



Universidad de Barcelona
Departamento de Microbiología
Facultad de Biología

Bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas

Vº Bº del Director de la tesis

Dr. Joan Jofre Torroella

Memoria presentada por
M^a Teresa Muniesa Pérez
para optar al grado de
Doctor en Biología

Barcelona, Julio de 1998

Programa de doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología
Bienio: 94-96

Anexos



Anexo 1: Diluyentes, medios de cultivo y antibióticos**Diluyentes****Peptona salina**

- Peptona	1 g
- NaCl	8,5 g
- Agua destilada	1000 ml

Disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Guardar a temperatura ambiente.

Ringer 1/4

- Ringer	2,5 g
- Agua destilada	1000 ml

Disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Guardar a temperatura ambiente.

Medios de cultivo para *E. coli***Medio de triptona****Medio líquido**

- Triptona	10 g
- Glucosa	1 g
- NaCl	5 g
- Agua destilada	1000 ml

Disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Guardar a 4 °C hasta su utilización

En la utilización de este medio para el crecimiento de la cepa *E. coli* CN13 se añadió ácido nalidíxico a una concentración de 100 mg /l en el momento de su utilización.

Agar blando

Añadir 7 g/litro de agar bacteriológico a la fórmula del medio, disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Mantener a 55 °C durante un máximo de una semana hasta su utilización.

En la utilización de este medio para el crecimiento de la cepa *E. coli* CN13 se añadió ácido nalidíxico a una concentración de 100 mg /l en el momento de su utilización.

Agar para crecimiento en placa

Añadir 15 g/litro de agar bacteriológico a la fórmula del medio, disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Preparar las placas y dejar solidificar. Guardar las placas a 4 °C hasta su utilización.

Medio Scholten's modificado (Havelaar y col., 1983)

Medio líquido

- Peptona	10g
- Extracto de levadura	3g
- NaCl	3 g
- Extracto de carne	12 g
- Solución de magnesio (100g MgCl ₂ .6H ₂ O / 50 ml agua)	0,3 ml
- Na ₂ CO ₃ (150 g/l)	5 ml
- Agua destilada	1000 ml

Disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Guardar a 4 °C hasta su utilización.

En la utilización de este medio para el crecimiento de la cepa *E. coli* CN13 se añadió ácido nalidíxico a una concentración de 100 mg /l.

Agar blando

Añadir 7 g/litro de agar bacteriológico a la fórmula del medio, disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Mantener a 55 °C durante un máximo de una semana hasta su utilización.

En el momento de utilizarlo, añadir 6 ml de la solución de CaCl₂ M estéril por litro de agar blando(*). Asimismo en la utilización de este medio para el crecimiento de la cepa *E. coli* CN13 se añadió ácido nalidíxico a una concentración de 100 mg/l.

Agar para crecimiento en placa

Añadir 15 g/litro de agar bacteriológico a la fórmula del medio, disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Añadir 6 ml de la solución de CaCl₂ M estéril por litro de agar para crecimiento en placa.

Preparar las placas y dejar solidificar. Guardar las placas a 4 °C hasta su utilización.

CaCl₂ 1 M

- CaCl ₂ (anhidro)	10,8g
- Agua destilada	100 ml

Disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

(*) NOTA: El CaCl₂ forma precipitados, por lo que se recomienda su adición al medio de agar blando inmediatamente antes de su utilización.

Medio de Luria (LB)

Medio líquido

- Triptona	10 g
- Extracto de Levadura	5 g
- NaCl	10 g
- Agua destilada	1000 ml

Disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos

LB suplementado con CaCl₂ 10 mM

- Medio líquido Luria	1000 ml
- CaCl ₂	1,46 g

Disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos

Agar blando

Añadir 7 g/litro de agar bacteriológico a la fórmula del medio, disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Mantener a 55 °C durante un máximo de una semana hasta su utilización.

