

1 RESULTADOS

Empleando el RNA kit Blue™ se realizaron extracciones de RNA de la cepa E9034A cada hora por 8 horas en medio de cultivo LB incubando a 37°C. Todas las extracciones se realizaron por duplicado. Con este RNA se realizó una hibridación tipo Northern empleando como sonda un fragmento del gen *lngA* (600 pb). Los resultados se presentan en la figura 1 en la que observamos que la transcripción de *lngA* se presenta entre el tiempo cero y las primeras dos horas de incubación (Figura 1). Aunque la concentración de RNA empleada para esta hibridación no fue la misma en todos los tiempos, los datos se consideraron por ser preliminares.

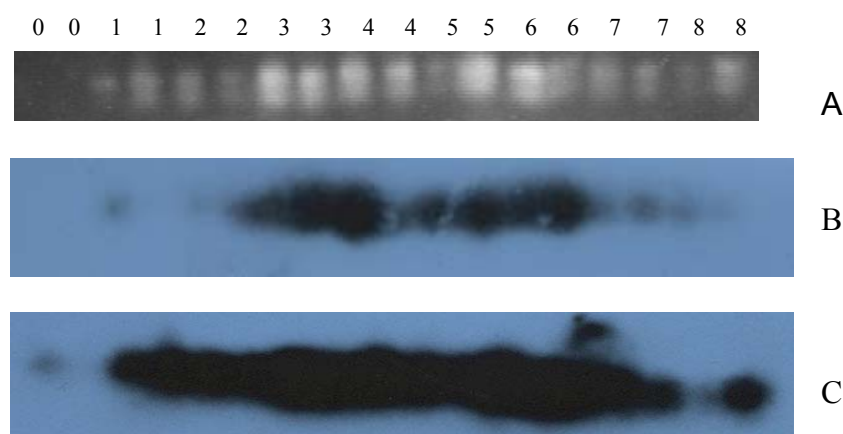


Figura 1. Primera hibridación. En el panel A se presenta una fotografía de RNA ribosomal, como se puede observar no se colocó la misma concentración de RNA en cada carril, en el tiempo cero no se observa RNA. Panel B muestra la radiografía obtenida después de exponer la placa radiográfica por un día a la membrana. Panel C muestra la radiografía obtenida después de exponer la placa radiográfica por cuatro días a la membrana. Los números corresponden al número de muestra. Todas las extracciones se realizaron por duplicado.

Este primer resultado supone que la expresión de *lngA* se da dentro de la primera hora de incubación por lo que las siguientes extracciones se realizaron a intervalos de 20 minutos durante dos horas. Desdichadamente el RNA kit Blue™ no funcionó para las siguientes extracciones.

Se hicieron extracciones de prueba con TRIzol™. Durante las pruebas encontramos que la lisis celular no era completa por lo que se modificó el protocolo

realizando un choque térmico que completara el rompimiento celular. Los geles mostraron un RNA algo degradado aunque las dos bandas correspondientes al RNA ribosomal se pudieron observar. Se prosiguió con la hibridación tipo Northern (resultados no mostrados).

Al tratarse de una cepa clínica, el plásmido que codifica para la formación de Longus es natural por lo que no tiene una resistencia a antibióticos asociada con la que pudiéramos garantizar la presencia del plásmido. Por lo que en condiciones del laboratorio en la que a la bacteria se le dan todos los requerimientos necesarios el plásmido se puede perder fácilmente al no ser vital para la bacteria.

A manera de control y con el fin de determinar la causa de la falta de hibridación, se realizó:

1. Un RTPCR de lngA, pero no se amplificó *lngA*, empleando como control positivo un PCR previo que resultó lngA positivo.
2. PCR de la cepa a partir de la cual se hicieron las extracciones de RNA, tampoco amplificó lngA.
3. PCR de un banco de cepas que resultaron positivas para lngA mediante inmunodetección, solo algunas de ellas amplificaron *lngA*.

Se eligió una de estas cepas para nuevamente extraer RNA. Además se realizó un PCR de cada cultivo antes de las extracciones para asegurar la presencia del lngA en todas las extracciones.

En esta ocasión el RNA se extrajo con éxito pero los geles mostraron que estaba degradado (Figura 3), y que no se puso la misma concentración de RNA en cada carril. Aún así se realizó el marcaje y se revelaron las placas a los 7 días de exposición sin obtener resultados positivos.

