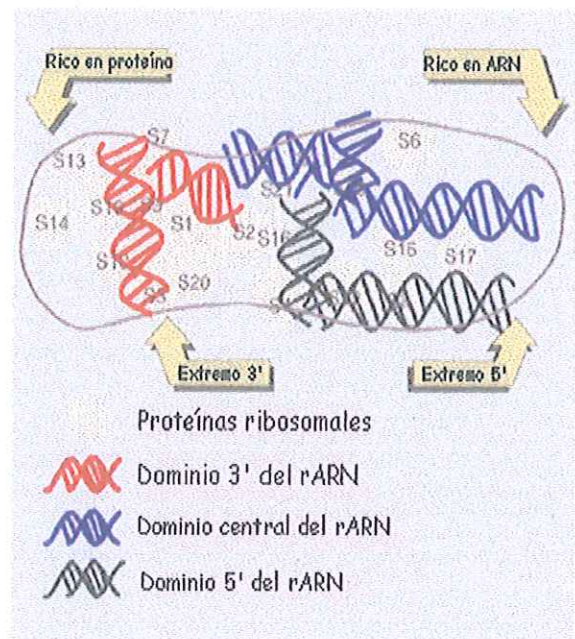


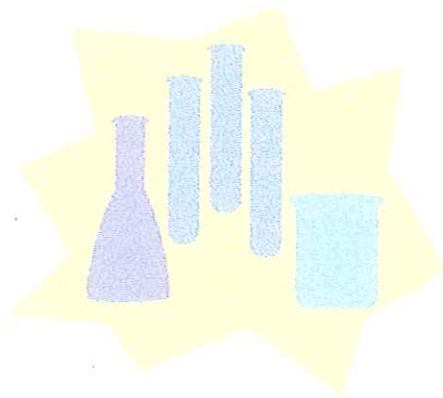
Figura 2) Ribosomas. (Tomada de Lewin, 1997).

alineación de la secuencia del gen 16S rADN. En su trabajo elabora un árbol filogenético basado en dicha secuencia, que se presenta en la figura 3 (Kita-Tsukamoto, 1993).

García-Ortega (1997), realizó un análisis de restricción teórico con las enzimas *Bst*UI, *Msp*I y *Hae*III, de la secuencia del gen 16S rADN de varias especies del género *Vibrio*; encontrando un patrón de restricción conservado para casi todas las especies analizadas con la enzima *Bst*UI. Además realizó un análisis de restricción práctico con la enzima *Bst*UI, que presenta un patrón conservado para las especies analizadas.

JUSTIFICACIÓN

Vibrio cholerae es el agente causante del cólera, una grave enfermedad diarreica que ocurre frecuentemente de forma epidémica. A pesar de que en los últimos 40 años se han dado grandes avances clínicos, el cólera continúa siendo una seria amenaza en los países en desarrollo, donde las condiciones sanitarias son precarias, los servicios médicos limitados y el agua potable no es segura. Debido a sus características muy particulares, la detección del cólera no es totalmente posible mediante las técnicas comunes de diagnóstico bacteriológico, por lo que es necesario desarrollar una técnica basada en sus propiedades genotípicas que sea rápida y precisa. En este sentido el análisis de restricción además de un análisis rápido sobre una secuencia específica provee información no sólo a nivel organismo, sino de la población e incluso de la comunidad a la que pertenecen. El gen 16S rARN contiene dentro de su secuencia regiones conservadas y regiones variables, éstas últimas pueden servir para identificar bacterias entre especies de un mismo género e incluso entre serotipos y cepas de una especie.



CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

METODOLOGÍA

Se trabajó con dos especies aisladas de Ejido Eréndira, B.C. (denominadas en este trabajo: *Vibrio sp C* y *G* respectivamente), *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* NO 01. Se utilizó como control *V. alginolyticus* (ATCC 17749), la cual ya ha sido caracterizada molecularmente por García-Ortega (1997).

Se realizó el análisis de restricción (RFLP) del gene 16S rADN, que fue amplificado a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y digerido con tres endonucleasas de restricción diferentes.

