



Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular II



AUTORES:

Dra. Elena Aréchaga Ocampo
Dra. Ana Leticia Arregui Mena
Dra. Claudia Haydée González de la Rosa
Arantxa López-Vallejo López

Departamento de Ciencias Naturales

ISBN: 978-607-28-0768-6

11 de Mayo 2016

Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular II

ISBN 978-607-28-0768-6

11 de Mayo del 2016



UEA Técnicas de Biología Molecular II

Autoras:

Dra. Elena Aréchaga Ocampo¹

Dra. Ana Leticia Arregui Mena¹

Dra. Claudia Haydée González de la Rosa¹

Arantxa López-Vallejo López²

¹ Departamento de Ciencias Naturales, División de Ciencias Naturales e Ingeniería, UAM, Unidad Cuajimalpa.

² Licenciatura en Biología Molecular, División de Ciencias Naturales e Ingeniería, UAM, Unidad Cuajimalpa.

Contenido

Prólogo	2
Práctica 1. Toma de muestras y evaluación microscópica	5
Práctica 2. <i>Western blot</i>	13
Práctica 3. ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	20
Práctica 4. Inmunolocalización	27
Práctica 5. Cariotipo	35
Práctica 6. FISH (<i>Fluorescence in situ hybridization</i>)	41
Práctica 7. <i>Southern blot</i>	48
Práctica 8. RFLP (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>)	57
Práctica 9. qPCR (<i>quantitative PCR</i>)	64
Práctica 10. Transfección	71
Práctica 11. Silenciamiento con ARN de interferencia	77
Abreviaturas	83
Soluciones	85
Agradecimientos	92

Prólogo

La Biología Molecular es una ciencia en plena expansión y con un amplio panorama de metodologías a desarrollar, que pueden aplicarse en el ámbito biomédico, en las ciencias forenses, en la investigación básica, etc. Una de las aplicaciones biomédicas es el diagnóstico molecular, que se refiere al diagnóstico de enfermedades mediante el uso de técnicas de Biología Molecular. Estas técnicas, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), son usadas de forma rutinaria en laboratorios tanto del sector público como privado, por lo cual se espera que el alumno interesado en el tema las comprenda y aplique exitosamente. Mucho antes de que las técnicas mencionadas fueran desarrolladas, el *Southern blot* constituyó por mucho tiempo uno de los pilares tanto del diagnóstico molecular como de la tipificación de individuos, pero fue cayendo en desuso debido a las ventajas inherentes a la PCR. Actualmente, el *Southern blot* se utiliza en pocas circunstancias, como en el diagnóstico del síndrome de frágil X y en la detección de clonalidad en algunas enfermedades malignas.


Este manual surge como respuesta a la necesidad de desarrollar una guía dirigida a alumnos de licenciatura, que aborde brevemente los fundamentos teóricos de algunas técnicas utilizadas como herramientas en el diagnóstico molecular, en el tratamiento de enfermedades genéticas, en la tipificación de individuos y en general, en la investigación biomédica básica. Se apega a los objetivos del programa de estudios de la UEA Técnicas de Biología Molecular II con clave 460320 de la Licenciatura en Biología Molecular, aprobada en el 2010 por Colegio Académico en su sesión 323. El contenido sintético de la UEA es: 1) Toma, manejo y procesamiento de muestras. 2) Identificación de individuos y enfermedades. 3) Pruebas genéticas. 4) Vectores de terapia génica. 5) ARN de interferencia. En el manual se plantean diversos ejercicios experimentales a manera de prácticas de laboratorio, con los cuales se reafirma y aplica el conocimiento del alumno en temas como la genética, la biología molecular, la inmunología y las técnicas instrumentales en el diagnóstico de enfermedades y tipificación humana. Además, se pone en práctica la interpretación de los resultados que conducen a un diagnóstico o conclusión adecuada.

Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular II

Cada práctica inicialmente hace referencia a los antecedentes del tema y sus aplicaciones en las áreas de investigación, industria biotecnológica, farmacéutica, ámbito social, entre otras, de acuerdo a la importancia individual de la técnica. Posteriormente, se muestran los materiales y equipos necesarios para la práctica seguido del método detallado paso a paso y continuando con una sección de análisis de resultados que incluyen preguntas o ejercicios referentes a la práctica que reafirmarán lo aprendido. Finalmente aparecen las referencias bibliográficas utilizadas. Al final del manual hay una sección llamada “Soluciones”, donde se detalla la preparación de las soluciones utilizadas a lo largo de las prácticas experimentales. Aunque no se hace énfasis en ello, debido a que un alumno que cursa esta UEA debería de haber aprobado varias UEA experimentales previamente, la seguridad de los alumnos que realizan las prácticas de laboratorio es primordial, por lo que se deben seguir las normas de seguridad e higiene estándar.

El objetivo de este manual es que el alumno pueda identificar de qué manera se aborda un problema tanto en el diagnóstico molecular de enfermedades, como en el tratamiento genético de las mismas o en la tipificación de individuos, mediante técnicas en Biología Molecular. Este texto fungirá como guía metodológica, por lo cual la realización de prácticas demostrativas, revisión conceptual de las técnicas, o bien, el diseño experimental al abordar un problema por parte del alumno, podría resultar ser un ejercicio aun más dinámico e ilustrativo, que la realización experimental de las técnicas en el laboratorio de docencia.

Es importante mencionar que las prácticas propuestas son autocontenidas y carecen de un orden cronológico entre ellas, es decir, el docente podrá decidir el número y orden de las prácticas a realizar según la dinámica y circunstancias del grupo y el trimestre, lo cual permite que no todas las prácticas tengan que ser realizadas en un sólo trimestre. Así mismo, el manual sugiere y hace referencia al uso de varios *kits* comerciales, como los mencionados en los apartados dedicados a *Western blot* y *Southern Blot*. Sin embargo, esto es meramente una sugerencia y el diseño experimental de las técnicas puede ser modificado de acuerdo a las necesidades del grupo.

En cada uno de los protocolos, el símbolo  indica acciones recomendadas en situaciones específicas y advierte al usuario sobre cuidados especiales. En todos los casos, los

Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular II

protocolos han sido estandarizados a la infraestructura con que cuentan los laboratorios experimentales de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería.

Práctica 1. Toma de muestras y evaluación microscópica

Objetivos

1. Tomar e identificar muestras de sangre, esperma y orina adecuadamente.
2. Procesar muestras de sangre, semen y orina, y observarlas al microscopio para identificar sus características morfológicas.
3. Realizar recuentos manuales de células.

Introducción

Las muestras de fluidos corporales como son la sangre, la orina o el semen son muy utilizados para conocer el estado general de salud de un individuo, empleándose para realizar distintos análisis bioquímicos y moleculares. La correcta toma de muestras, su identificación, así como su manejo posterior, son de gran importancia para la interpretación de los resultados.

El análisis de la composición de la orina indica principalmente tres factores: el estado de nutrición, los procesos metabólicos y la capacidad del riñón para manejar las sustancias. Por otro lado, la orina es un tipo de muestra de fácil acceso y recolección, y a través de ella se puede obtener información a bajo costo de diversas funciones metabólicas (1).

El manejo y estudio de muestras de semen es importante para el diagnóstico de infertilidad y las muestras son utilizadas para espermatobioscopía, inseminación artificial o fertilización *in vitro*. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor del 10 al 15% de las parejas en edad reproductiva consultan al médico por problemas de esterilidad, y por tanto demandan evaluación y tratamiento por esterilidad e infertilidad (2).

El análisis de la sangre nos puede dar información muy valiosa acerca del estado general de salud y metabólico de las personas; es además un material biológico importante para diversos análisis genéticos y para conocer la eficacia de fármacos.