Agar para crecimiento en placa

Añadir 15 g/litro de agar bacteriológico a la fórmula del medio, disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Preparar las placas y dejar solidificar. Guardar las placas a 4 °C hasta su utilización.

Medios utilizados en cultivo celular**Medio Eagel's modificado (MEM)**

- MEM	9,4 gr
- Bicarbonato sódico 7,5%	30 ml
- Glutamina 200mM	10 ml
- Penicilina 10 ⁴ unidades/ml/	10 ml
- Estreptomicina 10 ⁴ mg/ml	10 ml
- Suero fetal	10 %, 5 % o 1% (*)
- Agua destilada	1000 ml

Preparar el medio base (MEM), disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente añadir los otros componentes en condiciones estériles.

Solución fijadora cristal violeta y formol

- Cristal violeta	1,3 g
- Alcohol isopropílico	50 ml
- Formaldehído al 35-40 %	300 ml
- Agua	650 ml

Disolver por agitación y guardar a temperatura ambiente

Tripsina

- Tripsina (Difco) 1:250	1,25 g
- Tritriplex (EDTA)	0,1 g
- PBS	500 ml
- Penicilina:estreptomicina (10000unidades/ml:10000µg/l)	5 ml

Disolver por agitación. Esterilizar por filtración y guardar a 4°C.

(*) NOTA: El porcentaje de Suero fetal depende de si se está preparando el medio para la recuperación de células congeladas (10%), como medio de crecimiento (5%) o como medio de mantenimiento (1%).

Medio RPMI-1640 para hibridomas

- Medio 1640	10,4 g
- Agua bidestilada	1000 ml

Ajustar el pH a 4 con HCl 1N para favorecer la disolución del producto. Una vez disuelto, reajustar el pH a 7,2 con NaOH 1N antes de añadir bicarbonato sódico.

- Bicarbonato sódico 7,5 %(p/v)	26,7 ml
---------------------------------	---------

Esterilizar por filtración y guardar a 4 °C.

Antibióticos

Ácido nalidíxico

- Ácido nalidíxico	1 g
- NaOH 1M	2 ml
- Agua destilada	8 ml

Disolver el producto en NaOH por agitación. Una vez disuelto, añadir 8 ml de agua destilada. Esterilizar por filtración, alicuotar en tubos de 1,5 ml y guardar a (-20)°C.

Anexo 2: Tampones y reactivos**Tampón Glicina 0,25 M pH 9,5**

- Glicina	18,76 g
- Agua destilada	1000 ml

Disolver por agitación. Ajustar el pH a 9,5 con NaOH 10 M. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Tampón Salino-fosfato: PBS (1X)

- NaCl	8 g
- KCl	0,2 g
- Na ₂ HPO ₄	1,15 g
- KH ₂ PO ₄	0,2 g
- Agua destilada	1000 ml

Disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

PBS 2X: Se prepara según se ha descrito para el PBS 1X, pero disolviendo doble cantidad de cada producto en 1000 ml de agua destilada.

Sacarosa 20 %

- Sacarosa	20 g
- Agua destilada	ajustar a 100 ml

Disolver por agitación. Esterilizar por filtración. Guardar a 4 °C.

Preparación membranas de diálisis**Tampón de lavado**

- Na ₂ CO ₃	20 g
- EDTA 0,2 M	5 ml
- Agua destilada	995 ml

Disolver por agitación. Preparar inmediatamente antes de utilizar.

Tampón EDTA

- EDTA 0,2 M	5 ml
- Agua destilada	995 ml

Mezclar por agitación. Preparar inmediatamente antes de utilizar.

Tampón de diálisis

- NaCl	2,94 g
- Tris HCl pH 7,5 10mM	5 ml
- MgSO ₄	2,48 g
- Agua destilada	1000 ml

Disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Guardar a 4 °C.

Tratamiento con ADNasa

Tampón para ADNasa

- Acetato sódico 5mM	0,0684 g
- CaCl ₂ 1mM	0,011 g
- Glicerol	50 ml
- Agua bidestilada	50 ml

Disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Guardar a 4 °C.

