

## 1. OBTENCIÓN DE ADN DE BACTERIAS PATÓGENAS

Existen diferentes métodos para la obtención de ADN bacteriano que varían en duración y complejidad del procedimiento en función de la calidad del ADN que queramos obtener. En este apartado definimos dos métodos para extracción de ADN cromosómico como el método de hervido, que es un método rápido, pero con el que se obtiene un ADN de pureza mínima, pero suficiente para llevar a cabo procedimientos como la técnica de PCR; y el método de CTAB, más largo pero con el que se obtiene un ADN de mayor pureza útil para análisis posteriores con enzimas de restricción. Además, se incluye un protocolo comercial de extracción de ADN plasmídico adaptado para *Acinetobacter baumannii*.

### 1.1. MÉTODO DE HERVIDO

#### Materiales

- Cultivo bacteriano en placa de agar
- Asa de siembra
- Estufa a 37 °C
- Eppendorf de 1,5 ml estériles
- Pipetas y puntas desechables estériles
- Placa calefactora con capacidad de alcanzar 100°C
- Centrífuga

#### Soluciones

- Agua molecular autoclavada



**MATERIALES Y  
SOLUCIONES**

## **Protocolo**

1. Preparar un eppendorf estéril por cada muestra al que se añaden 100  $\mu$ litos de agua molecular autoclavada.
2. Tomar con un asa de siembra unas colonias de la placa de agar e introducirlas en el eppendorf, utilizando posteriormente la pipeta para obtener una suspensión homogénea.
3. Calentar a 100°C durante 15 minutos.
4. Añadir 900  $\mu$ litros de agua molecular estéril a cada eppendorf y homogeneizar.
5. Centrifugar durante 5 minutos a 12.000 rpm
6. Recoger el sobrenadante en un eppendorf estéril.

Para cada reacción de PCR se añaden de 1-5  $\mu$ l de este sobrenadante.

## **1.2. OBTENCION DE ADN GENÓMICO PURO**

### **Materiales**

- Cultivo bacteriano en placa de agar
- Asa de siembra
- Pipetas y puntas desechables estériles
- Eppendorf de 1,5 ml estériles
- Centrífuga

### **Soluciones**

- Cloroformo: isoamilalcohol: Mezclar cloroformo e isoamilalcohol en proporción 24: 1
- Fenol/cloroformo: isoamilalcohol: Mezclar en proporción 1: 1 fenol neutro saturado y cloroformo: isoamilalcohol (24:1) (v/v)
- CTAB/NaCl: Mezclar Hexadecyltrimethylammonium Bromide al 10 % y NaCl 5M en proporción 1:1. Mantener a temperatura ambiente.
- Solución RNAsa (10 mg/ ml):Disolver en agitación 100 mg del enzima en 10 ml de agua destilada, calentar a 90 °C durante 10 minutos para desactivar las DNAsas. Alicuotar y guardar a – 20 °C.

- Solución Proteinasa K (20 mg/ ml): Disolver en agitación 100 mg de proteinasa K en 5 ml de agua destilada estéril. Alicuotar y guardar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- TE pH 8.0: 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA. Autoclavar y mantener a temperatura ambiente.
- SDS al 10 % (p/v): Disolver 10 g de SDS en 100 ml de agua destilada. Mantener a temperatura ambiente.
- NaCl 5M: Disolver 292.2 g de NaCl en un volumen final de 1 litro. Autoclavar.
- Agua molecular autoclavada



### Protocolo

1. Resuspender un asa de colonias de una placa de agar en 500  $\mu\text{l}$  de TE hasta conseguir una perfecta homogeneización.
2. Añadir 30  $\mu\text{l}$  de SDS al 10 % y mezclar bien
3. Añadir 3  $\mu\text{l}$  de proteinasa K (20 mg/ml) e incubar 60 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$
4. Añadir 100  $\mu\text{l}$  de NaCl 5 M, mezclar haciendo espuma y añadir 80  $\mu\text{l}$  de CTAB/NaCl, mezclar volteando el tubo e incubar durante 10 minutos a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$
5. Añadir un volumen de la solución fenol/cloroformo:isoamilalcohol (25/24:1), mezclar volteando el tubo y centrifugar 5 minutos a 8000 rpm. Extraer la fase superior procurando no tocar la interfase.
6. Repetir el paso 5

7. Añadir RNAsa a una concentración final de 50 µg/ml e incubar durante 30 minutos a 37 °C
8. Repetir el paso 5
9. Extraer con igual volumen de cloroformo: isoamilalcohol (24:1). Voltear, centrifugar y extraer la fase superior. Hay que tener en cuenta el volumen que se recupera.
10. Precipitar con 1/10 volúmenes de acetato sódico y 2 volúmenes de etanol helado a -20° C o/n o a -80° C 1 hora.
11. Centrifugar a 12.000 rpm durante 20 minutos.
12. Retirar el etanol y dejar secar a 37 °C.
13. Resuspender en 50-200 microlitros de TE y conservar a -20 °C

Para utilizarlo en análisis posteriores se deberá cuantificar y determinar el grado de pureza (ver guía de problemas y soluciones).