Material y equipo necesario

Microscopio óptico

Cámara de Neubauer

Portaobjetos

Cubreobjetos

2 tubos cónicos 15 mL

Centrífuga clínica

1 tubo para muestra de sangre con anticoagulante

1 tubo para muestra de sangre sin anticoagulante

2 vasos para muestra de orina o semen

3 cajas con micropuntas (2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 200 a 1000 μ L)

3 micropipetas (P-1,000, P-200 y P-20)

1 cajas para tubos cónicos

Cloruro de sodio al 0.9 %

Tiras reactivas para orina

Tiras reactivas para medir pH (intervalo de 6-10)

Medio de dilución Weigman (bicarbonato sódico 0.6 M, formaldehído 0.35%)

Vacutainer

Alcohol al 70%

Portatubos

Algodón

Torniquete

Solución de Dacie (formaldehído 0.4%, citrato trisódico 3%)

Solución para diluir leucocitos (ácido acético 0.75%, violeta de genciana 0.25%)

Protocolo

Orina

👁 Utilizar guantes en todo momento, recordar que se está trabajando con muestras biológicas potencialmente contagiosas. Trabajar de forma ordenada y desechar cuidadosamente todos los materiales.

1. Toma de muestra. La primera orina del día es la muestra que se recomienda para la mayoría de las pruebas, ya que está más concentrada. La parte inicial debe ser descartada y sólo se recolecta el resto de la micción. La muestra debe colectarse en un recipiente de boca ancha, limpio, seco y a prueba de pérdidas, de preferencia estéril si pasarán más de 2 h antes del análisis. La muestra debe rotularse inmediatamente con el nombre del paciente, fecha, hora de recolección, dirección del paciente, datos del médico, tipo de muestra y análisis según el protocolo institucional. La etiqueta debe ir en el frasco, no en la tapa y no se debe desprender. Si la muestra no se va a evaluar en las siguientes 2 h, se debe refrigerar.

2. El examen de la orina tiene dos fases: la exploración fisicoquímica y la observación microscópica. Para las pruebas fisicoquímicas se empleará la tira reactiva que puede medir: pH, proteínas, glucosa, cuerpos cetónicos, urobilinógeno, bilirrubina y sangre entre otros, dependiendo la marca. La tira debe sumergirse en la orina de 1-2 s, se deben impregnar todos los reactivos. Al sacar la tira tocar el borde del recipiente para quitar el exceso. Comparar el color resultante de cada parte de la tira con el diagrama de referencia impreso en el frasco de las tiras reactivas. El tiempo ideal para tomar la lectura de la escala cromática va de 30 a 60 s. También se debe registrar el color y transparencia o turbidez en su caso (3).

3. Observación microscópica de la orina. Colocar 10 mL de orina en un tubo cónico y centrifugarlo por 5 min a 2000 rpm. Decantar el sobrenadante. Resuspender la pastilla de sedimento y colocar 15 μ L entre un portaobjetos y un cubreobjetos. Observarlo al microscopio, localizar los campos a bajo aumento y luego observar la muestra a 40X para determinar la presencia o ausencia de células epiteliales, leucocitos, eritrocitos, cilindros, cristales, bacterias u hongos levaduriformes.

Semen

1. Toma de la muestra. La obtención de la muestra debe ser por masturbación, las manos y los genitales deben estar limpios, la muestra debe contener todo el semen eyaculado (no sólo una parte). La muestra debe obtenerse en el sitio en el que se llevará a cabo el análisis para controlar el tiempo y la temperatura (20-37°C). Rotular inmediatamente con nombre y apellidos, así como con el código del laboratorio. Mantener la muestra a 37°C y si es posible en agitación, para evitar que se coagule.

2. Evaluación inicial macroscópica. Observar el color (homogéneo, gris opalescente) y la viscosidad (el semen al ser eyaculado presenta una apariencia coagulada, pero luego de 15 min su apariencia es más fluida), es importante reportar si se observa algo distinto. El volumen se determina pesando previamente el frasco en el que se va a eyacular y volviéndolo a pesarlo con la muestra; suponer que la densidad es igual a 1, por lo que 1 g de semen es igual a 1 mL. El límite inferior normal es de 1.5 mL. Para medir el pH se debe introducir una tira reactiva en el eyaculado y antes de 30 s comparar con la referencia. El límite inferior de referencia es de pH 7.2.

3. Evaluación microscópica. Se recomienda que se realice en un microscopio con platina con temperatura controlada a 37° C, si no es posible, considere que las bajas temperaturas pueden modificar la movilidad de los espermatozoides. Colocar 10 µL de la muestra en un portaobjetos y cubrirla con un cubreobjetos, observar la muestra con el objetivo 10X del microscopio. Buscar la presencia de aglutinaciones de espermatozoides y la presencia de otras células no espermáticas. El porcentaje de movilidad se determina colocando una muestra de 10 µL en un portaobjetos, se coloca un cubreobjetos y se deja reposar por un min a 37° C. Luego hacer una observación rápida de la muestra a 20X o 40X. La movilidad se clasifica en: espermatozoides inmóviles (IM); espermatozoides con movilidad no progresiva (NP); espermatozoides con movilidad progresiva (PR) que puede ser lineal o en círculos amplios (Fig. 1). Imaginar un cuadrado al centro, si se dispone de una retícula es mejor. Elegir un campo y comenzar a contar, primero se cuentan los espermatozoides con movilidad progresiva, luego los espermatozoides con movilidad no progresiva y por último los inmóviles, siguiendo el sentido de las agujas del reloj. Intente hacerlo de un solo golpe visual. El límite inferior de referencia para la movilidad total es de 38-42%, y para la

movilidad progresiva es 31-34%. Se debe hacer el conteo al menos por duplicado (preparar dos portaobjetos) y al menos deberán contarse 5 campos en cada uno de los portaobjetos.

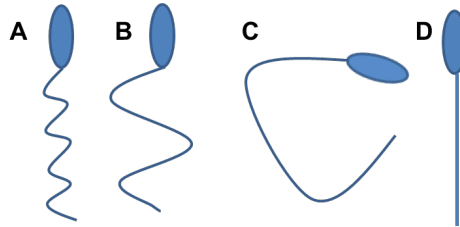


Fig. 1 Ilustración de la movilidad de los espermatozoides. A) Progresivo rápido. B) Progresivo lento. Ambos se agrupan en movilidad progresiva (PR). C) Móvil no progresivo (NP). D) Inmóvil (IM).

Para determinar el número de espermatozoides se debe realizar una dilución 1:50 de la muestra con medio de dilución Weigman, este medio de dilución inmoviliza a los espermatozoides. Tomar 10 μL de la dilución y colocarlos al borde del cubreobjetos colocado en una cámara de Neubauer para que entren por capilaridad, dejar reposar algunos segundos y comenzar a contar el cuadrante central (Fig. 2).

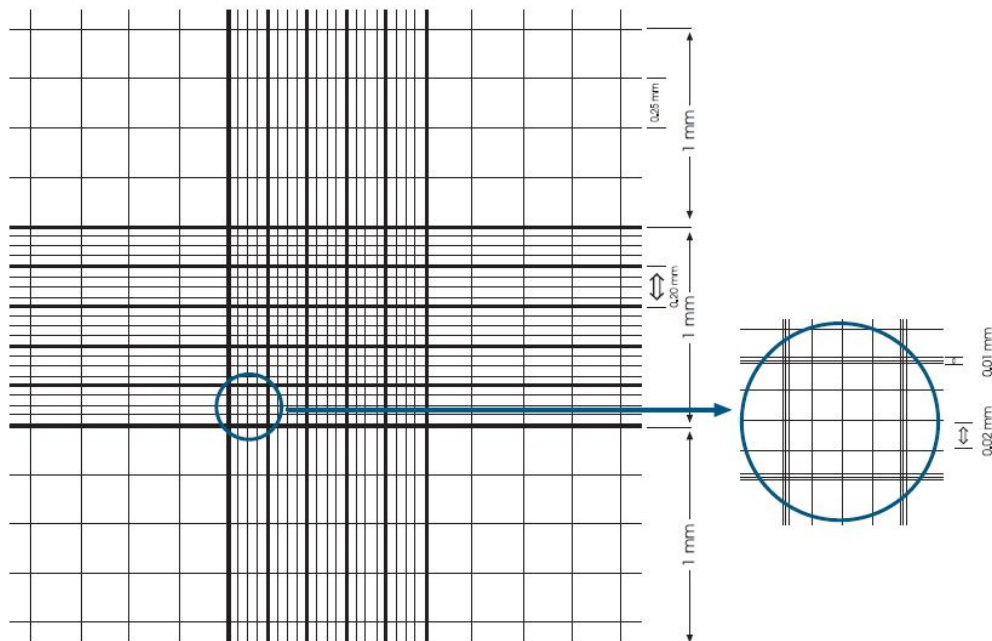


Fig. 2 Cámara de Neubauer, donde se aprecian sus dimensiones (4). El cuadrante central es el usado para el recuento de espermatozoides, ya que tiene una cuadrícula que facilita el conteo.