Electroforesis de ADN

TBE 10X

- Tris base	109 g
- Ácido bórico	55,6 g
- EDTA	92 g

Disolver por agitación en 400 ml de agua bidestilada. Ajustar el pH a 8,3 con NaOH 1M. Ajustar el volumen a 1 litro con agua bidestilada.

TBE 1X y 0,5X (A partir del solución concentrada de TBE 10X)

Disolver respectivamente 1/10 o 0,5/10 (v/v) la solución TBE 10X con agua bidestilada estéril. Mezclar por agitación. Preparar inmediatamente antes de utilizar.

Agarosa en TBE 1X

Las soluciones de agarosa dependen del tipo de ADN en estudio y del protocolo utilizado (Tabla 1).

Disolver la cantidad de agarosa necesaria en 100 ml de TBE 1X (p/v) (Tabla 1) en una botella de vidrio. Agitar manualmente y disolver la agarosa por calor mediante la utilización de un horno microondas, durante aproximadamente 5 minutos a nivel bajo. La agarosa disuelta presenta un aspecto transparente y homogéneo sin grumos.

Dejar reposar la agarosa hasta que se enfríe (aproximadamente 50 °C). Vertirla sobre la cubeta en el caso de preparación de un gel horizontal o introducirla entre los dos vidrios con la ayuda de una pipeta en el caso de preparación de un gel vertical.

Tabla 1.- Porcentajes de agarosa utilizados según el protocolo y el tipo de ADN en estudio.

Protocolo	Tamaño del ADN	% del gel de agarosa	Cantidad de agarosa por 100 ml de TBE 1X
Extracción de ADN	Superior a 1 Kb	0,8 %	8 g
Electroforesis vertical	Variable	1,5 %	1,5 g
Primera PCR	Entre 1 Kb y 500 pb	2 %	2 g
PCR anidada	Inferior a 500 pb	3 %	3 g

Tinción con bromuro de etidio

Esta técnica permite visualizar el ADN presente en los geles de agarosa. Actúa intercalándose entre las dos cadenas de ADN, emitiendo, en este caso, fluorescencia de color rojizo cuando se expone a radiación ultravioleta.

Solución concentrada (*)

- Bromuro de etidio	200 mg
- DMSO (Dimetilsulfóxido)	10 ml
- Etanol absoluto	90 ml

Disolver por agitación. Guardar a 4 °C protegido de la luz. La solución se mantiene en estas condiciones durante largo tiempo.

Solución de bromuro de etidio 0,5 µg/ml (tinción de geles de agarosa)(*)

- Solución concentrada	50 µl
- Agua destilada	200 ml

Mezclar suavemente por agitación. Guardar a temperatura ambiente protegido de la luz. Se recomienda preparar solución nueva cuando se observe un descenso en la actividad del producto.

Extracción y precipitación de ADN

EDTA 0,2 M

- EDTA	7,44 g
- Agua bidestilada	100 ml

Disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Guardar a temperatura ambiente.

Proteinasa K

- Proteinasa K liofilizada .Sigma.	10 mg
- Agua bidestilada estéril.	1 ml

Disolver por agitación en condiciones estériles. Guardar la mezcla a (-20) °C hasta su utilización.

(*) NOTA: El bromuro de etidio es un potente carcinógeno. Se recomienda manipularlo con precaución.

SDS 10 %

- SDS	10 g
- Agua bidestilada	100 ml

Disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Guardar a temperatura ambiente.

Biofenol (*)

El Biofenol viene equilibrado comercialmente a un pH de 8,0. Presenta un color amarillo que permite distinguirlo de la fase acuosa del tampón utilizado para equilibrarlo al pH adecuado. Este tampón es inmiscible en el fenol y se advierten dos fases separadas. Antes de usarlo se recomienda mezclar las dos fases agitando por inversión y dejarlo en reposo hasta que se vuelvan a separar. Guardar a 4 °C protegido de la luz.

