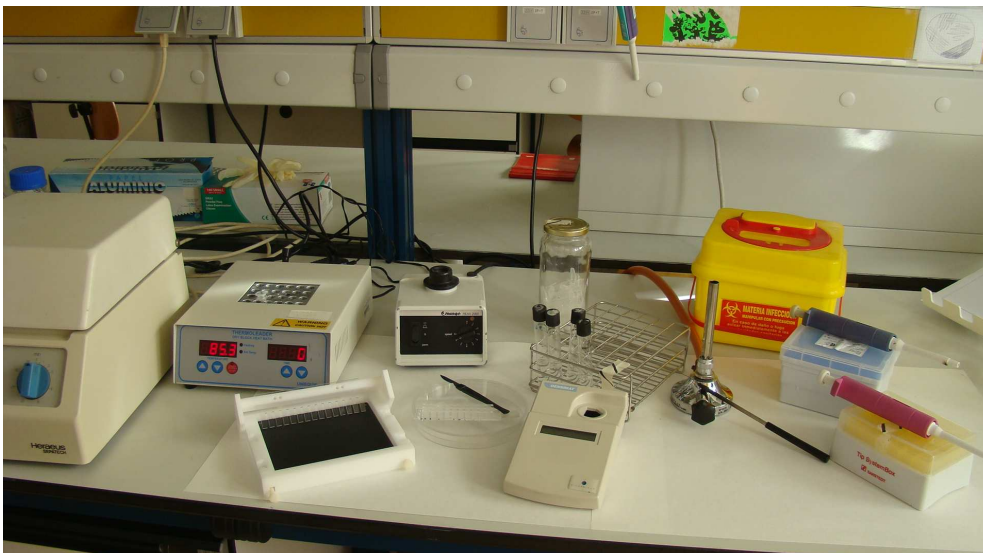


#### 4. ELEKTROFORESIA EREMU PULTSATUETAN (PFGE) BAKTERIO PATOGENOEN TIPAKETA GENETIKORAKO.

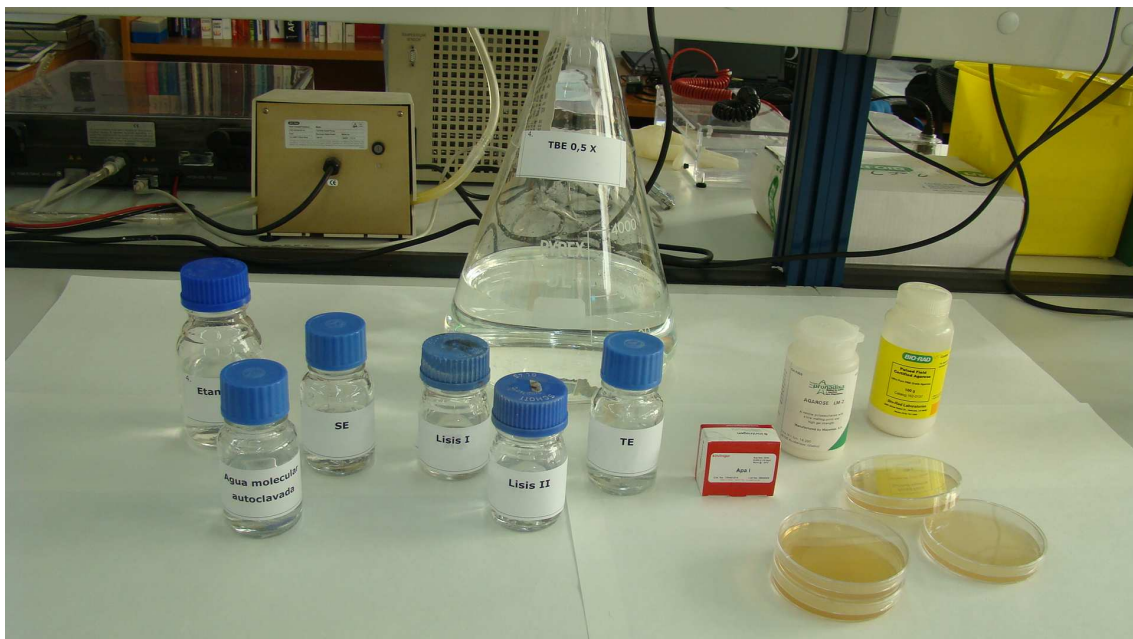
##### Materialak

- Agar plaketan hazitako bakterioak
- Molekular graduko agarosa
- Fusio-puntu beheko agarosa
- Eremu pulsatuentzako agarosa
- Murrizte-entzima (*Apa I A. Baumanni*in kasuan)
- Ereite uztaia
- Berogailua 37 °Ctan
- 1,5 ml-ko eppendorf esterilak
- 50 ml-ko hodi esterilak
- Pipetak eta erabili eta botatzeko punta esterilak
- *Cutter*
- Agarosa dadoak egiteko moldea
- Agarosa gela egiteko moldea
- Orrazia
- Plaka berogailua/mikrouhin labea
- Zentrifuga
- Kulturaren dentsitate optikoa neurtzeko espektrofotometroa (Mc Farland unitateak)
- Elektroforesia eremu pulsatuetan egiteko ekipamendua
- Transiluminadorea



## Disoluzioak

- Ur molekularra autoklabatuta
- SE: 75 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 7.5
- Liozima (10 mg/ml): Disolbatu liozima 10 mM Tris-Cl (pH 8.0) soluzioan erabiltzeko unean (egiaztatu soluzioaren pHa 8.0koa dela liozima disolbatu baino lehen )
- K Proteinasa (50 mg/ml): Disolbatu K proteina 50 mM Tris (pH 8.0), 1.5 mM kaltzio azetatoa soluzioan. Alikuotan banatu eta gorde -20°Ctan.
- Lisi 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 MgCl<sub>2</sub>.