Contar sólo los espermatozoides cuya cabeza queden dentro del cuadrante. Contar al menos las dos cuadrículas centrales (una en cada campo) y comparar los resultados, si son semejantes en un 95% se deberá obtener el promedio y calcular la cantidad de espermatozoides por mL como se indica a continuación.

El número de espermatozoides por mL se obtiene al multiplicar el promedio de espermatozoides x el factor de dilución x 10,000= espermatozoides/mL. Si los resultados de los conteos no son consistentes se debe volver a hacer las diluciones y el conteo

El límite inferior de referencia para la concentración es de 15 millones de espermatozoides/mL y para el número total de espermatozoides es de 39 millones de espermatozoides/eyaculado (este se obtiene al multiplicar el número de espermatozoides por mL por el número de mL de eyaculado).

Sangre

1. Toma de muestra. El donante de la muestra debe estar en ayuno. Siempre se debe utilizar material estéril y desechable para la toma de muestra y se debe realizar en condiciones de asepsia para evitar la contaminación. Se debe transmitir al paciente confianza, seguridad y profesionalismo durante el procedimiento. Preparar el material necesario (aguja, portatubos, vacutainer, tubos de vacío necesarios, desinfectante, gasas, torniquete). El paciente debe sentarse confortablemente en una silla, con el antebrazo colocado en un apoyabrazos inclinado y el brazo extendido, de manera que forme una línea recta desde el hombro a la muñeca. Examinar el brazo y seleccionar una vena mientras el paciente aprieta el puño con fuerza. Desinfectar el lugar de la flebotomía con alcohol del 70%, aplicar el torniquete y realizar la punción venosa. Durante la punción el portatubos debe estar colocado en un ángulo aproximado de 15° con respecto al brazo. La aguja debe introducirse a lo largo del curso de la vena hasta que esté totalmente en el interior de la misma. Para extraer la sangre, se introduce el tubo en el portatubos. Los dedos índice y medio se sitúan en las aletas del portatubos y el pulgar presiona completamente el tubo dentro del portatubos. Una vez obtenido suficiente volumen de muestra (aprox. 5 mL), se retira el torniquete y se extrae la aguja y el tubo con la muestra del portatubos. Mientras se retira la aguja, colocar un algodón haciendo presión sobre la zona de punción e indicar al paciente

que mantenga el brazo levantado durante unos minutos. Mezclar los tubos por inversión para asegurar una perfecta mezcla de la sangre con el anticoagulante. La aguja se depositará en una unidad de recolección y eliminación de residuos de seguridad. Identifique inmediatamente la muestra con nombre y apellidos del paciente.

2. Observación microscópica de la sangre. Se realizará un recuento directo de las células usando la cámara de Neubauer. Se hará una dilución 1:200 de la sangre con un medio isotónico como la solución de Dacie. Colocar 10 μ L de la dilución en cada campo de la cámara de Neubauer, observar que se hayan distribuido de forma homogénea a un aumento de 10X, y luego cambie el objetivo a 40X para hacer el conteo de las células. Contar los cuatro cuadros grandes de los extremos (dentro tienen 16 cuadros más pequeños) (Fig. 2), y obtener el promedio de las mediciones. Compare los resultados obtenidos en el campo superior con los del inferior, si el número de células es semejante, obtenga el promedio y continúe con los siguientes cálculos: número promedio de células x factor de dilución (200) x 10,000= número de eritrocitos/mL. El conteo deberá hacerse, al menos, por duplicado. Para hacer el recuento de leucocitos, se debe utilizar un diluyente que destruya a los eritrocitos y que tiña a los leucocitos. La dilución sanguínea debe hacerse 1:20 en la solución para diluir leucocitos. El conteo se realiza de la misma manera que para los eritrocitos pero considerando el factor de dilución (5).

3. No olvide lavarse las manos al iniciar y terminar la práctica, aunque siempre utilice guantes. Cambiar de guantes si cambió de paciente y lavarse las manos entre uno y otro. desechar adecuadamente todo el material en contacto con las muestras. Usar siempre la bata y cubrebocas. Desechar los punzocortantes en recipientes dedicados para ellos.

Análisis de resultados

Describa las características físicas, fisicoquímicas y la observación microscópica de la orina. Investigue los valores de referencia para cada indicador descrito. Explique la información que se puede obtener de cada parámetro registrado.

Describa las características físicas (color, viscosidad, volumen y pH) de la muestra de semen. Describa la movilidad y forma de los espermatozoides. Realice las cuentas

necesarias para determinar el número de espermatozoides por mililitro y por eyaculado. Compare sus resultados con los valores de referencia. Indique qué significan variaciones importantes en los valores obtenidos.

Describa sus observaciones de la muestra de sangre. Compare con los valores de referencia y explique la relevancia de las posibles diferencias en los resultados.

Referencias

1. Strasinger SK, Di Lorenzo MS. Análisis de Orina y de los Líquidos Corporales. 5a ed. Estados Unidos: Médica Panamericana; 2010.
2. López García MJ, Urbano Felices A, Cárdenas Povedano M. Manual de laboratorio para el análisis del semen. 1a ed. España: OmniaScience; 2012.
3. Paniagua Contreras GL. Manual de análisis clínicos. México: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Iztacala; 2010.
4. © SantiBadia / https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Reticulo_Neubauer.jpg / CC-BY-SA-4.0
5. Palomar Morales M. Métodos de Laboratorio manejo de animales, hematología e inmunología. México: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Iztacala; 2005.

Práctica 2. *Western blot*

Objetivos

1. Aprender el proceso de transferencia de proteínas desde un gel de poliacrilamida a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF).
2. Detectar una proteína específica en la membrana de PVDF mencionada en el objetivo 1, usando anticuerpos primario y secundario.
3. Comparar el gel de poliacrilamida teñido con Coomassie con la película radiográfica obtenida después de la reacción quimioluminiscente.

Introducción

La técnica llamada *western blot* (WB) o inmunoelectrotransferencia, permite identificar una proteína en particular dentro de una mezcla (1). En primera instancia, estas proteínas se separan por medio de una electroforesis desnaturizante o nativa en un gel de poliacrilamida según el peso molecular o la carga (Fig. 1). Después, una segunda electroforesis transfiere las proteínas desde el gel hasta una membrana (las más comunes son de difluoruro de polivinilideno (PVDF) o de nitrocelulosa). Una vez en la membrana, se utiliza un anticuerpo específico de la proteína de interés para detectar su presencia y su posición en el gel original. Esta interacción no se detecta a simple vista, se requiere un anticuerpo secundario marcado, que reaccionará contra el isotipo y la especie del anticuerpo primario (Fig. 2). Por ejemplo, si se utiliza un anticuerpo primario de ratón contra actina de humano, entonces el anticuerpo secundario puede ser de cabra contra anticuerpos de ratón. Este anticuerpo secundario lleva un radioisótopo, un marcador fluorescente o una enzima (como la peroxidasa de rábano (HRP) o la fosfatasa alcalina) que permite que el complejo anticuerpo-proteína sea detectado (Fig. 3). Al agregar el sustrato de la enzima, ésta produce un precipitado de color que se deposita en la membrana, o produce luz que es capturada en una placa radiográfica.

