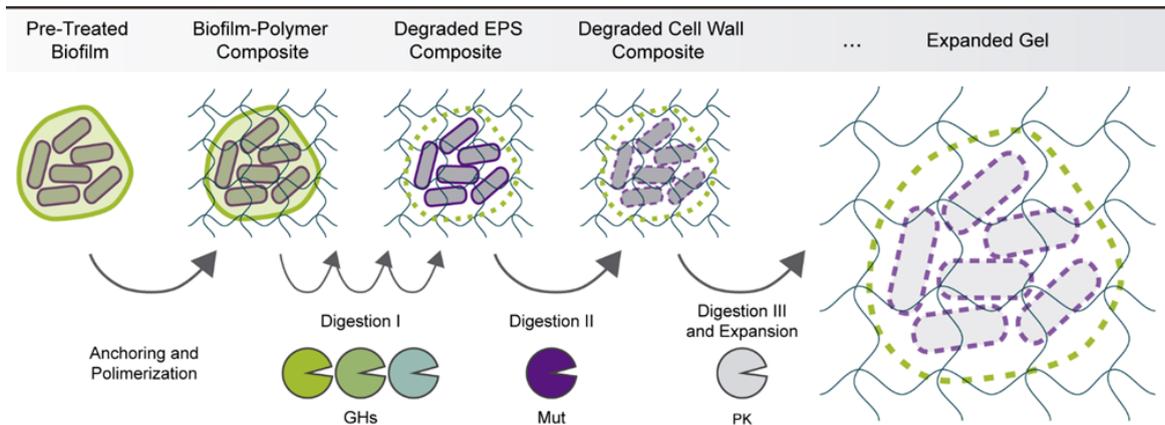


Microscopía de Expansión en biofilms de *Proteus mirabilis*



Introducción

El objetivo de este práctico es conocer los procedimientos asociados a ExM, llevar a cabo los pasos de gelificación de la muestra, expansión de los geles y montaje para microscopía, y capturar imágenes de muestras expandidas y sin expandir con microscopía confocal de disco giratorio. Con las imágenes que se adquieran se deberá estimar el factor de expansión obtenido aplicando conceptos y metodologías de procesamiento y análisis de imágenes aprendidas a lo largo del curso. Para ello, se tendrán a disposición biofilms de *P. mirabilis* ATCC 12453 crecidos sobre cubreobjetos de 12 mm, previamente fijados y teñidos fluorescentemente contra pared celular (conjugado fluorescente de lectina WGA-AlexaFluor 488, ex/em: 488/520 nm).

La variante de ExM que se experimentará es un prototipo desarrollado para expandir biopelículas de *P. mirabilis* de 48 horas de cultivo, bautizada como BiofilmExM (bExM). bExM se basa en la degradación de componentes estructurales presentes en biofilms bacterianos, como los exopolisacáridos de la matriz de EPS, el peptidoglicano de la pared celular bacteriana y proteínas en general. Para ello, las muestras de biofilm son sometidas a digestiones enzimáticas consecutivas que hidrolizan dichos componentes.

Procedimiento:

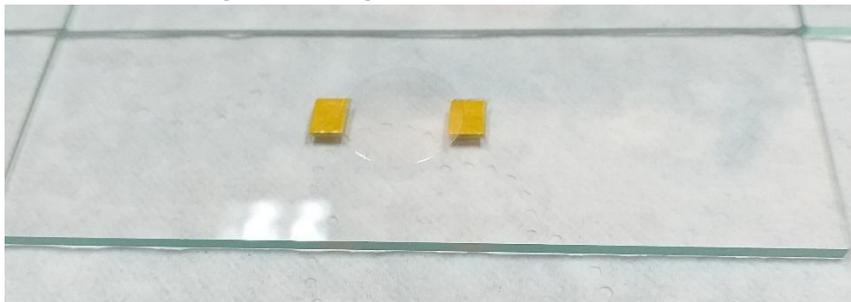
Planificación

Día	Actividades
Día 1 (Lunes)	Gelificación de muestras de biofilms. Tinción fluorescente de ADN. Expansión y montaje.
Día 2 (Martes)	Captura de imágenes microscopía confocal
Día 3 (Jueves)	Procesamiento y análisis de imágenes

Nota: secciones de los procedimientos escritos en rojo no se realizarán por falta de tiempo.