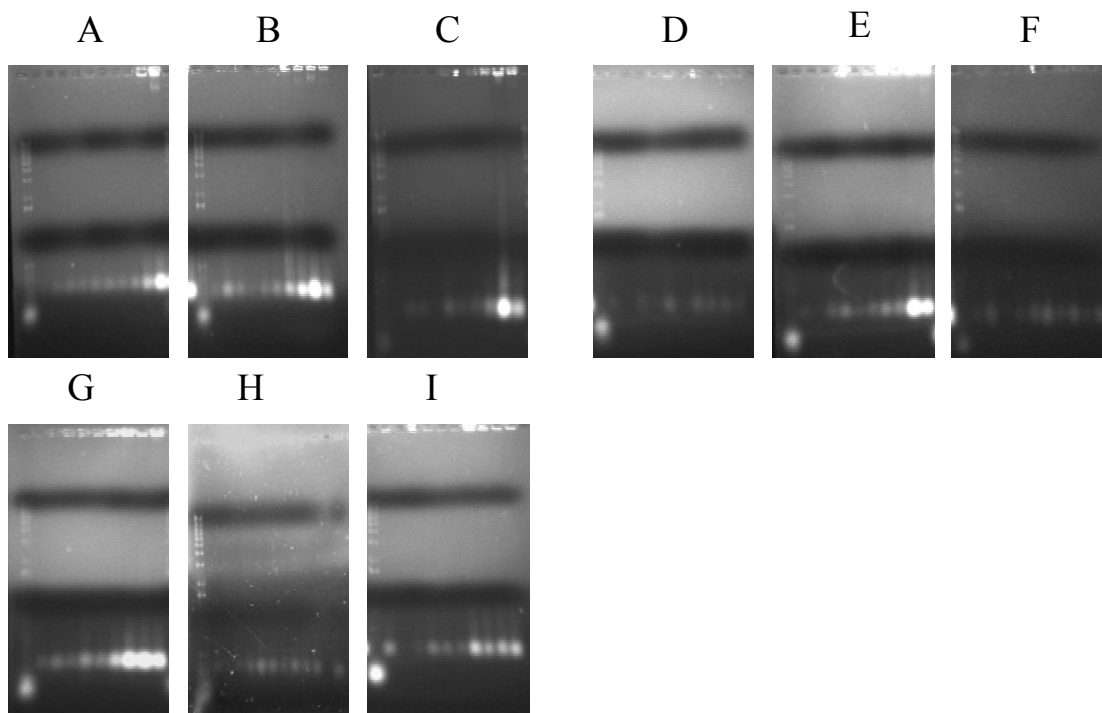


Figura 3. Segunda Extracción con TRIzol. En ningún carril se colocó la misma concentración de RNA En el panel A se presenta una fotografía de RNA ribosomal de E9034A en LB a 30°C. Panel B muestra RNA ribosomal en LB a 42°C. Panel C muestra RNA ribosomal en LB a 50°C. Panel D muestra RNA ribosomal en LB y MOPS (100mM). Panel E en LB y HEPES (100mM). Panel F en LB y MES (100mM). Panel G en LB y glucosa (25mM). Panel H en LB y galactosa (25mM). Panel I en LB y glicerol (50mM) Todas las extracciones se realizaron por duplicado cada 30 minutos a partir de la incubación.

Al observar que el ARN estaba degradado y con el fin de darnos una idea de en que medio se daba la expresión de lngA al incubar durante una hora, se realizó un dot blot (Figura 4) con las muestras de RNA de la segunda extracción con TRIzol. Se colocaron las muestras de una hora de incubación en cada una de los medios de cultivo por duplicado. Al marcar la membrana se observaron resultados positivos en todos los puntos. El resultado se presenta en la figura 4.