- Lisi II: %1 w/v N-lauroylsarcosine, 0,5 EDTA pH 9,5.
- TE: 10 mM Tris, 10 mM EDTA pH 7.5
- %70 etanola gainazalak garbitzeko
- 0,5 X TBE (10X stock soluziotik diluitu)
- Pisu molekulerreko markatzailea PFGE gradukoa
- Gelak tindatzeko soluzioa (Gel Red, Ethidio Bromuroa...)



## Protokoloa

### 4.A: AGAROSA DADOEN PRESTAKUNTZA BAKTERIOEKIN

1. Prestatu dadoak egiteko moldeak zeloarekin azpikaldea estaliz. Prestatu saiodiak kontzentrazioa neurtzeko eta zenbakitu.
2. Mikroorganismoak birsuspenditu SE tanpoiaren 2 ml-tan 2,3 - 2,7 Mc Farland uhertasuna lortu arte. Mikroorganismo batzuk ez dira hazkuntza minimoetan ondo hazten eta hazkuntza inguru aberatsak behar dituzte. Kasu honetan aurreko 3 garbiketa egingo zaizkie SE 2ml-kin birsuspenditu baino lehen.
3. Nahastu bolumen berdina (100-400  $\mu$ l) bakterioen esekidura eta fusio-puntu baxuko agarosa %2 kontzentrazioan (SEn disolbatutako agarosa eta 56-60 °Ctan mantenduta nahasteko ordua heldu arte; agarosa aldeztetik prestatu ahal da eta hozgailuan mantendu , dadoak egiteko orduan berotuz).
4. Nahastea moldeetan sartu (5 dado/lagin egitea gomendatzen da). Dadoak solidifikatzen utzi 4 °Ctan.
5. Dadoak moldeetatik atera eta saiodietan sartu (lagin bakoitzetik prestatutako dadoa saiosi bakoitzean) lisia egiteko. Erabiliko ez diren dadoak SE soluzioan mantendu ahal dira 4 °Ctan.

