

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: 2 de septiembre de 2015)

La proteómica es el estudio sistemático de las proteínas presentes en el genoma de un individuo, posibilitando la identificación, caracterización y función del proteoma global. En esencia, la proteómica se ha presentado como una herramienta que brinda información tanto biológica como evolutiva del organismo o especie. Para el estudio de la misma, la técnica empleada es la electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE), que consiste en la separación en función de la masa molecular que presenta la proteína, confiriendo unificación de cargas. En este estudio, se emplearon distintas cepas bacterianas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. El objetivo consistió en la determinación de las discrepancias y homologías de los proteomas presentes en las bacterias *Escherichia coli* W, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* C600, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhi* y *Proteus spp* empleando electroforesis en gel de poliacrilamida vertical. Para ello, se realizó una extracción proteica de las seis bacterias, y cada una de las muestras fue expuesta a un corrimiento en gel utilizando electroforesis denaturante SDS-PAGE, seguido de una tinción con Azul de Coomassie. Posteriormente, se realizó un análisis proteico relacionando evolutivamente, por medio de la construcción de fenogramas con los métodos UPGMA y NJ. Los perfiles proteicos obtenidos demuestran una cercanía evolutiva entre las cepas de *E. coli* analizadas y *Proteus spp*.

Keywords: *Enterobacteriaceae*, Electroforesis en Gel Vertical, Gel de Poliacrilamida, SDS-PAGE, Tinción, Azul de Coomassie, Fenograma

I. INTRODUCCIÓN

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se utilizaron proteínas bacterianas de *E. coli* W, *E. coli* K12, *E. coli* C600, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhi* y *Proteus spp*, 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 poliacrilamida 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. Las siguientes secciones describen 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 en 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 Poliacrilamida

Posterior a la extracción de proteínas se procede a realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida 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 poliacrilamida, 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 poliacrilamida, 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 po-

* Laboratorio de Biología Molecular - Artículo 1

nen 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.

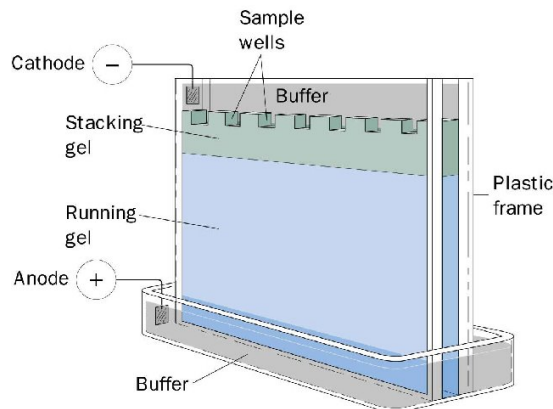


Figura 1. SDS-PAGE. La imagen muestra el montaje justo antes de realizar la siembra de las muestras.

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 $8\mu\text{l}$ 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 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 remueve 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°C por 8 días.

C. Tinción con Azul de Coomassie

Una vez el gel esté fijado, se tiñe con Azul de Coomassie 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 Coomassie 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°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°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, y se utiliza *PAUP 4 Beta* y *FigTree v1.4.2* para la construcción, modificación y análisis de los fenogramas.

Al tener identificadas las bandas presentes para cada uno de los organismo se puede hacer una matriz binaria, unos y ceros, para representar ausencia (0) o presencia (1) de cada proteína en cada celda del gel. Construida la matriz, se redacta un archivo .nex en el que se incluye el número de individuos, un nombre provisional para cada uno, por ejemplo Individuo 1, el número de celdas de la matriz y finalmente la matriz, cuidando que cada bacteria ocupe una fila. Se procede a cargar los datos a *PAUP* a través de este archivo. Realizada la carga de los datos, se ejecuta el comando NJ; este habilita la creación de un árbol filogenético por medio del análisis algorítmico de **Neighbor Joining** el cual “es un método puramente algorítmico, representando una aproximación heurística para encontrar el árbol de evolución mínima más corto” [1], es decir, el que implique menos pasos. Seguidamente, se ejecuta el comando UPGMA crea un árbol filogenético utilizando el análisis **Unweighted Pair Group Method Using Average Linkage** el cual “se puede concebir como un método heurístico para encontrar la topología ultramarina—todas las ojas equidistantes a la raíz—de mínimos cuadrados para una matriz de distancias pareadas” [1]. Obtenidos los árboles podemos visualizarlos y editarlos en *FigTree*. Después de realizar los cambios pertinentes y editar el árbol de manera que fuese sencilla su lectura, se guardan las imágenes para su posterior análisis.

