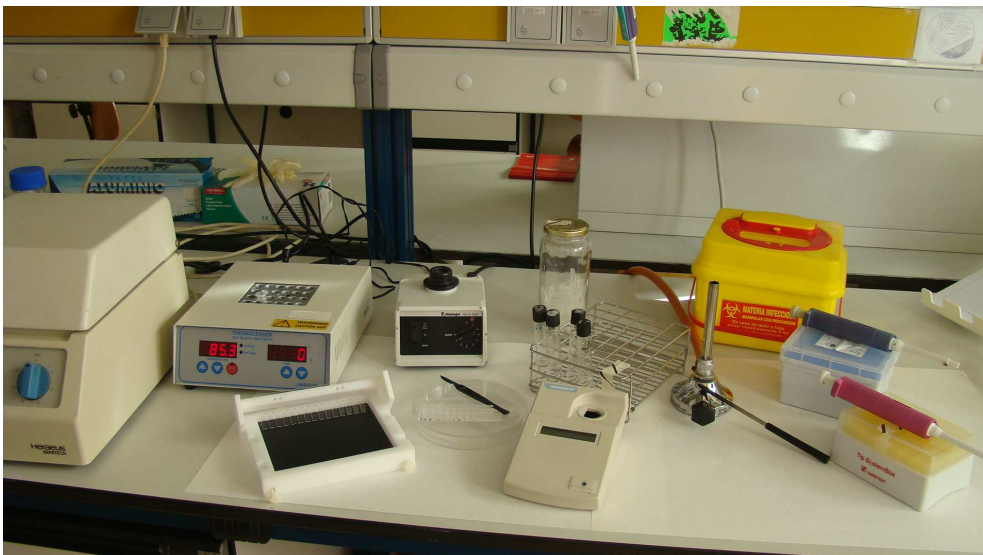


4. TIPADO GENÉTICO DE BACTERIAS PATÓGENAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN CAMPOS PULSADOS (PFGE)

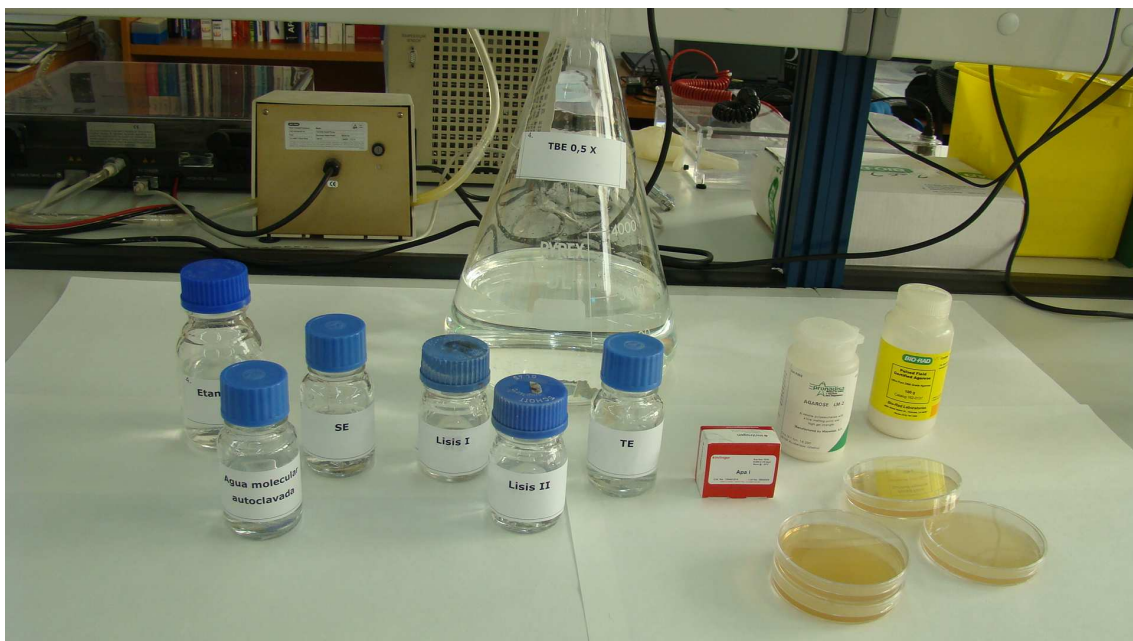
Materiales

- Bacterias crecidas en placas de agar
- Agarosa de grado molecular
- Agarosa de bajo punto de fusión
- Agarosa para campos pulsados
- Enzima de restricción (*Apa* I en el caso de *A. baumannii*)
- Asa de siembra
- Estufa a 37 °C
- Eppendorf de 1,5 ml estériles
- Tubos de 50 ml estériles
- Pipetas y puntas desechables estériles
- Cutter
- Molde para realizar los dados de agarosa
- Molde para realizar el gel de agarosa
- Peine
- Placa calefactora/horno microondas
- Centrífuga
- Espectrofotómetro para medir la densidad óptica del cultivo (unidades Mc Farland)
- Equipo para electroforesis en campos pulsados
- Transiluminador



Soluciones

- Agua molecular autoclavada
- SE: 75 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 7.5
- Lisozima (10 mg/ml): disolver lisozima en 10 mM Tris-Cl (pH 8.0) inmediatamente antes de su uso (Asegurarse que el pH es 8.0 antes de disolver la proteina)
- Proteinasa K (50 mg/ml): disolver en solución estéril de 50 mM Tris (pH 8.0), 1.5 mM acetato cálcico. Dividir en alícuotas y guardar a -20°C.
- Lisis I: 6 mM Tris, 100 mM EDTA, 1M NaCl, 0,5 % w/v Brij 58, 0,2 % w/v sodium deoxycholato, 0,5 % N-lauroylsarcosina, 1mM MgCl₂.