El siguiente diagrama de flujo describe de manera general la metodología que se siguió:

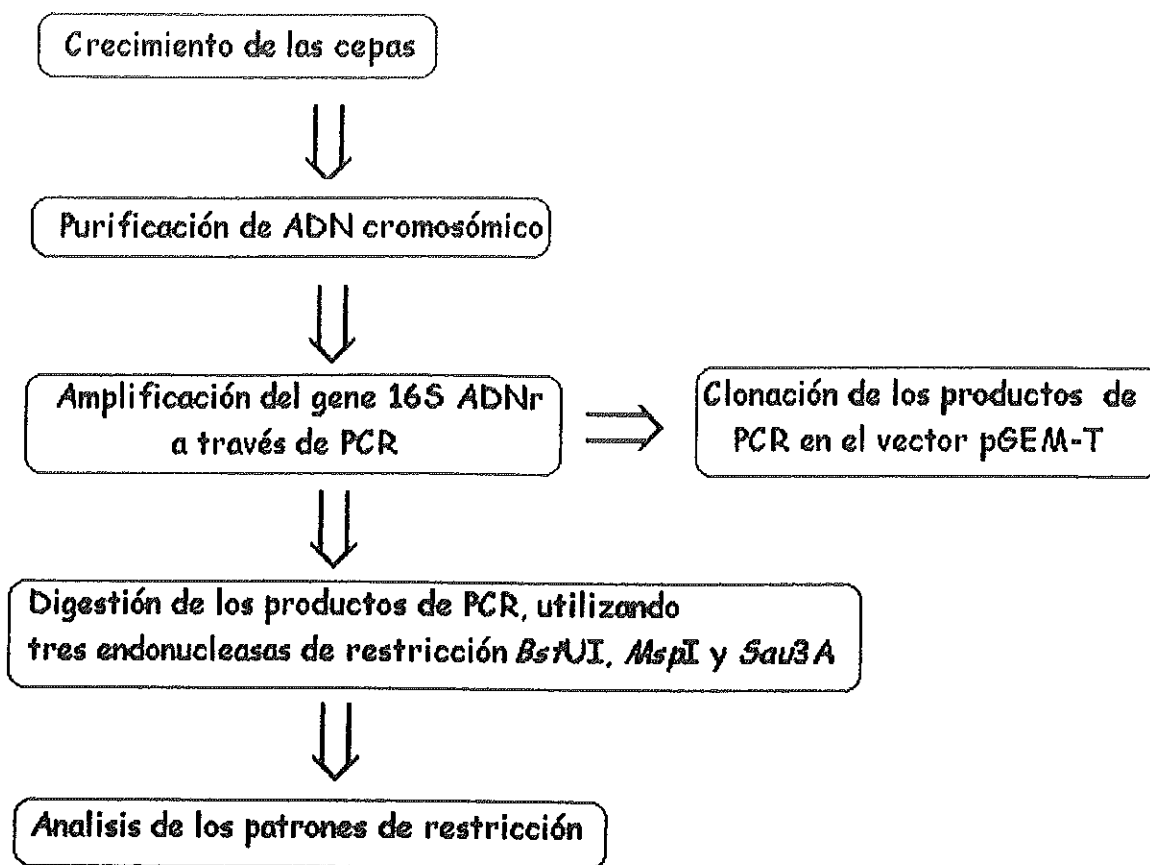


Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología.

Crecimiento celular:

Los controles utilizados en este trabajo fueron *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, las cuáles al igual que *V. cholerae* NO 01 forman parte del cepario del C.I.C.E.S.E. Las especies silvestres que se utilizaron, fueron las cepas (*Vibrio sp. C y G*) aisladas por García-Ortega (1997).

Debido a que dichas cepas se encontraban almacenadas en glicerol a -70°C , se recuperaron en un medio rico, Luria Bertani (LB) sólido a temperatura ambiente durante toda la noche.

Una vez recuperadas las células fue necesario transferir una colonia de las cepas crecidas en el medio LB, al medio TCBS (Tiosulfato-Agar-Bilis-Sacarosa)(DIFCO), que es específico para aislar *Vibrio cholerae* y otras especies de *Vibrio* enteropatógenas. Este cultivo se dejó crecer bajo las mismas condiciones que el anterior y se resembró una asada a medio SWC (Sea Water Complete) líquido, el cual se dejó crecer a temperatura ambiente sin agitación, hasta que alcanzó una densidad óptica de 2 (600nm). De aquí se tomaron alícuotas de 1.5 ml. con las que se purificó ADN cromosomal (Baumann, 1986).

