

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS
LICENCIATURA EN BIOLOGIA**



Manual de Prácticas

Laboratorio

“Introducción a la Biología Molecular”

Elaboró:

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler

Nombre del alumno (a): _____

Calificación final del laboratorio: _____

San Luis Potosí, S. L. P.

PREFACIO

El laboratorio de “Introducción a la Biología Molecular” esta dirigido a los estudiantes de la Licenciatura en Biología y se imparte en el tercer semestre de la carrera. Es una actividad complementaria a las sesiones teóricas del curso y tiene como objetivo fortalecer los conocimientos obtenidos en el aula mediante la aplicación de metodologías para la extracción y manipulación de biomoléculas (ácidos nucleicos y proteínas). El calendario de actividades contempla nueve sesiones prácticas en el laboratorio de Fisiología Animal y Vegetal de la Facultad de Ciencias y dos sesiones en el centro de computo que involucran actividades de uso de bases de datos y servicios bioinformáticos en línea.

Los objetivos específicos del laboratorio son:

- 1.- Adquirir destreza en la manipulación de muestras biológicas para purificación y cuantificación de ácidos nucleicos (DNA, RNA) y proteínas.
- 2.- Conocer el fundamento de la electroforesis y llevar a cabo la separación por tamaño de ácidos nucleicos y proteínas obtenidas de muestras diversas.
- 3.- Conocer las principales técnicas de transformación de bacterias.
- 4.- Amplificar moléculas de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa.
- 5.- Diseñar secuencias de oligonucleótidos a partir de secuencias genéticas de interés.
- 6.- Conocer las principales bases de datos para la obtención de información de secuencias de DNA y proteínas, y las principales herramientas bioinformáticas para el análisis *in silico* de dichas secuencias.

Dada la naturaleza del Laboratorio de Biología Molecular, los riesgos específicos para el manejo de material biológico y/o reactivos se especifica en cada práctica.

ÍNDICE

I. REGLAMENTO DEL LABORATORIO DE INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA MOLECULAR.....	4
II. EVALUACIÓN DEL LABORATORIO.....	6
III. ELABORACIÓN Y ENTREGA DEL REPORTE.....	7
IV. CALENDARIO DE PRÁCTICAS.....	8
PRÁCTICA 1. Extracción de DNA plasmídico.....	9
PRÁCTICA 2. Electroforesis de DNA	13
PRÁCTICA 3. Extracción de DNA vegetal	17
PRÁCTICA 4. Extracción de DNA de frutas empleando un método casero.....	21
PRÁCTICA 5. Extracción de RNA de tejidos vegetales, animales y de hongos ...	24
PRÁCTICA 6. Purificación de la proteína verde fluorescente GFP	29
PRÁCTICA 7. Electroforesis de proteínas de Escherichia coli	32
PRÁCTICA 8. Predicción de dominios/estructura de proteínas.....	36
PRÁCTICA 9. Transformación de células de Escherichia coli	39
PRÁCTICA 10. Diseño de oligonucleótidos	43
PRÁCTICA 11. Reacción en cadena de la polimerasa	46

I. REGLAMENTO DEL LABORATORIO DE INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA MOLECULAR

1. Para ingresar al laboratorio, es obligatorio el uso de la bata reglamentaria (blanca, de algodón y manga larga) debidamente abrochada y de su manual instructivo.
2. Para el desarrollo de la práctica se deberá portar zapato cerrado cómodo y seguro. Cuando se le indique deberá usar cubre boca y/o careta, guantes y lentes de seguridad.
3. Evitar el uso de joyas (anillos, pulseras, dijes, aretes largos, etc.) que puedan reaccionar con los productos químicos o que puedan engancharse en materiales o equipos. Además, es requisito traer el pelo recogido y las uñas cortadas para evitar contaminación.
4. El tiempo de tolerancia para llegar y entrar al laboratorio será establecido por el maestro (a) y/o instructor.
5. Los útiles y pertenencias que no cumplan un contenido en la práctica, deberán ser colocados en el lugar indicado por el maestro (a) y/o instructor.
6. Al iniciar y terminar cada práctica, deberá limpiar su mesa de trabajo dejándola en el orden en que le fue entregada. En caso de trabajar con muestra biológicas el área de trabajo se desinfectará con benzal o algún germinicida que le sea proporcionado por el maestro (a) y/o instructor.
7. Jamás deberá iniciar una práctica sin estar seguro de lo que se va a hacer, por lo que será su obligación leer previamente el manual y atender las indicaciones del maestro (a) y/o instructor.
8. Antes de empezar la práctica le será confiado material del laboratorio el cual tendrá que devolver al final de la misma. En algunas ocasiones, tendrá que aportar materiales o sustancias que sean requeridas para el desarrollo de una práctica particular.
9. Antes de empezar la práctica, deberá verificar la identidad de los productos químicos y biológicos. No deberá oler ni probar los reactivos o productos químicos-biológicos que desconozca. No pipetear con la boca.
10. Por su seguridad queda estrictamente prohibido fumar y consumir alimentos o bebidas durante el desarrollo de las prácticas. De igual forma, queda prohibido llevarse cualquier tipo cosas a la boca dentro del laboratorio.

11. Las prácticas deberán ser realizadas en orden ocupando el lugar asignado en las mesas de trabajo y no deberán desplazarse a otras mesas interviniendo en el trabajo de sus compañeros.
12. La práctica se debe desarrollar con limpieza evitando derramar sustancias en la mesa de trabajo y etiquetando debidamente las soluciones preparadas.
13. En caso de romper o derramar material contaminado, vierta inmediatamente el germicida proporcionado en el laboratorio y deje actuar al menos 10 min. Antes de limpiar el área avise a su supervisor. De igual forma, en caso de algún accidente (cortadura, salpicadura con material contaminado o algún reactivo, quemadura, entre otros) avise a su supervisor.
14. En ocasiones, es necesario reconocer alguna sustancia por su olor. La manera adecuada de hacerlo consiste en abanicar, con la mano, hacia la nariz un poco de vapor y aspirar indirectamente (nunca inhalar directamente del recipiente).
15. Jamás se deben verter los desechos a los lavabos, sino en los recipientes correspondientes asignados por el instructor.
16. Bajo ninguna excusa se permitirá el ausentarse de la práctica.
17. No se permitirán visitas ajenas al laboratorio durante el desarrollo de la práctica.
18. Al término de la práctica, deberá cerciorarse que las llaves de gas, vacío y agua queden perfectamente cerradas.
19. Lavarse las manos al entrar y al salir del laboratorio. El lavado también debe incluir los guantes usados colocándolos en el recipiente adecuado para su desecho.

II. EVALUACIÓN DEL LABORATORIO

El programa analítico del curso de Introducción a la Biología Molecular establece que el alumno deberá obtener una calificación aprobatoria en el laboratorio para acreditar la materia. La evaluación general del curso de detalla en la siguiente tabla, haciendo énfasis en las prácticas de laboratorio, cuyo puntaje equivale a un 15% de la calificación de la materia.

Elaboración y/o presentación de:	Porcentaje
Exámenes parciales (4)	75%
Examen ordinario (1)	10%
Prácticas de Laboratorio (11)	15%
Total	100%

Cada práctica de Laboratorio se evaluará con una escala de calificación de 0 a 10, y se considerarán los siguientes aspectos:

a) Sesiones prácticas en el Laboratorio

Aspecto	Puntaje
Examen previo*	1
Introducción	1
Observaciones	2
Cuestionario**	4
Resultados y conclusiones**	2
Total	10

*Consistirá en 2 preguntas relacionadas con la práctica, abarca conocimientos/fundamentos básicos del tema o bien particularidades de la metodología ó procedimiento a realizar.

**La ponderación puede variar un poco entre prácticas.

b) Sesiones prácticas en el centro de cómputo

Aspecto	Puntaje
Introducción	1
Resultados " <i>in silico</i> "	7
Conclusiones	2
Total	10

III. ELABORACIÓN Y ENTREGA DEL REPORTE

El reporte del laboratorio se evaluará de manera “individual” o en “equipo” (ver apartado *IV. calendario de prácticas*). El reporte se realizará a mano y se entregará en hojas tamaño carta blancas conforme al siguiente contenido:

- a) **Portada.** En ella se debe especificar el título de la práctica, nombre del alumno, equipo y fecha de entrega.
- b) **Introducción a la práctica.** Esta sección no debe ser mayor a una cuartilla, el alumno deberá generar una introducción personalizada para su reporte; debe esta basada en revisión de bibliografía.
- c) **Observaciones.** Incluyen dibujos y descripciones de lo realizado en el laboratorio en etapas particulares de un protocolo.
- d) **Cuestionario.** Abarca de tres a cuatro preguntas de investigación concretas.
- e) **Resultados.** Descripción de lo obtenido/logrado durante el desarrollo de la práctica.
- f) **Conclusiones**
- g) **Bibliografía.** Se recomienda emplear el formato APA para citar la fuente de donde se obtuvo la referencia bibliográfica.

Los reportes de una práctica concluida se entregarán al iniciar la práctica siguiente en el horario del laboratorio.

IV. CALENDARIO DE PRÁCTICAS

Nombre de la Práctica	Sesiones	Reporte	Fecha
1.- Extracción de DNA plasmídico	1 (2 horas)	Equipo	
2.- Electroforesis de DNA	1 (2 horas)	Equipo	
3.- Extracción de DNA vegetal	1 (2 horas)	Equipo	
4.- Extracción de DNA de frutas empleando un método casero	1 (2 horas)	Equipo	
5.- Extracción de RNA de tejidos vegetales, animales y de hongos	2 (4 horas)	Equipo	
6.- Purificación de la proteína verde fluorescente GFP	1 (2 horas)	Equipo (1 solo reporte práctica 6 y 7)	
7.- Electroforesis de proteínas de <i>Escherichia coli</i>	1 (2 horas)		
8.- Predicción de dominios/estructura de proteínas	1 (2 horas)	Individual	
9.- Transformación de células de <i>Escherichia coli</i>	1 (2 horas)	Equipo	
10.- Diseño de oligonucleótidos	1 (2 horas)	Individual	
11.- Reacción en cadena de la polimerasa	1 (2 horas)	Equipo	
Entrega de calificaciones finales del laboratorio			

Nota. La fecha de realización de cada práctica se incluirá en el calendario acorde al semestre agosto-diciembre del año correspondiente.