- Lisis II: 1 % w/v N-lauroylsarcosine, 0,5 EDTA pH 9,5.
- TE: 10 mM Tris, 10 mM EDTA pH 7.5
- Etanol al 70 % para limpieza de superficies
- TBE 0,5 X (diluir de la solución stock 10X)
- Marcador de peso molecular grado PFGE
- Solución de tinción de geles (Gel Red, Bromuro de Ethidio...)



Protocolo

4.A: INCLUSION DE LAS BACTERIAS EN DADOS DE AGAROSA

1. Preparar los moldes para hacer dados, tapando con celo la parte de abajo. Preparar los tubos para medir la concentración y numerarlos.
2. Resuspender los microorganismos en 2 ml de tampón SE hasta alcanzar una turbidez de 2,3 a 2,7 Mc Farland.. Algunos microorganismos no crecen lo suficientemente bien en medio mínimo y requieren de medios enriquecidos. A estos se les harán 3 lavados previos antes de resuspender en 2 ml de SE.
3. Mezclar un mismo volumen (100-400 μ l) de suspensión bacteriana con agarosa de bajo punto de fusión al 2 % (agarosa disuelta en SE y conservada a 56-60 °C hasta la hora de mezclar (Se pueden preparar con anterioridad unos eppendorf con la agarosa, conservarlos en el frigorífico, y calentarlos para que se disuelva a la hora de hacer los dados).
4. Introducir la mezcla en los moldes (se recomienda 5 dados por muestra). Dejar solidificar los dados a 4 °C
5. Sacar los dados de los moldes y meterlos en los tubos (1 tubo por muestra) para hacer la lisis. Los dados que no se vayan a utilizar en el momento se pueden conservar en SE a 4 °C.