1. Gelificación de muestras de biofilms

1. Preparar las pre-cámaras de gelificación usando portaobjetos y cinta de doble cara para actuar como espaciadores de 400 μm . La cinta doble cara tiene aproximadamente 100 μm de grosor, por lo que se debe recortar y plegar sobre sí misma para crear espaciadores de la medida requerida. Construir las pre-cámaras de gelificación según se puede observar en la siguiente imagen:



Pre-cámara de gelificación. Sobre un portaobjetos, posicionar 2 espaciadores de cinta doble cara como se observa en la imagen. El cubreobjetos de vidrio de 12 mm se muestra para referencia de la distancia que deben tener los espaciadores entre sí.

2. Preparar la solución de gelificación. Sobre hielo, se mezclan las soluciones de monómero, acelerador TEMED, inhibidor 4-hydroxy-TEMPO (4HT) y de iniciador persulfato de amonio (APS), en proporciones 47:1:1:1, respectivamente. La solución de iniciador se debe agregar al final para evitar una gelificación prematura. Las soluciones deben agitarse para asegurar una mezcla homogénea.

Preparar 900 μL de solución de gelificación, mezclando las siguientes cantidades en un tubo 1.5 mL:

Solución de monómero (846 μL) (Mantener en hielo para prevenir la gelificación prematura).

Solución de inhibidor (18 μL): 4-hydroxy-TEMPO (solución stock de 4HT a 0.5%, concentración final de 0.01% m/v).

Solución de acelerador (18 μL): TEMED (solución stock de TEMED al 10%, concentración final de 0.2% m/v).

Solución de iniciador (18 μL): APS (Solución stock de APS al 10%, concentración final de 0.2% m/v; se debe agregar al final)

3. Retirar la solución de monómero cubriendo los biofilms y reemplazarla por 300 μL de solución de gelificación. Agitar suavemente la placa y almacenar a 4°C durante 4 a 5 minutos para permitir la difusión de los componentes de gelificación a través del biofilm.
4. Con premura, depositar una gota de solución de gelificación entre los 2 espaciadores (40 μL es suficiente) sobre el portaobjetos y montar el biofilm boca abajo sobre dicha gota de solución y los 2 espaciadores, evitando la deposición de burbujas. Esto constituirá lo que es la cámara de gelificación, la cual se puede ver ilustrada en la siguiente figura:

Cámara de gelificación (vista lateral)

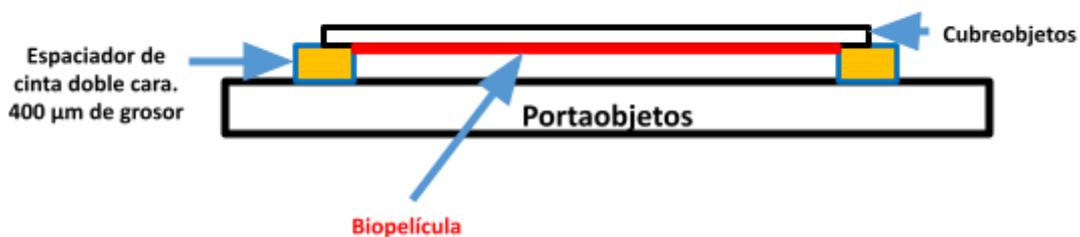


Diagrama de la cámara de gelificación. Ilustración de la organización de los componentes utilizados para construir una cámara de la gelificación para muestras de ExM. En rojo se representa a una biopelícula bacteriana formada sobre la superficie de un cubreobjetos. En anaranjado, espaciadores de 400 μm de grosor hechos con recortes de cinta adhesiva de doble cara de 100 μm de grosor, los cuales permiten que el gel embeba a toda la muestra, que éste no se excluya a través de los bordes de la cámara y también que la muestra no se aplaste entre el portaobjetos y el cubreobjetos. La figura no está a escala.

5. Almacenar la cámara de gelificación dentro de una cámara húmeda y dejar gelificar a 37°C durante 2 horas.
6. Retirar la cámara de gelificación de la cámara húmeda y llevar a visualización bajo microscopio confocal de disco giratorio. Tener cuidado de no dejar las muestras gelificadas fuera de la cámara húmeda ya que los geles son propensos a desecación.
7. Marcar sobre el cubreobjetos la(s) región(es) de interés para la expansión. Luego, abrir la cámara de gelificación cuidadosamente y remover el exceso de gel usando una cuchilla quirúrgica (Esto se hace debido a que si se expande el gel completo, éste alcanzaría un tamaño demasiado grande, creando dificultades para la manipulación, montaje y visualización).
8. Depositar los geles previamente acotados en una placa de pocillos y someterlos a los pasos de digestión respectivos.