PRÁCTICA NO. 1. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Datos básicos de la práctica

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad I. Estructura y composición química de ácidos nucleicos. Tema 1.6.8. Estructuras del alta complejidad: DNA superenrollado.

Introducción

Los plásmidos son moléculas de DNA circular, extracromosomal, que portan genes que confieren características útiles a la célula huésped, como por ejemplo: actividades metabólicas novedosas (capacidad de metabolizar sustancias orgánicas inusuales) y resistencia a antibióticos (ampicilina, cloranfenicol). En el laboratorio, la resistencia a antibióticos se emplea como un “*marcador de selección*” que permite asegurar que una bacteria en cultivo contiene un plásmido particular.

Los plásmidos se caracterizan por tener un origen de replicación (ORI) que les permite replicarse de manera independiente del cromosoma bacteriano. Los plásmidos de tamaño pequeño emplean la maquinaria enzimática de replicación de la célula para hacer copias de sí mismos. Algunos plásmidos de mayor tamaño contienen genes especiales para su replicación. Además, existen plásmidos “*integrativos*” los cuales se insertan en el cromosoma bacteriano y se mantienen de forma estable durante varias divisiones celulares.

Los plásmidos varían en tamaño (1 kb hasta 250 kb) y número de copias. Por ejemplo, aquellos empleados con fines de clonación tienen un tamaño no mayor 15 kb. El número de copias se refiere al número de moléculas de un plásmido individual que normalmente se encuentra en una célula bacteriana. El tamaño del plásmido influye en el número de copias, plásmidos grandes generalmente se encuentran en bajo número (1 a 2 plásmidos por célula bacteriana), mientras que los plásmidos pequeños pueden generar hasta 50 copias por célula. Estos últimos son útiles para clonar DNA de interés, ya que se pueden generar muchas copias del DNA recombinante.

Existen diferentes métodos para obtener DNA plasmídico a partir de una célula bacteria. El método de la lisis alcalina fue descrito por Birnboim y Doly en 1979. Este método involucra varias etapas: a) la lisis bacteriana, b) la precipitación y centrifugación

para remover los componentes celulares, c) la precipitación y purificación de DNA bacteriano con el uso de alcoholes. El pH alcalino empleado en el protocolo desnaturaliza al DNA. El DNA cromosómico se fragmenta (en trozos lineales) durante la extracción y las dos cadenas de DNA se separan completamente en el álcali. Las dos cadenas del DNA plasmídico no se separan completamente por ser circulares. Al neutralizar con acetato de potasio el DNA cromosómico se precipita pues los fragmentos lineales de cadena simplemente se entrelazan aberrantemente. Los plásmidos se renaturalizan y permanecen en solución.

Objetivo

Obtener DNA plasmídico a partir de células de *Escherichia coli* por el método de lisis alcalina.

Materiales y Equipo.

- Tubos tipo eppendorf de 1.5 mL
- Micropipetas de 100 y 1000 μ L
- Puntas para micropipeta de 100 y 1000 μ L
- Gradilla para tubos tipo eppendorf
- Recipiente con hielo
- Minicentrífuga
- Espectrofotómetro ultravioleta/visible (NanoDrop).

Soluciones, Reactivos y Material Biológico

- Cepas de *Escherichia coli* que contienen plásmidos
- Solución I. Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8.0), EDTA 10 mM (pH 8.0)
- Solución II. NaOH 0.2N, SDS 1%
- Solución III. Acetato de potasio 5M pH 5.5 (ajustado con ácido acético glacial).
- Isopropanol (previamente enfriado a -20°C)
- Etanol al 70% (previamente enfriado a -20°C)
- Agua destilada estéril

Uso obligatorio

- Guantes
- Bata blanca de algodón

Protocolo para la obtención de DNA plasmídico.

Lea cuidadosamente el procedimiento a desarrollar.

1. Centrifugar 1.5 mL del cultivo bacteriano por un 1 min a una velocidad de 12, 000 x g para concentrar las células al fondo del tubo. Eliminar el sobrenadante por decantación en el recipiente destinado a desechos biológicos. Repetir este proceso una vez más.
2. Resuspender la pastilla de células en 200 μ L de la solución I. Esto se realiza mediante un pipeteo suave. Poner el tubo en hielo por 1 min.
3. Añadir 400 μ L de la solución II (preparada al momento de usar). Mezclar suavemente por inversión hasta que la solución quede translúcida. Reposar máximo 5 min en hielo.
4. Agregar 300 μ L de la solución III, mezclar por inversión hasta observar un precipitado blanco. Dejar en hielo 15 min.
5. Centrifugar a una velocidad de 12, 000 x g durante 10 min. Tomar el sobrenadante con una micropipeta, transferirlo a un tubo tipo eppendorf limpio y agregar 600 μ L de isopropanol frío.
6. Dejar a -70 °C durante 30 min.
7. Centrifugar a una velocidad de 12, 000 x g durante 10 min. Descartar el sobrenadante por decantación. Lavar la pastilla de DNA plasmídico con 500 μ L de etanol al 70%. Centrifugar 1 min a 12,000 x g. Eliminar el sobrenadante por decantación. Secar la pastilla de DNA plasmídico (dejando el tubo invertido sobre una sanita durante 10 min).
8. Resuspender la pastilla de DNA plasmídico en 25-30 μ L de agua destilada estéril.
9. Determine la concentración de plásmido extraído empleando un espectrofotómetro ultravioleta/visible (NanoDrop).
10. Almacenar el DNA a -20°C. Todo el material que se almacena debe estar correctamente rotulado con su nombre y fecha.

Referencias

- 1.- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979, 7(6):1513-23.
- 2.- Brown T. A. *Gene Cloning & DNA Analysis*. 6th Edition. Wiley-Blackwell
- 3.- Sambrook, J. y Russel, D. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (3 Ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Reporte práctica 1. Extracción de DNA plasmídico

El valor o puntuación de cada apartado del reporte se indica entre paréntesis.

INTRODUCCIÓN CON REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS LISTADAS AL FINAL DEL REPORTE (1.0)

OBSERVACIONES (2.0)

1.- Dibuje cada etapa del proceso de extracción de DNA plasmídico y describa sus observaciones.

CUESTIONARIO. Investigue lo siguiente (4.0)

1.- ¿En qué se fundamentan los métodos de extracción de DNA por columna? Explique con un dibujo los pasos a seguir para obtener DNA por este método.

2.- ¿Qué métodos o técnicas se emplean para verificar la calidad, integridad y concentración del DNA plasmídico obtenido? Explique el fundamento de cada uno.

3.- Busque el mapa de un plásmido empleado para la clonación de fragmentos de DNA. Represente dicho mapa e indique cada uno de los elementos funcionales importantes de dicho plásmido.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES (2.0)

Reporte la concentración del plásmido obtenido. ¿Qué concluye de esta práctica?

PRÁCTICA NO. 2. ELECTROFORESIS DE DNA

Datos básicos de la práctica

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad 1. Estructura y composición química de ácidos nucleicos. Unidad 9. Métodos básicos en biología molecular.

Introducción.

La electroforesis es una técnica que emplea diferencias en carga eléctrica para separar moléculas de una muestra. Las moléculas de DNA tienen carga negativa, y cuando se someten a un campo eléctrico migran hacia el polo positivo. La tasa de migración de una molécula depende de dos factores: de su forma y de su relación masa/carga. La electroforesis en geles preparados con agarosa, poliacrilamida o una mezcla de ambos, genera una red compleja de poros a través de los cuales las moléculas de DNA deben viajar en su tránsito al polo positivo. Las moléculas de DNA más pequeñas migrarán más rápido a través del gel. Por lo tanto, la electroforesis en gel separa las moléculas por tamaño.

En la práctica, la composición del gel determina el tamaño de moléculas que se pueden separar. Por ejemplo, geles de agarosa al 0.5% nos permiten separar moléculas muy grandes ya que tiene poros grandes, se emplean para moléculas de 1 a 30 kb, lo que permite ver claramente diferencias entre moléculas que pesan de 10 a 12 kb. El gel estándar se prepara al 0.8% y geles más concentrados, como por ejemplo al 1.5 o 2% permiten distinguir diferencias de tamaño entre 50 y 100 pb. Los geles de poliacrilamida al 40% tienen poros muy pequeños y permiten separar moléculas de DNA muy pequeñas, de 1 a 300 pb, por lo que es posible distinguir entre moléculas de DNA que difieren en tan solo un nucleótido.

La forma más sencilla de visualizar un gel de electroforesis de agarosa, es mediante la tinción con bromuro de etidio, un agente intercalante de DNA, bajo la irradiación de luz ultravioleta. La limitante es que una concentración de DNA menor a 10 ng no es posible detectarla.

La determinación del peso molecular, se hace mediante un marcador de peso molecular, el cual está compuesto por múltiples fragmentos de DNA de tamaño conocido que en general nos indican un rango de tamaños que son múltiplos de 100 pb o bien de 1000 pb.

Objetivos.

Separar mediante electroforesis en gel agarosa las moléculas de DNA plasmídico obtenidos en la práctica anterior.

Determinar el peso molecular del DNA plasmídico obtenido.

Materiales y Equipo.