4.B: LISIS BACTERIANA

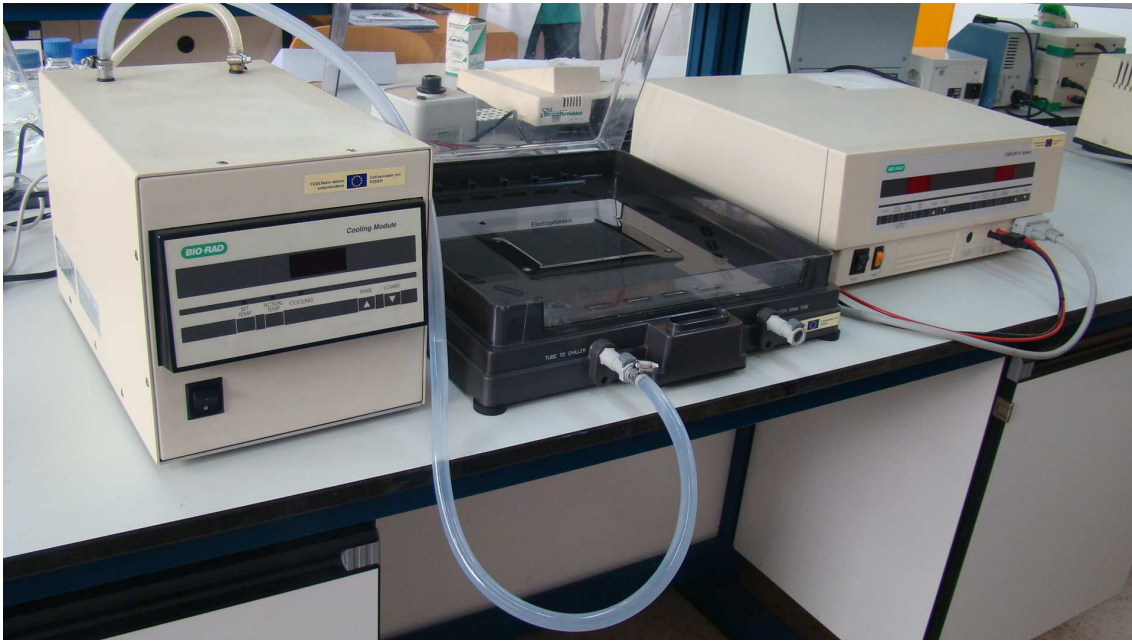
6. Incubar los dados en 3 ml de tampón de lisis I, que contendrá 500 μ g/ml de lizozima. Incubar a 37 °C con agitación o/n.. La lizozima se prepara en el momento, se pesa y se añade lo justo en el volumen de tampón.
7. Reemplazar el tampón de lisis I por 3 ml de lisis II. En eppendorf pequeños tendremos preparados stocks de proteinasa K (50 mg/ml); a cada tubo añadiremos 3,6 μ l de proteinasa K, tubos en los que ya hemos añadido el tampón de lisis II. Incubar a 53,7 °C toda la noche con movimiento.
8. Lavar los dados 3 veces con 3 ml de TE frío cada vez y cada hora. Conservar el TE y los botes lavados a 4 °C.
Cuando se va a hacer el 4º lavado, se añade sólo 2 ml de TE y se deja unos 45 minutos antes de seguir con la primera digestión.

4.C: DIGESTION DEL ADN DE CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

9. Cortar una porción de cada dado (1-2-mm) y colocar en tubos eppendorf. Limpiar bien con etanol tanto el cutter como la superficie donde se corta. Cada vez que se corta un dado, limpiar otra vez.
10. Cubrir los dados con 100 μ litros del tampón de reacción apropiado. El tampón suele venir a una concentración 10 X , luego hay que diluir en agua bidestilada estéril para tener la concentración adecuada . Incubar 1 hora a 4 °C
11. Reemplazar el tampón por 100 ml de tampón 1 X fresco y añadir la cantidad de enzima adecuada. En el caso de *A. baumannii* son 20 U de *Apa* I. Mezclar generosamente el contenido e incubar 4-5 horas sin agitación a la temperatura adecuada (en el caso de *Apa* I, 30 °C). También se puede dejar o/n.
12. Hacer una segunda digestión con *Apa* I igual que la anterior, y dejar 4h.
13. Tras la digestión se pueden guardar los dados 1 semana en TE a 4 °C.

4.D: SEPARACION DE FRAGMENTOS DE ADN MEDIANTE ELECTROFORESIS EN CAMPOS PULSADOS (PFGE)

14. Preparar el TBE 0,5 X (2 l mínimo para usar como tampón en la cubeta de electroforesis) y enfriarlo.
15. Preparar el gel con agarosa molecular normal en TBE 0,5 X al 1,2 %. Reservar un poco de agarosa (unos 2 ml) a 60 °C para sellar posteriormente los pocillos.
16. Meter los dados en los pocillos asegurándose que están íntegros. Hay que asegurarse que tocan la parte de delante del pocillo. Cargar también el marcador.
17. Sellar los pocillos con agarosa normal a 56 °C (que habíamos reservado antes). Dejar secar y retirar el excedente de agarosa.
18. Colocar el gel con la base negra en la cubeta, y programar las condiciones de electroforesis. En el caso de *A. baumannii*: rampas de 5- 35 segundos, durante 30 horas y a 14 °C, a un voltage de 200 V.



19. Teñir el gel durante 1 hora y desteñirlo en agua durante 40 minutos.
20. Visualizar el gel en el transiluminador

