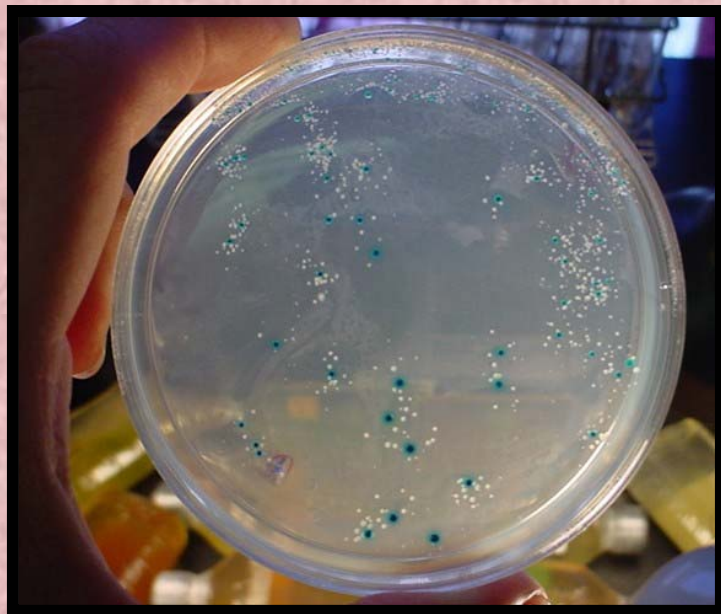


Laboratorio de **Genética de Bacterias**



Ríos-Velázquez • Rivera • López

Laboratorio de Genética de Bacterias

Primera edición



Ríos-Velázquez • Rivera • López

Laboratorio # 1: Preparación de Soluciones y uso de equipo en el laboratorio de genética bacteriana

1

Objetivos: Al finalizar el laboratorio se espera que el estudiante:

- Pueda preparar las soluciones y medios de cultivos utilizados rutinariamente en un laboratorio de genética bacteriana, usando las fórmulas matemáticas y reactivos apropiados.
- Identifique y maneje el equipo de laboratorio a ser utilizado durante el semestre.

Materiales:

Agua destilada
Agarosa
Tris
Tris-Cl
Tris-acetate
Acetato de Sodio (NaAc)
Ácido acético glacial
NaCl
Acido Ethylenediaminetetraacetico (EDTA)
LB (Luria Bertani) caldo
Tubos de ensayo y botellas de soluciones
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

Conceptos

1. **Solución stock:** es una solución que posee una concentración alta de uno o varios compuestos o reactivos químicos conocidos.
2. **Material Data Safety Sheets (MSDS)** = es un documento que contiene toda la información relacionada con una sustancia química, incluye información química y molecular del compuesto, medidas de seguridad que se deben de tomar en el momento del manejo rutinario de la sustancia y medidas a tomar en caso de que surja alguna emergencia.

Soluciones a prepararse:**1. 0.5M EDTA pH 8.0 (1L)**

Disolver 186.1g Na₂EDTA en 800ml de agua
Ajustar pH a 8.0 con NaOH
Completar hasta el volumen de 1L

2. TAE 10X (1L)

48.4g Tris base
11.42ml Ácido acético
20.0ml 0.5M EDTA

3. Tris-Cl 1M

Añada la cantidad de Tris-Cl calculada para 500 ml en 350ml de agua destilada.
Ajuste el pH
Complete hasta un volumen de 500ml

4. Tris acetate 0.5M (1L)

Vertir 60.57g de Tris añadir agua y ajustar el pH con ácido glacial acético.
Completar a 1L.

5. TE 10X pH 8.0

100mM Tris-Cl (pH 8.0)
10mM EDTA (pH8.0)

6. NaCl 5M

Para preparar 200ml de solución mezcle ____ g de NaCl y complete el volumen a 200ml

7. SDS 1%

Diluir 1g de SDS en 99ml de agua. Puede calentar la solución a 65°C si la misma no se disuelve.

8. Acetato de sodio 1M

Para preparar 200ml de solución mezcle ____ g de Acetato de Sodio y complete el volumen a 200ml

9. Amortiguador de lisis

40 mM Tris-acetate pH 7.8
 20 mM Sodium- acetate
 1.0 mM EDTA
 1% SDS

10. Agarosa (% indicado)

Según el porcentaje de agarosa a preparar, debe de diluir la misma en el amortiguador que este disponible (TAE, TBE etc.). Disponga la agarosa en el recipiente que contiene el amortiguador y caliente la solución hasta que la misma se disuelva (observará que se torna transparente).

11. LB (Luria Bertani)

10gNaCl
 5g Yeast Extract
 10g Triptona
 * Si es LB en platos Petri (sólido) se añade 15g de agar (agente solidificante) para 1L de solución

12. Loading Buffer (Azul de bromofenol)

30% glycerol y 0.30% de Azul de bromofenol

Fórmulas importantes para preparación de soluciones:

$$1. C_1V_1 = C_2V_2 ;$$

C_1 = concentración inicial C_2 concentración final

V_1 = volumen inicial V_2 volumen final

$$2. g = M (PM) V; (g = \text{gramos}, M = \text{Molaridad}, PM = \text{peso molecular y } V = \text{volumen en Litros})$$

Asignación:

Deberán conseguir los MSDS de los reactivos usados en el laboratorio.

Preguntas de conceptualización:

1. Usted está en el laboratorio y necesita preparar 25 platos de LB y cada plato deberá contener un volumen de 20ml. Calcule la cantidad indicada para cada uno de los componentes para el medio de cultivo.
2. ¿Cómo prepararía 500ml del siguiente amortiguador de lisis partiendo de las siguientes soluciones stock?

Concentración soluciones stock	Concentraciones deseadas
3M Tris-acetate pH 7.8	800 mM Tris-acetate pH 7
2M Sodium- acetate	2.5 mM Sodium- acetate
5M EDTA	74 mM EDTA
50% SDS	0.89% SDS

Referencias

Sambrook, J. and D. Russell. 2001. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. pp 5.8, 5.76.