- Cámara de Electroforesis de DNA y fuente de poder
- Micropipeta de 10 μ L
- Puntas para micropipeta de 10 μ L
- Charola y peine para geles
- Sistema fotodocumentador de geles
- Recipiente con hielo

Soluciones y Reactivos.

- Agarosa
- Buffer de corrida (TAE 1X: Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM)
- Buffer de carga naranja G 6X
- Marcador de peso molecular de 1 kb
- Muestra de DNA plasmídico obtenido en la práctica 1
- Bromuro de etidio (Solución stock 10 mg/mL)

Uso obligatorio

- Guantes
- Bata blanca de algodón

Procedimiento para electroforesis de DNA

Lea cuidadosamente el procedimiento a desarrollar.

1. **Preparación del gel de agarosa al 0.8%:** pesar 0.4 g de agarosa y disolver en 50 mL de buffer TAE1X. Fundir lentamente en el microondas hasta que la agarosa este líquida. Esperar a que enfríe un poco para agregarle 1 μ L de la solución stock de bromuro de etidio, agitar para disolver bien. Enseguida verter en la charola y ajustar bien los peines. Esperar a que solidifique a temperatura ambiente por lo menos 15 minutos, para su posterior uso.
2. **Preparación de la muestra de DNA:** cortar 2 cm de parafilm, colocar 6 μ L de buffer naranja G 6X por cada muestra a analizar; tomar 2 μ L de la muestra y colocar sobre la gota de buffer naranja G, mezclar muy bien mediante pipeteo.

3. **Electroforesis en gel:** servir el volumen de buffer TAE 1X indicado para la cámara de electroforesis a usar. Colocar el gel de agarosa y verificar que este cubierto totalmente por la solución del buffer TAE 1X. Con la micropipeta, tomar el volumen total de la mezcla muestra-buffer naranja G y colocarlo a partir del segundo pozo del gel; en el primer pozo se colocaran 2 μ L de marcador de peso molecular 1 kb (de la marca comercial en existencia). Conectar la fuente de poder a la cámara de electroforesis y correr el gel a 70 mV por 20 minutos. Finalmente, con ayuda del sistema fotodocumentador de geles se detectarán las moléculas de DNA teñidas con bromuro de etidio. El bromuro de etidio tiene una absorción máxima a 300 y 360 nm, y una emisión máxima a 590 nm. Por lo tanto, el bromuro de etidio intercalado en el DNA y excitado con luz UV, permitirá detectar moléculas de DNA mediante la emisión de luz color naranja.

Precaución. El *bromuro de etidio* es un agente intercalante del DNA con efecto mutágeno, puede ser carcinogénico y teratogénico. Es irritante para ojos, piel, mucosas y tracto respiratorio. En caso de derrame sobre los ojos o la piel, lavar abundantemente con agua durante 15 minutos usando una ducha de seguridad o un lavaojos. Si se inhala o se ingiere se debe buscar ayuda médica urgentemente.

Referencias

- 1.- Brown T. A. Gene Cloning & DNA Analysis. 6th Edition. Wiley-Blackwell
- 2.- Sambrook, J. y Russel, D. (2001). Molecular Cloning. A Laboratory Manual (3 Ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Reporte práctica 2. Electroforesis de DNA

El valor o puntuación de cada apartado del reporte se indica entre paréntesis.

INTRODUCCIÓN CON REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS LISTADAS AL FINAL DEL REPORTE (1.0)

OBSERVACIONES (2.0)

1.- Describa y represente con un dibujo los pasos a seguir para realizar una electroforesis en gel de agarosa. Donde sea necesario, indique las medidas de seguridad se tienen que tomar en cuenta para llevar a cabo este procedimiento.

CUESTIONARIO (3.0)

1.- Además del bromuro de etidio, ¿Qué otros compuestos se pueden emplear para visualizar moléculas de DNA? ¿En qué se fundamenta su uso?

2.- ¿Cuál es la función del buffer de carga “naranja G 6x”? Investigue la composición química de un buffer de carga.

3.- En el laboratorio se dieron a conocer diferentes marcadores de peso molecular para DNA. Investigue y represente un marcador de peso molecular para RNA e indique el rango de tamaños de dicho marcador.

RESULTADOS (2.0)

1.- Incluya la imagen del gel de electroforesis realizado en la práctica. Indique los pesos del marcador empleado y determine el peso molecular aproximado del plásmido obtenido.

2.- Indique ¿Qué patrones de migración pueden corresponder a formas relajadas y superenrolladas de los plásmidos obtenidos?

CONCLUSIONES (1.0)

PRÁCTICA NO. 3. EXTRACCIÓN DE DNA VEGETAL

Datos básicos de la práctica

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad 1. Estructura y composición química de ácidos nucleicos. Unidad 2. DNA y cromatina.

Introducción

El ácido desoxirribonucleico es un polímero que tiene la capacidad de almacenar y transmitir información genética. Este polímero está compuesto por cuatro tipos de nucleótidos (adenina, guanina, citosina y timina) unidos entre ellos por enlaces fosfodiéster; cada nucleótido estructuralmente contiene un grupo fosfato, una base nitrogenada (purina o pirimidina) y una azúcar desoxirribosa. En plantas, la biosíntesis de nucleótidos de pirimidina se lleva a cabo en plástidos; mientras que la biosíntesis de nucleótidos de purina ocurre en el citoplasma. La forma predominante del DNA es una doble hélice dextrógira, antiparalela, en la cual las bases nitrogenadas se aparean por dos o tres puentes de hidrogeno: A=T; G≡T. Esta hélice tiene direccionalidad 5'-3'. Además del DNA nuclear, en plantas encontramos DNA en mitocondrias y cloroplastos, estos genomas circulares, pequeños, codifican proteínas importantes para el funcionamiento del organelo y el mantenimiento de su material genético. La expresión del genoma de organelos como la mitocondria y el cloroplasto también se encuentra bajo un control fino del genoma nuclear. En plantas, existen mecanismos regulatorios que coordinan la expresión de genes nucleares, de mitocondria y de cloroplasto que permiten la síntesis de proteínas que funcionan en otros organelos citoplásmicos. La mayoría de los genomas de plástidos secuenciados en plantas como maíz, arroz, tabaco tiene tamaños de 120 a 160 kb, y mantienen una distribución y organización similar de sus genes. Mientras que el genoma nuclear de plantas, se encuentra organizado en varios cromosomas: *Arabidopsis thaliana* (5 cromosomas); *Glycine max* (20); *Oryza sativa* (12); *Vitis vinifera* (19), *Zea mays* (10), etc. Su longitud varía desde aprox. 120 Mb en *A. thaliana* hasta aprox. 2000 Mb en *Z. mays*. En esta práctica aplicaremos una técnica de rutina para la extracción de DNA vegetal total empleando una sal de amonio cuaternario: CTAB (bromuro de cetil-trimetil-amonio).

Objetivo

Obtener DNA de diferentes tejidos vegetales empleando el método de extracción basado en CTAB.

Materiales y Equipo.

- Tubos tipo eppendorf de 1.5 mL
- Micropipetas de 100 y 1000 μ L
- Puntas para micropipeta de 100 y 1000 μ L
- Mortero y pistilo
- Nitrógeno líquido
- Recipiente con hielo
- Minicentrífuga
- Agitador tipo vórtex
- Incubadora de bloque seco (termo bloque)
- Espectrofotómetro ultravioleta/visible (NanoDrop).

Soluciones, Reactivos y Material Biológico.

- Material Vegetal (hojas o raíces de plántulas de Arabidopsis, maíz, alfalfa, tabaco).
- Buffer CTAB 2X [CTAB 2% (W/V), NaCl 1.4 M, Tris-HCl 100 mM (pH 8.0), EDTA 20 mM]
- Cloroformo
- Isopropanol (previamente enfriado a -20°C)
- Etanol al 70% (previamente enfriado a -20°C)
- Agua destilada estéril

Uso obligatorio

- Guantes
- Bata blanca de algodón

Protocolo de Extracción de DNA vegetal

Lea cuidadosamente el procedimiento a desarrollar.

1. Macerar finamente el material vegetal en un mortero con nitrógeno líquido.
2. Colocar 100 mg de material vegetal molido en un tubo tipo eppendorf y agregar 200 μ L del Buffer de extracción CTAB 2X. Mezclar en agitador tipo vórtex.
3. Colocar la muestra en una incubadora de bloque seco (termo bloque) a 65°C por 15 min; después deje enfriar la muestra a temperatura ambiente sobre la mesa de trabajo.
4. Adicionar 200 μ L de cloroformo. Mezclar en agitador tipo vórtex.

5. Centrifugar la muestra por 5 min a una velocidad de 12, 000 x *g*.
6. Transferir la fase acuosa a un tubo tipo eppendorf limpio por pipeteo.
7. Adicionar 200 μ L de isopropanol frío y colocar el tubo 15 min en hielo.
8. Centrifugar por 5 min a una velocidad de 12,000 x *g*. Una vez centrifugado, descartar el sobrenadante por decantación.
9. Adicionar 700 μ L etanol al 70% para lavar la pastilla obtenida.
10. Centrifugar por 2 min a una velocidad de 12, 000 x *g*. Una vez centrifugado, descartar el sobrenadante por decantación y secar la pastilla a temperatura ambiente.
11. Resuspender la pastilla en 25-30 μ L de agua destilada estéril.
12. Determine la cantidad de DNA obtenido por cuantificación en un espectrofotómetro ultravioleta/visible (NanoDrop).
13. Separar mediante electroforesis en gel agarosa las moléculas de DNA genómico obtenidas.
14. Almacenar el DNA a -20°C. Todo el material que se almacena debe estar correctamente rotulado con su nombre y fecha.

