

5. DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA MEDIANTE HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE ADN

Materiales

- Eppendorf de 1,5 ml estériles
- Eppendorf de pared fina para PCR
- Puntas de pipeta estériles desechables
- Guantes
- Campana de flujo laminar
- Termociclador
- Transiluminador
- Toallitas de papel absorbente
- Filtros de nylon
- Cubeta para realizar la transferencia, en la que entre holgadamente el soporte para colocar el gel.
- Soporte para colocar el gel y realizar la transferencia, que debe ser más ancho y largo que el gel.
- Papel Whattman 3MM
- Papel de aluminio
- Agarosa
- Cubeta de electroforesis
- Cutter
- Horno de hibridación
- Parafilm
- Bolsa de hibridación
- Selladora
- Plataforma rotatoria
- DNA de esperma de salmón

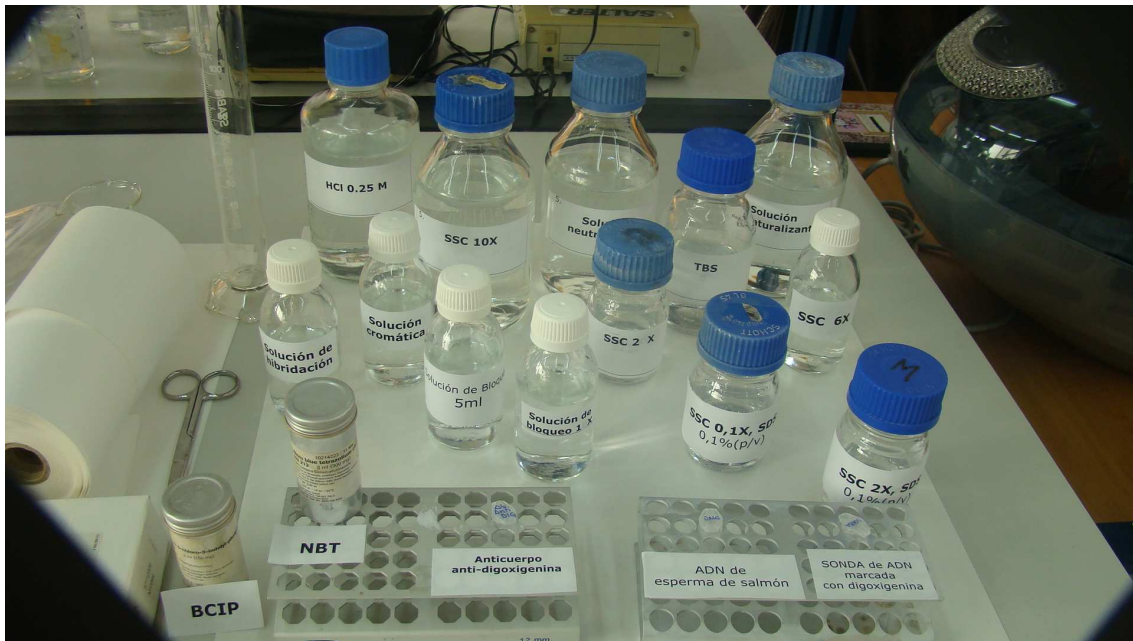
Soluciones

- Agua molecular autoclavada
- Tampón *Taq polimerasa* 10X
- Cloruro de magnesio 50 mM
- Iniciadores
- dATP, dGTP, y dCTP: 0.2 mmol/l de cada uno

- DIG-11-dUTP: 0.07 mmol/l
- dTTP: 0.13 mmol/l
- Agua bidestilada
- *Taq polimerasa* 5 U/ μ l (INVITROGEN)
- Marcador de peso molecular marcado con digoxigenina
- TBE 1X: se prepara por dilución de la solución stock de TBE 10X.
- Muestras
 - Acetato sódico 3M (p.H 5.2): Disolver 40.8 g de acetato sódico en agua destilada. Ajustar a pH 5.2 con ácido acético glacial. Completar hasta un volumen de 100ml y autoclavar.
- Etanol helado
 - TE (pH 8.0): 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA. Autoclavar y mantener a temperatura ambiente.
- SSC 20X: Disolver 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato sódico en agua destilada. Ajustar el volumen a 1 litro y autoclavar.
- Solución de HCl 0.25 M: Mezclar 21.5 ml de HCl 11.6 M (d. 1.18) con 978.5 ml de agua destilada. Mantener a temperatura ambiente.
- Solución desnaturalizante: 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH
- Solución neutralizante: 0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl
- Formamida desionizada: Mezclar 10 ml de formamida con 5-10 g de resina de intercambio iónico. Mezclar durante 30 minutos, filtrar con papel Whatman 3MM. y conservar a - 20 °C.
- Solución de hibridación: 50 %: 5 \times SSC, solución de bloqueo 2% (p/v), N-lauroylsarcosina, sal sódica 0.1 % (p/v) , SDS 0.02 % (p/v); 50 %:Formamida desionizada. A la cantidad necesaria de esta solución que se va a utilizar en el protocolo se le añade, en el momento de su utilización, 100 μ g de ADN de esperma de salmón recién desnaturalizado (calentando a 100 °C durante 10 minutos).
- Solución de bloqueo 10 X: 10 g de reactivo de bloqueo, 100 ml de tampón ácido maléico. Se prepara con agitación y calentando en el microondas. Se conserva a -20 °C. Diluir a 1 \times en el momento de su uso.
- Anticuerpo antidigoxigenina (Roche diagnostics)
- Tampón de ácido maleico: 11.6 g de ácido maleico, 30 ml NaCl 5M, agua destilada csp 1000 ml. Ajustar pH 7,5

