

# **El uso de *E. coli* en el perfeccionamiento de un método para obtener genes de bacterias no cultivables**

**Jennifer Hegewisch, Alix Carmona, Alicia Hernández, Thalía Fierro, David Montante**

Colegio Marymount

Asesor: Dr. Lorenzo Segovia (Dpto. de Ingeniería Celular y Biocatálisis, IBT-UNAM Cuernavaca)

Jueves 31 de mayo, 2007.

## **Resumen**

Actualmente uno de los mayores problemas en la Microbiología es que no se sabe cómo reproducir en el laboratorio al 99 % de las bacterias que existen en el mundo, es decir no son cultivables. Con el propósito de lograr obtener un mejor conocimiento de estas bacterias, montamos un método con el cual pudimos introducir genes de bacterias no cultivables en una bacteria fácilmente cultivable en el laboratorio. Utilizamos la bacteria *Escherichia coli* debido a que ya se sabe cómo nutrirla y manejarla en laboratorio. Insertamos segmento de ADN modelo en un plásmido de *E. coli* y lo introdujimos en bacterias de *E. coli*. Optimizamos los tiempos de incubación para la enzima de restricción *Bam HI* y la enzima ligasa para obtener segmentos de ADN con el tamaño adecuado e insertarlos en un vector molecular llamado plásmido. Estos plásmidos fueron introducidos por electroporación en bacterias. Las bacterias que contienen estos plásmidos son capaces de crecer en presencia del antibiótico Kanamicina. Determinamos el número de colonias de bacterias que crecían en cajas petri con un medio rico y Kanamicina para conocer el número de distintos plásmidos. Logramos obtener una colección de 35,000 colonias distintas.

## Introducción

La rama de la Biología que estudia los procesos bacteriales, sus características y los componentes de las bacterias se llama Microbiología. Tal es el caso que se estima que el 99 % de las especies bacterianas en el mundo están sin descubrir. La parte de la microbiología en la que nos vamos a centrar en esta investigación está combinada con la Ingeniería Genética (manipulación de genes) en donde se usan herramientas para obtener y secuenciar genes con muestras de ADN de cualquier origen. Una de las fuentes mas interesantes de ADN son los metagenomas, muestras de ADN ambiental obtenido sin necesidad de cultivar a los microorganismos que habitan cualquier ambiente.

Las primeras investigaciones de metagenomas fueron hechas en su mayoría y de manera reciente por J. Craig Venter, presidente del Instituto de Alternativas Biológicas de energía, y su equipo de trabajo en el barco Sorcerer II, en el Mar de Sargasso (ubicado cerca de las Bermudas).<sup>1</sup> Los investigadores clonaron grandes segmentos de genomas microbianos y visualizaron genes específicos con tintes fluorescentes. El ADN genómico se extrajo y se secuenció en los laboratorios (es decir ver el orden de los nucleótidos por los cuáles está formado como por ejemplo: Adenina, Guanina, Citosina Uracilo).<sup>2</sup> Después de su análisis bioinformático (a través de computadoras), ellos descubrieron por lo menos 1800 nuevas especies y más de 1.2 millones de nuevos genes. Se creía que el Mar de Sargasso era uno de los lugares con menos nutrientes y poca diversidad de especies, y por eso se le estudió, ya que las bacterias deberían haber sido más sencillas, pero no fue así.<sup>3</sup> Algunos organismos descubiertos tenían la capacidad de capturar la luz.<sup>4</sup> Con la secuenciación, los investigadores adquirieron información acerca del árbol filogenético (parecido entre las especies, tiempo de subdivisión entre las familias de éstas) de estas especies.<sup>5</sup> La secuenciación nos permite conocer mucha información acerca de las bacterias, pero para poder secuenciarlas [ver fig.1 como ejemplo] es necesario primero saber cómo reproducirlas en el laboratorio. Las bacterias son la clave de la mayoría de los procesos biológicos y químicos en el planeta.<sup>6</sup>

