

5.1

El ensayo SOS Chromotest en *Escherichia coli*

Introducción

La pérdida de estabilidad genómica tiene efectos negativos sobre la sobrevivencia de los seres vivos. Este fenómeno es ocasionado principalmente por factores ambientales con potencial genotóxico. Dado que desde sus comienzos, los seres vivos sobre la tierra han estado sometidos a condiciones de estrés genotóxico, a lo largo del proceso evolutivo, diferentes mecanismos celulares han aparecido y mantenido para hacer frente a estas condiciones de estrés. Inicialmente descubierta en *E. coli* y luego en otros grupos de Bacteria, la Respuesta SOS es un grupo de genes inducible involucrados en la regulación del ciclo celular, la reparación del ADN y el aumento de la variabilidad genética. Los genes SOS se encuentran bajo el control transcripcional de los genes *suIA* y *recA*; y se activan como respuesta al daño genético que inhibe la replicación del ADN. Valiéndose de este mecanismo y mediante ingeniería genética, Quillardet et al., (1982) desarrollan el ensayo SOS Chromotest para la evaluación y cuantificación del potencial genotóxico de muestras desconocidas. El presente procedimiento establece los pasos necesarios y obligatorios para realizar este ensayo, variante microvolumétrica, para la determinación de efectos genotóxicos de diferentes tipos de muestras como agua, extractos de suelo, sangre y orina.

Principio del ensayo

Como sistema de estudio se utiliza la enterobacteria *Escherichia coli*, cepa PQ-37 de genotipo *F⁻ thr leu his-4 pyrD thi galE galK or galT lac ΔU169 srl300::Tn10 rpoB rpsL rfa trp::Muc⁺ sfiA::Mud(Ap, lac)cts*, la cual contiene una fusión transcripcional en la que el gen que codifica para la enzima β-galactosidasa se expresa bajo el control del promotor del gen *suIA* involucrado en la respuesta SOS de bacterias. De esta forma la actividad específica β-galactosidasa es un indicador del nivel de inducción de la respuesta SOS; y por tanto, un indicador indirecto del daño producido al ADN.

Definiciones

Control (+). Usado como indicativo de la inducción del gen *suIA* en la cepa PQ-37. Se realiza con agentes genotóxicos de referencia reportados en la literatura.

Control (-). Solo contiene células y agua, permite conocer la actividad enzimática basal de la célula pues no provoca ningún tipo de lesión sobre ésta.

Placebo. Solvente en el cual se prepara la muestra ensayada.

Control (Placebo). Permite definir si el efecto encontrado en el ensayo es producto de la muestra o del solvente en el que ésta se encuentra diluida. Contiene las células y el solvente.

Actividad enzimática específica. Se define como la cantidad de enzima, la cual forma un nano-mol de 4-nitrofenol en un minuto de ensayo a una temperatura de 28°C y un pH 7. Se expresa en U/mg de proteína.

Mezcla S9. Es un homogenizado de hígado de rata que aporta las enzimas microsomales hepáticas que metabolizan aquellas sustancias que necesitan ser modificadas (pro-genotóxico) para que se evidencie su efecto genotóxico en el ensayo.

Preparación de muestras

Dependiendo de la muestra esta puede tener diferentes tipos de procesamiento para el ensayo. **Agua y Orina.** Las muestras son centrifugadas a 12000rpm en tubos de microcentrífuga durante 15min, y el sobrenadante es traspasado a un nuevo tubo de microcentrífuga estéril, y conservado a -20°C hasta su uso. **Sangre.** Las muestras son centrifugadas a 12000rpm en tubos de microcentrífuga durante 15min, para extracción del plasma. Una vez colectado, éste es conservado en tubos de microcentrífuga estériles hasta su uso a -20°C. **Tierra.** Las muestras de tierra son disueltas por agitación en vortex en diferentes solventes dependiendo del tipo de contaminante que se desee analizar y luego son centrifugadas a 12000rpm en tubos de microcentrífuga durante 15min y el sobrenadante es traspasado a un nuevo tubo de microcentrífuga estéril, y conservado a -20°C hasta su uso.