Otros pasos importantes durante un WB son el bloqueo y los lavados. El bloqueo se realiza antes de agregar el anticuerpo primario, y es necesario porque las membranas tienen una alta afinidad por todas las proteínas (incluyendo anticuerpos), de tal forma que el anticuerpo se uniría inespecíficamente a todos los lugares que estuvieran “libres” de proteínas. Las soluciones bloqueadoras más comunes son de leche, de gelatina o de albúmina. Los lavados se realizan después de cada incubación con anticuerpos para eliminar a todos aquellos que no estén unidos fuertemente a las proteínas transferidas y así disminuir la señal inespecífica al revelar (2, 3).

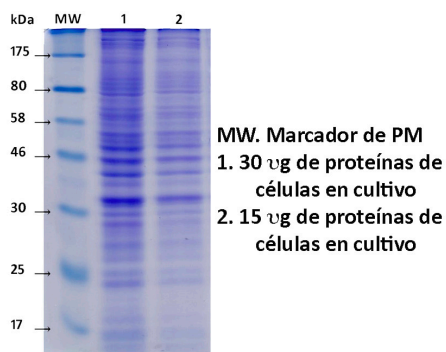


Fig. 1 SDS-PAGE con azul de Coomassie

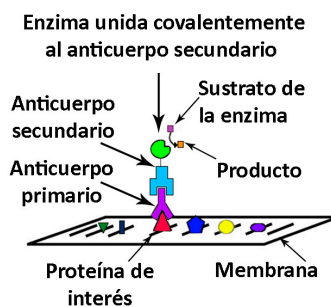


Fig. 2 Esquema de un WB

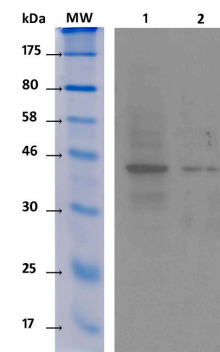


Fig. 3 WB anti-pJNK

Esta práctica requiere de al menos 2 días para realizarse. Se iniciará con un gel de poliacrilamida que ya contenga las proteínas separadas por peso molecular. Para revelar el WB, se utilizará la reacción de quimioluminiscencia catalizada por la HRP, que se basa en la oxidación del luminol por el peróxido (el luminol oxidado emite luz).

Material y equipo necesario

- 1 cámara de transferencia con aditamentos (Mini Trans-Blot® Cell de la marca BioRad)
- 1 fuente de poder (PowerPac™ HC de la marca BioRad)
- 1 agitador magnético
- 1 barra magnética
- 1 transiluminador de luz blanca
- 1 cuarto oscuro
- 1 pipeta de vidrio para retirar burbujas

1 charola para armar el sándwich del gel
2 charolas de revelado
1 contenedor con hielo
1 casete de rayos X
1 bolsa transparente
3 cajas con micropuntas (2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 200 a 1000 μ L)
3 micropipetas (P-1,000, P-200 y P-20)
Papel filtro
Membrana PVDF
Películas radiográficas
Amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%)
Solución de Ponceau (Reactivo de Ponceau S al 2%, ácido tricloroacético al 30%)
Solución reveladora de radiografía
Solución fijadora de radiografía
TBS-T (Tris 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Tritón x-100 0.1%)
Solución bloqueadora (TBS-T con 5% de leche sin grasa)
Anticuerpo primario específico para la proteína de interés
Anticuerpo secundario conjugado con HRP, específico para el anticuerpo primario
Kit de detección por quimioluminiscencia (por ejemplo, *ImmobilonTM Western HRP Substrate* de la marca Merck, que contiene luminol y la solución de peróxido)
1 gel de poliacrilamida desnaturalizante que haya sido sometido a electroforesis previamente. En los carriles 1 y 5 debe contener marcador de peso molecular y en los carriles 2 y 6 la proteína de interés no purificada. Cortar por la mitad longitudinalmente para obtener 2 geles iguales, uno se teñirá con azul de Coomassie y el otro se someterá a WB.

Protocolo

Transferencia de proteínas (protein blotting)

👁 Utilice guantes en todo momento.

1. Cortar el papel filtro y la membrana de PVDF a la medida del gel de poliacrilamida.
2. Hacer una marca con lápiz sobre la membrana que permita conocer su orientación.
3. Sumergir la membrana de PVDF en metanol por 2 min en agitación suave y después en agua destilada por 2 min.
4. Equilibrar las almohadillas de fibra, los papeles filtro, el gel y la membrana en buffer de transferencia por al menos 5 min.
5. Abrir el casete portador del gel y colocar en el siguiente orden sobre el lado del cátodo (color negro): almohadilla de fibra, papel filtro, gel, membrana, papel filtro y almohadilla de fibra (Fig. 4).

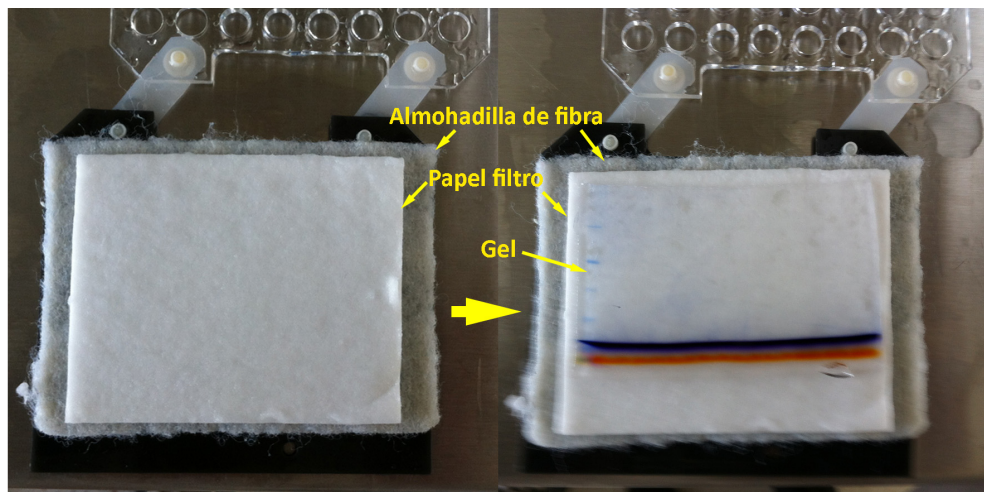


Fig. 4 Ensamble del sándwich.

7. Eliminar cualquier burbuja que se haya formado en el sándwich y cerrar el casete.
8. Colocar el tanque de transferencia sobre un agitador magnético y llenar hasta la mitad con el amortiguador de transferencia.
9. Añadir una barra de agitación y comenzar la agitación.
10. Introducir el casete en el módulo de transferencia (el lado negro del casete hacia el lado negro del módulo) y luego en el tanque (Fig. 5A).
11. Agregar amortiguador de transferencia hasta llenar el tanque y rodearlo con hielo para disipar el calor que se generará durante la electroforesis (Fig. 5B).