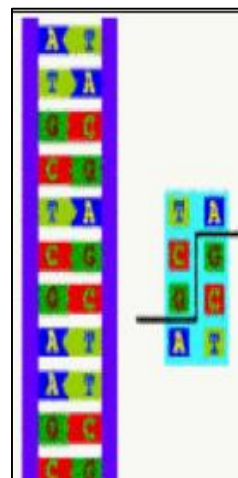


Fig.1 – Ejemplo de Secuencia de nucleótidos (ACGT)

Nuestro objetivo es lograr insertar genes de bacterias no cultivables (modelo) en bacterias *Escherichia coli* para reproducirlas y poder analizar así este material genético.

## Materiales y Métodos

**Equipo** Electroporador (Biorad), centrífuga (Eppendorf), cámaras de electroforesis (Owl), Agitador (Vortex), campana de aire (Nu air), fuente de poder (Biorad) y kit de purificación (Quiagen).

**Materiales** Cajas Petri, tubos de ensaye, tubos de Eppendorff, pipetas volumétricas, puntas para micropipetas, etc.

**Reactivos** Medios de cultivo (ej: hidrolizados de levadura), soluciones amortiguadoras, enzimas de restricción (cortan el ADN en lugares específicos), polimerasas (sintetizan el ADN, lo copian), bacterias *E. coli*, antibiótico Kanamicina y geles de agarosa para electroforesis de ADN.

Para poder poner a punto esta metodología purificamos ADN total [Ver procedimiento detallado en el Anexo 1] de la bacteria modelo *E. coli* y lo cortamos en segmentos específicos con ayuda de las enzimas de restricción *Sau3A* (segmentos “A”). Esto significa que los extremos de sus secuencias genéticas (Guanina, Citosina, etc) van a ser iguales en cada uno de los segmentos sin importar el tamaño de éstos. i.e. son compatibles. Para garantizar que podríamos obtener todos los genes enteros hicimos una digestión parcial de manera a que quedaran siempre moléculas sin cortar en todos los sitios. A través de la electroforesis [Ver procedimiento detallado en el anexo 2] pudimos determinar el tamaño de los segmentos “A”. Por separado purificamos y cortamos plásmidos de *Escherichia coli* “B” con *Bam HI*. Estos plásmidos son pequeños cromosomas que pueden replicarse en *E. coli*. Las enzimas *Sau3A* y *Bam HI* tienen la característica de producir cortes que dejan colas de ADN que son complementarias entre sí. Esto significa que los extremos, además de ser iguales y compatibles entre ellos, lo serán también con los segmentos “A”. Juntamos los segmentos de tipo “A” con segmentos tipo “B”. Para que estos pedazos se peguen utilizamos una enzima llamada ligasa la cual crea enlaces covalentes entre estos fragmentos. Al fusionarse se crean plásmidos recombinantes de *E. coli* con genes de bacterias no cultivables. (A estos plásmidos los llamaremos “C”) [Ver la representación gráfica en la Fig. 2]. Con un medio que contiene Kanamicina, sólo las bacterias que llevan estos plásmidos fusionados sobrevivirán.