Procedimiento

I. Esquema general de la estrategia metodológica:

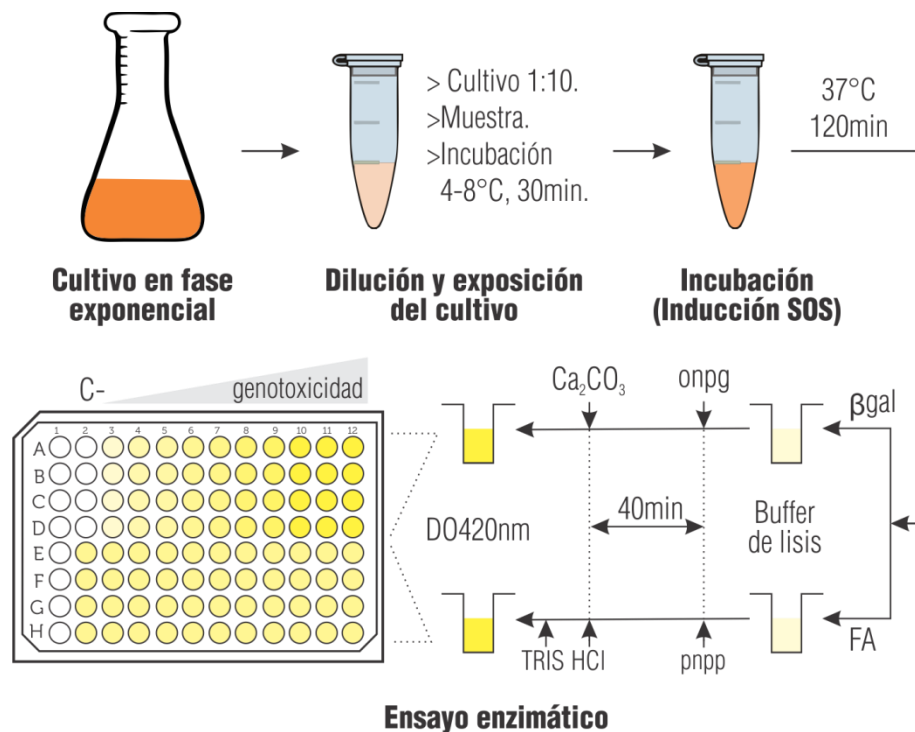


Figura 1. Estrategia metodológica para la realización del ensayo SOS Chromotest en *Escherichia coli* PQ37.

II. Conservación de la cepa microbiana:

Conservación en glicerol

- Inocular 2ml de cultivo en un frasco con 20ml de medio LB suplementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de Ampicilina y 17 $\mu\text{g/ml}$ de Tetraciclina, e incubar durante ~14h a 37°C.
- Verificar la pureza del cultivo mediante tinción de Gram.
- Inocular 7ml del cultivo en un frasco que contenga 3ml de glicerol.

- d) Mezclar bien el cultivo con el glicerol.
- e) Distribuir las células en tubos de microcentrífuga estériles a razón de 1ml por tubo.
- f) Rotular adecuadamente (nombre, fecha y método de conservación).
- g) Conservar a -80°C .
- h) Chequear la viabilidad del cultivo anualmente.

> Este método permite la conservación de la cepa *Escherichia coli* PQ37 por un periodo aproximado de 5 años.

Conservación en agar semi-sólido

- a) Inocular 2 ml de cultivo en un frasco con 20 ml de medio LB suplementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de Ampicilina y 17 $\mu\text{g/ml}$ de Tetraciclina, e incubar durante $\sim 14\text{ h}$ a 37°C .
- b) Verificar la pureza del cultivo mediante tinción de Gram.
- c) Inocular 2,5 ml del cultivo en un frasco que contenga 2,5 ml de agar semi-sólido.
- d) Mezclar bien el cultivo con el agar semi-sólido.
- e) Incubar durante $\sim 14\text{ h}$ a 37°C .
- f) Rotular adecuadamente (nombre, fecha y método de conservación).
- g) Conservar a -80°C .
- h) Chequear la viabilidad del cultivo anualmente.