Laboratorio # 2: Extracción de DNA genómico de bacterias

2

Objetivos: Al finalizar el laboratorio se espera que el estudiante:

- Aísle DNA de distintos microorganismos usando métodos físicos, químicos y enzimáticos.
- Compare y contraste entre los diversos métodos de extracción de DNA.
- Identifique y ensamble el equipo para la electroforesis de DNA.
- Determine la concertación y pureza de DNA mediante espectrofotometría.

Materiales:

Cultivos recientes de *E.coli*, *B cereus*, *S. cerevisiae* , Basidiomyceto
Amortiguador de lisis
NaCl 5M
Cloroformo
Etanol absoluto frío
TE
RNAsa
Cámara de electroforesis

Información general

Para una extracción de DNA efectiva usted deberá conocer las características básicas de la muestra con la que trabajará, se debe conocer si el DNA a ser extraído proviene de una célula procariótica o eucariótica dado que los componentes que forman la pared y membrana celular de estos organismos es distinta. Existen diversos métodos de extracción de DNA que se ajustan a las necesidades de cada tipo de muestra, estos incluyen tratamientos físicos, químicos, enzimáticos o una combinación de los mismos.

La preparación de amortiguador de lisis para una extracción de DNA es un ejemplo de un método químico de extracción. En dicho amortiguador se le añaden

detergentes tales como el SDS, CTAB o enzimas tales como la lizoenzima y agentes químicos los cuales promueven una lisis celular efectiva.

La técnica de extracción física de DNA utilizando esferas de cristal o porcelana conocidas en inglés como “bead beating”. Involucra el añadir partículas en forma de esferas de diversos tamaños, a la muestra. Mediante el proceso de colisión dichas moléculas van a fusionar la pared celular del organismo causando mayor efectividad en la lisis celular. Otro método físico es el cambio drástico de temperaturas conocido como “freezing and thawing”, en la misma se realizan alrededor de 3 ciclos en donde se coloca su muestra a una temperatura entre -70 á -80°C y luego se calienta.

Una vez se extrae el DNA se debe de conocer la concentración del mismo. Una de las técnicas para conocer la concentración del DNA es la espectrofotometría. Otro método que nos permite estimar la concentración del DNA, involucra el realizar una electroforesis con estándares o marcadores con concentración conocida. Si se conoce la concentración de las bandas del marcador, se puede comparar la intensidad de las bandas de su muestra con la de sus estándares y hacer una estimación de concentración.

Protocolo de extracción de DNA genómico:

1. 1.5 ml de cultivo saturado de bacterias, centrifugar 5 min. a 13,000 rpm.
2. Resuspender el sedimento con 200 μl de amortiguador de lisis
3. Añadir 66 μl de 5M NaCl y mezclar bien (para remover la mayor cantidad de proteínas y debris celular)* Puedes calentar por 10 minutos a 65°C para mayor lisis celular.*
4. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min., transferir el sobrenadante a un microtubo nuevo.
5. Añadir 1 Vol. de phenol/cloroformo o cloroformo y mover invirtiendo el microtubo gentilmente hasta ver una solución blancuzca.
6. Centrifugar a 13,000 rpm por 3 min., transferir sobrenadante a un microtubo nuevo.

*es recomendable hacer una segunda extracción con cloroformo para mayor limpieza del DNA.

7. Añadir 2 volúmenes de etanol absoluto (frío) o 0.6 volúmenes de alcohol isopropílico para precipitar el DNA por 15 minutos, centrifugar 5 min. a 13,000 rpm. (si se coloca en hielo o en -20°C se puede precipitar mayor cantidad de DNA)
8. Descartar el sobrenadante y añadir 500 µl de etanol al 70% para lavar el DNA, centrifugar por 5 minutos a 13,000rpm.
9. Descartar el sobrenadante y secar en “Speed Vac” y resuspender en 40-70µl TE 1X (RNA se remueve utilizando RNAsa 10µg/µl, colocando en baño de Maria 30 min. seguido de una extracción con cloroformo para remover la RNAsa – **paso 5**)
10. Guardar a -20°C

Amortiguador de lisis	Tris-Acetato
40 mM Tris-acetate pH 7.8 20 mM Sodium- acetate 1.0 mM EDTA 1% SDS	Para preparar 1 litro de solución a 0.5M: se añaden 60.57g Tris y se completa con agua. Se ajusta el pH con ácido acético glacial MM= 121.14 g/mol

* RNAsa

- 10mM Tris-Cl pH 7.5
- 15mM NaCl
- Calentar a 80⁰ C por 10 minutos
- Dejar enfriar, añadir RNAsa a 10ug/ml
- Guardar a -20°C

Cuantificación de DNA utilizando un espectrofotómetro

La concentración de ácidos nucleicos puede ser determinada utilizando la espectrofotometría ya que estos absorben luz ultravioleta a un intervalo de 260nm. La concentración de ácidos nucleicos es determinada con la siguiente formula:

ug/ml del ácido nucleico = (Abs_{260nm})(factor de dilución recíproco)(factor de conversión de concentración)

El factor de conversión de concentración es que por cada densidad óptica a 260nm (OD_{260nm},) es equivalente a 50ug/ml de DNA y si nos referimos a RNA el factor es 40ug/ml. Además de medir a 260nm se recomienda hacer unas medidas a 280nm para comprobar impurezas en el ácido nucleico por la presencia de proteínas. Las proteínas pueden absorber a este rango debido a la presencia de aminoácidos aromáticos como triptofano y tiroxina. Para esto divide el resultado de la absorbancia de 260nm sobre la de 280nm. Esto le indica la pureza de su muestra con respecto a proteínas. Resultados mayores de 1.7 se consideran una muestra pura. Para realizar el ejercicio, en una cubeta de cuarzo añada 658 µl de TE o agua y 2µl de la solución de DNA. Esto de dará una dilución en factor de 2/660 el cual su recíproco sería 330. Si la absorbancia a 260nm fue de 0.008 entonces:

$$[\text{DNA}] = (50\text{ug/ml})(0.008)(330) = \mathbf{132\text{ug/ml o }132\text{ng/}\mu\text{l}}$$

Procedimiento

1. Tome dos celdas o cubetas de cuarzo limpias. En una añada 1000µl de TE (esta solución será su estándar). En la segundo cubeta añada su muestra de DNA diluida 1000 veces.
2. Ajuste el largo de onda del espectrofotómetro a 260 nm.
3. Coloque el estándar y calibre el espectrofotómetro (oprime la tecla de “auto zero”).
4. Proceda a tomar la medida de Absorbancia de su muestra
5. Anote sus medidas en la tabla que se le provee continuación.
6. Calcule la concentración de su muestra de DNA.