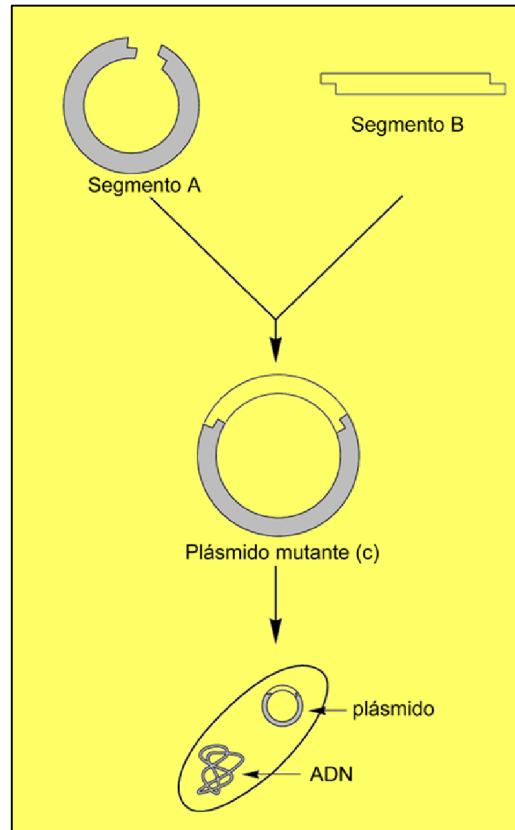


Fig. 2. Ejemplo de Segmento de ADN (a+b=c) e inserción del plásmido en la bacteria.

En el laboratorio donde estuvimos han estado trabajando con genes involucrados en la síntesis del aminoácido triptofano por lo que decidimos usar este sistema como modelo para la obtención de genes particulares. Este enfoque se podría usar para obtener cualquier gen en particular. Ponemos bacterias *E. coli* (no capaces de sintetizar triptofano) junto con los plásmidos C en el electroporador [Ver ejemplo en el Anexo 3]. A través de un shock eléctrico de 4 A logramos que los plásmidos se introdujeran a las bacterias por diferencia de carga. Éstas se replicaron y expresaron la información adquirida. Ya que los plásmidos C se encuentran dentro de las bacterias *E. coli*

introducimos a estas últimas en un medio de recuperación en el que todo tipo de nutrientes necesarios para *E. coli* estarán a su disposición. Ahí crecieron bacterias con todo tipo de características. Para distinguir las bacterias que adquirieron la capacidad de sintetizar triptofano, cuando estuvieron estables se transfirieron a un medio sin triptofano. Sólo aquellas bacterias que hayan adquirido un gen capaz de sintetizar triptofano sobrevivieron en este medio. Reproducimos las bacterias en una caja de Petri, y contamos el número de colonias obtenidas.

## Resultados y Discusión

El primer experimento fue buscar las condiciones para que el DNA modelo fuera digerido parcialmente con la enzima *Sau3A*. Para encontrar las condiciones adecuadas incubamos la misma cantidad de DNA con concentraciones decrecientes de enzima por 30", posteriormente corrimos las muestras de DNA digerido en un gel de agarosa. [Ver Figura 3]. Se puede observar que la digestión óptima es usando 0.125 unidades de enzima para 300 nanogramos de DNA. Paralelamente preparamos el plásmido donde insertamos los insertos modelos dejando a la enzima *Bam HI* cortar los segmentos por 30 minutos. Los resultados fueron que obtuvimos 9 000 colonias con genes modificados, lo cual es muy poco ya que necesitábamos obtener 100 000 (una muestra representativa y número suficiente para garantizar que sí se llevó a cabo la fusión en gran proporción). Una posible explicación es que el vector no estaba suficientemente digerido por lo que fue necesario realizar el experimento de nuevo utilizando un mayor tiempo de digestión.

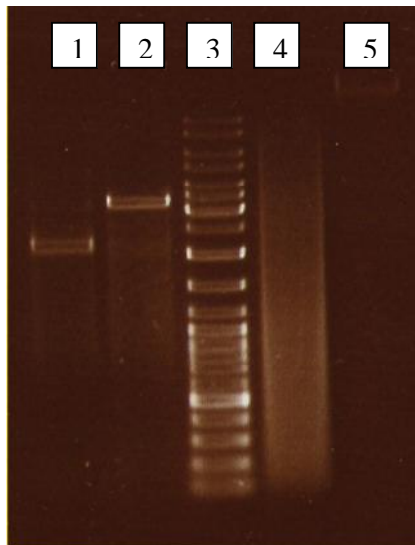


Fig. 3. Gel de agarosa con una cinética de digestión de DNA de *E.coli* con la enzima de restricción *Sau3A*. En el primer carril se observa DNA sin digerir. Carril 8 marcadores de peso molecular. Carriles 2,3,4,5,6,7 contienen 1, 0.5,0.25,0.125,0.0625 y 0.03125 unidades de enzima *Sau3A*