Referencias

- 1.- Clarke J. D. Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) DNA Miniprep for Plant DNA Isolation. Cold Spring Harb Protoc; 2009; doi:10.1101/pdb.prot5177
- 2.- Brown T. A. Gene Cloning & DNA Analysis. 6th Edition. Wiley-Blackwell
- 3.- Sambrook, J. y Russel, D. (2001). Molecular Cloning. A Laboratory Manual (3 Ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Reporte práctica 3. Extracción de DNA vegetal

El valor o puntuación de cada apartado del reporte se indica entre paréntesis.

INTRODUCCIÓN CON REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS LISTADAS AL FINAL DEL REPORTE (1.0)

OBSERVACIONES (2.0)

1.- Dibuje cada etapa del proceso de extracción DNA vegetal y describa sus observaciones.

CUESTIONARIO. Investigue lo siguiente (4.0)

1.- ¿Cuál es el fundamento de la extracción de DNA con el buffer CTAB?

2.- Para el material vegetal que proceso, investigue:

a) Nombre científico de la planta

b) ¿Cuántos cromosomas tiene? (La mayoría de las plantas que se procesaron en el laboratorio tienen su genoma secuenciado o en proceso de secuenciación; en caso que no, buscar la información de una planta filogenéticamente emparentada)

c) ¿Cuál es su ploidía ($n=2$, $n=4$, etc.)?

3.- Investigue un protocolo para aislar cloroplastos y obtener DNA de cloroplasto.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES (2.0)

1.- Incluya la imagen del gel de electroforesis realizado en la práctica. Indique los pesos moleculares del marcador empleado y señale las bandas que corresponden al DNA genómico extraído.

2.- Reporte la concentración del DNA obtenido

3.- ¿Qué concluye de esta práctica?

PRÁCTICA NO. 4. EXTRACCIÓN DE DNA DE FRUTOS EMPLEANDO UN METODO CASERO

Datos básicos de la práctica

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad 1. Estructura y composición química de ácidos nucleicos. Unidad 2. DNA y cromatina.

Introducción

En prácticas anteriores se han empleado métodos clásicos de la Biología Molecular para la extracción de DNA. En esta ocasión se empleara un método no común para dicha extracción, es decir, los reactivos puros que se habían utilizado serán sustituidos por compuestos análogos a estos que se encuentran en solución en sustancias y/o alimentos que se usan en la vida diaria.

Objetivo

Obtener DNA de diferentes frutos empleando el método de extracción casero, donde el alumno será capaz de distinguir las etapas importantes de dicho método.

Materiales y Equipo.

- Bolsas tipo ziploc
- Filtros para café
- Recipiente de colecta de 200 mL
- Tubos tipo Falcón de 50 mL
- Embudo
- Probeta de 100 mL

Soluciones, Reactivos y Material Biológico.

- Frutos frescos o congelados (fresa y/o kiwi)
- Buffer de lisis casero (para 100 mL, mezclar 10 mL de shampoo Pantene Pro-V, ¼ de cucharada de sal común y 90 mL de agua).
- Alcohol al 95% (adquirido en la farmacia).

Uso obligatorio

- Guantes
- Bata blanca de algodón

Protocolo de Extracción de DNA vegetal

Lea cuidadosamente el procedimiento a desarrollar.

1. Preparar 100 mL de buffer de lisis casero.
2. Colocar el fruto en una bolsa tipo ziploc, cerrarla muy bien y triturar el tejido hasta homogenizar la muestra.
3. Agregar 10 mL del buffer de lisis a la bolsa.
4. Continuar triturando por 2 minutos más.
5. Pasar el contenido de la bolsa al filtro de café para separar el tejido triturado y obtener la fase líquida en un recipiente de 200 mL. Filtre la muestra por lo menos 10 minutos.
6. Colocar 25 mL de la fase líquida filtrada en un tubo tipo Falcón de 50 mL, y agregar 25 mL de etanol al 95% frío.
7. Esperar unos minutos a que precipite el DNA.
8. Recuperar la madeja de DNA con ayuda de una varilla de vidrio. Colocar la madeja de DNA en un tubo tipo eppendorf de 1.5 mL que contenga 50-100 μ L de agua destilada.

Referencias

Integrated DNA technologies (<http://www.dnalc.org>)

Reporte práctica 4. Extracción de DNA vegetal por un método casero

El valor o puntuación de cada apartado del reporte se indica entre paréntesis.

INTRODUCCIÓN CON REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS LISTADAS AL FINAL DEL REPORTE (1.0)

OBSERVACIONES (2.0)

1.- Dibuje cada etapa del proceso de extracción DNA y describa sus observaciones, haciendo una analogía a métodos previos que involucran lisis celular y precipitación de ácidos nucleicos.

CUESTIONARIO (5.0)

- 1.- Investigue la composición química de las sustancias que utilizó en la práctica, y explique detalladamente ¿Por qué fue posible realizar la extracción de DNA con dichas sustancias?
- 2.- Además del shampoo ¿Qué otras sustancias podemos emplear en métodos caseros de obtención de DNA?
- 3.- ¿Qué características presenta el DNA de la fresa para poder ser aislado en gran concentración, incluso a partir de un método casero? ¿Qué otros frutos poseen características semejantes?
- 4.- ¿Qué métodos se emplean para la extracción de DNA a partir de frutos con un alto contenido de azúcares? Describa un protocolo.

CONCLUSIONES (2.0)

PRÁCTICA NO. 5 EXTRACCIÓN DE RNA DE TEJIDOS VEGETALES, ANIMALES Y DE HONGOS

Datos básicos de la práctica

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad 1. Estructura y composición química de ácidos nucleicos. Tema 1.7. El ácido ribonucleico (RNA) es una cadena lineal. Unidad 4. Principios básicos del proceso de transcripción.

Introducción

Todos los genes tienen que expresarse para ser funcionales, el proceso de transcripción participa en la primera etapa de expresión génica al generar una molécula de RNA que es complementaria al gen transcrito. Para algunos genes, como los que codifican RNAs de transferencia y ribosomales, el transcrito por si solo es funcional. Para otros genes, el transcrito tiene que ser traducido en una proteína.

La extracción de RNA es una etapa previa para realizar análisis moleculares diversos que nos permiten identificar un transcrito de interés (presencia o ausencia) y sus niveles de expresión (cantidad de transcrito), procesamientos alternativos del transcrito, la determinación del sitio de inicio de la transcripción al obtener la secuencia 5' no traducida (5'-UTR), la identificación de proteínas de unión a RNA, entre muchas otras aplicaciones.

La extracción de RNA total empleando el reactivo TRIzol se fundamenta en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que permite la obtención de moléculas de RNA de tamaño variado (pequeños hasta grandes). El reactivo de TRIzol mantiene la integridad del RNA al inhibir eficientemente la actividad RNAasa al momento de romper y homogenizar las células/tejidos. Después de homogenizar la muestra, se añade cloroformo, lo que permite la separación de una fase acuosa superior (conteniendo el RNA), una fase intermedia, y una fase inferior orgánica de color roja (conteniendo DNA y proteínas). El RNA se precipita de la fase acuosa empleando isopropanol. Este método permite la obtención de una buena cantidad de RNA total, por ejemplo, de 8 a 15 μg (1×10^6 células epiteliales), 73 μg (de una hoja joven de tabaco), 6-10 μg (1 mg de hígado), etc.

Objetivos.

Obtener RNA total de diferentes organismos eucariontes empleando el reactivo de Trizol.

Conocer las etapas importantes del método de extracción de RNA, así como adquirir el conocimiento básico en el manejo y cuidado de este tipo de muestras.

Materiales y Equipo.

- Tubos tipo eppendorf de 1.5 mL
- Micropipetas de 100 y 1000 μ L
- Puntas para micropipeta de 100 y 1000 μ L
- Mortero y pistilo
- Nitrógeno líquido
- Recipiente con hielo
- Minicentrífuga
- Agitador tipo vórtex
- Incubadora de bloque seco (termo bloque)
- Sistema fotodocumentador de geles
- Espectrofotómetro ultravioleta/visible (NanoDrop)

Soluciones, Reactivos y Material Biológico.

- Material vegetal (hojas de plántulas de Arabidopsis, tabaco, etc.), animal (tejidos y/o órganos internos) y fúngico (levaduras o micelios).
- Reactivo de Trizol (marca Invitrogen)
- Cloroformo
- Isopropanol (previamente enfriado a -20°C)
- Agua DEPC (dietil pirocarbonato al 0.01% v/v)
- Etanol al 75% (preparado con agua DEPC)
- Buffer MOPS 5X (2.06 g de MOPS, 0.325 g de acetato de sodio, 1 mL de EDTA 0.5M, volumen final 100 mL aforados con agua DEPC).

Uso obligatorio

- Guantes
- Bata blanca de algodón

Protocolo para la extracción de RNA (sesión 1)

Lea cuidadosamente el procedimiento a desarrollar.

1. Preparación de la muestra: macerar el material biológico con nitrógeno líquido en un mortero hasta obtener un polvo fino.

2. Homogenización: Homogenizar el tejido (50-100 mg) con 0.5 mL de Trizol.
3. Separación: Incubar las muestras homogenizadas 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteínas. Adicionar 0.1 mL de cloroformo. Agitar vigorosamente durante 15 s en vórtex e incubar la muestra 3 min a temperatura ambiente. Centrifugar la muestra a una velocidad de 12,000 x g por 15 min. Después de la centrifugación la mezcla se separa en una fase fenol-cloroformo color roja, una interfase color blanco y una fase acuosa superior incolora.
4. Precipitación: Transferir la fase acuosa a un tubo tipo eppendorf nuevo. Precipitar el RNA de la fase acuosa al mezclar con 0.25 mL de isopropanol. Incubar la muestra 10 min a temperatura ambiente, centrifugar a una velocidad de 12,000 x g por 10 min. El RNA precipita en forma de gel en el fondo del tubo.
5. Lavado: Eliminar el sobrenadante, lavar la pastilla con 0.5 mL de etanol al 75%. Mezclar la muestra en un agitador tipo vórtex y centrifugar a una velocidad de 7,500 x g durante 5 min. Eliminar el sobrenadante.
6. Obtención del RNA: Secar la pastilla de RNA obtenida por un periodo corto a temperatura ambiente. Disolver el RNA en 30 μ L de agua DEPC y guardar la muestra a -70°C. Todo el material que se almacena debe estar correctamente rotulado con su nombre y fecha.