Purificación de ADN cromosómico:

Las células del cultivo en SWC se lisaron utilizando lisozima (10 mg/ml) y SDS al 10%. Las proteínas fueron removidas por digestión con proteinasa K (20 mg/ml). Los residuos de la pared celular, polisacáridos y proteínas restantes fueron removidos por una precipitación selectiva con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 10% y el ADN cromosomal se recuperó del sobrenadante por medio de una precipitación con isopropanol. El ADN precipitado se centrifugó por 10 minutos a 10,000 r.p.m. y el pellet se lavó con etanol al 70% (Maniatis, 1982).

Para verificar la extracción se analizaron 5 μ l de muestra con 1 μ l de colorante (xilencianol y azul de bromofenol) por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio (1 μ g/ml). El gel se corrió 1 hora a 100 voltios y se observó con luz ultravioleta.

Amplificación del gen 16S rDNA:

La técnica de PCR es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias definidas de ADN. La reacción contenía dos oligonucleótidos iniciadores 16Sf y 16Sr , una solución amortiguadora, enzima Taq polimerasa, desoxirribonucleótidos (dNTP's) y ADN cromosómico de las cinco cepas (Maniatis, 1982). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Gene E (TEHNE, INC., 2996 New Jersey, USA).

Los pasos de la amplificación incluyeron un ciclo inicial de 95 °C (10 minutos) para desnaturalizar toda la doble cadena; 25 ciclos durante los cuales se amplificó el gen, que incluyen: la desnaturalización térmica de la doble cadena a 95 °C (1 minuto), alineamiento de los iniciadores en su secuencia complementaria a una temperatura de hibridación (T_m) de 55 °C (1 minuto) y la extensión de los iniciadores por síntesis enzimática a 72°C (2 minutos). Finalmente la reacción se interrumpe con un último ciclo de 72 °C por 10 minutos (Maniatis, 1982).

La T_m se calculó en base a la secuencia de los oligos utilizados, multiplicando las bases nucleotídicas A y T por dos y las bases C y G por 4, debido a la cantidad de enlaces entre puentes de Hidrógeno.

Análisis de restricción:

El análisis de restricción del gene 16S rADN de las diferentes cepas se hizo utilizando tres endonucleasas diferentes (Tabla 1). La reacción se llevó a cabo agregando 5 μ l de producto de PCR, 3 μ l de solución amortiguadora y 1 μ l de enzima, agregando agua destilada y filtrada c.b.p. 30 μ l.

Tabla 1. Condiciones de reacción.

<u>Endonucleasa de restricción</u>	<u>Sitio de corte</u>	<u>Tiempo de reacción (horas)</u>	<u>Temperatura de reacción (°C)</u>	<u>Solución amortiguadora</u>
BstUI (Biolabs)	5' CG ∇ CG 3' 3' GC.GC 5'	4	60	Ne buffer 2: NaCl (50mM); tris-HCl (10 mM); MgCl ₂ (10mM); DTT (1mM). pH 7.9
MspI (Boehringer Mannheim)	5' C ∇ CGG 3' 3' GGC.C 5'	4	37	Buffer L: Tris-HCl (10mM); MgCl ₂ (10mM); ditioeritrol (1 mM). PH 7.5
Sau3A (Boehringer Mannheim)	5' ∇ GATC 3' 3' CTAG. 5'	4	37	Buffer A: Tris-acetato (33 mM); K-acetato (66mM); Mg-acetato (10mM); ditioeritrol (0.5mM). pH 7.9.

Una vez digeridos los productos de PCR bajo las diferentes condiciones de reacción, se corrieron en un gel de acrilamida-bisacrilamida 30:0.8 % a 50 voltios durante una hora junto con un marcador de peso molecular. Después el gel se tiñó con bromuro de etidio ($1\mu\text{g/ml}$) y se observó y fotografió con iluminación UV[14a].

El análisis de los patrones de restricción se realizó de forma visual.

Clonación:

Es importante aclarar, que todos los análisis de restricción fueron hechos con el mismo producto de PCR, que a su vez fue obtenido del ADN cromosomal de una misma colonia, para evitar errores por posible contaminación o mal manejo de las muestras. Por esto mismo, con el objeto de poder realizar análisis posteriores a las mismas muestras los productos de PCR fueron clonados en un plásmido pGEM-T.

El plásmido pGEM-T (Promega) está diseñado especialmente para clonar productos de PCR. Contiene una timidina en ambos extremos 3' que aumenta la eficiencia en la ligación y sitios de restricción para diferentes enzimas en los extremos para poder remover fácilmente el producto clonado (Figura 5).