III. Chequeo del genotipo de la cepa *Escherichia coli* PQ-37:

- a) Inocular 200 μl de cultivo de la cepa conservada en glicerol en un frasco con 20 ml de medio LB suplementado con 50 $\mu\text{g/ml}$ de Ampicilina y 17 $\mu\text{g/ml}$ de Tetraciclina, e incubar durante $\sim 14\text{ h}$ a 37°C .
- b) Sembrar el cultivo crecido en dos cajas de medio Agar-McConkey, una suplementada con 50 $\mu\text{g/ml}$ de Ampicilina y 17 $\mu\text{g/ml}$ de Tetraciclina y la otra con 50 $\mu\text{g/ml}$ de Ampicilina, 17 $\mu\text{g/ml}$ de Tetraciclina y 1 $\mu\text{g/ml}$ de bleomicina. La siembra debe desarrollarse por estría.
- c) Al día siguiente observe las características morfológicas de las colonias. Las colonias de la cepa *Escherichia coli* PQ37 en medio Agar-McConkey suplementado con bleomicina deben mostrar un color entre rosa y rojo vino. Esto debido a la inducción del gen reportero (β -galactosidasa) en presencia de bleomicina, que permite la fermentación de la Lactosa, produciendo acidificación del medio y viraje del indicador, de rojo neutro a rojo vino. Como la inducción de la enzima depende de la presencia del agente genotóxico, la bacteria en su ausencia no puede fermentar la Lactosa. En su lugar, ésta utiliza las peptonas como fuente de carbono, basificando y coloreando el medio de amarillo anaranjado.

> El medio Agar-McConkey es un medio selectivos para coliformes debido a la presencia de sales biliares y violeta cristal que impiden el crecimiento de bacterias Gram-positivas, pero permite el crecimiento de enterobacterias.

Conservación cultivo de trabajo:

El cultivo de la cepa sujeto al chequeo de genotipo que está en buen estado se puede mantener en tubo de 15 ml con tapa rosca a $4-8^{\circ}\text{C}$, y usarse como un cultivo de trabajo para desarrollar ensayos de genotoxicidad. Bajo tales condiciones la cepa *Escherichia coli* PQ37 puede mantenerse por cerca de un mes.

IV. Obtención cultivo en fase exponencial:

- Se toma cultivo de trabajo (200 µl de cultivo conservado en glicerina ó 2 ml de cultivo de trabajo) para inocular en 20 ml de medio LB suplementado con 50 µg/ml de Ampicilina y 17 µg/ml de Tetraciclina. Entonces, éste se incuba durante ~14 h a 100 rpm a una temperatura de 37°C.
- Al día siguiente, se inoculan 2 ml del cultivo crecido en un frasco de cultivo con 20 ml de medio LB fresco suplementado con 50 µg/ml de Ampicilina y 17 µg/ml de Tetraciclina, y se incuba hasta una DO600nm de 0.4 bajo las condiciones anteriormente descritas. El cultivo alcanzará esta DO en un tiempo aproximado de 2 horas.

> Más de 2 h de incubación para alcanzar la fase exponencial podría indicar mal estado fisiológico de la cepa bacteriana de trabajo.

V. Preparacion de las diluciones seriadas del compuesto a evaluar. Usar tubos de microcentrífuga con 5 µl de la muestra a evaluar. Dado que a estos tubos se les añadirá 150 µl de cultivo en fase exponencial diluido, la concentracion del compuesto a evaluar debe estar 30 veces concentrada, de tal forma que al añadir las cultivo, el compuesto quede a la concentración que se desea evaluar.

VI. Dilución del cultivo en fase exponencial y exposición:

- El cultivo en fase exponencial se diluye 10 veces: 200 µl de cultivo en 1800 µl de LB 1X o de mezcla S9 para el ensayo con activación metabólica, (suplementado con 50 µg/ml de Ampicilina y 17 µg/ml de Tetraciclina), y se distribuye en los tubos de microcentrífuga que contiene las muestras a evaluar (ver Tabla 1).

Tabla 1. Preparación de los tratamientos requeridos en la realización del ensayo SOS Chromotest.

Tratamientos	Células disueltas en LB	Celulas disueltas en mezcla S9	Muestra	Agua destilada	Placebo	4-NQ-10
C(-)	150 µl	-	-	5 µl	-	-
C(-) S ₉ (+)	-	150 µl	-	5 µl	-	-
Placebo	150 µl	-	-	-	5µl	-
Placebo S ₉ (+)	-	150 µl	-	-	5 µl	-
Muestra X	150 µl	-	5 µl	-	-	-
MuestraX S ₉ (+)	-	150 µl	5 µl	-	-	-
C(+)	150 µl	-	-	-	-	5 µl

- La exposición se permite durante 30 min a 4-8°C.

- c) Una vez las células fueron expuestas a la muestra del ensayo, éstas se incuban durante 2 h a 37 °C, en las que la Respuesta SOS tiene lugar.
- d) Posterior a la incubación, se realizan los ensayos enzimáticos en una placa de ELISA e 96 pozos que se divide en 2. Las filas A-D se emplean en el ensayo de β -galactosidasa, mientras las filas E-H se usan para el ensayo de fosfatasa alcalina. Cada columna (1-12), corresponde a un tratamiento con 4 réplicas cada uno (ver Figura 1).