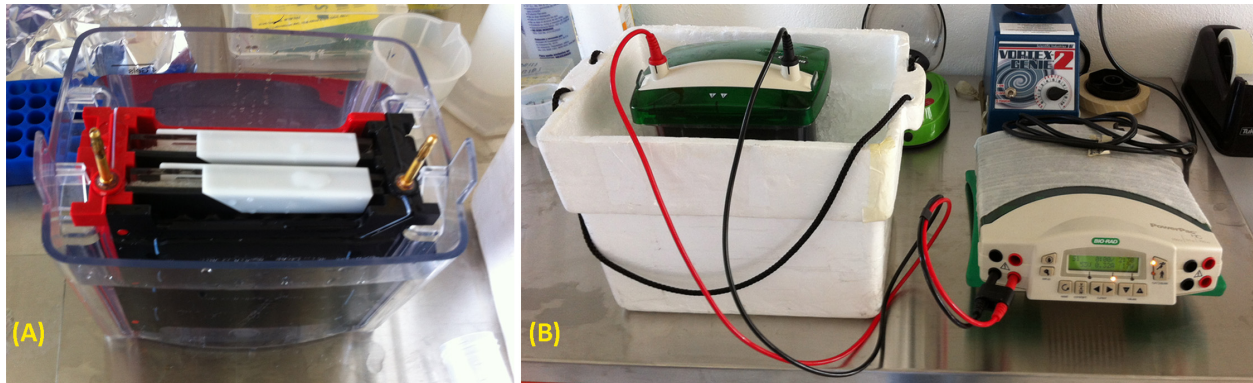


Fig. 5 Casete en módulo de transferencia (A). Rodear el tanque con hielo y conectar a la fuente de poder (B).

12. Colocar la tapa y conectar los cables a la fuente de poder asegurándose de hacer coincidir los colores de los cables a los de las entradas de la alimentación (Fig. 5B).
13. Programar la fuente de poder y dar inicio a la transferencia (0.5 A por 60 min).
14. Al terminar, retirar el casete, desmontar el sándwich, teñir el gel con azul de Coomassie y teñir la membrana con rojo de Ponceau para verificar la transferencia.

Inmunodetección

15. Sumergir la membrana en solución bloqueadora y agitar por 1 h a temperatura ambiente.
16. Reemplazar la solución bloqueadora por la dilución adecuada del anticuerpo primario en solución bloqueadora fresca.
17. Incubar en agitación constante por 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C.
18. Retirar el anticuerpo primario y lavar con TBS-T por 15 min en agitación constante.
👁 El anticuerpo primario se puede reutilizar hasta 3 veces más si se almacena a -20°C.
19. Repetir los lavados 3 veces más por 5 min cada uno.
20. Agregar la dilución adecuada del anticuerpo secundario en TBS-T e incubar por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante.
21. Retirar el anticuerpo secundario y lavar con TBS-T por 15 min y luego 3 veces más por 5 min cada uno.
22. Guardar la membrana en TBS a 4° C hasta su revelado.

Revelado por quimioluminiscencia

23. Colocar una bolsa transparente dentro del casete de rayos X.
24. Previamente a temperatura ambiente, mezclar 200 μ L del reactivo de luminol y 200 μ L de la solución de peróxido (ambos del kit *ImmobilonTM Western HRP Substrate*) con 1 mL de TBS.
25. Agregar inmediatamente a la membrana y pipetear sobre ella por 5 min.
26. Drenar el exceso de líquido y colocar dentro de la bolsa en el casete de rayos X.
27. Dentro del cuarto oscuro y sólo con luz roja, colocar una película radiográfica encima de la membrana, cerrar el casete y esperar 2 min.
28. Retirar y sumergir por 2 min en solución reveladora, solución fijadora y agua.
29. En caso de ser necesario, colocar una segunda película radiográfica variando el tiempo de exposición.

Análisis de resultados

Compare la película radiográfica con el gel teñido e identifique la banda de interés. Suponiendo que apareciera más de una banda, o bien, que no se viera ninguna, ¿cuáles serían algunas de las causas posibles? ¿cómo se podría determinar la causa correcta? ¿qué controles agregaría al experimento? ¿para qué se tiñó la membrana?

Identifique los 2 eventos con los que evaluó la eficacia de la transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana. Discuta sobre el uso de anticuerpos primarios conjugados con HRP y la diferencia con respecto a conjugar la enzima con anticuerpos secundarios. Explique la reacción enzimática realizada por la HRP, cómo podría detectarla con métodos colorimétricos y compare la sensibilidad de éstos con respecto a la quimioluminiscencia.

Señale qué es la intensidad del campo eléctrico (E, medida en V/cm) y los factores que la afectan. Compare los 2 principales sistemas de transferencia de proteínas por electroforesis (semi-seco y en tanque).

Describa cómo se puede determinar el tiempo y el voltaje necesarios para transferir proteínas a una membrana cuando se está estandarizando un WB e investigue los

elementos que influyen en la elección del tipo de gel (desnaturalizado vs. nativo), tipo de membrana o tipo de anticuerpo (monoclonal vs. policlonal).

¿A qué se refiere el término *stripping* cuando hablamos de WB y para qué sirve?

El WB se utiliza en el diagnóstico de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Describa en qué casos se indica su realización y cuáles son los criterios de positividad según la Organización Mundial de la Salud.

Referencias

1. Burnette WN. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981; 112 (2): 195-203.
2. Farrell SO, Taylor LE. *Experiments in biochemistry: a hands-on approach: a manual for the undergraduate laboratory*. 2a ed. USA: Thomson Brooks/Cole; 2006.
3. Bio-Rad Laboratories, Inc. *Protein Blotting Guide*. Disponible en: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf. Consultado Noviembre 4, 2014.

Práctica 3. ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Objetivos

1. Identificar la presencia de un antígeno o un anticuerpo específico en una muestra en solución por medio de un ELISA.
2. Calcular la concentración del antígeno o del anticuerpo presente en la muestra problema a partir de la construcción de una curva patrón.
3. Diferenciar entre los distintos tipos de ELISA.

Introducción

El ensayo por inmovilización ligada a enzimas, más conocido por su acrónimo en inglés “ELISA”, permite detectar la presencia de un anticuerpo o un antígeno en una muestra; fue descrito por primera vez en 1971 por Engvall y Perlmann. El ensayo requiere adsorber sobre una fase sólida (generalmente microplacas de poliestireno) antígenos o anticuerpos y posteriormente, conjugar con una enzima al antígeno o al anticuerpo. Finalmente se agrega un sustrato cromogénico para la enzima que permitirá la formación de un color observable o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro, evidenciando la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo. La intensidad del color producido permite el cálculo de la cantidad de antígeno o anticuerpo. Se han desarrollado diferentes métodos ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA sándwich, ELISA competitivo y ELISA de inhibición. Estos métodos difieren en el orden en que se añaden los antígenos y anticuerpos a los pozos, en si permiten detectar antígenos o anticuerpos y en si los antígenos o los anticuerpos son conjugados con la enzima (1).

En el ELISA indirecto, la muestra que contiene el anticuerpo que queremos identificar (Ab primario) se añade a la placa de microtitulación recubierta con el antígeno específico (Ag) y se deja reaccionar. Las proteínas no unidas al Ag se eliminan con lavados. La presencia del complejo Ag-Ab primario se detecta mediante la adición de un Ab secundario anti-isotipo (anti-anticuerpo) conjugado con la enzima. El Ab secundario no unido se lava y

posteriormente se agrega el sustrato cromogénico (2). El color desarrollado es directamente proporcional a la concentración de Ab primario (Fig. 1).

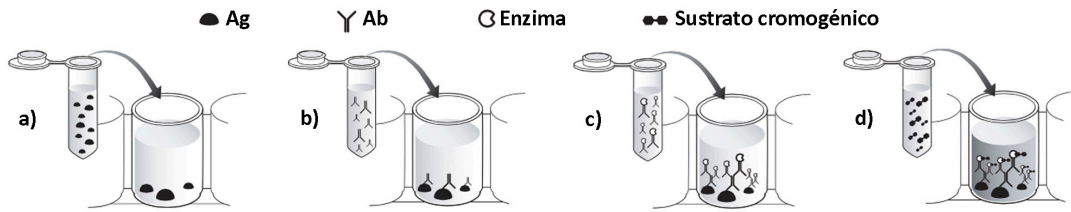


Fig. 1 ELISA indirecto. a) Adsorber el Ag, b) agregar la muestra experimental, c) agregar el anti-Ab secundario conjugado, d) agregar el sustrato cromogénico. Imágenes tomadas y modificadas de (3).