El gen 16S rADN de las diferentes cepas fue ligado a éste plásmido bajo las siguientes condiciones de reacción:

Tabla 2. Condiciones de reacción de la ligación .

Producto de PCR	3 μ l
pGEM-T	0.5 μ l
Enzima (T4 ligasa)	1 μ l
Buffer	2 μ l
BSA	0.2 μ l
Tiempo:	3 horas
Temperatura:	16 °C

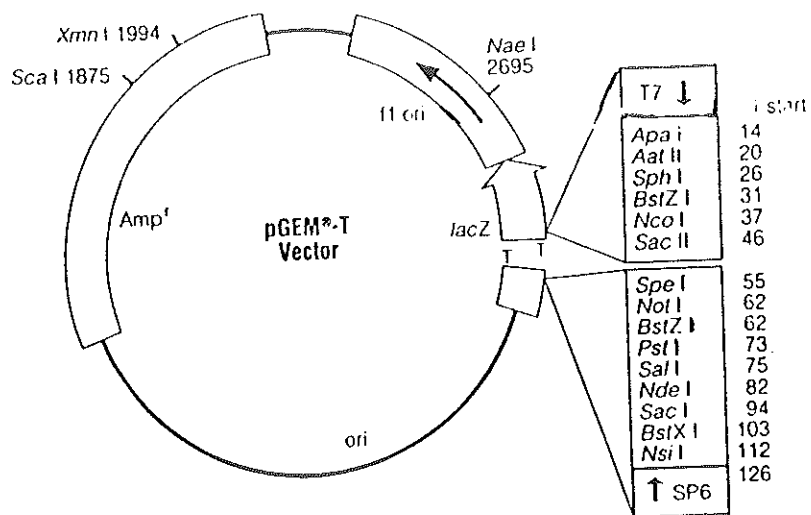


Figura 5. Diagrama del vector de clonación pGEM-T. 3003 pb. Origen de replicación para *E. coli*. Resistencia a ampicilina, un gene reportero *lacZ* y un sitio polilinker

Una vez realizada la ligación del gen 16S rADN en el plásmido pGEM-T, se realizó una transformación con choque térmico para introducir el plásmido ligado en células competentes de *E. coli* (DH5a). Después de dicho shock, las células se recuperaron en medio LB y se sembraron 100 μ l en cajas Petri con LB sólido + ampicilina (50 μ g/ml) y se dejó crecer toda la noche a 37 $^{\circ}$ C (Maniatis, 1982).

A partir de éste cultivo se purificó ADN plasmídico, tomando una alícuota de 1.5 ml. para obtener un pellet que fué resuspendido en amortiguador SET. Posteriormente se rompieron las células con lizosima y se degradó el ARN agregando una ARNasa. El ADN plasmídico se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 70%. El precipitado se guardó seco a -20 $^{\circ}$ C (Maniatis, 1982).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIONES

A) CRECIMIENTO CELULAR DE LAS ESPECIES ANÁLIZADAS:

ESPECIE	TEMPERATURA(°C)	TIEMPO	MEDIO DE CULTIVO
<i>Vibrio cholerae</i> No-01	37	Toda la noche	T ₁ N ₁ y SWC sólido
	25	Toda la noche	SWC sólido
<i>Vibrio paraemoliticus</i>	37	Toda la noche	LB y SWC sólido
	25	Toda la noche	LB y SWC sólido
		12 a 72 Hrs.	SWC líquido (240 rpm.)
<i>Vibrio alginoliticus</i>	25	Toda la noche	SWC sólido
		1 a 5 días	SWC líquido (240 rpm.)
<i>Vibrio sp. (C)</i>	25	Toda la noche	SWC sólido
		1 a 5 días	SWC líquido (240 rpm.)
<i>Vibrio sp. (G)</i>	25	Toda la noche	SWC sólido
		1 a 5 días	SWC líquido (240 rpm.)

Tabla 3. Condiciones de crecimiento celular para las cepas analizadas.

- *Vibrio cholerae* NO 01 creció a ambas temperaturas (25 y 37 °C) en medio sólido, pero no creció en medio líquido. Se ha reportado que *Vibrio cholerae* al igual que otros vibrios enteropatógenos crecen a 37°C sin agitación (Alexander,1998; Castellanos, 1996; Koch, 1993).

Las condiciones del cultivo de variaron para intentar crecerlas en medios líquidos (se usó LB y SWC), pero no se obtuvo ningún

crecimiento por lo que fue necesario resuspender del medio sólido directamente en el amortiguador TBE para la purificación de ADN cromosómico.