Precaución: el *reactivo TRIzol* contiene fenol (tóxico y corrosivo) y el isotiocianato de guanidina (un irritante); pudiendo causar daños a la salud si no se maneja adecuadamente. Evite el contacto directo con la piel, ojos, vías respiratorias.

Protocolo para electroforesis de RNA (sesión 2)

1. Preparación del gel de agarosa desnaturalizante: Pesar 0.3 g de agarosa y fundirlos con 18.5 mL de agua DEPC. Una vez fundida la agarosa, agregar 6 mL de Buffer MOPS 5X y 5.5 mL de formaldehído. Vaciar en el molde y colocar los peines.
2. Preparación de la muestra de RNA y separación por electroforesis: Tomar 2 μ L de RNA, agregar 6 μ L de buffer de desnaturalización e incubar a 65°C durante 10 min. Transferir a hielo. Agregar 1 μ L de bromuro de etidio (0.625 mg/mL) a cada muestra. Colocar el gel en la cámara de electroforesis. Añadir el buffer de corrida (MOPS 1x). Con la micropipeta, tomar el volumen total de la mezcla RNA-buffer-bromuro y colocarla en cada pozo del gel. Conectar la fuente de poder a la cámara

y correr el gel a 70 mV por 30 minutos. Finalmente, con ayuda del sistema fotodocumentador de geles se detectarán las moléculas de RNA teñidas con bromuro de etidio.

3. Cuantificar el RNA extraído empleando un espectrofotómetro ultravioleta/visible (NanoDrop).

Precaución. El *bromuro de etidio* es un agente intercalante del DNA con efecto mutágeno, puede ser carcinogénico y teratogénico. Es irritante para ojos, piel, mucosas y tracto respiratorio. En caso de derrame sobre los ojos o la piel, lavar abundantemente con agua durante 15 minutos usando una ducha de seguridad o un lavajos. Si se inhala o se ingiere se debe buscar ayuda médica urgentemente.

El *formaldehído* es altamente volátil, inflamable y tóxico. Se clasifica como carcinógeno para humanos (cáncer nasofaríngeo). Evitar inhalación de vapores tóxicos y el contacto con la piel.

Referencias

- 1.- Brown T. A. Gene Cloning & DNA Analysis. 6th Edition. Wiley-Blackwell
- 2.- Sambrook, J. y Russel, D. (2001). Molecular Cloning. A laboratory manual (3 Ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 3.- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Walter, P. (2008). Molecular Biology of the Cell (5 ed.). USA: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- 4.- TRIzol Reagent (www.lifetechnologies.com)

Reporte práctica 5. Extracción de RNA de tejidos vegetales, animales y de hongos

El valor o puntuación de cada apartado del reporte se indica entre paréntesis.

INTRODUCCIÓN CON REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS LISTADAS AL FINAL DEL REPORTE (1.0)

OBSERVACIONES (1.0)

1.- Dibuje cada etapa del proceso de extracción de RNA, de la electroforesis de RNA y describa sus observaciones. Indique el material vegetal que proceso y las características de dicho material.

CUESTIONARIO (4.0)

1.- Represente los patrones de bandas de RNA que pueden ser observados en un gel de electroforesis desnaturalizante e indique a que corresponde cada banda

2.- ¿Qué criterios se utilizan para sugerir que un RNA esta íntegro y que la muestra es de buena calidad al observar un gel de electroforesis de RNA?

3.- ¿Qué protocolos de extracción de RNA se emplean para el aislamiento de RNAs pequeños? Describa un protocolo

4.- ¿En qué consiste el método RACE (rapid amplification of cDNA ends)?

RESULTADOS (2.0)

1.- ¿Qué concentración de RNA obtuvo? Investigue ¿Qué concentración de RNA se puede obtener a partir de tejidos vegetales empleando el reactivo de TRIzol?

2.- Incluya el gel de electroforesis de RNA, indique cuál es su muestra y describa sus resultados haciendo referencia a la concentración y calidad del RNA obtenido.

CONCLUSIONES (1.0)

PRÁCTICA NO 6. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP)

Datos básicos de la práctica

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad 5. Principios básicos de traducción. Tema 5.14. Modificaciones postraduccionales.

Introducción

La proteína verde fluorescente (GFP, green fluorescent protein) de *Aequorea victoria* de 238 aminoácidos, es empleada como un reportero para monitorear la dinámica de diferentes procesos en células u organismos vivos, como por ejemplo, reportero de expresión génica. Además, se puede emplear como una etiqueta de fusión para localizar proteínas o seguir sus movimientos intracelulares.

En la medusa *Aequorea victoria*, la bioluminiscencia reside en células especiales llamadas fotocitos, los cuales emiten luz fluorescente verde por la activación secuencial de dos fotoproteínas: la aequorina y la GFP. Al unir calcio, la aequorina emite luz azul la cual excita a la GFP para producir fluorescencia verde. La proteína GFP tiene una propiedad única ya que forma su cromóforo a partir de la ciclación y oxidación de 3 aminoácidos (Ser65, Tyr66 y Gly67). Esta modificación postraducciona ocurre pocas horas posterior a su síntesis (2 a 4 h). La proteína madura tiene dos picos de absorción, a 395 nm (pico mayor) y a 475 nm (pico menor). La excitación de la proteína a cualquiera de las dos longitudes de onda estimula la emisión de luz verde a 508 nm.

La expresión de proteínas recombinantes, puede llevarse a cabo mediante su clonación en vectores de expresión y su posterior introducción a un sistema de expresión como por ejemplo *Escherichia coli*. Las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* se pueden producir en forma soluble, pero en muchos casos, especialmente con niveles de expresión elevados, pueden agregarse y formar cuerpos de inclusión insolubles, lo que limita su purificación.

La purificación de proteínas que contengan en su secuencia una etiqueta de 6 histidinas ("6xHis-tagged proteins") se puede realizar mediante cromatografía de afinidad empleando una resina Ni-NTA (níquel-ácido nitroloacético). Para realizar esta purificación, se emplea imidazol a bajas concentraciones en los buffers de lisis y de lavado (10-20 mM). El imidazol es un anillo que forma parte de la estructura de la histidina. El anillo de

imidazol en los residuos de histidina (6xHis-tag) se une a los iones níquel que se encuentran inmovilizados en los grupos NTA. El imidazol, también se puede unir a los iones níquel, y de esta manera compite por la unión de otros residuos de histidina que se encuentran en proteínas que no poseen la etiqueta 6xHis-tag. A bajas concentraciones de imidazol, se previene la unión no específica de proteínas. Los buffers de lisis y lavado, también tienen una fuerza iónica alta (NaCl 300 mM) lo que evita uniones inespecíficas de proteínas a la matriz.

La elución de la proteína de interés, se realiza aumentando la concentración de imidazol en el buffer de elución, lo que permite la disociación de las proteínas marcadas con la etiqueta de histidinas, las cuales ya no pueden competir por el sitio de unión a la resina.

Objetivo

Purificar la proteína GFP a partir de un cultivo de *E. coli* empleando una resina de iones níquel.

Materiales y Equipo.

- Tubos tipo eppendorf de 1.5 mL
- Micropipetas de 100 y 1000 μ L
- Puntas para micropipeta de 100 y 1000 μ L
- Nitrógeno líquido
- Recipiente con hielo
- Minicentrífuga
- Agitador tipo vórtex
- Incubadora de bloque seco (termo bloque)
- Agitador orbital

Soluciones, Reactivos y Material Biológico:

- Cepa de *E. coli* transformada con el vector pQE-60, la cual expresa de manera constitutiva la proteína verde fluorescente (GFP)
- Buffer de lisis: Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM
- Buffer de lavado: Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM
- Buffer de elución: Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM

Uso obligatorio

- Guantes
- Bata blanca de algodón

Protocolo para purificación de proteínas recombinantes

Lea cuidadosamente el procedimiento a desarrollar.

- 1.- Centrifugar el cultivo bacteriano (1.5 mL en un tubo tipo eppendorf), tirar el sobrenadante y congelar las células en nitrógeno líquido. Se centrifugaran 2 tubos. El paquete celular de uno de los tubos se guardará a -70°C para la práctica 7 (electroforesis de proteínas) y el otro tubo se empleará para la purificación de la proteína GFP.
- 2.- Lisar las células bacterianas (de ambos tubos) por ciclos de congelamiento-descongelamiento. Para ello, congele la pastilla bacteriana en nitrógeno líquido por 1 minuto, posteriormente descongele la pastilla a 37°C. Repetir el proceso 15 veces.
3. Disolver la pastilla en 1 mL de *buffer de lisis*. Colocar la muestra en el agitador orbital durante 10 min a 4°C.
- 4.- Colocar la muestra en hielo por 5 min y centrifugar a 12,000 x g (4°C) por 5 min.
- 5.- Equilibrar la resina de níquel ("Ni-NTA agarose"). Para ello, tome 50 µL de la resina y añada 1 mL de *buffer de lisis*. Agitar manualmente, centrifugar dando un pulso, eliminar el sobrenadante. Repetir este paso una vez más.
- 6.- A la resina equilibrada, añadir el sobrenadante de la muestra centrifugada en el paso 4 e incubar 1 h a 4°C en el agitador orbital.
- 7.- Después de incubar, centrifugar y eliminar el sobrenadante. Realice 3 lavados con el *buffer de lavado*. Cada lavado consisten en añadir 1 mL de buffer a la resina, agitar manualmente, centrifugar dando un pulso y eliminar el sobrenadante.
- 8.- Agregar 50 µL de *buffer de elución*. Este paso permitirá liberar la proteína recombinante de la resina, el sobrenadante se observará de color verde.
- 9.- Observar la fluorescencia de la proteína purificada empleando una lámpara de luz ultravioleta.
- 10.- Guarde la proteína purificada a -20°C para su posterior análisis mediante un gel de electroforesis (SDS-PAGE). Todo el material que se almacena debe estar correctamente rotulado con su nombre y fecha.