- TBS: 0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl; pH 7.5

- Solución cromática: 0.1 M Tris-HCl pH 9.5; 0.1 M NaCl. Preparar en el momento de usar y en un recipiente recubierto por papel de aluminio (no le puede dar la luz), añadir a 10 ml de la solución anterior 50 μ l de NBT y 37.5 μ l de BCIP (Roche diagnostics)

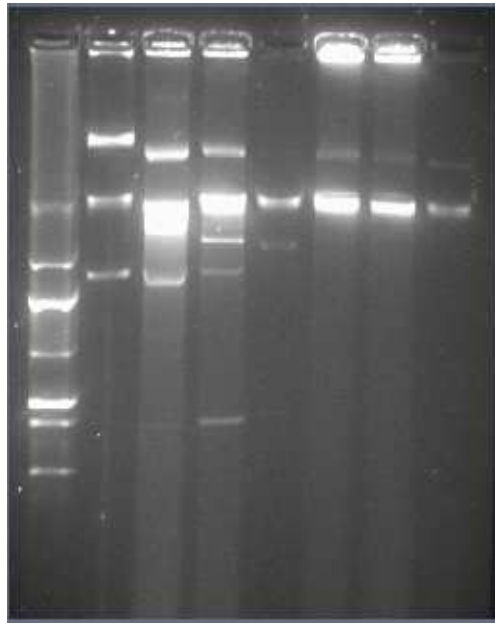


Protocolo

5.A: TRANSFERENCIA DE ADN POR EL MÉTODO *SOUTHERN TRANSFER*

Mediante esta técnica los fragmentos de ADN que han sido separados dependiendo de su tamaño por electroforesis son desnaturalizados, transferidos a un filtro de nylon e inmovilizados. La posición relativa de los fragmentos de ADN en el gel se conserva durante su transferencia al filtro.

1. Fotografiar el gel después de realizar la electroforesis para poder calcular el tamaño y posición de las bandas de ADN.



2. Colocar el gel en una bandeja de cristal y recortar todas las zonas inservibles.
3. Sumergir el gel en una solución de HCl 0.25 M durante 15 min
4. Desnaturalizar el ADN sumergiéndolo el gel en diferentes volúmenes de solución desnaturalizante durante 2×15 min a temperatura ambiente con agitación.
5. Neutralizar el gel sumergiéndolo en diferentes volúmenes de solución neutralizante durante 2×15 min a temperatura ambiente.
6. Cubrir un soporte con papel Whatman 3 MM. El soporte debe ser más ancho y más largo que el gel. Colocar este soporte dentro de una bandeja. Añadir un volumen de $10 \times$ SSC humedeciendo el papel Whatman 3 MM que cubre el soporte y de manera que la parte inferior del mismo quede bien cubierta. Eliminar todas las burbujas que haya entre el soporte y el papel Whatman 3 MM.
7. Colocar un borde de parafilm (de manera que el gel encaje en el recuadro formado, un poco por encima de los bordes del parafilm) y colocar el gel sobre el papel Whatman 3 MM. Hay que asegurarse de que no haya burbujas entre el papel Whatman 3 MM y el gel.
8. Cortar un trozo de filtro de nylon que sea 1-2 mm más largo que el gel en ambas dimensiones. Usar guantes para manejar el filtro y no tocarlo nunca con las manos..
9. Sumergir el filtro en $2 \times$ SSC durante 2- 3 min

10. Colocar el filtro humedecido sobre el gel, de tal forma que un borde esté sobre la línea de pocillos del gel. Tener cuidado de extraer todas las burbujas que se hayan atrapado entre el gel y el filtro.

11. Humedecer 3 trozos de papel Whatman 3 MM (del mismo tamaño que el gel), en $2 \times$ SSC y colocarlos sobre el filtro de nylon. Quitar todas las burbujas.

12. Cortar una torre de toallitas de papel (5- 8 cm de altura). Colocarlas sobre el papel Whatman 3 MM. Poner una tapa de cristal encima del todo, y colocar un peso de 500 g. El objetivo es que el líquido de la bandeja suba a través del gel y del filtro, de manera que los fragmentos de ADN son eluidos del gel y transferidos al filtro de nylon. El gel se rodea con un borde de parafilm para evitar cortocircuitos de fluido entre las toallitas de papel y el papel Whatman 3 MM de debajo del gel.