### 4.B: BAKTERIOEN LISIA

6. Inkubatu dadoak liozima 500  $\mu$ g/ml daukan lisi I tanpoiaren 3 ml-tan gau osoa agitazioarekin. Liozimaren soluzioa erabiltzeko momentuan prestatzen da, pisatzen da eta tanpoiaren bolumen dagokiona botatzen da.
7. Lisi I tanpoia ordezkatu lisi II tanpoiaren 3 ml-ekin. Eppendorf txikietan K proteinasaren stock soluzioak edukiko ditugu (50 mg/ml); saiodi bakoitzean K proteinasaren soluziotik 3,6  $\mu$ l gehituko dizkiogu (lisi II tanpoia bota ondoren). Inkubatu 53,7 °Ctan gau osoa agitazioarekin.
8. Dadoak garbitu 3 aldiz 4 °Ctan dagoen TE 3 ml-ekin orduero. TE soluzioa eta saiodiak 4 °Ctan.  
4. garbiketa egiterakoan, TE 2ml bakarrik gehitzen da eta 45 minutu inkubatu lehenengo digestioarekin hasi baino lehen.

#### 4.C: DNAren DIGESTIOA MURRIZTE-ENTZIMEN BIDEZ.

9. Dado bakoitzetik 1-2-mm-ko zati bat moztu eta eppendorf baten ipini. Etanolarekin ondo garbitu bai *cutterra* bai dadoa mozteko erabiltzen den gainazala. Dado baikoitza moztu ondoren ondo garbitu
10. eppendorf bakoitzean 100 µl erreazio tanpoiarekin gehitu dadoa estali arte. Tanpoia 10 X kontzentrazioan egoten da, beraz ur bidestilatuan diluitu egin behar da dagokion kontzentrazioa lortzeko. Ikubatu ordu bat 4 °Ctan.
11. Tanpoia ordezkatu 1 X tanpoiaren 100 µl-rekin eta dagokion entzimaren kantitatea gehitu. *A. baumannii*-n kasuan *Apa I* entzimaren 20 U gehitu behar dira. Ondo nahastu eta inkubatu 4-5 ordu (edo gau osoan) agitaziorik gabe dagokion tenperaturan (*Apa I*: 30 °Ctan) .
12. Bigarren digestioa burutu *Apa I* entzimarekin (lehen bezela) eta inkubatu 4 ordu dagokion tenperaturan (*Apa I*: 30 °Ctan)
13. Digestioa egin eta gero dadoak aste bat gorde ahal dira TE soluzioan 4 °C tan.

#### 4.D: DNA FRAGMENTOEN BEREIZKETA EREMU PULTSATUEN ELEKTROFORESIAREN BIDEZ (PFGE)

14. 0,5 X TBE prestatu (gutxienez 2 l elektroforesi-kubeta betetzeko) eta hoztu.
15. gela prestatu agarosa molekularra erabiliz. (%1,2a, 0,5 X TBE tanpoian). Agarosa pixka bat gorde (2 ml gutxi gora behera) 60 °Ctan putzuak estaltzeko.
16. Dadoak putzuetan sartu (apurtu barik) putzuen aurreko aldea ikutuz. Markatzailea kargatu.
17. Bete putzuak aurretik gordetako agarosarekin. Lehortzen utzi eta soberako agarosa baztertu.
18. gela (bere base beltzarekin) kubetan kokatu, eta elektroforesiaren baldintzak programatu. *A. baumannii*in kasuan: 5- 35 segunduko arlanpak, 30 ordu eta 14 °Ctan, 200 V-ko boltajea.



19. Gela tindatu (aldez aurretik Gel Red bota ez badugu) ordu batean eta koloregabetu uretan 40 minututan.
20. Bistaratu transiluminadore batean.

