

1 MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 CEPAS BACTERIANAS

Las cepas empleadas se describen en la tabla 1, en general las cepas se cultivaron en medio LB (Luria Bertani) a 37 °C de 12 a 18 h, al menos que se indiquen otras condiciones de cultivo.

Tabla1. Descripción de las cepas de *Escherichia coli* usadas en este estudio.

Categoría	Cepa	Serotipo	Pilus (i)	Tipo de toxina	lngA probe	lngA PCR	Immunobl ot
Prototipo	E9034A	O8:H9	CS3	LT, ST	positivo	positivo	positivo
Control negativo	E9034P	O:H9	no determinado		negativo	negativo	negativo

1.2 SONDAS

Las sondas se obtuvieron por amplificación empleando la reacción en cadena de la polimerasa PCR.

Las condiciones fueron las que se describen en la figura 1, en la tabla 2 se encuentran los primers empleados para amplificar cada uno de los genes y el tamaño esperado de los mismos.

Tabla 2. Descripción de las sondas utilizadas en el estudio correspondientes a los genes lngA, lngB y región reguladora

Gen	Primer delantero	Primer reverso	Tamaño
LngA	5'-ACAGCGAGGTATGAGCCTTCTG-3'	5'-GCTCTGGCTAAGTCCGTTTCAG-3'	630 pb
LngB	5'-CACAGAGACAATTTTATCAAAAATGAGAGGC-3'	5'-CAGAACCACAAACCTAATACAGTAGAGTAT-3'	400 pb
región reguladora	5'-ATGCGGAATTCAGAAATCA-3'	5'-ACCTAACCCGGGAATCTTTCCG-3'	650 pb

1.3 EXTRACCIÓN DE RNA

1.3.1 KIT DE EXTRACCIÓN FAST RNA KIT BLUE™ DE Q-BIOGENE

Fue el primer kit en ser utilizado y su protocolo se encuentra descrito en el apéndice A.

1.3.2 EXTRACCIÓN POR TRIZOL™

La extracción se realizó con TRIzol (Total RNA Isolation Reagent), un reactivo que incorpora una mezcla estable de fenol, Gu SCN, colorante y estabilizantes que facilitan el aislamiento de RNA (Protocolo en el apéndice B).

Al protocolo se le realizaron las siguientes modificaciones con el fin de mejorar la extracción de RNA de nuestra bacteria de manera mucho más específica:

1. Todo el protocolo se llevó a cabo con las mismas proporciones pero con base en un volumen inicial de 400µl del reactivo TRIzol.
2. La bacteria se creció en medio sólido con el fin de obtener mayor volumen celular y después se tomó la muestra con agua tratada con DEPC.
3. Después de añadir el TRIzol a la muestra, se dejó a -71°C por una hora y después a 37°C durante 15 minutos, esto con el fin de provocar un choque térmico que facilitara el rompimiento de la célula.

1.3.3 KIT DE EXTRACCIÓN RNEASY® DE QIAGEN

El protocolo de este kit se encuentra descrito con precisión en el apéndice C.

1.4 HIBRIDACIÓN TIPO NORTHERN

Metodología utilizada para identificar secuencias específicas de RNA en las que las moléculas de RNA se separan por electroforesis, se transfieren a membranas de nylon y se identifican al hibridar con una sonda adecuada. Se utiliza transferencia alcalina downward con un buffer de transferencia (SCS 20X).

El gel para la separación por electroforesis se prepara con agarosa al 4.5%, MOPS 10X, formaldehído y agua tratada con DEPC. Las muestras de RNA se mezclan con el buffer NBSB y se dejan a 65°C por 10 minutos antes de cargar el gel.

La muestra transferida se fija en un aparato *crosslinker* que irradia rayos UV directamente a la membrana para que el RNA se fije en el nylon y se puedan marcar después con una sonda que en este caso es homóloga.

1.5 DOT BLOTTING

Las muestras no se separan por electroforesis, se ponen directamente sobre la membrana goteando la muestra logrando una mancha circular. La membrana se fija utilizando el *crosslinker* y el marcaje se hace con una sonda homóloga.

1.6 HIBRIDACIÓN CON SONDAS RADIOACTIVAS

- Prehibridización

Solución prehibridación: 1mM EDTA; 0.5M Na₂HPO, pH 7.2; 7% SDS

Incubar las membranas con la solución a 65°C por 5 minutos. Con el fin de que se empape la membrana con la solución.

Preparación de la sonda: 3µl de la sonda y 42µl TE, en baño maría durante 3 minutos.

Se añaden 5µl de la marca. Para precipitar la mezcla se añaden 5µl de tRNA (acarreador), 5µl de AcNa y 200µl de etanol. Se centrifuga la mezcla por 10 minutos.

- Hibridización

Se utilizó el kit *rediprime*TMII de amersham farmacia biotech para el marcaje aleatorio de las sondas (random priming).

Se añade la sonda desnaturalizada y se remueven las burbujas. Se deja hibridando de 4 a 24 horas a 65°C con agitación.

- Lavados

Se realizan 3 lavados con la siguiente solución: 20X SDS; 10% SDS y agua destilada.

Las membranas están listas entonces para la autoradiografía. Se deben colocar en una bolsa sellada con el fin de que la membrana permanezca húmeda y se puedan realizar más hibridaciones con las mismas muestras.

- Revelado

Las membranas se colocan junto con el film y se dejan a -71°C durante el tiempo necesario (de 1 a 8 días) dependiendo de la intensidad del marcaje. Se revelan las placas en el cuarto oscuro y se revisan los resultados.

1.7 VARIACIONES EN LOS MEDIOS DE CULTIVO

Con el fin de encontrar si hay o no medios de cultivo que cambien el tiempo de expresión de los genes estructurales del pili Longus se probaron 9 variaciones en el medio de cultivo sólido Luria Bertani (LB). Las variaciones hechas en los medios de cultivo se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Variaciones en los medios de cultivo

Fuente de carbono	PH	Temperatura
Glucosa	6.5 MES	30°C
Galactosa	7 MOPS	36°C
Glicerol	7.5 HEPES	50°C

Para el control del pH se utilizaron los siguientes buffers: MOPS para un pH = 7, MES para un pH = 6.5 y HEPES para un pH= 7.5.

1.8 MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES UTILIZADAS

1.8.1 MEDIO LURIA BERTANI (LB)

Este medio se preparó con la siguiente receta: cloruro de sodio (10g), extracto de levadura (5g), peptona de caseína (10g), agar (15g) y aforando con agua destilada a 1 litro. Todos los medios de cultivo fueron esterilizados antes de su uso.

1.8.2 MOPS 10x

Este buffer fue el utilizado para el corrimiento de los geles con las muestras de RNA y se preparó con las siguientes cantidades. MOPS (167.44g), NaOAc (27.2ml), Na₂EDTA (14.88g) y aforando a 4 litros con agua destilada.

1.8.3 GEL DE AGAROSA CON FORMALDEHÍDO

El gel para el corrimiento de las muestras de RNA contiene formaldehído que ayuda a mantener la integridad del ácido nucleico y su receta es la siguiente: agarosa (0.3g), agua con DEPC (22ml), formaldehído (3ml) y MOPS 10X (5ml).

1.8.4 CONCENTRACIONES DE NUTRIENTES EN LOS MEDIOS DE CULTIVO

Glucosa	25mM	MOPS	100mM
Glicerol	50mM	HEPES	100mM
Galactosa	25mM	MES	100mM