7. ¿Cuán pura esta su muestra? ¿Qué cosas podría hacer para aumentar la pureza de su muestra?

Absorbancia nm		260/280	Concentración µg/ml
260	280		

Electroforesis de DNA

1. Limpie la cámara de electroforesis, coloque la peinilla de la cámara en el lugar correspondiente y proceda a vertir alrededor de 25-30ml de agarosa 1% (líquida) en la cámara, permita que la agarosa se solidifique.
2. Añada TAE 1X a la cámara de electroforesis justo hasta donde está la marca indicadora del fabricante.
3. Con sumo cuidado remueva la peinilla
4. Tome ___ µl del marcador molecular que este disponible y añada ___ µl de “loading dye” mezcle bien y proceda a colocar esta solución en la primera fosa de su gel de electroforesis.

5. Tome un 1% del total de su muestra y añada __ μ l de “loading dye”. Luego proceda colocar esta solución en la gel de electroforesis.
6. Una vez haya servido todas sus muestras en el gel, coloque la tapa correspondiente a la cámara, verifique los electrodos y asegúrese que el electrodo negativo pare con el negativo y el positivo con el positivo. Conecte dichos electrodos en la fuente de energía. **RECUERDE EL DNA TIENE CARGA NEGATIVA, ASÍ QUE LO COLOCARÁ EN EL POLO NEGATIVO (ELECTRODO NEGRO) PARA QUE MIGRE HACIA EL POLO POSITIVO (ELECTRODO ROJO).**
7. Ajuste el voltaje de la fuente de energía usando, 10V por cada cm^2 del largo del gel.
8. Luego de aproximadamente 45 – 50 minutos deberá apagar la fuente de energía, remover el gel y colocarlo en bromuro de etidio (**use guantes en todo momento solución carcinogénica**) durante 15 min. (para teñir el DNA presente en la gel). El tiempo que se deje la gel tiñendo, depende de la concentración del bromuro de etidio.
9. Coloque el gel en agua durante 5 min. para destañirla (**use guantes en todo momento solución carcinogénica**)
10. Observe la gel en la lámpara UV.
11. Luego de anotar sus resultados descarte la gel en el zafacón de Biohazard.

Asignación:

Consiga dos artículos científicos que describan métodos de extracción de DNA para diferentes organismos y prepare una tabla donde usted anotará las similitudes y diferencias entre ambos protocolos.

Preguntas de conceptualización:

Diseñe un método para extraer DNA de un hongo, de una planta y de *Staphylococcus aureus*. ¿Cuales serían las diferencias?

Referencias

Sambrook, J. and D. Russell. 2001. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. pp 5.8, 5.76.

Laboratorio # 3: Plásmidos: aislamiento y purificación

3

Objetivos: Al finalizar el laboratorio se espera que el estudiante:

- Describir los tipos de plásmidos su importancia función y usos en la ingeniería genética.
- Se relacione con diversos métodos de extracción y purificación de plásmidos.

Materiales:

Perfectprep Plasmid Mini Sample Kit
Cultivo bacteriano que contenga el plásmido

Solución I: Glucosa/Tris/EDTA (GTE)

50mM glucosa
25mM TrisCl pH 8.0
10mM EDTA
Añada 4mg/mL lisozima antes de utilizar.

Solución II: NaOH/SDS

0.2N NaOH
1% (w/v) SDS
Prepare esta solución antes de ser utilizada.

Solución III: Acetato de Potasio 5M

29.5 mL ácido acético glacial
KOH en grano hasta pH de 4.8
H₂O hasta 100 mL
Guardar a temperatura ambiente, no esterilizar.

RNAasa

10mM TrisCL pH 7.5
15mM NaCl
Caliente a 80°C por 10 min. Permita que la solución enfrie a temp. ambiente y guarde en alícuotas a -20°C. Diluya a 10 µg/mL.

Información general

Los plásmidos son moléculas de DNA extracomosomal los cuales están presentes en algunas células bacterianas, levaduras y hongos. Los mismos poseen DNA de doble hebra, mayormente son circulares pero también se han encontrado plásmidos lineares. La replicación de los plásmidos es independiente de la replicación del cromosoma del huésped ya que los plásmidos poseen su propio origen de replicación. El número de copias de un plásmido en la célula es variable todo depende del origen de replicación del que posea el mismo y su regulación. Los plásmidos no son esenciales para el desarrollo o supervivencia de la célula pero le proveen una ventaja competitiva a las células que los poseen, dado a que los plásmidos poseen genes que le confieren características selectivas a su huésped tales como resistencia a antibióticos, nuevas habilidades metabólicas como degradación de carbohidratos, factores de virulencia y producción de toxinas entre otros.

Existen unos requerimientos básicos que un plásmido debe poseer para que sea un buen vector al aplicar su uso en la biología molecular. El mismo debe poseer un origen de replicación, un gen para un marcador de selección (ya sea resistencia a algún antibiótico) y un lugar de clonaje múltiple (MCS). El MCS es una región donde pueden digerir varias enzimas de restricción pero solamente una vez.

Una célula puede perder su plásmido luego de varios ciclos de replicación, pero para que esto sea posible deben de ocurrir ciertos cambios en las condiciones ambientales. A este proceso se le conoce como “plasmid curing”. Existen diversos métodos para el aislamiento de plásmidos. Las técnicas de Minipreps o mini preparaciones de plásmidos, permiten la recuperación de plásmidos de DNA circular sobre el DNA cromosomal. El tratamiento de las células con una base de pH alto o un detergente interrumpe el apareamiento de las bases nitrogenadas, ocasionando que el DNA cromosomal se desnaturalice y se separe. Por el contrario la configuración superenrollada del plásmido se mantiene estable.

La lisis alcalina es el método mayormente utilizado para el aislamiento de plásmidos circulares proveniente de células bacterianas. Existen diversos protocolos para realizar lisis alcalina pero todos se rigen por los siguientes pasos básicos.