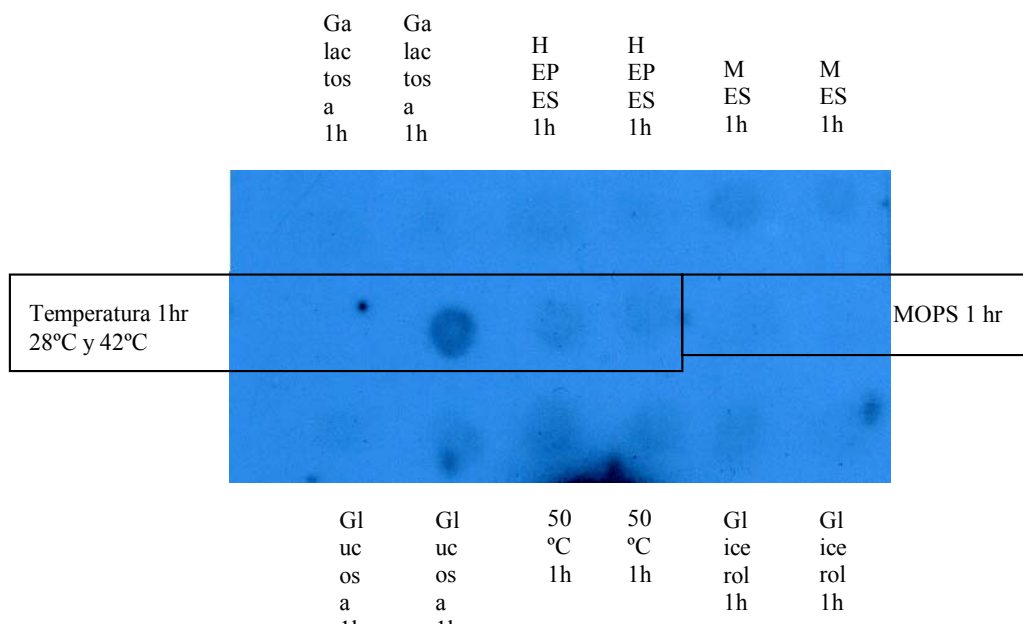


Figura 4. Dot blot. Se muestra la radiografía obtenida después de exponer la placa radiográfica por cuatro días a la membrana. Las muestras son de la segunda extracción con TRIzol a la hora de crecimiento en los diferentes medios de cultivo.

En este caso aunque en el dot blot se observó hibridación en todas las muestras, siendo la muestra correspondiente a una hora de incubación en LB a 42°C la que dio mejor señal, no se trata de un resultado confiable ya que nuevamente no se cuantifico el RNA que se colocó en cada muestra.

Finalmente se hizo una última extracción con el kit RNeasy® con un intervalo de media hora entre el tiempo cero y las dos horas de incubación empleando únicamente medio LB. En este caso como se observa en la figura 5 el RNA no se degradó. La hibridación con la sonda de *lngA* mostró resultados sorprendentes. Las bandas de RNA ribosomal se marcaron completamente. En un segundo intento, con menos tiempo de exposición, se observó menos ruido en el film, pero aún así no se pudo ver una hibridación que correspondiera al *lngA* de manera clara, como se observa en la figura 5.

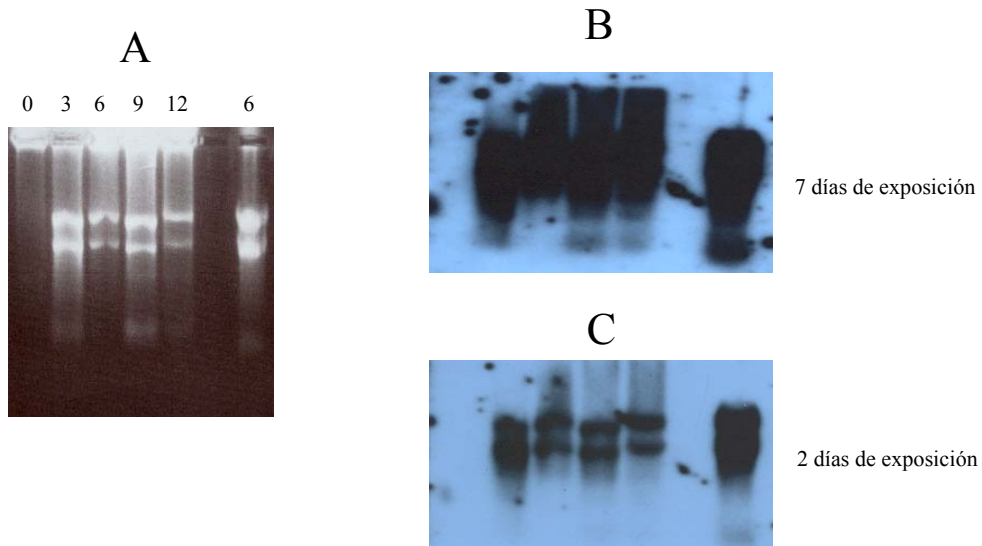


Figura 5. Extracción con RNeasy e hibridación. En el panel A se presenta una fotografía de RNA ribosomal. No se realizaron extracciones por duplicado y las extracciones fueron hechas cada media hora. En el tiempo cero no se observa mRNA. Panel B muestra la radiografía obtenida después de exponer la placa radiográfica por siete días a la membrana. Panel C muestra la radiografía obtenida después de exponer la placa radiográfica por dos días a la membrana. Los números corresponden al número de muestra.

El trabajo realizado hasta ahora aun no nos indica bajo que condiciones nutricionales y en que tiempo se expresa el gen *lngA*, sin embargo este trabajo marca un precedente que facilitara metodológicamente la realización de experimentos posteriores en los que se espera determinar las condiciones bajo las cuales se regula la expresión de *lngA*.