Esta variación en las condiciones de crecimiento se puede deber a que la cepa de *V. cholerae* NO 01 utilizada, ya ha estado mucho tiempo en el laboratorio.

- *Vibrio parahaemolyticus*, creció a 37 °C y a temperatura ambiente en medio sólido, a diferencia de lo reportado anteriormente que indica una temperatura única de 37 °C. En medio líquido creció a temperatura ambiente con agitación continua (200 r.p.m.), estas condiciones deberían ser iguales o muy semejantes a las de *V. cholerae* ya que ambas cepas son enteropatógenas, sin embargo su permanencia en el laboratorio pudo haber afectado dichas condiciones (Castellanos, 1996; Koch, 1993; Wong, 1999).
- *V. alginolyticus*, *Vibrio sp. G* y *C*, crecieron solamente a temperatura ambiente y su crecimiento en medio SWC líquido fue con agitación constante.

Las cepas aisladas del medio (*Vibrio sp. C y G*), se encontraban en aguas frías y en movimiento por lo que estas condiciones de cultivo concuerdan con lo esperado.

B) PURIFICACIÓN DE ADN CROMOSÓMICO.

El ADN cromosómico de las cepas analizadas (*Vibrio cholerae* No-01, *Vibrio parahemolyticus* y *Vibrio alginolyticus*, así como dos especies aisladas del medio natural), fue analizado por electroforesis y fotografiado con iluminación ultravioleta (Figura 6). Se usó como control ADN cromosómico de *Bacillus subtilis*, para verificar que el tamaño de la banda sea el esperado (4,000 Kpb aproximadamente).

No se observan restos de ARN ni otros residuos de sales que puedan afectar el resultado del PCR.

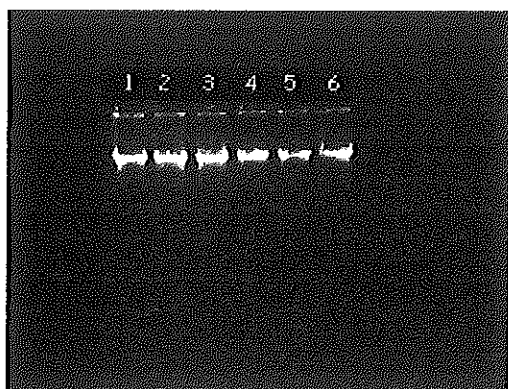


Figura 6. ADN cromosomal de las especies:
1) *Bacillus subtilis* (4000 Kpb); 2) *Vibrio cholerae* No-01
3) *Vibrio paraemoliticus*; 4) *Vibrio alginolyticus*;
5) *Vibrio sp.* (C); 6) *Vibrio sp.* (G).

C) AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S rADN.

El gen 16S rADN amplificado del ADN cromosómico a través de PCR, se verificó por electroforesis y fue fotografiado bajo iluminación UV (Figura 7). Este gel de agarosa, se corrió con un marcador de pesos moleculares (de 50 a 2000p.b) para verificar el tamaño del fragmento obtenido, el cuál debe ser de aproximadamente 1.4 Kpb, según lo reportado anteriormente (Lewin, 1997).

La fotografía de los productos de PCR (figura 7), no presenta amplificados no específicos ni residuos de sales ó ADN degradado, por lo que no fue necesario purificarlos antes de hacer los análisis de restricción.



Figura 7. Detección de los productos de PCR (Gene 16S rADN)
1) Marcador de pesos moleculares en pb; 2) *Vibrio cholerae* No-01
3) *Vibrio paraemolyticus*; 4) *Vibrio alginolyticus*;
5) *Vibrio sp. (C)*; 6) *Vibrio sp. (G)*.

D) ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN EXPERIMENTAL.

- El análisis de restricción con la enzima *Bst*UI, mostró un patrón de restricción conservado para todas las especies con excepción de la cepa analizada de *Vibrio cholerae* NO 01. Esto concuerda con lo reportado por García-Ortega (1997) para las especies aisladas del medio y para *Vibrio alginolyticus*.
- El análisis de restricción con la enzima *Msp*I, mostró un patrón de restricción conservado para todas las especies con excepción de la cepa analizada de *Vibrio cholerae* No-01; lo cual difiere de lo esperado según análisis de restricción teóricos reportados anteriormente (García, 1997), que proponen patrones de restricción variables para la mayoría de las especies de *Vibrio* utilizando esta enzima.
- El análisis de restricción con la enzima *Sau*3A, mostró un patrón de restricción conservado para todas las especies con excepción de la cepa analizada de *Vibrio cholerae* NO 01. Este análisis en particular no se puede comparar con estudios anteriores, pero contribuye como

una fuerte evidencia sobre la diferencia del gene 16S rADN de *Vibrio cholerae* NO 01, con el de las otras especies analizadas.