El segundo experimento se realizó utilizando la enzima de restricción *Bam HI* durante 1 hora y la enzima de ligasa durante 30 minutos. Obtuvimos solo 4 colonias bacterianas. Debido a que el tiempo de la enzima BamHI ya se había modificado, y el tiempo de la enzima *Sau 3a* es fijo, ahora se tuvo que modificar el tiempo de acción de la enzima ligasa para obtener más colonias bacterianas.

El tercer experimento se realizó utilizando la enzima *Bam HI* durante 30 min, pero incubando con la enzima ligasa durante 1 hora. Obtuvimos 35 000 colonias. Lo cual es un mejor resultado ya que al repetirlo 3 veces se obtendrían las 100 000 colonias necesarias. [Ver. Fig. 4 para los geles corridos]

En los resultados se observó que cambiando el tiempo de uso de las enzimas, se puede aumentar el número de colonias fusionadas o mutantes. Estos tiempos y cantidades específicas finales determinan las condiciones necesarias para poder construir bancos de genes. Al tener una muestra de DNA ambiental, las cuales en general son muy pequeñas, podemos transportar estas condiciones para poder realizar bancos esta vez que realmente contengan genes de bacterias no cultivables.



← Electroforesis final

Figura 4. DNA utilizado para construir los bancos. Carril 1, DNA no digerido del vector. Carril 2 DNA digerido con *BamHI*, Carril3, Marcadores de peso molecular. Carril 4 DNA modelo de *E. coli* digerido con *Sau3A* y carril 5 DNA modelo sin digerir.

### Conclusiones

Se creó un banco de genes modelos, es decir una fusión de DNA de *Escherichia coli* utilizado como modelo en otros plásmidos de la misma especie. Se logró optimizar la metodología hasta que quedara un proceso definido y eficiente de tiempos y cantidades de uso de enzima. La cantidad de colonias

obtenidas de los experimentos fueron las necesarias para poder tener bancos representativos de genes de bacterias no cultivables. Los resultados del proyecto pueden ser utilizados como un avance en los métodos de reproducción para bacterias no cultivables.

### Agradecimientos

Agradecemos al Instituto de Biotecnología UNAM, especialmente a nuestro asesor, el Dr. Lorenzo Segovia, por su apoyo en el desarrollo del presente proyecto. A su vez quisiéramos agradecer a nuestro profesor, el Dr. Enrique Galindo.

### Bibliografía

<sup>1</sup> Kowalsky, H., IBEA Announces Sorcerer II Expedition, Global Expedition To Sample World's Oceans And Land To Characterize And Understand Microbial Populations Using Environmental ADN Sequencing, Gordon and Betty Moore Foundation, Marzo 4, 2004. <http://www.moore.org/pa-newsitem.aspx?id=498&pa=36> La página fue consultada el 11 de febrero del 2007. (Es confiable porque es una página .org es decir una organización sin paga o sea no busca vender, y además es de una fundación de divulgación científica).

<sup>2</sup> Russell, P., *iGenetics & Mendelian approach*, Benjamin – Cummings Publishing Company, April 4, 2005. pp.123-135. (ISBN: 13-978-0805346664).