13. La transferencia se produce en 12 -24 horas. A medida que las toallitas se humedecen deben ser reemplazadas. El rango de transferencia del ADN depende del tamaño de los fragmentos y de la porosidad del gel. Los fragmentos pequeños (< 1 kb) se transfieren de un gel de agarosa al 0.8 % en 1/2 horas, mientras que los de > 5 kb lo hacen en 15 o más horas.

14. Una vez transcurrido el tiempo retirar las toallitas y retirar el filtro.

15. Sumergir el filtro en $6 \times$ SSC a temperatura ambiente durante 5 min y dejar secar sobre una hoja de papel Whatman 3 MM.

16. Someter el filtro, por el lado del DNA, a radiación UV durante 2 min

Si el filtro no va a ser usado inmediatamente para la hibridación puede ser guardado a temperatura ambiente entre hojas de Whatman 3 MM.

5.B:HIBRIDACIÓN CON LA SONDA DE ADN MARCADA CON DIGOXIGENINA

Obtención de la sonda marcada con digoxigenina-dUTP

1. Se prepara una master con las siguientes concentraciones de nucleótidos:

- dATP, dGTP, y dCTP: 0.2 mmol/l de cada uno
- DIG-11-dUTP: 0.07 mmol/l
- dTTP: 0.13 mmol/l
- agua bidestilada estéril

2. El resto de los componentes de la PCR se añaden de la forma habitual. Como ADN molde se utiliza el ADN de la cepa control del gen del que se quiere hacer la sonda, y se utilizan los primers correspondientes, así como las correspondientes condiciones en el termociclador.

3. El amplificado se purifica precipitando el ADN mediante la adición de 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M y 2 volúmenes de etanol helado. Dejar precipitar durante toda la noche a - 20 °C. Se centrifuga a 12000 rpm durante 20 min y se resuspende en TE.

Para comprobar que realmente hay sonda y su cantidad, se mide el ADN en un espectrofotómetro. Posteriormente hay que ver si la sonda está marcada y en qué cantidad. Para ello se corta un trozo de filtro de nylon, se humedece en $2 \times \text{SSC}$, y se aplican diluciones seriadas de la sonda. Se revela el gel según el protocolo que se describe en el procedimiento de hibridación y se observa la aparición de puntos de color azul de mayor a menor intensidad, según se haya aplicado mayor o menor cantidad de sonda. Para saber la cantidad de sonda añadir se comparan las muestras con un patrón del que se conoce la concentración.

Hibridación

El proceso de hibridación se divide en 3 pasos: prehibridación, hibridación y lavados.

1. Prehibridación. Se coloca el filtro en una bolsa de plástico sellada con al menos 20 ml de solución de hibridación por filtro de 100 cm², y se incuba a 42 °C durante un mínimo de 1 hora, homogeneizando la solución de vez en cuando.

2. Hibridación. Reponer la solución de hibridación con 2.5 ml de solución de hibridación por filtro de 100 cm² a la que se le añade, además del esperma de salmón recién desnaturalizado, la sonda de ADN también recién desnaturalizada (calentando a 100 °C durante 10 minutos). La concentración óptima de ADN marcado en la mezcla de hibridación depende de la cantidad de ADN por detectar en el filtro. Generalmente se usan 10 -15 ng de sonda marcada por cada ml de solución de hibridación. Incubar al menos 6 h a 42 °C, redistribuyendo la solución ocasionalmente.

3. Lavados. Una vez transcurrido el tiempo, se recoge el filtro y se lava a temperatura ambiente con al menos 50 ml de solución. Se realizan 2 lavados de 15 minutos con una solución 2 X SSC, SDS 0.1 % (p/v), y posteriormente otros 2 lavados de 30 minutos a 68 °C con una solución 0.1 X SSC, SDS 0.1 % (p/v).

Detección de los híbridos

1. Incubar el filtro durante al menos 30 min en 20 ml de solución de bloqueo 1 X.
2. Lavar el filtro 3 veces durante 10 minutos con 50 ml de TBS.
3. Centrifugar el anticuerpo antidigoxigenina durante 5 minutos antes de usar.

Diluir el anticuerpo en la solución de bloqueo en proporción 1: 5000. Incubar el filtro durante 1 h en 20 ml (por filtro de 100 cm²).

4. Lavar 3 veces durante 10 minutos con aproximadamente 50 ml de TBS

5. Cubrir el filtro con solución cromática y dejar actuar hasta que se forme el color (comienza al cabo de unos minutos y la reacción se completa en 1 día). El recipiente o bolsa en la que se deposite el filtro debe estar recubierto totalmente con papel de aluminio de manera que no le de la luz. No agitar.

6. Una vez completada la reacción se lava el filtro en agua durante 5 minutos. Fotografiar el filtro húmedo. Dejar secar a temperatura ambiente sobre papel Whatman 3 MM. (Los colores pierden un poco al secarse)