III. RESULTADOS

A. El gel y patrón de bandeo

Al terminar el proceso de tinción y destinción con azul de Coomassie descrito arriba, se obtienen los primeros resultados visibles: un patrón de bandeo en el gel de poli-acrilamida. Dicho patrón comprueba la presencia de proteínas en el gel así como también que los procedimientos anteriores fueron desarrollados con éxito. A continuación se muestra una imagen del gel húmedo —figura 2— justo antes de iniciar el proceso de secado; y una segunda figura que muestra el gel en su estado final —figura 3.

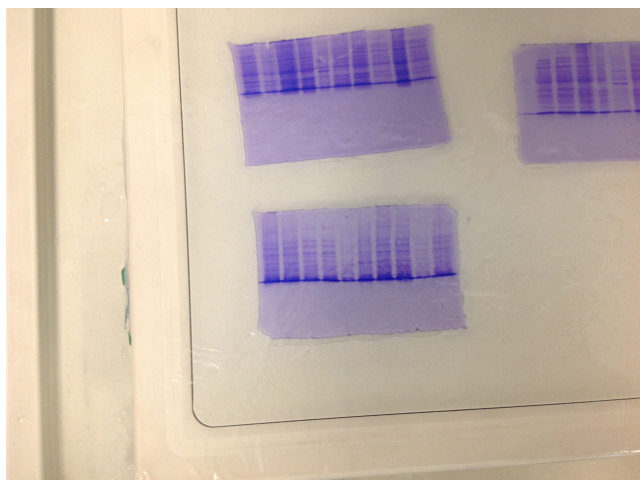


Figura 2. **Fotografía del gel húmedo**, justo después de terminar el proceso de destinción y siendo preparado para su secado. Se observa el patrón de bandeo con facilidad.

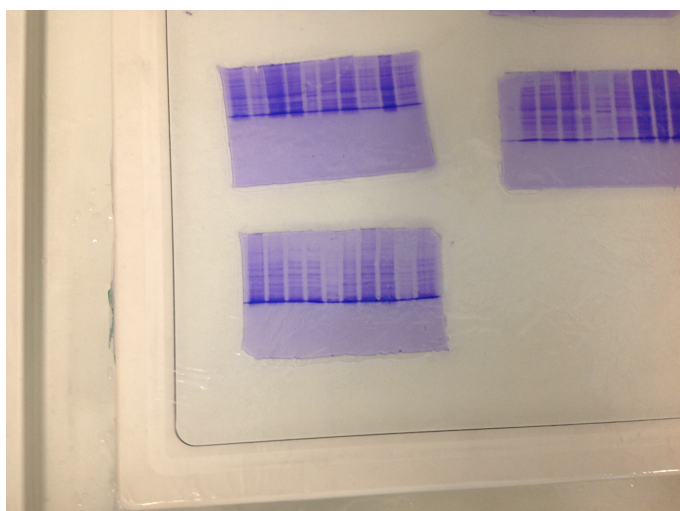


Figura 3. **Fotografía del gel seco**. Se observa con mayor claridad y nitidez las bandas de cada una de las muestras.

B. La matriz y los árboles

La obtención de bandas claramente definidas en el gel, permitió la elaboración de la matriz binaria y su correcto análisis.

Luego de completar con los campos requeridos en el archivo .nex, y cargarlo correctamente al programa, se pudo correr los dos diferentes algoritmos y visualizar sus resultados. Los esquemas siguientes representan los resultados obtenidos en su forma gráfica, siendo la figura 4 el resultado arrojado por NJ y la figura 5 el que se logró con UPGMA.