VII. Medición de la actividad enzimática β -galactosidasa y Fosfatasa Alcalina.

Ensayo enzimático β -galactosidasa (β g)

- a) En una placa de ELISA conteniendo en cada pocillo 135 μ l de Buffer Z se le adicionan 15 μ l de células de cada tratamiento.
- b) Se incuba la placa durante 20 min a temperatura ambiente para que ocurra la lisis celular.
- c) Se adiciona 30 μ l de 4 mg/ml ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido).
- d) Incubar la placa durante 40 min a temperatura ambiente para desarrollo color.
- e) Detener la reacción añadiendo 100 μ l de Na_2CO_3 (1M).
- f) Homogenizar la mezcla de reacción y medir la absorbancia a 420 nm en el espectrofotómetro lector de placas ELISA.

> Este tiempo puede ser variado si la absorbancia a 420nm no se encuentra en el rango de 0,1-0,4.

Ensayo enzimático Fosfatasa alcalina (FA)

- a) En una placa de ELISA conteniendo en cada pocillo 135 μ l de Buffer T se le adicionan 15 μ l de células de cada tratamiento.
- b) Se incuba la placa durante 20 min a temperatura ambiente para que ocurra la lisis celular.
- c) Se adiciona 30 μ l de 4 mg/ml PNPP (p-Nitrofenilfosfato).
- e) Incubar la placa durante 40 min a temperatura ambiente para desarrollo del color.
- f) Detener la reacción añadiendo 50 μ l de 2.5M HCl y 5 minutos después adicionar 50 μ l de 2 M TRIS.
- g) Homogenizar la mezcla de reacción y medir la absorbancia a 420 nm en el espectrofotómetro lector de placas ELISA.

VII. Cálculo del Factor de Inducción (SOSIF). El SOSIF es la razón, normalizada con las unidades enzimáticas FA, entre las unidades enzimáticas β g en el tratamiento y el control negativo. Las unidades enzimáticas de la actividad β g y FA se calculan de acuerdo con Quillardet y Hofnung (1985) de la siguiente manera:

$$\text{Unidades Enzimáticas (UE)} = \frac{1000 \times A_{420}}{t}$$

Donde A_{420} es la medida de la absorbancia leída a 420nm, y t es el tiempo de incubación en presencia del sustrato (ONPG o PNPP) en minutos.

La relación (R) entre las unidades de la β G y FA refleja la inducción del gen *su/A* incluso cuando se produce inhibición de la síntesis de proteínas:

$$R = \frac{UE_{\beta g}}{UE_{FA}}$$

El criterio de genotoxicidad es el factor de inducción SOS que representa los niveles de inducción del gen *su/A* normalizados en cada tratamiento. Éste se considera como una medida indirecta del daño primario (genotoxicidad) inducido en el ADN por los tratamientos:

$$SOSIF = \frac{R_{tratamiento}}{R_{control(-)}}$$

La interpretación de los resultados se realiza considerando lo siguiente:

Tabla 2. Criterio de genotoxicidad de acuerdo al SOSIF.

SOSIF	Interpretación
< 1,5	No genotóxico
1,5-2,0	Inconcluso
> 2.0 y una clara relación dosis-efecto	Genotóxico

Preguntas

- ¿Por qué todos los medios de crecimiento se suplementan con Ampicilina y Tetraciclina?
- ¿Qué característica de la cepa de *E. coli* PQ37 la hace precisa como modelo para el ensayo SOS Chromotest? ¿Podría usarse otro modelo bacteriano? ¿Cuál?
- ¿Cómo podría utilizarse el principio aquí descrito en el desarrollo de un biosensor? ¿Qué características del presente modelo serían limitantes en dicho desarrollo? ¿Qué profesiones se requerirían en el equipo desarrollador?
- ¿Es éste un ensayo propio para automatizar? ¿Por qué? Plantee escenarios regionales y nacionales de monitoreo ambiental en el que este ensayo automatizado tendría un rol determinante.

Bibliografía

- Quillardet P., y Hofnung M. 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research* 147: 65-78.
- Quillardet P., Huisman O., D'Ari R. y Hofnung M. 1982. SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 5971-5975.
- Quillardet P. y Hofnung M. 1993. The SOS Chromotest. *Mutation Research* 279: 235-279.

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor , New York.