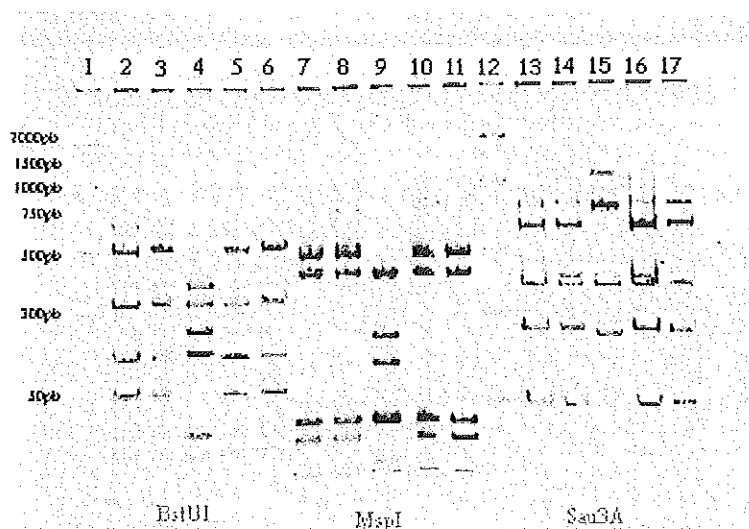


Figura 3. análisis de restricción de las cinco cepas con tres endonucleasas diferentes. 1,12) Marcador de pesos moleculares (50-2000). 2,7,13) *V. alginolyticus*; 3,8,14) *V. parahaemolyticus*; 4,9 ,15) *V. cholerae*; 5,10,16) control C; 6,11,17) control G.

Los patrones de restricción conservados con las tres endonucleasas de restricción utilizadas, muestran la relación estrecha que existe entre las cepas aisladas del medio, *Vibrio alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. La similitud de las secuencias del gen 16S rARN para las últimas dos especies, al igual que la diferencia del gen 16S rARN de *Vibrio cholerae*

con respecto a estas especies, ya había sido discutido anteriormente por Tsukamoto (1993).

Quien analizó mediante un análisis de secuenciación los genes 16S rARN de 50 cepas diferentes entre ellas: *V. parahaemoliticus*, *V. alginolyticus* y cinco cepas de *Vibrio cholerae* (Figura 3). Encontró que las cepas de *Vibrio cholerae* están muy relacionadas entre sí y con *V. mimicus*, pero filogenéticamente se encuentran lejos de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* y de otras especies del género *Vibrio*. La diferencia de la secuencia del gene 16S rARN de *V. cholerae*, la adjudica a que el requerimiento de sodio para esta especie no es limitante para su crecimiento (Tsukamoto, 1993).

Por otro lado, debido a que se utilizó el gene 16S rARN de las especies analizadas, no es posible que las diferencias del patrón de restricción de *Vibrio cholerae* se deban a los dos cromosomas que tiene esta bacteria, ya que todos los operones completos del ARN ribosomal son exclusivos del cromosoma I.

Los resultados reportados en este trabajo concuerdan con lo reportado anteriormente, tanto para los patrones de restricción

conservados con la enzima *Bst*UI de las cepas *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* (García-Ortega, 1997), como para la relación entre especies reportada por Tsukamoto (1993). Esto nos da referencia de la eficiencia del método utilizado en el presente trabajo.

Además, el análisis de restricción para *Vibrio cholerae* NO 01, da la pauta para diseñar una sonda de diagnóstico, que permita identificar directamente esta cepa.

CONCLUSIONES

El patrón de restricción de las especies analizadas fue conservado para todas las especies con excepción de *Vibrio cholerae*, la cuál mostro para los tres análisis de restricción un patron específico, aunque diferente para cada enzima utilizada.

El patrón de restricción obtenido con cada una de las endonucleasas utilizadas puede servir para identificar la cepa de *Vibrio cholerae* NO 01 analizada.