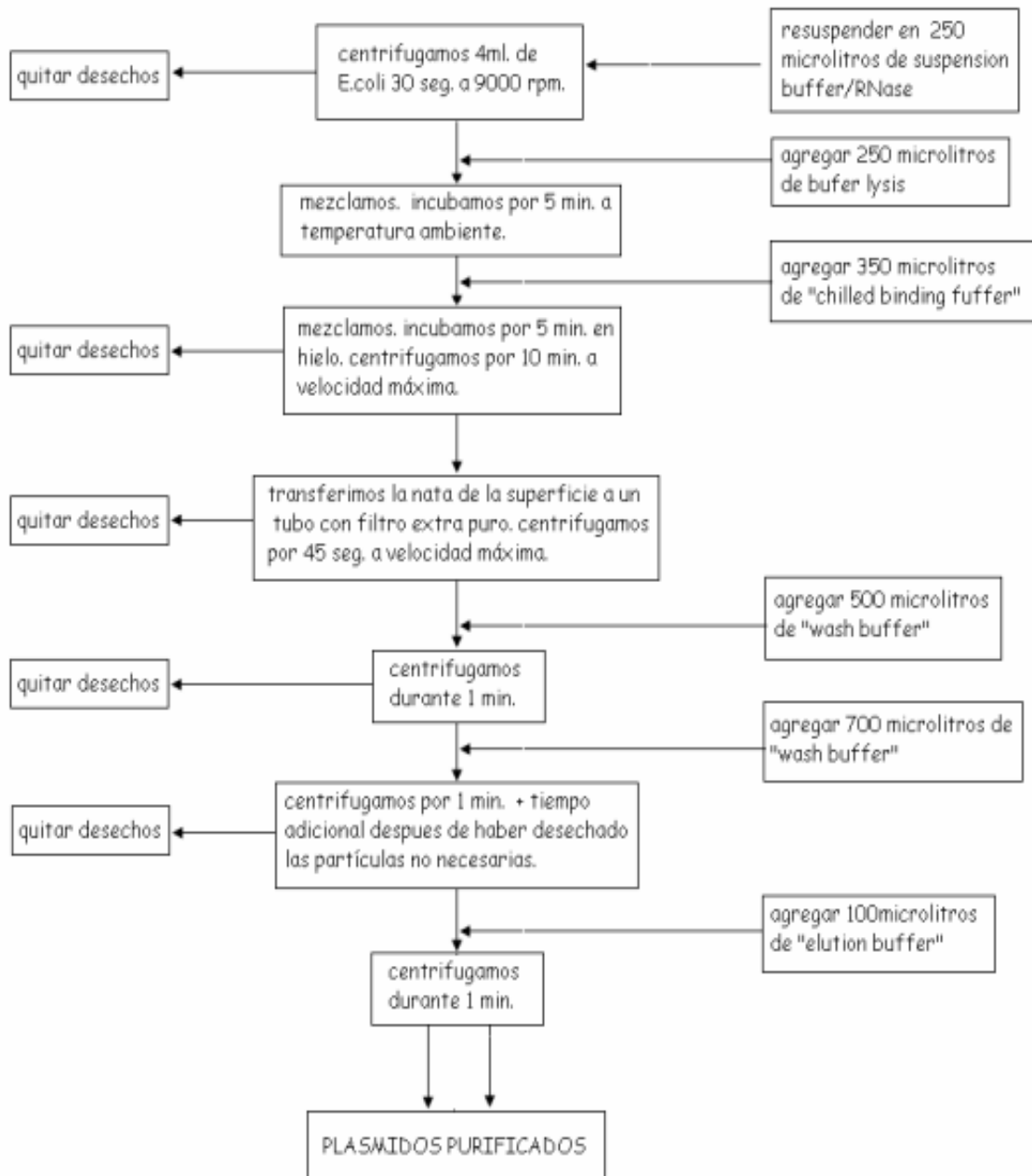
<sup>3</sup> Venter, J., Karin Remington, John F. Heidelberg, Aaron L. Halpern, Doug Rusch, Jonathan A. Eisen, Dongying Wu, Ian Paulsen, Karen E. Nelson, William Nelson, Derrick E. Fouts, Samuel Levy, Anthony H. Knap, Michael W. Lomas, Ken Nealson, Owen White, Jeremy Peterson, Jeff Hoffman, Rachel Parsons, Holly Baden-Tillson, Cynthia Pfannkoch, “Environmental Genome Shotgun Sequencing at the Sargasso Sea,” *Science*, Vol 304, Abril 2, 2004, pp. 66-74.