- a. Remover las células del medio de cultivo en caldo mediante centrifugación.
- b. Descartar el sobrenadante para reducir contaminación mediante fragmentos de la pared celular del huésped.
- c. Resuspender las células en un amortiguador que contenga Tris, EDTA y glucosa.
- d. Lisar las células con NaOH y SDS
- e. Unión de las hebras de DNA y remoción de contaminación mediante el acetato de potasio.
- f. Precipitación del DNA de plásmido mediante alcohol (etanol o isopropanol) y una sal (Acetato de amonio, Cloruro de litio, Cloruro de sodio o Acetato de sodio) .
- g. Enjuague del material genético con EtOH al 70%
- h. Resuspender el material genético.

Protocolo de extracción de Plásmidos (Mini-prep)

Día # 1

- Inocular la bacteria deseada (contiene plásmido) en caldo nutritivo por 24 horas. Recordar que si el plásmido tiene algún gen de selección, como por ejemplo resistencia a algún antibiótico, se debe inocular la bacteria en un medio nutritivo que contenga ese antibiótico.

Día # 2

- Transferir 1.5 ml de la bacteria en un microtubo (1.5ml) estéril y centrifugar a 13,000 rpm (revoluciones por minuto) por 2 minutos para formar un “pellet” de bacterias.
- Descartar el sobrenadante y resuspender cada “pellet” en 100 µl de la solución I e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Recordar que la Sol. I debe estar en hielo.

- Añadir 200 μ l de la Solución II (fría) y mezclar bien invirtiendo el microtubo. Incubar en hielo por 5 minutos.
- Añadir 150 μ l de las Solución III y mezclar mediante vortex. Incubar en hielo por 5 minutos.
- Nuevamente vortex varios segundos y centrifugar por 5 minutos a 13,000 rpm.
- Transferir el sobrenadante a un microtubo estéril. Añadir 1 volumen de phenol/cloroformo/alcohol isoamílico (1:1:4), vortex y centrifugar 1 minuto a 13,000 rpm.
- Transferir la fase acuosa (arriba) a un microtubo estéril y añadir 2 volúmenes de alcohol absoluto (etanol 100%). Mezclar invirtiendo el tubo y dejar incubando por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar por 5 minutos a 13,000 rpm y descartar el sobrenadante.
- Lavar el sedimento añadiendo 1ml de alcohol al 70 % (etanol) y mezclar invirtiendo.
- Dejar secar el sedimento no mas de 5 min.
- Resuspender el sedimento en 50 μ l de TE 1X y añadir 1 μ l de RNAasa A.
- Guardar a -20° C.

Asignación:

Consiga el mapa del vector con el que su grupo está trabajando. Haga una lista de las características especiales que posee su vector y la célula huésped que lo contiene.

Preguntas de conceptualización:

¿Pueden los plásmidos de un grupo de microorganismos (ej. gram-positivos) replicarse en otro grupo de microorganismos (ej. gram-negativos)? ¿Por qué?

Referencias

Sambrook, J. and D. Russell. 2001. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. pp 5.8, 5.76.

Laboratorio # 4: Amplificación de diversos genes utilizando la Reacción de Polimerasa en cadena (PCR)

4

Objetivos: Al finalizar el laboratorio se espera que el estudiante:

- Identifique los pasos de una reacción de PCR.
- Desarrolle una reacción de PCR tomando en cuenta los parámetros involucrados en la amplificación y el tipo de material genético.
- Discuta la importancia de cada uno de los reactivos utilizados para la amplificación del material genético mediante PCR.

Materiales:

Thermociclador
Micro tubos y tubos para PCR
Muestra de DNA
Buffer 10X para PCR
Taq polimerasa o Vent polimerasa
Deoxirubonucleotidos (dNTP's)
Cofactor apropiado (de acuerdo a la polimerasa utilizada); $MgCl_2$, $MgSO_4$
Iniciadores (se suministran según la muestra a amplificarse)
Agua deionizada estéril

Información general

La técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) es amplificar o aumentar el número de copias de un fragmento dado de DNA. Para lograrlo existen tres pasos esenciales que se repiten de 25 a 35 ciclos. Todo esto ocurre en una máquina conocida como el termociclador la cual aumenta o disminuye la temperatura de los tubos que contienen la reacción de PCR en periodos cortos de tiempo. Estos pasos son la desnaturalización, el “annealing” y la extensión. La desnaturalización consiste en separar la doble hebra de DNA rompiendo los enlaces de hidrógeno entre las hebras, convirtiendo la molécula en hebra sencilla. Usualmente la temperatura utilizada fluctúa entre 94-95 °C. En el “annealing”, los iniciadores se unen a las hebras guías mediante

complementariedad de bases. Los mismos hibridizan en regiones específicas de la hebra sencilla de DNA. La temperatura de “annealing” depende del T_m de los iniciadores (Típicamente se utilizan 5 grados por debajo del T_m más bajo de los dos iniciadores). El T_m se define como la temperatura a la cual el 50% de los oligonucleotidos presentes en la reacción han hibridizado con su hebra complementaria. Luego la unión del iniciador y la hebra guía es reconocida por la DNA polimerasa la cual va colocando nuevos nucleótidos de acuerdo a la secuencia de la hebra guía. La polimerasa reconoce estas secuencias que por complementariedad forman DNA de hebra doble y comienza a colocar bases nitrogenadas, este paso es conocido como la extensión. La polimerasa va colocando los dinucleotidos trifosfatados (dNTP's) de 5'a 3' leyendo el DNA de 3'a 5'. La temperatura que se utiliza para la extensión es usualmente 72°C ya que ésta es la temperatura óptima de actividad para la mayoría de las polimerasas.