El ELISA sándwich también requiere un Ab primario (unido a la fase sólida) y uno secundario (unido a la enzima), pero en este caso, ambos se unen a epítopos diferentes del mismo Ag, el cuál es el que deseamos identificar en la muestra. La muestra se somete entonces al Ab primario inmovilizado y se deja reaccionar. Las proteínas no unidas se eliminan con lavados. La presencia del complejo Ab-Ag se detecta mediante la adición del Ab secundario conjugado con la enzima. El Ab secundario no unido se lava y posteriormente se agrega el sustrato cromogénico (2). El color desarrollado es directamente proporcional a la concentración del Ag (Fig. 2).

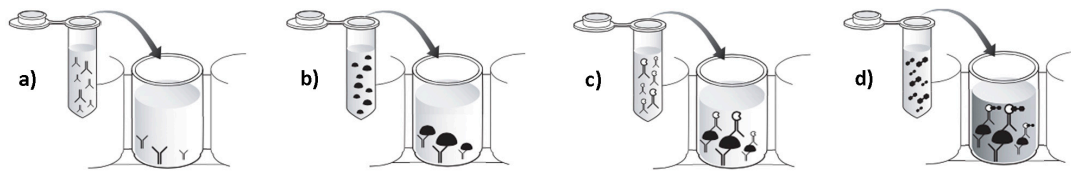


Fig. 2 ELISA sándwich. a) Adsorber el Ab primario, b) agregar la muestra experimental, c) agregar el Ab secundario conjugado, d) agregar el sustrato cromogénico. Imágenes tomadas y modificadas de (3).

Material y equipo necesario

- 1 lector de microplacas
- 2 microplacas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano
- 1 contenedor con hielo
- 3 cajas con micropuntas (2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 200 a 1000 μ L)

3 micropipetas (P-1,000, P-200 y P-20)

1 caja para microtubos

6 microtubos de 1.6 mL

Solución bloqueadora (Tris 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween-80 0.01%, BSA 0.2%)

Solución de lavado (Tris 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween-80 0.9%)

Solución sustrato (Ácido cítrico 48.6 mM, Na₂HPO₄ 102.8 mM, H₂O₂ 0.024%, O-fenilenediamina 7.4 mM)

Amortiguador de bicarbonato-carbonato 0.1 M, pH 9.6

H₂SO₄ 1 M

Muestras experimentales para ELISA indirecto (5-10 µg/mL en amortiguador bicarbonato-carbonato 0.1 M, pH 9.6; la presencia y concentración del Ab es desconocida)

Ab primario (anti-antígeno, para ELISA indirecto y ELISA sándwich), diluido en amortiguador bicarbonato-carbonato 0.1 M, pH 9.6 (1:1,500 – 1:2,500)

Ab secundario-HRP (anti-isotipo para el ELISA indirecto), diluido en solución bloqueadora (1:500 – 1:2,000)

Muestras experimentales para ELISA sándwich (5-10 µg/mL en amortiguador bicarbonato-carbonato 0.1 M, pH 9.6; la presencia y concentración del Ag es desconocida)

Ab secundario-HRP (anti-antígeno para el ELISA sándwich), diluido en solución bloqueadora (1:500 – 1:2,000)

Muestras de referencia para la curva estándar y para adsorber en los pozos (con el Ag o el Ab a identificar a concentración conocida)

Muestras de control positivo y control negativo

Protocolo

👁 Utilice guantes en todo momento. Considerar que el tiempo entre el pipeteo de la primera y la última muestra colocada en los pozos deberá ser inferior a 30 min. Respetar el orden de la adición de reactivos a los pozos de manera que las condiciones de incubación sean las mismas para cada pozo.

☞ Para las curvas estándares, preparar las muestras de referencia con diluciones seriales 1:2 con solución bloqueadora en microtubos de 1.6 mL rotulados del 1 al 6.

ELISA indirecto

1. Adsorber la muestra de referencia con el Ag en los pozos de una de las placas de microtitulación (100 μ L/pozo). Incubar a 37° C durante 2 h o toda la noche a 4° C.
2. Agregar en cada pozo 200 μ L de solución de lavado teniendo cuidado de no tocar el fondo del pozo con la punta de la pipeta. Retirarlo después de 2 min, volteando la microplaca sobre papel absorbente. Repetir tres veces el procedimiento.
3. Añadir 100 μ L de las muestras de referencia (diluciones seriales) y las muestras control (+ y -) en los pozos apropiados de la fila A (Fig. 3). El pozo 12 debe quedar vacío.

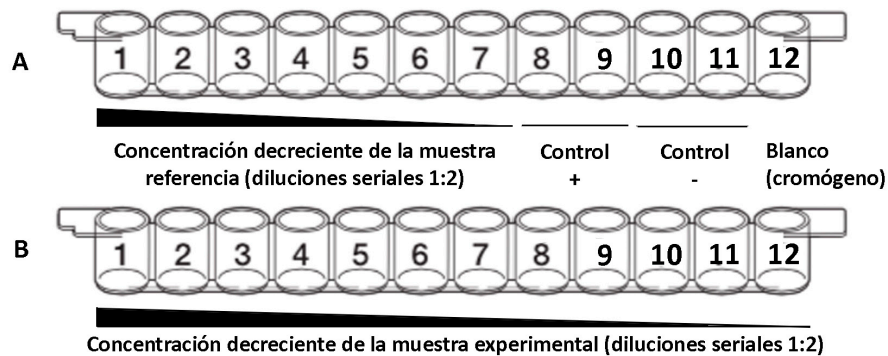



Fig. 3 Esquema de la disposición de muestras en la placa de microtitulación. Imágenes tomadas y modificadas de (3).

4. Agregar en cada pozo de la fila B 100 μ L de la solución bloqueadora. Luego agregar 100 μ L de la muestra experimental en el pozo 1 de la fila B y mezclar por pipeteo.
 5. Preparar una serie de diluciones 1:2 del pozo 1 al 12 de la fila B, transfiriendo 100 μ L del primer pozo al segundo, luego del segundo al tercero y así sucesivamente. Por último, retirar el exceso de 100 μ L del último pozo.
- ☞ Es muy importante mezclar bien la solución en cada pozo antes de transferir los 100 μ L.
6. Incubar por 2 h a temperatura ambiente y luego lavar como en el paso 2.

7. Agregar 100 μL del Ab secundario-HRP (anti-isotipo) por pozo, incubar 2 h a temperatura ambiente.
8. Lavar como en el paso 2.
9. Agregar 100 μL de la solución sustrato en todos los pozos e incubar 2 h a 37° C en oscuridad.
10. Parar la reacción enzimática agregando 50 μL de H_2SO_4 1 M en todos los pozos.
11. Registrar la absorbancia a 450 nm con el lector de microplacas. Restar la lectura obtenida en el pozo 12 de la fila A (blanco del cromógeno, Fig. 3).

ELISA sándwich

1. Adsorber las muestras de referencia con el Ab primario en los pozos de otra placa de microtitulación (150 μL /pozo). Incubar toda la noche a 4° C.
2. Agregar en cada pozo 200 μL de solución de lavado teniendo cuidado de no tocar el fondo del pozo con la punta de la pipeta. Retirarlo después de 2 min, volteando la microplaca sobre papel absorbente. Repetir tres veces el procedimiento.
3. Añadir 100 μL de las muestras de referencia (diluciones seriales) y las muestras control (+ y -) en los pozos apropiados de la fila A (Fig. 3). El pozo 12 debe quedar vacío.
4. Agregar en cada pozo de la fila B, 100 μL de la solución bloqueadora . Luego agregar 100 μL de la muestra experimental en el pozo 1 de la fila B y mezclar por pipeteo.
5. Preparar una serie de diluciones 1:2 del pozo 1 al 12 de la fila B, transfiriendo 100 μL del primer pozo al segundo, luego del segundo al tercero y así sucesivamente. Por último, retirar el exceso de 100 μL del último pozo.
 Es muy importante mezclar bien la solución en cada pozo antes de transferir los 100 μL .
6. Incubar por 2 h a temperatura ambiente y luego lavar como en el paso 2.
7. Agregar 100 μL del Ab secundario-HRP (anti-antígeno) por pozo, incubar 2 h a temperatura ambiente.
8. Lavar como en el paso 2.
9. Agregar 100 μL de la solución sustrato en todos los pozos e incubar 2 h a 37° C en oscuridad.
10. Parar la reacción enzimática agregando 50 μL de H_2SO_4 1 M en todos los pozos.

