

Extracción de ADN de fagos

Introducción

Los fagos se producen en grandes cantidades (stock de alto título, véase el protocolo) mediante la infección de su huésped bacteriano, dando lugar generalmente a un lisado que contiene de 10^8 UFC/mL a 10^{11} UFC/mL en marine broth. A continuación, el fago se precipita con polietilenglicol (PEG), para poder concentrarlo aún más si es necesario, y el fago puede reabsorberse con un tampón compatible con nucleasas. En efecto, antes de extraer el ADN viral (protegido por la cápside), es necesario degradar el ADN y el ARN del hospedador bacteriano, sobre todo si se quieren producir bibliotecas de secuenciación. Estas nucleasas se inhiben añadiendo el agente quelante EDTA, y las proteínas pueden digerirse con proteinasa K. A continuación, el ADN fágico se purifica mediante extracción con fenolcloroformo y precipitación con etanol. Los kits comerciales pueden ser una alternativa, pero no funcionan con todos nuestros aislados, así que es mejor utilizar los (viejos) métodos probados.

Materiales

- 5x PEG solución (500 mL)
 - 5 M NaCl stock solución – 250 mL
 - PEG8000 – 100 g
 - H₂O cantidad necesaria 500 mL
 - Mezclar hasta que se disuelva
- SM buffer
 - NaCl 100 mM
 - MgSO₄·7H₂O 8 mM
 - Tris-Cl 50 mM pH7.5
- DNase RQ1 (Promega) y su buffer
- RNase
- EDTA 0.5N pH 8
- Proteinase K a 20 mg/ml
- SDS 20%
- Mix 1VPhénol 1V (cloroformo, isoamyl alcohol 24.1)=> comprar esta mezcla
- Cloroformo/isoamyl alcohol 24.1 : esto se puede comprar o hacer en el lab
- Acetato de sodio 3N pH 5.4
- Etanol puro, 70%
- TE: Tris 10mM pH7.5 et EDTA 1mM pH8

Método

Concentración PEG

1. A 40 mL de fago (título alto, esquizo 10^8 PFU/mL) añadir 10 mL de PEG 5X, mezclar invirtiendo el tubo e incubar toda la noche a 4°C (tubo cónico).
2. Centrifugar a $19.000 \times g$ durante 60 min a 4°C.
3. Resuspender el pellet con 500 µl de tampón SM a 4°C, puede almacenarse a 4°C.
4. Comparar el título de los fagos concentrados y no concentrados: ¿título final del fago?

Digestion nucleasa

1. Añadir la cantidad de DNasa necesaria para el tampón final 1X (50 µl de tampón 10X + 450 µl de concentrado de fago).
2. Mezclar pipeteando suavemente
3. Añadir 1µl de DNase RQ1 (Promega) a 1 Unidad/µl
4. Añadir 2,5 µl de ARNasa a 3,5 mg/ml
5. Mezclar pipeteando suavemente
6. Incubar a 37°C durante 30 minutos

7. Frenar la reacción añadiendo 20 µl de EDTA 0,5M pH8 a la preparación de 500 µl (20 mM final)=> proceder inmediatamente a la extracción.

Extracción

1. A 500 µl de fago tratado con nucleasas añadir 12,5 µl de una solución de 20 mg/ml de proteinasa K y 12,5 µl de SDS al 20%.
2. Mezclar invirtiendo suavemente el tubo dos o tres veces.
3. Incubar 30 min a 55°C
4. Añadir 2V de Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (Tomar una alícuota del frasco a un falcon y PIPETAR BAJO LA CAPA ACUOSA).
5. Mezclar invirtiendo suavemente el tubo dos o tres veces.
6. Centrifugar 5 min a 14.000 rpm.
7. Recuperar la fase superior en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, evitando la torta blanquecina en la interfase con la fase fenólica.
8. Añadir 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1).
9. Mezclar invirtiendo suavemente el tubo dos o tres veces.
10. Centrifugar durante 5 minutos a 14.000 rpm.
11. Recoger la fase superior en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, evitando la interfase.
12. Añadir 1/10 volumen de acetato de sodio 3N pH5.4, mezclar invirtiendo el tubo.
13. Añadir 2,5 volúmenes de etanol 100%, mezclar invirtiendo el tubo: ¿se ve una mancha gelatinosa? en caso afirmativo, pasar directamente a la centrifugación. Si no, incubar a -20°C durante al menos una hora (se puede parar ahí).
14. Centrifugar durante 10 minutos a 14.000 rpm, RT. Laval el pellet con 500µl 70% etanol a RT.
15. Centrifugar durante 5 minutos a 14.000 rpm, RT
16. Re-suspender con 50 µl de tampón TE (aumentar el volumen si es viscoso) incubar 1H a 65°C o ON a 4°C
17. Cuantificar con nanodrop (prestar atención a la relación 260/280, que debe estar entre 1,7 y 2).
18. Comprobar la calidad del ADN en un gel de migración al 0,7% 50V ON a 4°C

Tips importantes!

Los kits comerciales pueden ser una alternativa, pero no funcionan con todos nuestros aislados, por lo que es mejor utilizar los (viejos) métodos probados.

Referencias

- 1- Cahier K, Piel D, Barcia-Cruz R, Goudenège D, Wegner KM, Monot M, Romalde JL and Le Roux F*. Environmental vibrio phage-bacteria interaction networks reflect the genetic structure of host populations. **Environmental microbiology** 2023 Mar 6. doi: 10.1111/1462-2920.16366.
- 2- Piel D, Bruto M, Labreuche Y, Blanquart F, Chenivesse S, Lèpanse S, James A, Dubert J, Petton B, Lieberman E, Wegner KM, Hussain FA, Kauffman KM, Polz MF, Bikard D, Gandon S, Rocha EPC and Le Roux F*. Phage-host coevolution in natural populations. **Nature Microbiology**. 2022 Jul;7(7):1075-1086.