Referencias

- 1.- Brown T. A. Gene Cloning & DNA Analysis. 6th Edition. Wiley-Blackwell
- 2.- The QIAexpressionist™. 5th Ed. Qiagen.

NOTA: LA PRÁCTICA 6 Y 7 SE EVALUARÁN EN UN SOLO REPORTE, YA QUE SON COMPLEMENTARIAS.

PRÁCTICA No 7. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Datos básicos de la práctica

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad 5. Principios básicos de traducción.
Tema 5.14. Modificaciones postraduccionales.

Introducción.

Existen diferentes técnicas que nos permiten separar la mezcla compleja de proteínas presentes en las células, como por ejemplo: la filtración en gel, la cromatografía y la electroforesis. Estos métodos requieren de a) una diferencia física entre las moléculas a separar y b) toman ventaja de esta característica para poner las moléculas en movimiento. En la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, “polyacrylamide gel electrophoresis” por sus siglas en inglés), un campo eléctrico ejerce la fuerza sobre la molécula. Esta fuerza es proporcional a la carga total o neta de dicha molécula. Las moléculas migran en el gel de acuerdo a su tamaño y su forma. Masas mas grandes tienen menor movilidad que masas pequeñas, y estructuras mas compactas tienden a tener mayor movilidad. La movilidad de proteínas desnaturalizadas es menor que la de proteínas nativas. Sin embargo, para muchas aplicaciones es deseable separar las proteínas como monómeros y no como complejos proteicos, por lo que se emplean agentes para desnaturalizar las proteínas previo a separarlas por electroforesis. La desnaturalización de las proteínas se puede llevar a cabo empleando agentes como la urea (rompe puentes de hidrógeno) o el ditiotreitól (rompe los puentes de disulfuro). El SDS (dodecilsulfato de sodio) el cual es un detergente cargado negativamente, también se emplea para desnaturalizar a las proteínas. Forma un complejo detergente-proteína que confiere una estructura extendida con una carga uniforme.

En esta práctica se separaran mediante SDS-PAGE las proteínas de una cepa de *E. coli* que expresa de manera constitutiva la proteína GFP y se analizará la pureza de la proteína GFP obtenida en la práctica anterior.

Objetivos.

Obtener el perfil de proteínas de la cepa de *E. coli* transformada con el vector pQE60.

Analizar mediante electroforesis la pureza de la proteína GFP obtenida en la práctica anterior y determinar su peso molecular.

Materiales y Equipo.

- Cámara de electroforesis vertical
- Fuente de poder
- Sistema de preparación y montaje de gel de acrilamida
- Micropipetas de 100 y 1000 μ L
- Puntas para micropipetas de 100 y 1000 μ L

Soluciones, Reactivos y Material Biológico.

- Proteína GFP purificada en la práctica No. 6
- Células de *E. coli* transformadas con el vector pQE60
- Buffer Laemmli 2X [Tris-HCl 0.125 M (pH 6.8), SDS al 4%, glicerol al 20%, beta-mercaptoetanol al 10%, agua, trazas de azul de bromofenol]
- Coomassie blue G-250 al 0.25% [0.25g de Coomassie brilliant blue G250, 10 mL de ácido acético glacial y 90 mL de metanol:agua (1:1 v/v)].
- Acrilamida/bisacrilamida (37.5:1), al 30%
- Tris 1.5 M (pH 8.8)
- Tris 1.0 M (pH 6.8)
- SDS al 10%
- Persulfato de amonio (APS) al 10%
- TEMED (N,N,N,N'-tetrametiletildiamina).
- Agua destilada

Uso obligatorio

- Guantes
- Bata blanca de algodón

Procedimiento para electroforesis de proteínas.

Lea cuidadosamente el procedimiento a desarrollar.

1.- Preparación de la muestra: tomar 100 μ L de la muestra lisada del cultivo bacteriano de la práctica anterior y 10 μ L de su proteína purificada y añadir un volumen equivalente de Buffer Laemmli 2X. Hervir las muestras a 95°C durante 10 min. Colocar en hielo. Centrifugar 2 min a 12,000 x g. Usar de 5 a 10 μ L de su muestra para el gel.

2.- Ensamblaje del soporte para la preparación del gel de proteínas: el instructor hará una demostración y explicará como se ensambla cada componente del soporte.

3.- Preparación del gel de electroforesis.

El gel de electroforesis de proteínas consta de un gel concentrador y un gel separador.

a) Gel separador al 10% (para 4 mL) – agregar en un recipiente 1.54 mL de agua destilada, 1.34 mL de acrilamida al 30%, 1.04 mL de Tris 1.5M (pH 8.8), 40 µL de SDS al 10%, 40 µL de APS al 10% y por último agregar 2 µL de TEMED. Verter esta mezcla en el soporte para preparación del gel de electroforesis.

b) Gel concentrador al 5.1% (para 2 mL) – agregar en un recipiente 1.4 mL de agua destilada, 0.33 mL de acrilamida al 30%, 0.25 mL de Tris 1.0M (pH 6.8), 20 µL de SDS al 10%, 20 µL de APS al 10% y por ultimo agregar 1 µL de TEMED. Verter esta mezcla en el soporte para preparación del gel de electroforesis, una vez que haya solidificado el gel separador.

4.- Separación de proteínas mediante el gel de electroforesis

Colocar el gel con su soporte en la cámara de electroforesis. Agregar la suficiente cantidad de amortiguador de corrida 1X. Cargar las muestras y el marcador de peso molecular. Separar las proteínas a una velocidad de 150-200 mV durante 30 min.

5.- Tinción y revelado del gel de electroforesis de proteínas

Colocar el gel en un recipiente y recubrir con el colorante Coomassie blue G-250 al 0.25%. Incubar 30 min en agitación constante (50 RPM). Descartar el colorante y eliminar el exceso de este lavando el gel con agua miliQ. Posteriormente, destiñir el gel agregando una mezcla de 40% metanol/ 10% ácido acético. Incubar 10-20 min en agitación constante. Repetir el proceso hasta observar bandas claras de proteínas.

Referencias

1.- Brown T. A. Gene Cloning & DNA Analysis. 6th Edition. Wiley-Blackwell
2.- Sambrook, J. y Russel, D. (2001). Molecular Cloning. A Laboratory Manual (3 Ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Reporte práctica 6 y 7. Purificación de la proteína verde fluorescente (GFP), Electroforesis de proteínas.

El valor o puntuación de cada apartado del reporte se indica entre paréntesis.

INTRODUCCIÓN CON REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS LISTADAS AL FINAL DEL REPORTE (1.0)

OBSERVACIONES (1.0)

- 1.- Dibuje cada etapa de la purificación de la proteína verde fluorescente y anote sus observaciones.
- 2.- Represente con un esquema los pasos a seguir para realizar una electroforesis de proteínas.

CUESTIONARIO (4.0)

- 1.- ¿Qué otras proteínas fluorescentes existen? Además de *Aequorea victoria* qué otros organismos producen proteínas fluorescentes.
- 2.- Además del Níquel, ¿Qué otros metales permiten la purificación de proteínas que contienen una etiqueta de histidinas?
- 3.- ¿En qué se fundamenta la cromatografía de exclusión molecular? ¿Qué ventajas ofrece este método para la purificación de proteínas?
- 4.- Además del colorante Coomassie blue G-250 ¿Qué otros compuestos se pueden emplear para teñir geles de proteínas? ¿Qué aplicaciones tienen?

RESULTADOS (2.0)

- 1.- Represente un espectro de absorción para la proteína GFP. Indique si obtuvo fluorescencia al colocar su proteína purificada en la lámpara UV. ¿Qué pudo afectar la eficiencia de purificación de su proteína?
- 2.- Incluya la imagen del gel de electroforesis realizado en la práctica, indique el peso molecular de la GFP. En proporción ¿Qué tan abundante es GFP con respecto a las proteínas endógenas de la cepa *E. coli* pQE60 empleada en la práctica?

CONCLUSIONES (1.0)

PRÁCTICA NO. 8. PREDICCIÓN DE DOMINIOS/ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS

Datos básicos de la práctica

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad 5. Principios básicos de traducción. Tema 5.14. Modificaciones postraduccionales: procesamiento proteolítico, acetilación, glicosilación, fosforilación, inteínas.

Esta práctica se realizará en el centro de cómputo. El día de la práctica se impartirá un taller en el cual se darán a conocer los aspectos más importantes a considerar en predicción de dominios, péptidos señal y modelado de estructura de proteínas. El reporte de la práctica se entregará vía correo electrónico el día señalado por el instructor.

Objetivo general

Conocer las principales herramientas de análisis *in silico* de secuencias de DNA y proteínas disponibles en las bases de datos EBI (The European Bioinformatics Institute), NCBI (National Center for Biotechnology Information), Expasy (SIB Swiss Institute of Bioinformatics) y CBS (Center for Biological Sequence Analysis).

Objetivos específicos

- a) Realizar una traducción *in silico* de una secuencia de DNA.
- b) Determinar el número de intrones y exones presentes en un gen al comparar una secuencia de DNA con una secuencia de RNA.
- c) Predecir la estabilidad de la proteína a partir de su secuencia.
- d) Identificar las posibles modificaciones postraduccionales que podría tener una proteína de interés.
- e) Predecir los dominios presentes y la posible función de una proteína.
- f) Predecir un modelo de estructura de una proteína.

