

Relación filogenética de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae por medio de electroforesis SDS-PAGE en Gel de Policrilamida Vertical*

Angie Ramos, Daniel Molano, Elkin Alvis, and Sofía Ardila
Universidad de los Andes
Bogotá D.C. - Colombia

(Fecha: 1 de septiembre de 2015)

Aquí va el resumen

Keywords: Cromatografía, Electroforesis en Gel Vertical, Gel de Policrilamida, SDS-PAGE, Tinción, Azul de Coomassie

I. INTRODUCCIÓN

Aquí hay q escribir la introducción de nuestro artículo[1].

- Identificar nítidamente el problema.

Resaltar trabajos y contribuciones de otros autores respecto al tema objeto.

- Justificación.
- Hipótesis.
- Objetivos.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se utilizaron proteínas bacterianas de *Escherichia coli* (*E. Coli*) K12, *E. Coli* C600, , todas pertenecientes a la familia enterobacteriaceae; a continuación se enuncian los pasos seguidos para determinar su relación filogenética. Primero se realizó la extracción de proteínas de las células correspondientes, luego se realizó una electroforesis SDS-PAGE en gel de policrilamida vertical y se procedió a teñir con azul de Coomassie. Se analizó el patrón de bandas obtenido utilizando la herramienta computacional *PAUP* obteniendo finalmente los fenogramas correspondientes, con los cuales se pudo determinar la relación filogenética entre las bacterias estudiadas. A continuación se describe en detalle cada uno de los procedimientos enunciados.

A. Extracción de Proteínas Bacterianas

El primer paso para determinar las relaciones filogenéticas de las bacterias en estudio es extraer las proteínas de las células. Se comienza dejando las bacterias en crecimiento ON (Over Night) en caldo LB con una agitación de 250rpm. Una vez terminado el crecimiento,

se procede a medir con una micropipeta 1ml de cada uno de los cultivos y se colocan en *ependorfs* individuales. Se centrifugan las muestras a 13Mrpm durante 5 minutos; seguidamente, se descarta 800μl de la solución en hipoclorito diluido. Los 200μl restantes fueron resuspendidos con vórtex. Se añade, a continuación, 100μl de *buffer* (contiene SDS), correspondientes a $\frac{1}{2}$ del volumen de cada una de las soluciones con las muestras en los *ependorfs*. Luego éstos se pusieron en una plancha de calentamiento durante 5 minutos a 100°C. Posteriormente se centrifugaron a 13Mrpm por 5 minutos, y finalmente, se extraen de cada una de las muestras el sobrenadante donde se encuentran las proteínas de interés.

B. Electroforesis en geles de Policrilamida

Posterior a la extracción de proteínas se procede a realizar la electroforesis en geles de policrilamida vertical.

Se comienza preparando los geles. El primero a preparar es el gel de separación; se prepara este gel a una concentración del 10 % debido a que las proteínas en cuestión se encuentran en el rango de 16-70KDa. El primer paso es mezclar en un beaker 2ml de solución de policrilamida, 1.25ml de una solución con pH 8.8 y 1.75ml de H₂O. A continuación se adicionan simultáneamente 50μl de persulfato de amonio al 10 % y 8μl de TEMED. Inmediatamente se vierte dentro de la cámara del montaje y se deja polimerizar unos 45 minutos. Para el gel de agrupamiento, se comienza mezclando en un beaker 325μl de policrilamida, 625μl de una solución con pH 6.8 y 1525μl de H₂O. Luego se adiciona simultáneamente 25μl de persulfato de amonio al 10 % y 5μl de TEMED, se agita bien y se vierte en la cavidad del montaje, se ponen los peines para crear los pozos y se deja polimerizar por 15 minutos. Transcurrido este tiempo se pueden retirar los peines y proceder con el montaje de la cámara de electroforesis. El montaje debe verse similar al mostrado en la figura 1.

Para realizar el montaje de la cámara electroforética, se asegura el o los pares de geles en el interior de esta. Se llena la cámara interna con *buffer* de electroforesis 1X hasta que cubra los pozos y vierta el resto del *buffer* en la cámara externa. Se continúa sembrando 8μl de cada una de las muestras. Terminado el sembrado, se cierra apropiadamente la cámara y se programa el corrido de electroforesis a 150V y 90 minutos. Una vez terminado

* Laboratorio de Biología Molecular - Artículo 1



Figura 1. SDS-PAGE

el corrido se procede a fijarlo. Para esto se prepara una solución de fijado, que se compone de 50 % de etanol, 10 % de ácido acético y 40 % de dH_2O . Esta solución se vierte en las cubetas del kit y a continuación se desmonta el gel de la cámara. Primero se apaga y desconecta la fuente de poder, se retira el montaje de los vidrios y se separa con cuidado el gel de estos. Se separa y se descarta el gel de agrupamiento y se hace un pequeño corte en alguna esquina para identificar la ubicación del primer carril del gel. A paso seguido se deposita el gel en la cubeta con la solución de fijado y se guarda la el gel a $4^{\circ}C$ por 8 días.