<sup>4</sup> Pollack, A., A New Kind of Genomics, With an Eye on Ecosystems, The New York Times, October 21, 2003.  
<http://query.nytimes.com/gst/fullpage.html?res=9407EEDB113EF932A15753C1A9659C8B63&sec=health&spon=&pagewanted=print>. La página fue consultada el 11 de febrero del 2007. (Es confiable porque relata los mismos hechos publicados por J. Craig Venter en su informe<sup>5</sup> e incluye algunos datos extras confirmados por esta bibliografía).

<sup>5</sup> Comunicación personal con el Dr. Lorenzo Segovia (IBT-UNAM), Del lunes 11 de febrero al jueves 31 de Mayo, 2007.

<sup>6</sup> Villalón, J., El código genético y la secuencia de nucleótidos, *Ciencia y Desarrollo*, No. 162, Enero-Febrero, 2006, pp. 35-40

Anexo 1: Purificación de plásmidos



## Anexo 2:

### Electroforesis

#### Formación de geles

El gel de agarosa se calienta en el horno de microondas. Se vierte en el molde y se espera a que se cuaje (gelatina). Con un peine se forman hoyos en el gel. En estos hoyos se introducen las soluciones para llevar a cabo la electroforesis.

#### Mezclar soluciones

Se mezclan los plásmidos con glicerol y colorante azul. El glicerol se utiliza debido a que el ADN no es denso. Con la coloración que da el colorante es fácil analizar los resultados, sino se disuelve entre el glicerol.

#### Electroforesis

Se inyectan los plásmidos en los hoyos del gel. Debido a la carga negativa del ADN y la carga proporcionada por la fuente de poder (100volts), el ADN es atrapado por el gel. "Se correrá" el gel.

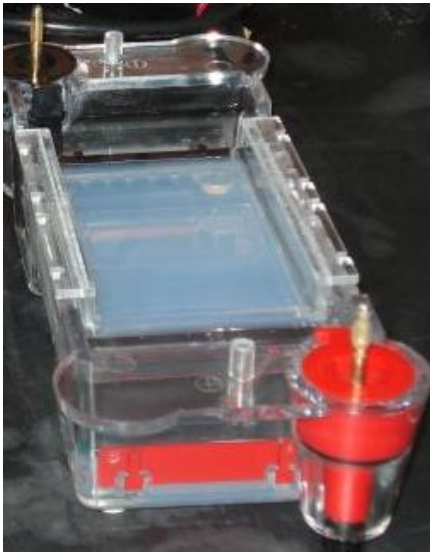


Fig. 5 Ejemplo de gel en la electroforesis. La coloración azul es debido al DNA pintado que contiene.

#### Teñir

Al meter la muestra en Bromuro de Etidio, los resultados se vuelven visibles bajo luz ultravioleta [Fig.3 y 4]

#### Luz ultravioleta

Se prende la luz. Cada una de las líneas apreciables es un segmento de ADN que fue liberado en el gel. Después de sumergir el gel en agua y verlo una vez más bajo la luz ultravioleta, los resultados pueden ser apreciados con mayor facilidad.

Anexo 3:

### **Ejemplo de Electroporación**

Experimento 2: plásmido en bacteria.

- 1.- En una celda [ Ver. Fig. 6 para ejemplo] se introducen 2  $\mu$ l. de *E. coli* y células de *E. coli*.
- 2.- Se le da una carga de 1.8 volts.
- 3.- El shock eléctrico resultante es de 4.64 Amperes.
- 4.- Se introduce 1  $\mu$ l. de *SOC* en la celda (para restablecerlas las células).
- 5.- Se colocan en tubos de ensaye para dejarlas en una incubadora a 37°C con agitador durante 1 hora.



Fig. 6 Ejemplo de Celdas para introducir células en el electroporador