Existen diferentes reactivos que son necesarios para que las reacciones de PCR se lleven a cabo adecuadamente. Estos son: un amortiguador, una fuente de Mg^{++} que funcione como cofactor ($MgCl_2$ o $MgSO_4$), dNTP's, iniciadores, DNA (hebra guía) y la DNA polimerasa. La concentración de éstos reactivos depende del tamaño del fragmento a amplificarse. Por ejemplo: si vamos a amplificar un fragmento de 500pb vs un fragmento de 5500pb, los dNTP's deben estar en mayor concentración para el fragmento de 5500pb. Las concentraciones sugeridas por reacción son las siguientes; el $MgCl_2$ o $MgSO_4$ se utiliza a una concentración de 2.5mM, 1 pmol de cada iniciador, 0.01-0.1µg de DNA y 0.025U/µl de la polimerasa. Los iones de magnesio son bien importantes ya que éstos pueden afectar el “annealing” y la actividad de la enzima. Por supuesto que cada investigador puede optimizar su proceso de amplificación creando lo que se conoce como curvas de los distintos reactivos. El propósito de éstas, es cambiar las concentraciones de uno de los reactivos y observar cual de ellos produce mejores resultados,

Existen un sin número de aplicaciones para el PCR. Algunas de ellas son: amplificar fragmentos para clonarlos en un vector, realizar pruebas de identificación de microorganismos amplificando regiones que se conservan entre especies (genes), “Restriction Fragment Length Polymorphisms” (RFLP) donde se amplifican regiones específicas y se cortan con endonucleasas para observar el patrón de bandas en una gel,

como también se pueden secuenciar estas regiones amplificadas para hacer comparaciones y poder buscar similitudes o diferencias entre las especies de organismos.

La persona que desarrollo la técnica de PCR fue, Kary Mullis por la cual se le adjudicó el Premio Nobel de Química en 1993. El Dr. Mullis logro amplificar el gen de la β -globina humana (Mullis y cols., 1986; Mullis y Faloona., 1987) y el diagnóstico prenatal de la anemia falciforme (Saiki y cols., 1985; Saiki y cols., 1986; Embury y cols., 1987), desde entonces la técnica de PCR ha revolucionado todos los campos que estudian y manipulan los ácidos nucleicos.

Existen diversas fórmulas para calcular el T_m de los iniciadores. Al momento de calcular el T_m lo único que debe conocer es la secuencia de su oligonucleotido. Además existen diferentes programas en la Internet donde se introduce la secuencia y automáticamente indica el T_m , peso molecular y % de G/C del fragmento. A continuación las diferentes fórmulas y la dirección de Internet para los programas electrónicos.

* $T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G+C)$

* Si son oligos largos (mayor de 30 nucleótidos)

$$T_m = \frac{\Delta H}{(A + \Delta S) + R \ln (Ct/4)} 273.15 + 16.6 \log [\text{salt}]$$

- <http://www.gensetoligos.com/Calculation/calculation.html>

Procedimiento:

1. Utilice guantes en todo momento. Una vez se le hayan entregado todos los reactivos mantenga los mismos en hielo.
2. Partiendo de las soluciones stock calcule la cantidad apropiada para realizar el “master mix” de PCR. Recuerde incluir alícuotas para su control positivo y el control negativo.

Tabla de cálculos de los reactivos de PCR

Reactivos	Stock	Reacción	Cantidad
Agua	-----	-----	
Amortiguador	10X	1X	
Primer (F)	10pm/ μ l		
Primer (R)	10pm/ μ l		
MgSO ₄	100mM		
DMSO	---		
DNTP's	10mM	250 μ M	
Polimerasa	5U/ μ l _(taq) / 2U/ μ l _(Vent)	0.025 U/ μ l	
Template			
Total de la reacción		—————→	

- Añada la cantidad apropiada de cada uno de los reactivos en un microtubo estéril excepto el DNA.
- Distribuya las alícuotas pertinentes de acuerdo al volumen de su reacción total en los tubos de PCR.
- Añada la concentración de DNA indicada.
- Ajuste los parámetros del termociclador.
- Una vez finalizada el proceso de PRC, coloque los microtubos en hielo.

Al momento de corroborar si la amplificación fue efectiva utilice un gel de agarosa del porcentaje que le indique su instructor para realizar la electroforesis del DNA.

Asignación:

¿Qué son iniciadores degenerados? ¿Para qué se usan?

Preguntas de conceptualización:

¿Qué cambios en los parámetros de corrida del PCR se deben hacer (si alguno) a organismos que en su DNA sean ricos en Guanina y Citosina (high G-C)?

Referencias

- Anderson, M. (1990) Perfecting the polymerase chain reaction. *Laboratory Equipment Digests*. 1:30-31
- Breslauer K.J., Frank R., Blocker H., Markey L.A. (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3746-3750
- Chesters, J.K. (1996) Polymerase chain reaction. *Proc Nutr Soc.* 55 (1B):599-604. Review.
- Freier S.M., Kierzek R., Jaeger J.A., Sugimoto N., Caruthers M.H., Nielson T., Turner D.H. (1986) Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stabilit. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9373-9377
- Freier S.M. (1993) Hybridization: Considerations affecting Antisense Drugs in Antisense Research and Applications, eds. Grooke S.T. and Lebleu B. CRC Press, Inc., 67
- Schutzbank, T.E. y Sterm, H.J. (1993) Principles and appications of the PCR. *J. Int. Fed. Clin. Chem.* 35 (3):96-105. Review.

Laboratorio # 5: Enzimas de restricción, tipos, usos como herramientas en ingeniería genética

5

Objetivos: Al finalizar el laboratorio se espera que el estudiante:

- Desarrolle reacciones de digestión de DNA usando endonucleasas
- Describa las aplicaciones que tienen en el área de la ingeniería genética el uso de endonucleasas
- Construya mapas de restricción de fragmentos de DNA cortados con endonucleasas

Materiales:

Diferentes enzimas de restricción tales como: *Hae* III, *Hind* III, *Eco*RI, *Bam*HI, *Sma*I, *Xba* I

Información general

Las enzimas de restricción o endonucleasas, son enzimas que cortan el DNA por los enlaces fosfodiéster en una secuencia palíndromica específica. Una secuencia palíndromo es aquella que se lee igual en ambas direcciones, por ejemplo $\begin{matrix} \text{AAGCTT} \\ \text{TTCGAA} \end{matrix}$. Las mismas provienen, en su mayoría, de organismos procariotas los cuales las producen como mecanismos de defensa, ya que degradan DNA extraño que entra a la célula. Las bacterias no degradan su propio DNA, pues tienen la capacidad de metilar su DNA y de esta manera reconocerlo del extraño ya que las endonucleasas no pueden romper DNA que esté metilado.