Links de Internet:

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.ebi.ac.uk

www.expasy.org

[http://www.cbs.dtu.dk/services/
emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pestfind](http://www.cbs.dtu.dk/services/emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pestfind)

Procedimiento

Busque el siguiente número de acceso (**AAA27722**) en la base de datos del NCBI e indique:

- a) Nombre de la proteína y organismo de origen _____
- b) Longitud de la secuencia de la proteína _____ (en amino ácidos)
- c) Busque el gen o el pre-RNA de esta proteína. Dé el número y la longitud de la secuencia (en nucleótidos) de los exones e intrones presentes en este gen:

Exones: _____

Intrones: _____

Identifique la secuencia de los bordes exón-intrón: _____

- d) Use la secuencia de la proteína para buscar su localización intracelular mediante programas que predigan la presencia de un péptido señal. Para ello use en el “CBS Prediction Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)”; las aplicaciones SignalP 4.1 Server, TargetP 1.1 Server y NetNES 1.1 Server.
- e) ¿Qué localización intracelular tiene? _____
- f) ¿Cuál es la función de la proteína identificada? Para ello consulte la siguiente liga: geneontology.org, en la ventana de búsqueda “search GO data” introduzca el nombre de la proteína (revise la información disponible en ontología y anotaciones).
- g) Prediga los dominios presentes en la proteína. Puede emplear diferentes herramientas: InterProScan Sequence Search (EBI database; <http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>), pfam (<http://pfam.xfam.org>), CD Search (NCBI database), entre otros.
- h) Prediga ¿Qué modificaciones postraduccionales podría sufrir esta proteína? ¿En qué sitio de la secuencia proteica ocurren? Para ello utilice: CBS Prediction Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>).
- i) Determine si la proteína es estable o no. Para ello empleé la herramienta Pestfind de la base de datos EBI.

Reporte práctica 8. Predicción de Dominios/Estructura de Proteínas

El valor o puntuación de cada apartado del reporte se indica entre paréntesis.

INTRODUCCIÓN CON REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS LISTADAS AL FINAL DEL REPORTE (1.0).

ANÁLISIS IN SILICO (7.0)

Busque los siguientes números de acceso (AAA36740 y CAJ75785) en la base de datos del NCBI e indique:

- Nombre de la proteína y organismo de origen _____
- Longitud de la secuencia de la proteína _____ (en amino ácidos)
- Busque el gen o el pre-RNA de esta proteína. Dé el número y la longitud de la secuencia (en nucleótidos) de los exones e intrones presentes en este gen:

Exones: _____

Intrones: _____

Identifique la secuencia de los bordes exón-intrón: _____

- Obtenga la secuencia de la proteína y busque su localización intracelular mediante programas que predigan la presencia de un péptido señal. ¿Qué localización intracelular tiene?
- ¿Cuál es la función de la proteína identificada?
- Prediga los dominios presentes en la proteína.
- Prediga ¿Qué modificaciones postraduccionales podría sufrir esta proteína? ¿En qué sitio de la secuencia proteica ocurren?
- Determine si la proteína es estable o no, mediante la búsqueda de secuencias PEST.
- Posicione a la proteína identificada en una ruta metabólica e indique el sustrato y producto de la misma.

CONCLUSIONES (2.0)

Práctica No 9. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE *ESCHERICHIA COLI*

Datos básicos de la práctica

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad 8. Uso de plásmidos bacterianos como vehículos para manipular fragmentos de DNA. Unidad 9. Métodos básicos en biología molecular.

Introducción

Uno de los acontecimientos trascendentales en la Tecnología del DNA Recombinante fue el desarrollo de técnicas de transformación de células de *Escherichia coli*. A principios de 1970 se observó que al colocar células bacterianas en hielo en presencia de una solución salina (cloruro de calcio o cloruro de rubidio), éstas células se volvieron más eficientes para adquirir un DNA foráneo.

Aún se desconoce porque el tratamiento salino genera células competentes para la transformación. Se sugiere que el CaCl_2 precipita al DNA afuera de las células y que la sal es responsable de algún cambio en la pared celular que mejora la unión del DNA. El aumento en la temperatura (42°C) estimula la migración del DNA al citoplasma.

Las células de bacteria también se pueden transformar al ser sometidas a un campo eléctrico (2500 mV), mediante el cual se forman nanoporos en la membrana plasmática de la bacteria incrementando su permeabilidad. Estos nanoporos, son temporales, y la membrana regresa a su estado original.

En esta práctica se emplearan ambos métodos de transformación y se aprenderá a determinar la eficiencia de transformación a partir de una concentración de DNA conocida.

Objetivo

Transformar células de *Escherichia coli* cepa Top10 por choque térmico y por electroporación.

Materiales y Equipo.

- Micropipetas de 10, 100 y 1000 μl
- Puntas para micropipeta de 10, 100 y 1000 μl
- Incubadora de bloque seco (termo bloque)

- Electroporador
- Incubadora con agitación

Soluciones, Reactivos y Material biológico.

- Células químicamente competentes de *E. coli* cepa Top10
- Células electrocompetentes de *E. coli* cepa Top10
- Medio de cultivo Luria-Bertani líquido (LB; extracto de levadura 0.5%, bacto-triptona 1%, NaCl 1%).
- Medio de cultivo LB sólido suplementado con el antibiótico de interés.
- DNA plasmídico

Uso obligatorio

- Guantes
- Bata blanca de algodón

Protocolo

a) Transformación de células de *E. coli* por choque térmico

- 1.- Colocar las células químicamente competentes en hielo y descongelar por 10 min.
- 2.- Agregar 2 μL del plásmido a transformar a las células e incubar 10 min en hielo.
- 3.- Colocar las células en un bloque de calentamiento a 42°C durante 30 s.
- 4.- Transferir inmediatamente las células a hielo y añadir 500 μL de medio LB sin antibiótico. Recuperar las células 1 h a 37°C en una incubadora con agitación.
- 5.- Sembrar 100 μL del cultivo transformado en placas de medio LB con el antibiótico de selección.
- 6.- Incubar las células bacterianas a 37°C por 24 h.

b) Transformación de células de *E. coli* por electroporación

- 1.- Colocar las células electrocompetentes en hielo y descongelar por 10 min.
- 2.- Agregar 1 μL del plásmido pUC19 (1 $\text{pg}/\mu\text{L}$) a las células. Transferir las células a una celdilla de electroporación previamente enfriada. Incubar 10 min en hielo (puede incubar de 5 a 30 min en hielo).
- 3.- Encender el electroporador, colocar la celdilla en el equipo y dar un pulso a 2500 mV.
- 4.- Inmediatamente, añadir 500 μL de medio LB sin antibiótico. Recuperar las células 1 h a 37°C en una incubadora con agitación.
- 6.- Sembrar 20, 50 y 100 μL del cultivo transformado en placas de medio LB con el antibiótico de selección (ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- 7.- Incubar las células bacterianas a 37°C por 24 h.

Eficiencia de transformación

Se determina empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{no. de colonias en la placa}}{\text{pg de DNA control}} \times \frac{1 \times 10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{\text{volumen de reacción}}{\text{volumen sembrado}}$$

La eficiencia de transformación nos indica el número de unidades formadoras de colonia por μg de DNA.

Referencias

- 1.- Brown T. A. Gene Cloning & DNA Analysis. 6th Edition. Wiley-Blackwell
- 2.- Sambrook, J. y Russel, D. (2001). Molecular Cloning. A Laboratory Manual (3 Ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 3.- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Walter, P. (2008). Molecular Biology of the Cell (5 ed.). USA: Garland Science, Taylor & Francis Group.

Reporte práctica 9. Transformación de células de *Escherichia coli*

El valor o puntuación de cada apartado del reporte se indica entre paréntesis.

INTRODUCCIÓN CON REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS LISTADAS AL FINAL DEL REPORTE (1.5)

OBSERVACIONES (1.5)

1.- Dibuje cada etapa de la transformación de células de *E. coli*. Anote sus observaciones.

CUESTIONARIO (4.0)

1.- Investigue el genotipo de la cepa Top10 de *E. coli*. ¿Qué otros genotipos de *E. coli* se emplean para hacer células competentes, describa las características principales de estas cepas?

2.- ¿Qué métodos se emplean para transformar células de insecto? Describa el fundamento del método.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES (2.0)

1.- Calcule la eficiencia de transformación de las células transformadas.

2.- ¿Qué concluye de esta práctica?

Práctica No. 10. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Datos básicos de la práctica

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad 3. Replicación del DNA. Tema 3.3. Síntesis de la cadena líder. Unidad 9. Métodos básicos en biología molecular. Tema 9.2. Reacción de la polimerasa en cadena o PCR.

Esta práctica se realizará en el centro de cómputo. El día de la práctica se impartirá un taller en el cual se darán a conocer los aspectos más importantes a considerar en el diseño de oligonucleótidos. El reporte de la práctica se entregará vía correo electrónico el día señalado por el instructor.

Introducción

Los oligonucleótidos son pequeñas secuencias de DNA, específicas al fragmento de DNA a amplificar, a partir de los cuales la DNA polimerasa puede iniciar una reacción de polimerización. Un buen diseño de oligonucleótidos es de suma importancia para obtener resultados óptimos en una reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Los oligonucleótidos deben cumplir con las siguientes características:

- . a) Longitud: 18-30 nt
- . b) Temperatura de alineamiento (T_m): entre 55 y 65°C
- . c) Si la T_m de uno de sus oligonucleótidos es muy baja, trate de buscar otra secuencia cercana que tenga un mayor contenido en GC, o ampliar la longitud del oligonucleótido para aumentar la temperatura.
- . d) El contenido de GC debe ser de 40 a 60%, el extremo 3' de cada oligonucleótido debe terminar con una C ó una G (esto promueve la unión al molde).
- . e) Si incluye sitios de restricción en sus oligonucleótidos, debe añadir una secuencia de 3 a 4 nucleótidos en el extremo 5' a partir del cual corta la enzima de restricción.
- . f) Se debe evitar la formación de estructuras secundarias en los oligonucleótidos, procurando tener una distribución balanceada de regiones ricas en GC y AT.