Nota: Cabe resaltar que en el gel se siembran proteínas de 2 bacterias más: bla1 y bla2. Estas fueron suministradas por el docente al momento de la siembra.

C. Tinción con Azul de Coomasie

Una vez el gel esté fijado, se tiñe con Azul de Coomasie para ver el patrón de bandeo.

Se prepara la solución de tinción mezclando 50 % de metanol, 10 % de ácido acético, 40 % de dH_2O y Coomasie al 0.05 %. Se Retira la solución de fijación de la cubeta, cuidando que el gel no quede con pliegues, se agrega la solución de tinción y se deja en agitación continua a aproximadamente 60rpm y $37^{\circ}C$ durante 45 minutos. Transcurrido el tiempo, se descarta la solución de tinción y se hace un lavado dH_2O . Seguido de esto, se agrega la solución de destinción previamente preparada así: 50 % de metanol, 10 % de ácido acético y 40 % de dH_2O . La cubeta con el gel en la solución de destinción, se deja en agitación constante a 50rpm y $37^{circ}C$ hasta que se obtiene la intensidad de las bandas deseada.

Obtenido el bandeo deseado, se retira el gel de la solución de destinción y se pone a secar en papel celofán en frío toda una noche.

D. Construcción del fenograma

Una vez seco el gel, se procede al reconocimiento y conteo de bandas para su análisis utilizando *PAUP*.

III. RESULTADOS

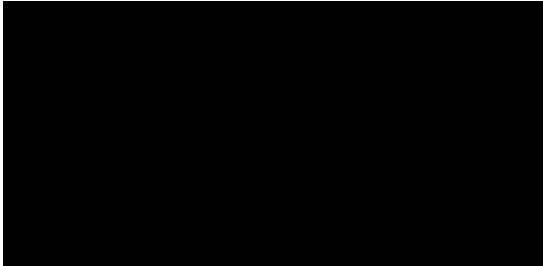


Figura 2. Gel I

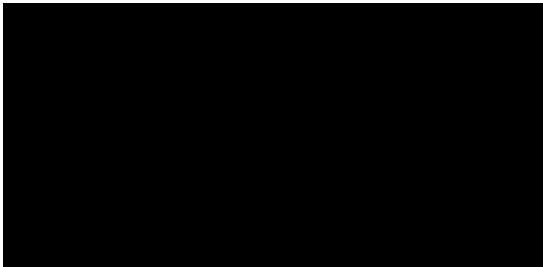


Figura 3. Gel II

A. La matriz

Cuadro I. Matriz.

Banda	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Organismo 1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Organismo 2	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Organismo 3	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Organismo 4	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Organismo 5	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Organismo 6	1	1	1	1	1	1	1	1	1

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

[1] Alfonso, M., Bernardo, B., Carlos, C., and Domingo, D. (2010). El problema de los gatos y los perros. *Mascotas*,

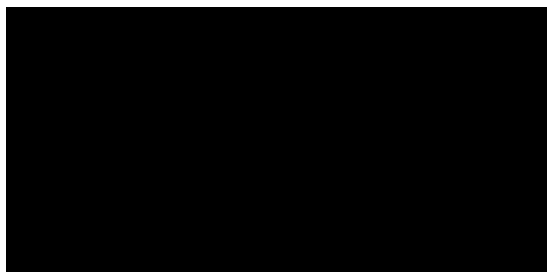


Figura 4. Árbol Nj.

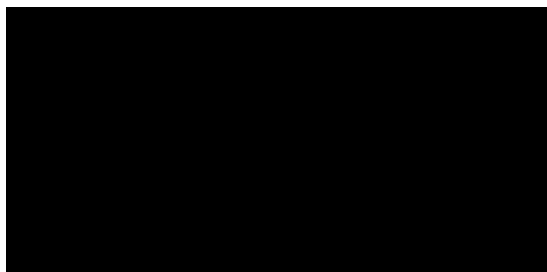


Figura 5. Árbol UPGMA