### **1.3. OBTENCION DE ADN PLASMÍDICO** (Protocolo adaptado del kit comercial “Plasmid Mini Kit Qiagen”)

#### **Materiales**

- Cultivo bacteriano en caldo
- Asa de siembra
- Estufa a 37 °C
- Eppendorf de 1,5 ml estériles
- Pipetas y puntas desechables estériles
- Placa calefactora con capacidad de alcanzar 100°C
- Centrífuga
- Kit comercial de extracción de plásmidos

#### **Soluciones**

- Agua molecular autoclavada
- Solución salina
- TES: 0.01M Tris pH7.8, 0.05M EDTA, 0,5%SDS
- Proteinasa K (stock a 50mg/ml en agua destilada)
- TE: 10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1mM EDTA

## **1. Siembra de bacterias.**

1.1. Siembra de 1 ó 2 colonias en 10 ml de caldo de un medio rico e incubar a 37° C durante toda la noche y con movimiento aprox. de 140–300rpm.

## **2. Recogida de células y lavados.**

2.1. Centrifugar los 10 ml de cultivo a 10000 rpm durante 10 min y desechar el sobrenadante.

2.2. Lavar el pellet con 5 ml de solución salina e inmediatamente se centrifuga a 10000 rpm durante 10 min. Desechar sobrenadante y repetir el lavado otra vez.

## **3. Tratamiento del pellet con TES y proteinasa K.**

3.1. Añadir 1 ml de TES y diluir el pellet. Posteriormente se añaden 0.5 µl de proteinasa K y se incuba a 37° C durante 30 min. Transcurrido este tiempo se centrifuga a 12000 rpm durante 10 min y se elimina con cuidado el sobrenadante.

## **4. Kit Qiagen siguiendo las recomendaciones del fabricante.**

4.1. Resuspender el pellet bacteriano en 300µl del tampón P1\*.

4.2. Añadir 300µl del tampón P2\*, mezclar enérgicamente invirtiendo el tubo entre 4–6 veces e incubar a temperatura ambiente durante 5 min.

4.3. Añadir 300µl del tampón P3\*, mezclar enérgicamente invirtiendo el tubo entre 4–6 veces e incubar en hielo durante 5 min.

4.4. Centrifugar a una velocidad de 10000–13000 rpm, durante 10 min y extraer el sobrenadante que contiene el DNA plasmídico.

4.5. Equilibrar la columna del kit con 1 ml del tampón QBT\* permitiendo que éste baje por gravedad.

4.6. Pasar por la columna el sobrenadante obtenido en el apartado 4.4. permitiendo que entre por gravedad en la resina.

4.7. Lavar la columna 2 x 2ml del tampón QC\*.

4.8. Eluir el DNA con 800µl del tampón QF\*.

4.9. Precipitar el DNA eluido con 0.7 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar y centrifugar inmediatamente a 10000 rpm durante 30 min. Decantar cuidadosamente el sobrenadante.

4.10. Lavar el pellet del DNA con 1 ml de etanol al 70% y centrifugar a 10000 rpm durante 10 min.

4.11. Decantar cuidadosamente el sobrenadante y dejar secar el pellet durante el tiempo necesario asegurándose que no queda nada de etanol.

4.12. Diluir el pellet en un tampón como TE\* pH 8.0.

**\*Anexo . Composición de *Buffers* del kit.**

<b>Buffer</b>	<b>Composición</b>	<b>Mantenimiento</b>
Buffer P1 (tampón de resuspensión)	50 mM Tris-Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100µg/ml RNase A	2–8°C, después de añadir la RNase A
Buffer P2 (Tampón de lisis)	200 mM NaOH, 1%SDS(p/v)	15–25°C
Buffer P3 (Tampón neutralizante)	3.0M Acetato potásico pH5.5	15–25°C o 2–8°C
Buffer QBT (Tampón de equilibrio)	750mM NaCl; 50mM MOPS, pH 7.0 ; 15% isopropanol(v/v); 0,15% Triton X–100(v/v)	15–25°C
Buffer QC (Tampón de lavado)	1.0mM NaCl; 50mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol(v/v)	15–25°C
Buffer QF (Tampón de elución)	1.25 M NaCl; 50mM Tris-Cl, pH 8.5;15% isopropanol(v/v)	15–25°C y momento de uso a 65°C para obtener plásmidos de alto peso molecular.
TE	10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1mM EDTA	15–25°C