- g) Evite la presencia de 4 o mas nucleótidos repetidos en la secuencia del oligonucleótido, evite repetidos de dinucleótidos (ejemplo. ACCCC ó ATATATAT).
- h) Evite la homología intra-oligonucleótido (mas de 3 bases que complementen dentro del oligonucleótido) o homología inter-oligonucleótido (que el oligonucleótido sentido y antisentido compartan secuencias complementarias). Esto podría dar lugar a dímeros entre oligonucleótidos, en lugar de aparearse con la secuencia de DNA deseada.

Objetivo.

Diseñar oligonucleótidos para la amplificación específica de fragmentos de DNA.

Sitios Web

www.ncbi.nlm.nih.gov

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>

Procedimiento

- 1.- Ingresar a la pagina del NCBI y buscar el siguiente código: AF272711.
- 2.- Seleccionar el marco de lectura abierto (ORF) de dicho gen. Copiar la secuencia en formato FASTA en un archivo word o en un bloq de notas, indicar el tamaño del ORF.
- 3.- Diseñar una pareja de oligonucleótidos sentido (5') y antisentido (3') para amplificar el marco de lectura completo de este gen siguiendo las especificaciones para un buen diseño de oligonucleótidos.
- 4.- Diseñar otra pareja de oligonucleótidos sentido (5') y antisentido (3') que permita amplificar únicamente un fragmento de 150 pb.

Reporte práctica 10. Diseño de Oligonucleótidos

El valor o puntuación de cada apartado del reporte se indica entre paréntesis.

INTRODUCCIÓN CON REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS LISTADAS AL FINAL DEL REPORTE (1.0).

ANALISIS *IN SILICO* (7.0)

1.- Diseñe una pareja de oligonucleótidos para amplificar el marco de lectura abierto del gen que codifica la piruvato deshidrogenasa de *Bombyx mori* (Acceso GenBank: NM_001099834).

- Proporcione la secuencia del oligonucleótido sentido (5') y antisentido (3') diseñados
- Indique la Temperatura de alineamiento (T_m) de cada oligonucleótido, su longitud y su contenido de GC.
- Marque la posición de los oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia del gen de la piruvato deshidrogenasa e indique el tamaño del amplicón.
- ¿Cuál es la función biológica de la piruvato deshidrogenasa?

2.- Diseñe una pareja de oligonucleótidos para la detección del virus de papiloma humano tipo 16. Para ello, primero visite la siguiente liga http://viralzone.expasy.org/all_by_species/5.html, y conozca la organización del genoma del virus. En la parte inferior derecha de esta página, ubique la información para cepas de referencia y descargue la secuencia de DNA correspondiente a la cepa tipo 16. Seleccione el marco de lectura del gen HpV16gp1, que codifica a una oncoproteína viral. Diseñe una pareja de oligonucleótidos que amplifiquen un segmento entre 125 y 150 pb de este marco de lectura.

- Proporcione la secuencia del oligonucleótido sentido (5') y antisentido (3') diseñados.
- Indique la Temperatura de alineamiento (T_m) de cada oligonucleótido, su longitud y su contenido de GC.
- Marque la posición de los oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia del gen de la HpV16gp1.
- ¿Qué papel juega el gen/proteína HpV16gp1 del virus en células infectadas?

CONCLUSIONES DE LA PRÁCTICA (2.0)

Práctica No. 11. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Datos básicos de la práctica

Diseñada para reforzar los temas vistos en la Unidad 3. Replicación del DNA. Tema 3.3. Síntesis de la cadena líder. Unidad 9. Métodos básicos en biología molecular. Tema 9.2. Reacción de la polimerasa en cadena o PCR.

Introducción

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que permite obtener múltiples copias de una molécula de DNA mediante la amplificación enzimática de una secuencia de DNA templado. La secuencia a amplificar es delimitada por una pareja de oligonucleótidos que hibridan con cada una de las cadenas de polinucleótidos de la doble hélice.

La amplificación generalmente se lleva a cabo empleando la enzima DNA polimerasa I (Taq) de *Thermus aquaticus*. Este organismo habita aguas termales y la mayoría de sus enzimas son termoestables (resistentes a desnaturalización por calor).

Una reacción de PCR contiene el DNA blanco, una pareja de oligonucleótidos, desoxinucleótidos trifosfato, cloruro de magnesio, Buffer [Tris-HCl (pH 8.4) y KCl] y la Taq DNA polimerasa. La reacción comienza al calentar la mezcla de reacción a 94°C, a esta temperatura los puentes de hidrógeno que mantienen unidas a las dos cadenas de polinucleótidos de la doble hélice se rompen, desnaturalizando al DNA en moléculas de cadena sencilla. Posteriormente, se baja la temperatura a 50-60°C, lo cual permite una cierta re-naturalización de las hebras de DNA y del apareamiento de los oligonucleótidos con su secuencia complementaria. La síntesis de DNA se lleva a cabo a 72°C. El ciclo de desnaturalización-alineamiento-extensión se repite aproximadamente 30 ciclos, obteniendo microgramos de un producto de PCR a partir de unos cuantos nanogramos de DNA templado.

La temperatura de alineamiento empleada es de suma importancia ya que esta afecta la especificidad de la reacción. La hibridación DNA-DNA es dependiente de la temperatura. Si la temperatura es muy alta, no ocurre hibridación y si es muy baja puede haber apareamientos incorrectos, permitiendo que los oligonucleótidos se unan a más de un sitio y se amplifiquen otras regiones no deseadas.

La temperatura de alineamiento ideal debe que permitir la hibridación del oligonucleótido y su templado, y evitar la formación de híbridos inespecíficos. Esta temperatura se puede estimar al determinar la T_m ó “melting temperature” del híbrido oligonucleótido-templado. La T_m es la temperatura a la cual un híbrido apareado correctamente se disocia. Una temperatura 1 a 2°C debajo de la T_m es lo suficientemente baja como para permitir la formación correcta de un híbrido oligonucleótido-templado, pero lo suficientemente alta como para evitar que híbridos con algún apareamiento incorrecto sean estables. La T_m puede ser determinada con la siguiente formula:

$$T_m = (4 \times [G + C]) + (2 \times [A + T])^\circ C$$

Donde [G + C] es el numero de nucleótidos de guanina y citosina presentes en el oligonucleótido, y [A + T] el número de nucleótidos de adenina y timina. La temperatura de alineamiento empleada para una reacción de PCR se obtiene al calcular la T_m de cada oligonucleótido y experimentalmente se emplea una temperatura de 1 a 2°C por debajo la T_m .

Objetivo.

Amplificar secuencias de DNA a partir de plásmidos y de DNA genómico empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

Materiales y Equipo.

- Tubos para PCR de 0.2 mL
- Micropipetas de 1, 10 y 100 μ L
- Puntas para micropipeta de 1, 10 y 100 μ L
- Termociclador
- Hielo

Soluciones y Reactivos.

- DNA molde (plásmido, DNA genómico)
- dNTPs (mezcla de dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 10 mM)
- Buffer Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM, KCl 50 mM
- Cloruro de Magnesio 50 mM
- Oligonucleótido sentido y oligonucleótido antisentido (10 pmol c/u)
- Agua destilada
- Taq DNA polimerasa

Uso obligatorio

- Guantes
- Bata blanca de algodón

Protocolo

1.- Preparar la siguiente mezcla de reacción en un volumen total de 50 μL :

Reactivo	Volumen
DNA templado (nanogramos)	1 μL
Buffer Tris-HCl (pH 8.4) - KCl 10x	5 μL
Cloruro de Magnesio 50 mM	3 μL
dNTPs 10 mM	1 μL
Oligonucleótido sentido 10 pmol	1 μL
Oligonucleótido antisentido 10 pmol	1 μL
Taq DNA polimerasa casera	1 μL
Agua destilada	37 μL

2.- Programar el termociclador:

Desnaturalización inicial	94°C	5 min
30 ciclos	Desnaturalización	94°C/45s
	Alineamiento	60°C/45s
	Extensión	72°C/1 min 30 s
Extensión final	72°C	8 min
	4°C	∞

3.- Colocar la muestra en el termociclador para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa.

4.- Preparar un gel de electroforesis para visualizar sus resultados siguiendo el protocolo descrito en la práctica 2.

Referencias

- 1.- Brown T. A. Gene Cloning & DNA Analysis. 6th Edition. Wiley-Blackwell
- 2.- Sambrook, J. y Russel, D. (2001). Molecular Cloning. A Laboratory Manual (3 Ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Reporte 11. Reacción en Cadena de la Polimerasa

El valor o puntuación de cada apartado del reporte se indica entre paréntesis.

INTRODUCCIÓN CON REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS LISTADAS AL FINAL DEL REPORTE (2.0)

CUESTIONARIO (4.0)

- 1.- ¿En qué consiste la técnica de PCR cuantitativa? ¿Qué aplicaciones tiene?
- 2.- ¿Cómo influye la concentración de magnesio en una reacción de PCR?
- 3.- ¿Qué es un DNA polimerasa de alta fidelidad? ¿Qué características tienen estas enzimas?

RESULTADOS (2.0)

- 1.- Describa sus resultados. Incluya la imagen del gel de electroforesis e indique el tamaño del amplicón obtenido.

CONCLUSIONES (1.0)