2. Tinción fluorescente de ADN para muestras gelificadas y digeridas (previo a expansión)

Solución de tinción de SYTO 61 5 μ M :

Solución	Volumen (μ L)
Stock de SYTO 61 5 mM	1
PBS 10x	999

1. Retirar la solución en donde se encuentran inmersos los geles (PBS 10x) y reemplazar por 300 μ L de solución de tinción de SYTO 61. Tener precaución de no aspirar los geles con la punta de la micropipeta ya que pueden dañarse. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente (RT) con agitación suave.

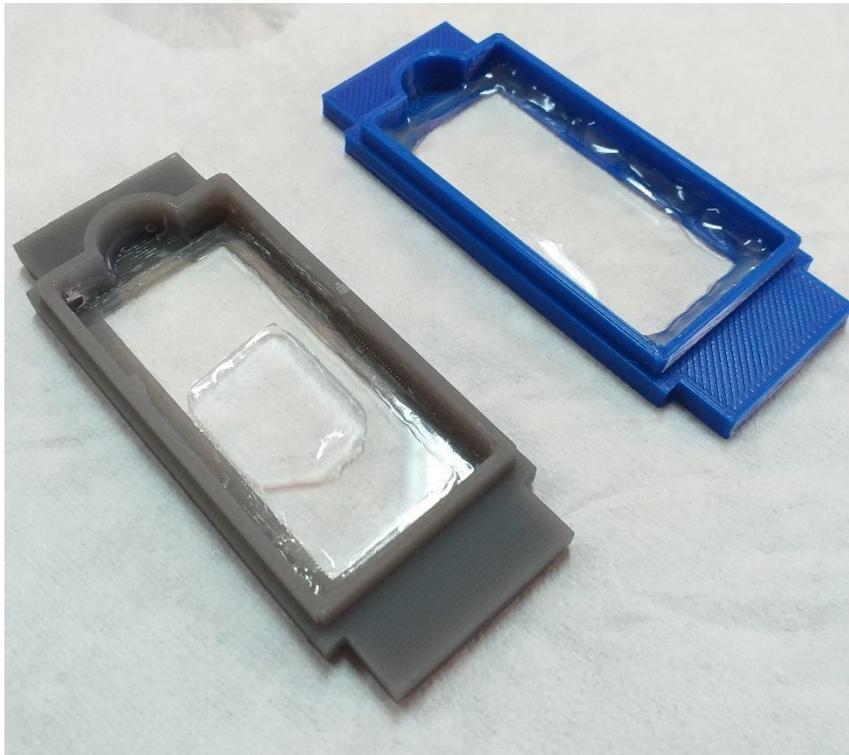
3. Expansión y montaje de geles

1. Retirar la solución tinción de SYTO 61 y traspasar los geles a una placa Petri de 60 mm, evitando a toda costa que los geles se plieguen sobre sí mismos.
2. Agregar agua desionizada en exceso e incubar bajo agitación suave y a RT por 20 min. Repetir este proceso 5 veces.
Paralelamente a la expansión, se deben preparar las cámaras de visualización para microscopía. Empapar la superficie de vidrio con poli-L-lisina al 0.1% durante 20 minutos. Luego, retirar la solución de poli-L-lisina y realizar 2 lavados con agua desionizada para remover el exceso. Luego, dejar secar al aire durante una hora, o al interior de una

incubadora a 37°C para acelerar el proceso de secado. Este recubrimiento con poli-lisina se emplea para inmovilizar los geles para su visualización.

3. Tras el quinto ciclo de diálisis, remover el agua cubriendo los geles y con la ayuda de un pincel y un cubreobjeto de 24x50 mm, traspasar los geles expandidos a las cámaras de visualización. La superficie de vidrio de éstas debe estar completamente seca, y a los geles expandidos se les debe retirar el exceso de agua con la ayuda de papeles Kimwipe para evitar que el agua se interponga entre la superficie del gel y el recubrimiento de poli-lisina sobre la superficie del vidrio.

4. Una vez montados los geles en su respectiva cámara de visualización, agregar agua desionizada hasta cubrir completamente los geles, como se muestra en la imagen a continuación. Es importante que los geles expandidos se encuentren hidratados durante todo el proceso de visualización para evitar su encogimiento durante la captura.



Geles expandidos montados en cámaras de visualización. A la izquierda se muestra un gel montado sin sumergir y a la derecha un gel sumergido completamente en agua.