11. Registrar la absorbancia a 450 nm con el lector de microplacas. Restar la lectura obtenida en el pozo 12 de la fila A (blanco del cromógeno, Fig. 3).

Análisis de resultados

¿Por qué se necesitan analizar las muestras de control positivas y negativas junto a las muestras experimentales? ¿Por qué se requieren lavar los pozos después de cada paso?

¿Por qué es recomendable analizar las muestras por duplicado o triplicado?

Si la muestra experimental dio un resultado negativo para el antígeno, ¿significa que el antígeno no está presente? ¿Qué razones puede haber para un resultado negativo cuando el antígeno está realmente presente?

Los ELISA indirectos permiten detectar anticuerpos contra agentes infecciosos, aún en personas que no tengan síntomas. ¿Porqué es importante detectar anticuerpos en las personas que no parecen enfermas? ¿Qué razones puede haber para una prueba positiva cuando en realidad no se tiene la enfermedad?

Señale 2 métodos para adsorber antígenos o anticuerpos a un soporte sólido.

Compare las ventajas y desventajas de las enzimas más utilizadas para conjugar con anticuerpos o antígenos en los ELISA, e indique los diferentes sustratos y el color de los productos para cada enzima. Explique cómo podría detectar la reacción enzimática con métodos fluorescentes y luminiscentes. Investigue los factores que influyen en la elección del tipo de sustrato para cada ELISA.

Ilustre el fundamento del ELISA para detectar embarazo en las pruebas “caseras”. Mencione un ejemplo del uso del ELISA en medicina veterinaria, pruebas de alimentos y agricultura.

Referencias

1. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. 5th ed. Estados Unidos: John Wiley & Sons; 2002.

Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular II

2. Nigam A, Ayyagari A. Lab Manual in biochemistry, immunology and biotechnology. India: Tata McGraw-Hill; 2007.
3. Bio-Rad Laboratories, Inc. ELISA Immuno Explorer™ Kit. Disponible en: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/literature/4110175.pdf>. Consultado Noviembre 20, 2014.

Práctica 4. Inmunolocalización

Objetivos

1. Detectar una proteína de interés usando anticuerpos primario y secundario de entre el total de proteínas presentes en una célula de mamífero.
2. Identificar la localización subcelular de la proteína de interés por técnicas de microscopía.
3. Reflexionar sobre el fundamento, variaciones y aplicaciones de esta técnica.

Introducción

La inmunolocalización es una técnica utilizada para la identificación y localización de proteínas en las células a partir de una reacción de antígeno-anticuerpo que puede ser visualizada por microscopía óptica, fluorescente o electrónica (1) (Fig. 1).

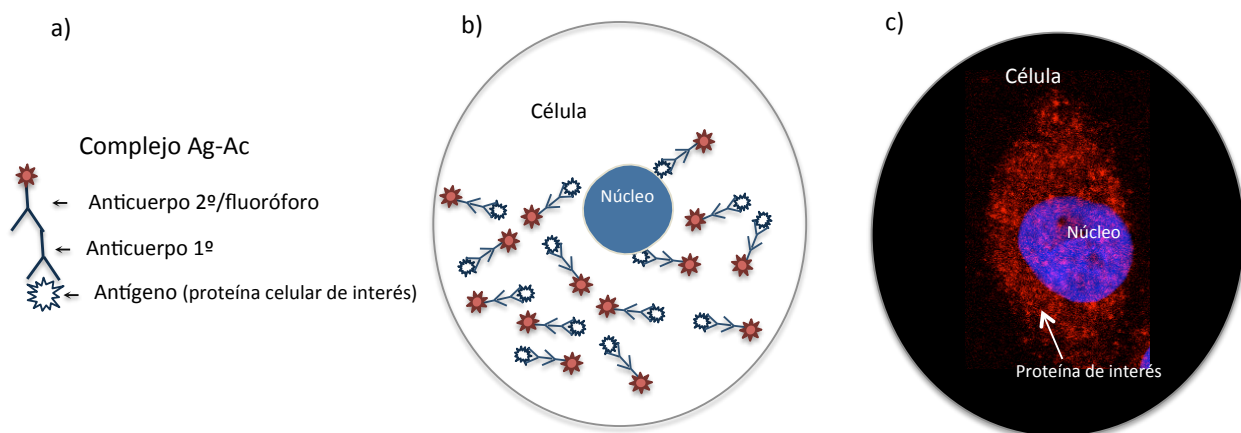


Fig. 1 Inmunolocalización con fluorescencia. a) Esquema de la formación del complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). b) Esquema de la inmunolocalización de una proteína intracelular mediante la formación del complejo Ag-Ab. c) Fotomicrografía de la inmunolocalización de una proteína intracelular por microscopía de fluorescencia (ejemplo esquemático en b).

Esta técnica permite determinar la presencia y localización específica de proteínas sobre especímenes citológicos provenientes de muestras clínicas (sangre, saliva, improntas,

orina, etc.) o cultivos celulares eucariontes y procariontes. Tiene 3 bases fundamentales: la química, la histología y la inmunología (1).

La identificación de las proteínas por inmunolocalización se basa en el uso de anticuerpos específicos (anticuerpo primario) que reconocerán y se unirán a la proteína de interés (Fig. 1a). Para identificar el complejo antígeno-anticuerpo se utilizará un segundo anticuerpo que reconoce y se une al anticuerpo primario. Este anticuerpo secundario será una inmunoglobulina unida a un marcador, que puede ser oro coloidal, peroxidasa, fosfatasa alcalina o fluoróforos, que permitan la detección del complejo inmunológico mediante reacciones identificables por microscopía (Fig. 1a). Las técnicas inmunocitoquímicas permiten analizar la expresión e identificar la localización de proteínas celulares o bien de agentes biológicos externos presentes en las células, como virus, bacterias, plásmidos, hongos o protozoarios (2) (Fig. 2).

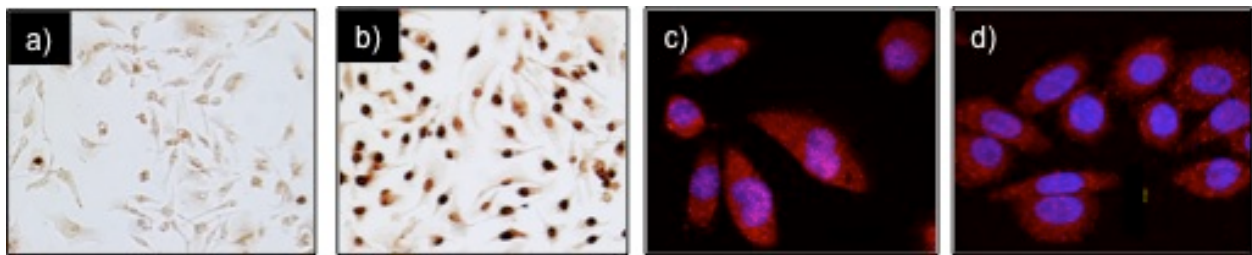


Fig. 2 Fotomicrografías de inmunocitoquímicas. Identificación de proteínas a) citoplasmáticas y b) nucleares mediante la reacción con peroxidasa. Proteínas c) citoplasmáticas y nucleares y d) citoplasmáticas localizadas con fluorescencia.