Estos son los resultados finales y esperados, los cuales pueden ser analizados de manera directa, clara y concisa.

Cuadro I. **Matriz Binaria** obtenida a partir de la lectura de las bandas en el gel seco.

Banda	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>E. Coli C600</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
<i>E. Coli K12</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
<i>E. Coli W</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
<i>Proteus</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
<i>Salmonela</i>	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1
<i>Yersenia</i>	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1

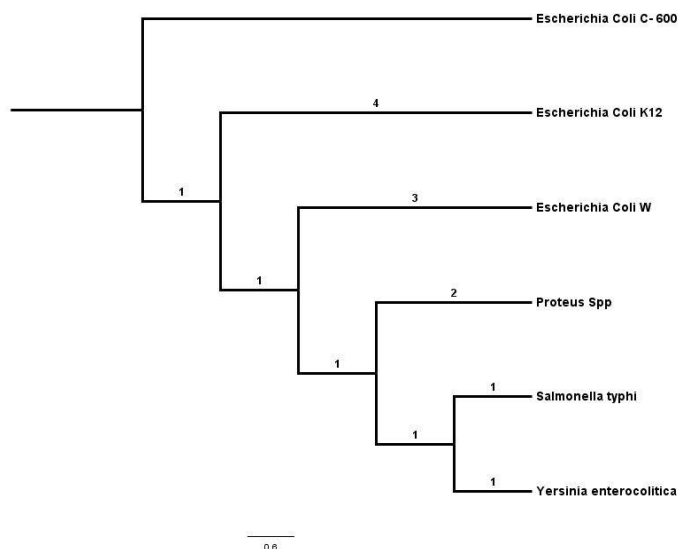


Figura 4. **Árbol NJ**: Fenograma obtenido luego de correr el algoritmo NJ y hacer algunas ediciones para su mejor visualización y lectura.

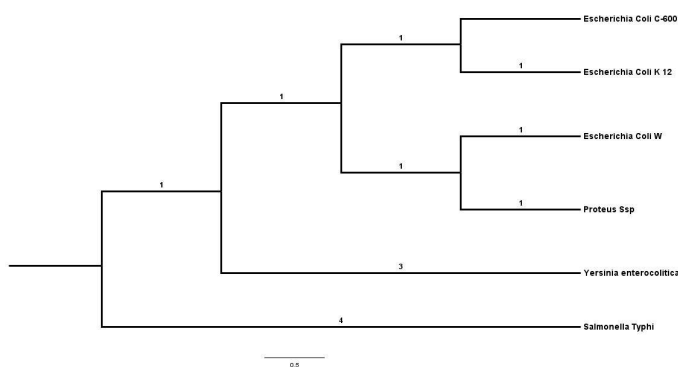


Figura 5. **Árbol UPGMA**: Fenograma obtenido luego de correo el algoritmo UPGMA y hacer algunas ediciones para su mejor visualización y lectura.

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Al mirar los fenogramas se puede concluir la cercanía evolutiva que tiene las cepas analizadas entre sí. A partir del primer árbol —figura 4— KDJEIUDJSHS-

DUDFHDHD; mientras del segundo —figura 5— se puede afirmar JDEHDUEHEHEHED.

A partir de estos resultados se puede corroborar que los procedimientos fueron seguidos adecuadamente.

El objetivo de la práctica se cumplió a satisfacción.

Los posibles errores en esta práctica pudieron ser causados por una serie de factores como:

- Incertidumbre de los instrumentos utilizados en las prácticas.

- Precisión de los aparados utilizados en las prácticas.
- Errores en el seguimiento de los procedimientos.
- Errores introducidos por el hombre, tales como el paralaje, ...

[1] Vinuesa, P. (2007). *Metodos de distancia y Pruebas de bootstrap*. Centro de ciencias Genómicas, UNAM, 1 edition.