Acetato sódico 3 M

- Acetato sódico	41 g
- Agua bidestilada	100 ml

Ajustar a pH :4,5 - 5,5 con HCl 35%. Disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Guardar a temperatura ambiente.

Fijación de ADN a una membrana**SSC 6X**

- Tampón SSC 20X	33 ml
- Agua bidestilada estéril	100 ml

Mezclar por agitación y guardar a temperatura ambiente.

(*) NOTA: El biofenol es un producto altamente tóxico por inhalación y contacto. Se recomienda manipularlo con precaución.

Hibridación sonda radiactiva

Tampón hibridación sonda radiactiva

(Volumen final 7 ml para 1 membrana)

- SSC 20x	2,1 ml
- NaPO ₄ 1M	140 µl
- SDS 10%	0,7ml
- Esperma de salmón (1mg/ml)(*)	70 µl
- Reactivo de Denhard's	350 µl
- Agua destilada	3,64 ml

Mezclar por agitación. Preparar inmediatamente antes de utilizar.

Reactivo de Denhard's

- Ficoll	10 g
- Polivinilpirrolidona	10 g
- BSA (Suero de Albúmina bovina)	10 g
- Agua destilada	500 ml

Disolver por agitación. Esterilizar por filtración y guardarlo alicuotado a (-20) °C.

Tampón de lavado sonda radiactiva

- 6X SCC	170 ml
- SDS 10%	30 ml
- Agua destilada estéril	300 ml

Mezclar por agitación y guardar a temperatura ambiente.

Hibridación de una sonda marcada con digoxigenina

SSC 20X

- NaCl	175,3 g
- Citrato sódico	88,2 g
- Agua bidestilada	1000 ml

Disolver por agitación, ajustar el pH a 7,0 y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Guardar a temperatura ambiente.

(*) NOTA: Se recomienda hervir 5 minutos el esperma de salmón antes de incorporarlo al tampón.

SSC 5X+1%SDS

- SSC 20X	125 ml
- SDS 10%	5 ml
- Agua bidestilada estéril	370 ml

Mezclar por agitación y guardar a temperatura ambiente.

SSC 2X+1%SDS

- SSC 20X	50 ml
- SDS 10%	5 ml
- Agua bidestilada estéril	445 ml

Mezclar por agitación y guardar a temperatura ambiente.

Tampón de Hibridación

- SSC 20X	62,5 ml
- Agente bloqueante	50 ml
- Sarcosil 10 %	2,5 ml
- SDS 10%	0,5 ml
- Agua bidestilada	134,5 ml

Mezclar por agitación. Preparar inmediatamente antes de utilizar.

Agente bloqueante

- Agente bloqueante(Kit Digoxigenina Boehringer Mannheim)	10 g
- Tampón # 1	100 ml

Disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Guardar a 4 °C.

Tampón # 1

- Ácido Maléico	11,6 g
- NaCl	8,8 g
- Agua bidestilada	1000 ml

Disolver por agitación, ajustar a pH 7,5 y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos

Guardar a 4 °C

Tampón # 2

- Tampón #1	900 ml
- Agente bloqueante	100 ml

Mezclar por agitación y guardar a 4 °C.

Tampón #3

- Tris 1M pH 8,0	50 ml
- NaCl 5M	10 ml
- MgCl ₂ 1M	25 ml
- Agua bidestilada	415 ml

Mezclar por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Guardar a 4 °C

Tampón de lavado

- Tween 20	3 ml
- Tampón # 1	1000 ml

Mezclar por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Guardar a 4 °C

Detección de la sonda

Solución reveladora

- Revelador	100 ml
- Agua destilada	400 ml

Mezclar por agitación. Preparar inmediatamente antes de utilizar.

Solución Fijadora

- Fijador	100 ml
- Agua destilada	400 ml

Mezclar por agitación. Preparar inmediatamente antes de utilizar.