La técnica de RFLP o análisis de restricción sirvió para cumplir con el objetivo general de este trabajo, ya que es un método relativamente rápido, que no requiere de grandes cantidades de muestra y que además no es tan costoso como la secuenciación u otras técnicas moleculares que son empleadas en la actualidad.

Por otro lado el gen 16S rARN puede ser utilizado para diferenciar *Vibrio cholerae* del resto de las especies, sin que esto tenga relación con los dos cromosomas presentes en esta bacteria. Sin embargo este gen no es apto para diferenciar las otras especies del género *Vibrio* entre sí, debido a que es altamente conservado de acuerdo a lo encontrado en este trabajo.

PERSPECTIVAS

- Realizar análisis de restricción posteriores con las mismas enzimas utilizadas en este trabajo, pero para más cepas de *Vibrio cholerae* patógenas y no patógenas y para *Vibrio mimicus*.
- Tratar de diseñar un oligo específico para *Vibrio cholerae*.
- Secuenciar el gene 16S rADN de las cepas aisladas del medio.

CAPÍTULO 4

BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander D., DePaola A., Chirtel S. and Young R.B. 1998. Detection *Vibrio cholerae* in oyster (*Crassostrea virginica*) homogenate based on centrifugal removal of antimicrobial agents. *Journal of Microbiological Methods*. 33:237-244.
- Barry T., Collieran G., Glennon M., Dunican L.K. and Gannon F. 1991. The 16S/23S Ribosomal Spacer Region as a Target for DNA Probes to Identify Eubacteria. *PCR Methods and Applications*. 1:51-56.
- Baumann P. and Schubert R.H. 1986. Family II. *Vibrionaceae*. In: Facultative anaerobic gram-negative rods. In: Claus D., Berkekey R. The *Bergey's Manual of Bacteriology*, Vol 2. William and Wilkins, Baltimore USA, pp. 516-60.
- Braun-Howland E.B., Vescio P.A. and Nierzwicki-Bauer S.A. 1993. Use of a Simplified Cell Blot Technique and 16S rRNA-Directed Probes for Identification of Common Environmental Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(10):3219-3224.
- Castellanos M.I., Chauvet A., Deschamps A., and Barreau C. 1996. PCR Methods for Identification and Specific Detection of Probiotic Lactic Acid Bacteria. *Current Microbiology*. 33:100-103.
- Fox G.E., Wisotzkey J.D. and Jurtschuk P, Jr. 1992 How Close Is Close: 16S rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient To Guarantee Species Identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42(1):166-170.
- García-Ortega A.M. 1997. Caracterización molecular de especies marinas del género *Vibrio*. Tesis de licenciatura. UABC-FCQ, Tijuana B.C.
- Heidelberg J.F., Einsen J.A., Nelson W.C., Clayton R.A., Gwinn M.L., Dodson R.J., Haft D.H., Hickey E.K., Peterson J.D., Umayam L., Gill S.R., Nelson K.E., Read T.D., Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva M.D., Vamathevan J., Bass S., Qin H., Dragoi I., Sellers P., McDonald L., Utterback T., Fleishmann R.D., Nierman W.C., White O., Salzberg S.L., Smith H.O., Colwell R.R., Mekalanos J.J., Venter J.C. 2000. DNA sequence of both cromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406(6795):477-483.

- Kaper J.B., Nataro, J.P., Roberts N.C., Siebeling R.J. and Bradford H.B. 1986. Molecular Epidemiology of Non-O1 *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* in the U.S. Gulf Coast Region. *Journal of Clinical Microbiology* 23(3):652-654.
- Karunasagar I., Sugumar G., Karunassagar I. And Relley A. 1995. Rapid detection of *Vibrio cholerae* contamination of seafood by polymerase chain reaction. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 4(4):365-368.
- Kita-Tsukamoto K., Oyaizu H., Nanba K and Simidu U. 1993. Phylogenetic Relationships of Marine Bacteria, Mainly Members of the Family *Vibrionaceae*, Determined on the Basis of 16S rRNA Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 43(1):8-19.
- Koch W.H., Payne W.L., Wentz B.A. and Cebula T.A. 1993. Rapid Polymerase Chain Reaction Method for Detection of *Vibrio cholerae* in Foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(2):556-560.
- Kristjansson M., Samore M.H., Gerding D.N., DeGirolami P.C., Bettin K.M., Karchmer A.W., and Arbeit R.D. 1994. Comparison of restriction Endonuclease Analysis, Ribotyping, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Molecular Differentiation of *Clostridium difficile* Strains. *J. Clin. Microbiol.* 32(8):1963-1969.
- Lewin B. (1997). *Genes vi*. Oxford University Press and Cell Press. Oxford N.Y. 6th edition. 1260 pp.
- MacDonell M.T. and Colwell R.R. 1984. Identical 5S rRNA Nucleotide Sequence of *Vibrio cholerae* Strains Representing Temporal, Geographical, and Ecological Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*. 48 (1):119-121.
- Maniatis, T., E. F. Fritsh, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Marshall S., Clark C.G., Wang G., Mulvey M., Kelly M.T. and Johnson W.M. 1999. Comparison of Molecular Methods for Typing *Vibrio Parahaemolyticus*. *J. Clin. Microbiol.* 37(8): 2473-2478.
- Martínez P. J., Blanch A.R. and Jofre J. 1994. Rapid Detection and Identification of *Vibrio anguillarum* by Using a Specific Oligonucleotide Probe Complementary to 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(2):732-137.