Las endonucleasas sirven para construir el mapa físico de una molécula de DNA rompiéndola en pequeñas regiones de tamaño definido. Cuando se identifican los puntos de restricción y podemos ver en una electroforesis los tamaños definidos del fragmento o molécula de DNA que queremos, lo llamamos mapa de restricción. Para lograrlo se hace una digestión con enzimas deseadas, se corre una electroforesis para observar tamaño de las bandas (digestión total). Esto lo combinamos con digestiones sencillas (El DNA y una sola enzima) así fragmentos se superponen unos con otros y logramos construir el mapa

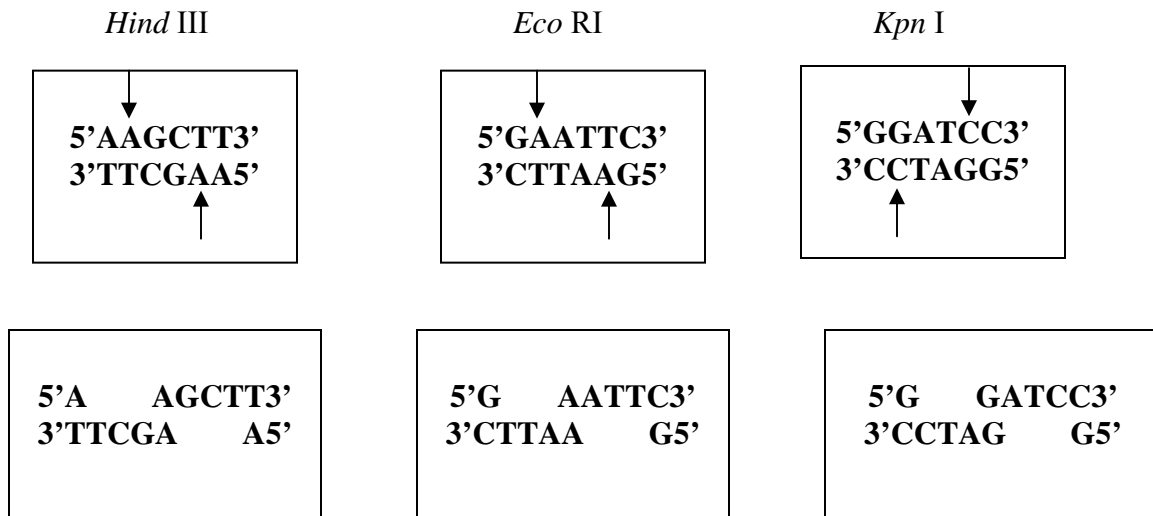
de la molécula de DNA. Entre otras aplicaciones podemos encontrar: generación de fragmentos para subclonarlos con vectores apropiados, fragmentar DNA genómico para separación de electroforesis o “Southern Blot.”

Es importante considerar ciertos parámetros que pueden ser críticos cuando se trabaja con endonucleasas los cuales pueden afectar las digestiones. La pureza del DNA es bien importante ya que contaminantes como cloroformo, fenol, detergentes y sales pueden afectar la actividad de la enzima. Los “buffers” o amortiguadores deben utilizarse en la mayoría de los casos, como 10% de la reacción por su contenido de glicerol el cual puede afectar la reacción. Hay que tener en cuenta que una unidad de enzima es la cantidad de enzima que corta 1µg de DNA en 1 hora.

Existen diferentes tipos de enzimas de restricción: tipo I, II, y III. Las de tipo I y III tienen actividad de restricción y modificación (metilación). Estas necesitan ATP para moverse a través de la molécula de DNA. Las de tipo II solamente tienen actividad de restricción y no necesitan ATP.

Las endonucleasas pueden producir varios tipos de cortes como lo son:

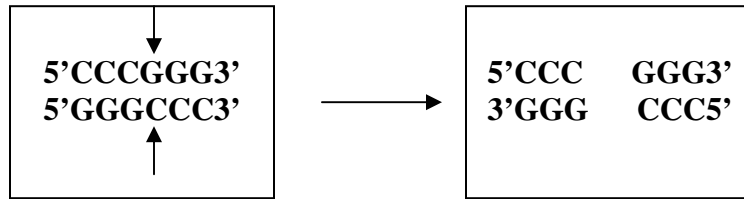
1. Cortes Sticky o cohesivos



Pueden existir cohesivos 5' o 3'. En los ejemplos anteriores *Hind* III y *Eco* RI producen cortes cohesivos 5' y *Kpn* I produce un corte cohesivo 3'.

2. Cortes blunt o abruptos

*Sma*I



Las mismas se nombran de acuerdo al organismo de donde provienen, por ejemplo

Eco RI

Escherichia coli cepa RV 13, I primera endonucleasa de esta cepa

Protocolo

Para cada reacción de digestión utilizaremos la siguiente reacción de digestión:

* Incubar 1 hora la siguiente reacción a 37°C

2.0 ul agua

1ul de amortiguador

6.5 ul inserto

0.5 ul enzima

10 µl Rx

* nota: si se va a hacer una doble digestión (con dos enzimas), se le añade 0.5µl de la otra enzima y se le resta esa cantidad al agua. Además hay que verificar que en el amortiguador que se utilice, ambas enzimas tengan la mayor actividad.

* Es importante que el estudiante busque cuáles son las concentraciones de enzima y DNA, ya que en la reacción anterior sólo aparecen las cantidades.

* Luego de la digestión el estudiante hará una electroforesis con el resultado de la digestión, esto lo vamos a llamar RFLP.

Asignación

1. ¿De que organismos provienen las endonucleasas utilizadas en el laboratorio?

Pregunta de conceptualización

2. El instructor le facilitará un ejercicio de mapa de restricción para practica.

Referencias

Sambrook, J. and D. Russell. 2001. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. pp 5.8, 5.76.

Laboratorio # 6: Discriminación entre grupos microbianos utilizando Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

6

Objetivos: Al finalizar el laboratorio se espera que el estudiante:

- Desarrolle reacciones de RFLP dadas, de genes de 16S y 18S rDNA
- Describa las aplicaciones de la técnica en la biología molecular
- Compare patrones de restricción entre genes de 16S rDNA de diversos grupos microbianos

Materiales

Diferentes enzimas de restricción tales como: *Hae* III, *Hind* III, *Eco*RI, *Bam*HI, *Sma*I, *Xba* I.