"Western blot": Preparación de un gel de poliacrilamida**Solución A : Acrilamida-Bis (30 % T- 27 % C)**

- Acrilamida (*)	29,2g
- Bis	0,8 g
- Agua destilada	100 ml

Disolver por agitación. Guardar a 4 °C durante un máximo de 3 meses protegido de la luz.

Solución B (Tampón de resolución: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)

- Tris base	18,15 g
- Agua destilada	100 ml

Disolver por agitación. Ajustar el pH con HCl 1N hasta 8,8. Guardar a 4 °C.

Solución C (Tampón de compactación: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)

- Tris base	6 g
- Agua destilada	100 ml

Disolver por agitación. Ajustar el pH con HCl 1N hasta 6,8. Guardar a 4 °C.

Persulfato amónico (APS 10 %)

- APS	1 g
- Agua destilada	10 ml

Disolver por agitación, alícuotar en microtubos y guardar a (-20) °C.

(*) NOTA: La acrilamida es neurotóxica. Se recomienda manipularla con precaución

Tampón de carga LSB 2X (Laemmli Sample Buffer)

(Para un volumen final de 80 ml)

- Tris-HCl pH 6,8. 0,5 M	20 ml
- Glicerol	16 ml
- SDS 10%	32 ml
- Azul de bromofenol 0,05 % (p/v)	4 ml
- 2- β -mercaptoetanol	8 ml

Mezclar por agitación y guardar a (-20) °C.

Mezclar el tampón de carga con las muestras que se pretenden estudiar, en relación 1:1 (v/v). Antes de cargarlas al gel se recomienda hervir las muestras 5-7 minutos (Ver apartado Material y Métodos Capítulo 1). Puesto que el 2- β -mercaptoetanol es un producto muy volátil, otra posibilidad es añadirlo después de hervir la muestra en lugar de incorporarlo inicialmente al tampón de carga. En este caso se añadirán 100 μ l de 2- β -mercaptoetanol por cada ml de LSB 2X.

Tampón de recorrido

- Tris base	3g
- Glicina	14,4 g
- SDS	1 g
- Agua destilada	1000 ml

Disolver por agitación y guardar a 4 °C.

Western blot : Inmunodetección

TBS-Tween+3% BSA

- TBS-Tween (5X)	100 ml
- BSA	15 g
- Agua destilada	400 ml

Disolver por agitación. Preparar inmediatamente antes de utilizar.

TBS-Tween 5X

- Tris	6,055 g
- NaCl	40,9 g
- Tween 20	5 ml
- Agua destilada	1000 ml

Disolver por agitación. Guardar a 4 °C.

TBS-Tween 1X

- TBS-Tween 5X	100 ml
- Agua destilada	400 ml

Mezclar por agitación. Preparar inmediatamente antes de utilizar.

Tampón base número 3 (5X).

- Tris-HCl 1M pH 9,6	250 ml
- NaCl	2,922 g

Disolver por agitación. Guardar a 4 °C.

Tris-HCl 1M pH 9,6

- Tris	60,57 g
- Agua destilada	500 ml

Ajustar el pH con HCl hasta pH 9,6. Disolver por agitación y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Guardar a temperatura ambiente.

Tampón para inmunodetección número 3

- Tampón base número 3	2 ml
- MgCl ₂ 2M (40X)	250 μl
- Agua destilada	10 ml

Mezclar por agitación. Preparar inmediatamente antes de utilizar.

Microscopía electrónica

Ácido fosfotúngstico 2% KOH, pH 7,2

- Ácido fosfotúngstico	2 g
- Solución KOH 0,1 M	100 ml

Ajustar el pH con KOH 1M a 7,2. Disolver por agitación y esterilizar por filtración (*). Guardar a temperatura ambiente.

(*). NOTA: Se recomienda volver a filtrar antes de su utilización, dado que tiende a formar precipitados.

Letter 10