- Nishimura M., Kita-Tsukamoto K., Kogure K., Ohwada K. and Simidu U. 1993. A New Method to Detect Viable Bacteria in Natural Seawater Using 16 SrRNA Oligonucleotide Probe. *Journal of Oceanography*. 49:51-56.
- Pujalte M.J., Ortigosa M., Urdaci M.C., Garay E. and Grimont P.A.D. 1993. *Vibrio mitili* sp. Nov., from Mussels. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 43:358-362.
- Shangkuan Y.H., Tsao C.M. and Lin H.C. 1997. Comparison of *Vibrio cholerae* O1 isolates by polymerase chain reaction fingerprinting and ribotyping. *J Med. Microbiol.* 46: 941-948.
- Vicente A.C.P., Coelho A.M. and Salles C.A. 1997. Detection of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* heat-stable toxin gene sequence by PCR. *J.Med.Microbiol.* 46:398-402
- Vickery M.C.L., Smith A.L., DePaola A., Jones D.D., Steffan R.J. and Bej A.K. 1998. Optimization of the arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) for intra species differentiation of *Vibrio vulnificus*. *Journal of Microbiological Methods*. 33:181-189.
- Waldor M.K. and Mekalanos J. 1996. Lysogenic Conversion by a Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin. *Science*. 272:1910-1914
- Waldor M.K. and RayChaudhuri D. (2000). Treasure trove for cholera research. *Nature* 406(6795):443-546.
- Williams N. 1996. Phage Transfer: A New Player Turns Up in Cholera Infection. *Science*. 272:1869-1870.
- Wong H.C., Ho C.Y., Kuo L.P., Wang T.K., Lee C.L. and Shin D.Y.C. 1999. Ribotyping of *Vibrio parahaemolyticus* Isolates Obtained from Food Poisoning Outbreaks in Taiwan. 43 (7): 631-636.

ANEXO

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR:

PURIFICACIÓN DE ADN CROMOSOMAL

REACTIVOS:

Amortiguador TE (Tris HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8)

Lisozima 10 mg/ml

ARNasa

Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%

Proteinasa K 20 mg/ml

Cloruro de sodio (NaCl) 5M

Cloroformo /alcohol isoamílico 24:1

Fenol /cloroformo /alcohol isoamílico 25:24:1

Isopropanol

Etanol al 70%

Solución de bromuro de hexadecilmetilamonio (CTAB) (CTAB al 10% en una solución de NaCl 0.7M)

1. Crecimiento celular.
2. Centrifugar 1.5 ml de cultivo en una microcentrífuga a 12,000 rpm durante 2 minutos o hasta que se forme un pellet compacto. Descartar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet en 567 μ l de amortiguador TE. Agregar 5 μ l de lisozima e incubar a 37°C durante 10 minutos y agregar 10 μ l de ARNasa e incubar por 20 minutos. Adicionar 30 μ l de SDS y 3 μ l de proteinasa K para obtener una concentración final de 100 μ l/ml de proteinasa K y de 0.5% de SDS. Incubar una hora a 37°C.
4. Adicionar 100 μ l de NaCl 5M y mezclar.
5. Agregar 80 μ l de solución de CTAB/NaCl. Mezclar e incubar 10 minutos a 65 °C.
6. Agregar 0.7 ml de cloroformo/alcohol isoamílico. Agitar y centrifugar durante 5 minutos.