16S, 18S e ITS del rDNA amplificados (resultados del lab #4)

Información general

RFLP es una técnica en la biología celular y molecular donde fragmentos de DNA de un mismo gen en distintos organismos pueden compararse al cortar los mismos con endonucleasas. El patrón de bandas obtenido luego de realizar la restricción, permite determinar si los organismos comparados son similares, pertenece a la misma especie, género o familia. RFLP es más utilizado a nivel intraespecífico o taxas más relacionadas. Por lo tanto la presencia o ausencia de fragmentos provocados cambios en los sitios de restricción nos sirve para identificar especies o poblaciones.

Esta técnica ha servido en el área jurídica para resolver crímenes como asesinatos, violaciones y para prueba de paternidad. Además en el área de la biología molecular ha sido de gran impacto ya que facilita la diferenciación de secuencias de genes entre organismos, debido a mutaciones tales como: sustituciones de bases, adiciones, deleciones o rearrreglos de secuencias. Si esto ocurre, podemos decir que diferencias en patrones de bandas nos revelan diferencias entre secuencias de DNA.

En el laboratorio estaremos realizando RFLP del gen 16S de diferentes bacterias tales como: *Escherichia. coli*, *Bacillus subtilis*, y *Rhodobacter sphaeroides*; además del gen 18S y de la región “Internal Transcribed Spacer” (ITS) de ciertos hongos. Compararemos las diferencias en patrones de bandas, diferenciaremos entre organismos e identificaremos ciertos desconocidos. Para las digestiones de DNA utilizaremos las endonucleasas: *EcoRI*, *Hind III*, *SmaI*, *Hae III*, *Bsa HI* y *Xba I*. Se seguirán los mismos parámetros para hacer las reacciones de las digestiones del laboratorio 5, ***Enzimas de Restricción.***

Para cada reacción de digestión utilizaremos la siguiente reacción de digestión:

* Incubar 1 hora la siguiente reacción a 37°C

2.0 ul agua
 1ul de amortiguador
 6.5 ul inserto
0.5 ul enzima
 10 µl Rx

* nota: cuando se hacen dobles digestiones (con dos enzimas), se le añade 0.5µl de la otra enzima y se le resta esa cantidad al agua. Además hay que verificar que en el amortiguador que se utilice, ambas enzimas tengan la mayor capacidad de función

Procedimiento:

1. De las reacciones de PCR de 16S y 18S de diferentes organismos, hechas anteriormente en el laboratorio, preparar las siguientes combinaciones de digestión siguiendo las instrucciones de reacción de digestión antes mencionadas.
 - a. **Para 16S rDNA** (*Escherichia. coli*, *Bacillus subtilis*, y *Rhodobacter sphaeroides*):
 - i. *EcoRI*
 - ii. *Hind III*
 - iii. *SmaI* - *Hind III*
 - iv. *EcoRI* - *Hind III*
 - b. **Para 18S rDNA**
 - i. *Hae III*
 - ii. *Bsa HI*
 - iii. *Hae III* - *Bsa HI*
 - c. **Para ITS rDNA**
 - i. *Bsa HI*
 - ii. *Hae III*
 - iii. *Hae III* - *Bsa HI*
2. incubar a 37°C por 1hr.

3. Realizar una electroforesis de DNA en agarosa 2%
4. Comparar patrones, diferenciar entre organismos e identificar los desconocidos

Asignación

1. Conseguir un artículo científico donde hayan utilizado esta técnica para diferenciar entre grupos de organismos.

Preguntas de conceptualización:

1. ¿Que es tRFLP, y ARDRA? ¿Para que se utilizan?
2. ¿Cómo se comparan con el RFLP?

Referencias

Sambrook, J. and D. Russell. 2001. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. pp 5.8, 5.76.

Laboratorio # 7: Clonación tipos y usos

7

Objetivos: Al finalizar el laboratorio se espera que el estudiante:

- Defina el concepto de clonación
- Describa los tipos y aplicaciones del mismo en la genética de bacterias y genética molecular
- Inserte un fragmento de DNA en un vector plásmido usando herramientas de ingeniería genética
- Confirme la presencia del fragmento clonado usando métodos moleculares, bioquímicos y enzimáticos.

Materiales

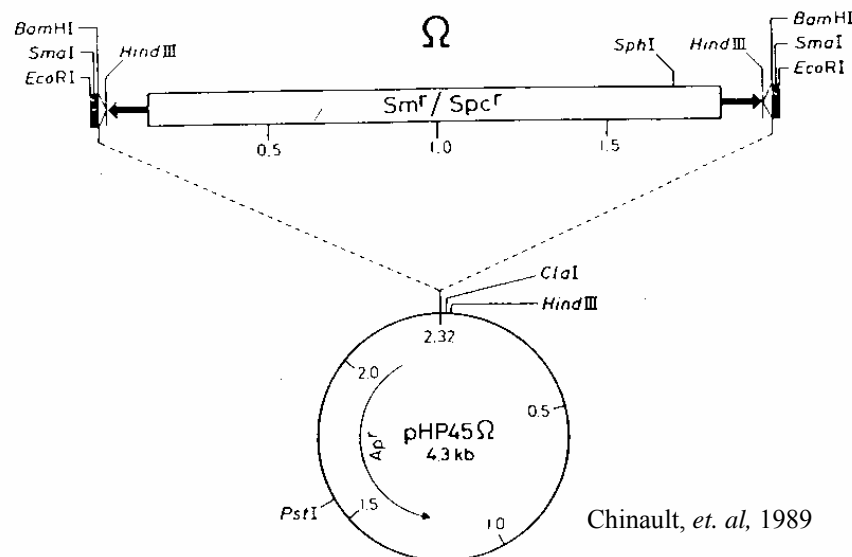
T4 DNA ligasa
plásmido pHP45 Ω
plásmido pUC 19
Mini prep. – Kit (Quiagen)
Calf Intestine Phosphatase (CIP)

Información general

Las técnicas de clonación podemos definir las como construcción de moléculas de DNA al unir diferentes secuencias que son obtenidas de diferentes organismos. Luego que tengamos ese producto, se llama DNA recombinante. Para lograr la unión de las moléculas de DNA necesitamos una ligasa o enzima de ligación. La ligación no es otra cosa que la formación del enlace fosfodiéster para unir bases adyacentes que están en hebra una sencilla. Estas moléculas de DNA recombinante se producen usando enzimas de restricción cortando en lugares específicos del vector y del DNA que se interese introducir. Los plásmidos, por su capacidad de replicarse independientemente del DNA cromosomal, se hace posible la multiplicación indefinida de la molécula formada. Es bien importante que la inserción no se haga en lugares que interrumpan alguna función

del vector. Para ser considerado un buen vector, el mismo necesita ser capaz de replicarse, ser pequeño (aprox. 15kb), y poseer marcadores de selección. Dichos marcadores pueden ser genes que le confieran resistencia a antibióticos. También es importante que tengan genes reporteros para poder monitorear y distinguir entre los plásmidos que tienen la inserción de los que no la tienen. En este caso, el ejercicio de laboratorio utilizaremos el plásmido pUC 19, éste tiene una porción del gen de *lac z* (gen **reportero**) que codifica para la enzima β -galactosidasa la cual en presencia del sustrato cromogénico X-gal, produce coloración azul en las colonias de bacterias. El gen de selección que posee pUC 19 (*bla*), le confiere a las células que lo posee resistencia a ampicilina (Amp^R). Por último pUC19 posee una región de clonaje múltiple (MCS, por sus siglas en inglés) con secuencias únicas de reconocimiento por endonucleasas. La combinación entre el gen de monitoreo y el MCS permite realizar lo que se conoce como monitoreo azul/blanco (white/blue screening)

En el laboratorio vamos a cortar pUC 19 con la endonucleasa *Hind* III y le vamos a insertar un fragmento de 2kb obtenido del plásmido pHP45 Ω que posee un gen que confiere resistencia a kanamicina. A continuación el mapa del plásmido pHP45 Ω .



Ligación

La T4 DNA ligasa es una enzima que tiene un peso molecular de 60 KD, requiere de ATP para poder trabajar y catalizar la formación de enlaces fosfodiéster entre el grupo hidroxilo del extremo 3' del DNA y el grupo fosfato en el extremo 5' del otro fragmento. La ligación de terminales cohesivos da lugar a la regeneración de los lugares de restricción. Existen diversos factores que afectan una ligación, entre ellos se encuentran: la temperatura, la concentración iónica en la solución, la naturaleza de los terminales cohesivos o abruptos, la concentración de la inserción y la concentración del vector. Cuando se realiza una reacción de ligación es recomendado utilizar una razón 1:3 de vector a inserción (tres veces más inserción que vector), esto cuando son terminales cohesivos. En los casos de ligaciones con terminales abruptos la reacción es más lenta, ya que los terminales no se complementan y se requiere de 10 a 30 veces más ligasa y además se pueden utilizar razones de 1:5 y 1:10 de vector a inserción. Por otro lado, la temperatura es un factor que puede cambiar de acuerdo al tipo de terminal y ligasa usado en la ligación. En la mayoría de los casos se utiliza una temperatura de 14-16°C para ligar terminales cohesivos y una temperatura de 20-25°C para ligar terminales abruptos.

Protocolo

1. Se hará una digestión del plásmido pHP45 Ω utilizando las endonucleasas *Hind* III, *Eco*RI y *Bam* HI. Ver laboratorio #5, ***Enzimas de Restricción***
2. Hacer una electroforesis de la digestión, en un gel de agarosa 2%
3. Cortar del gel los fragmentos que se producen y purificarlos con el kit de extracción de gel siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos obtenidos del plásmido pHP45 Ω los vamos a llamar el inserto.
4. Incubar 1 hora la siguiente reacción a 37°C

0.0 μ l agua
 1 μ l de amortiguador correspondiente
 8.5 μ l l inserto
 0.5 μ l enzima (*Hind* III, *Eco* RI, *Bam* HI)
 10 μ l

* Nota: Los reactivos están en el orden en que deben ser añadidos. Siempre añada la enzima al final de la reacción.

Digestión del plásmido pUC 19 (Vector)

1. Incubar 1 hora la siguiente reacción a 37°C

6.5µl agua
 1.0µl de buffer
 2.0µl vector
0.5µl enzima
 10µl

2. El vector será tratado con Calf Intestine Phosphatase (CIP) para remover los grupos fosfatos de la molécula, para evitar así que el vector se una consigo mismo (recircularizarse). Este proceso no es necesario cuando se generan sitios cohesivos distintos no complementarios (e corta el vector con dos enzimas de restricción). La siguiente reacción se incuba por 30 min. A 37°C.

7.0µl agua
 2.0µl buffer
 10µl vector
1µl CIP
 20µl

3. Luego del tratamiento se realiza una extracción orgánica con cloroformo. Añadir 1vol de cloroformo, mezclar gentilmente. Centrifugar por 5 min. A 13,000 rpm.

4. Precipitar el DNA con 0.6 vol. De alcohol isopropílico por 45 min. Centrifugar por 5 min. a 13,000 rpm, descartar el sobrenadante y lavar con alcohol al 70%.

5. Centrifugar 5min. a 13,000 rpm, descartar sobrenadante.

6. Secar en Speed Vac o al aire (por más de 5 min.) y resuspender en 20µl de agua.

Ligación

Luego que obtenemos el inserto y el vector se ha defosfatado, procedemos a hacer la reacción de ligación la cual es incubada por 1 hora a 15°C. Luego de concluir la ligación, la misma se almacenará a -20°C para utilizarse en el próximo laboratorio.

a. agua	= 4µl
b. "Buffer" ligasa	= 1µl
c. Inserto	= 3µl
d. Vector	= 1µl
e. Enzima	= <u>1 µl</u>
	10µl

Asignación

1. Defina y describa el proceso de alpha complementación

Preguntas de conceptualización

2. ¿Cómo realizamos una clonación direccional?

Referencias

Chinault, A. C., V. A. Blakesley, E. Roessler, D. G. Willis, C. A. Smith, R. G. Cook, and R. G. Fenwick, Jr. 1986. Characterization of transferable plasmids from *Shigella flexneri* 2a that confer resistance to trimethoprim, streptomycin, and sulfonamides. *Plasmid* 15:119–131.

Sambrook, J. and D. Russell. 2001. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. pp 5.8, 5.76.