La actividad enzimática de la peroxidasa de rábano (HRP) es el método inmunocitoquímico más utilizado debido a que permite tener preparaciones permanentes que pueden ser analizadas en microscopio óptico o electrónico. La peroxidasa puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno en presencia de un donador de electrones para formar productos de color marrón (Fig. 2a y 2b). El 3-3´diaminobenzidina (DAB) es el donador de electrones utilizado en una inmunocitoquímica cuando se utilizan anticuerpos marcados con peroxidasa. Como resultado de la oxidación, la peroxidasa forma polímeros altamente densos e insolubles que pueden ser observados por microscopía óptica. Las aplicaciones de la inmunocitoquímica son diversas y van desde la presencia y localización celular de proteínas útiles en el diagnóstico de enfermedades como el cáncer, o con fines de

investigación para la identificación de proteínas de patógenos intracelulares, para la localización intracelular de proteínas exógenas (provenientes de genes transfectados) y para la localización e identificación de organelos como las mitocondrias. De manera importante, la inmunocitoquímica se emplea en el cáncer para el diagnóstico, tipificación y diferenciación de tumores, determinación de un tumor primario desconocido, para identificar micrometástasis y precisar el tratamiento (3).

Material y equipo necesario

1 campana de flujo laminar, nivel II de bioseguridad
1 caja de 6 pozos para cultivo de células adherentes
1 cámara de Neubauer
6 cubreobjetos de vidrio
6 portaobjetos
3 cajas con micropuntas (2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 200 a 1000 μ L)
3 micropipetas (P-1,000, P-200 y P-20)
1 incubadora a 37° C
1 agitador orbital
1 microscopio óptico
1 contenedor con hielo
1 pinza con punta fina
1 recipiente de plástico con tapa tipo tupperware®
1 microtubo de 1.6 mL
Parafilm M®
Línea celular adherente de mamífero sembrada en caja Petri al 100% de confluencia
Medio de cultivo adecuado para la línea celular
Suero fetal de bovino (SFB)
Tripsina 0.05% en medio de cultivo
PBS (Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 2 mM, NaCl 137 mM, pH 7.5)
Paraformaldehído al 4% en PBS

Tritón x-100 al 0.1% en PBS

H₂O₂ al 3% en metanol

Albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS

Diaminobencidina (*2-Solution DAB*)

Anticuerpo primario

Anticuerpo secundario acoplado a HRP

Solución de hematoxilina para tinción

Solución de PBS y glicerol 1:1 (v/v)

Protocolo

Preparación de las células

👁 Utilice guantes en todo momento. Esta parte del protocolo deberá hacerse en campana de flujo laminar nivel II de bioseguridad, 24 h antes de iniciar el protocolo,

1. Esterilizar cubreobjetos de vidrio por inmersión en etanol al 90% y secarlos cuidadosamente.

2. Colocar un cubreobjetos en cada pozo de la caja de 6 pozos para cultivo estéril (Fig. 3). La caja se meterá en el horno de microondas 2 veces durante 1 min cada vez para asegurar la esterilidad.

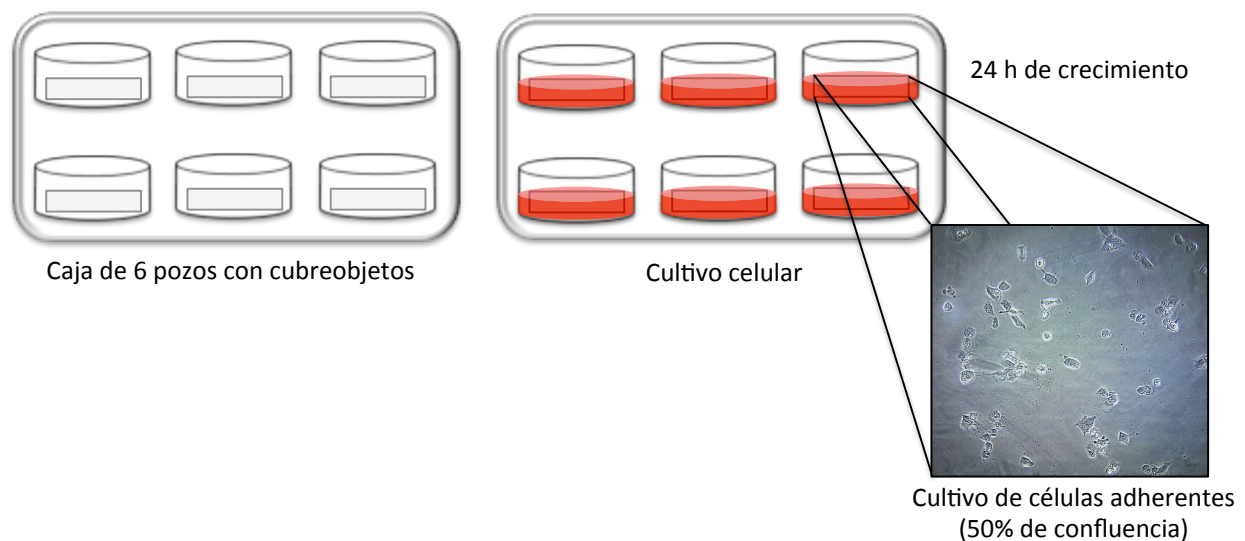


Fig. 3 Esquema de la preparación y siembra de los cultivos de células eucariontes adherentes.

3. Despegar las células en cultivo con tripsina al 0.05%, resuspender en 2 mL de medio de cultivo y estimar el número total de células con una cámara de Neubauer.
4. Sembrar 1×10^6 células resuspendidas en 2 mL de medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB) en cada uno de los pozos de la caja de cultivo que contiene los cubreobjetos. Las células crecerán sobre el cubreobjetos (Fig. 3).
5. Incubar las células a 37° C en una incubadora de CO₂ humidificada durante 24 h o hasta alcanzar 50-70% de confluencia (Fig. 3).

Inmunodetección

👁 Utilice guantes en todo momento. Esta parte del protocolo se hará en la mesa de trabajo. No es necesario hacerlo en campana.

1. Aspirar el medio de cultivo de cada pozo y suavemente lavar las células 2 veces con PBS. Evitar que las células se sequen.
2. Eliminar el PBS y adicionar 1 mL de paraformaldehído al 4% en PBS a cada pozo para fijar las células. Incubar por 15 min a temperatura ambiente.
3. Eliminar el paraformaldehído y lavar las células 3 veces con PBS. Los lavados se harán durante 10 min colocando la caja en un agitador orbital.
4. Eliminar el PBS del último lavado y adicionar 1 mL de tritón X-100 al 0.1% en PBS a cada pozo para permeabilizar las células. Incubar durante 10 min a temperatura ambiente.
5. Eliminar la solución de permeabilización y lavar 3 veces con PBS. Los lavados se harán durante 10 min colocando la caja en un agitador orbital.
6. Eliminar el PBS del último lavado y adicionar 1 mL de H₂O₂ al 3% en metanol a cada pozo para inhibir la peroxidasa endógena. Incubar durante 10 min a temperatura ambiente.
7. Eliminar el H₂O₂ y lavar las células 3 veces con PBS. Los lavados se harán durante 10 min colocando la caja en un agitador orbital.
8. Eliminar el PBS del último lavado y adicionar 1 mL de BSA al 1% en PBS a cada pozo como solución de bloqueo. Incubar durante 30 min a temperatura ambiente.
9. Eliminar la solución de bloqueo y lavar 3 veces con PBS. Los lavados se harán durante 10 min colocando la caja en un agitador orbital.

10. Después del último lavado, eliminar el PBS e incubar con el anticuerpo primario, siguiendo el esquema de la Fig. 4.

Agregar 30 μL de la solución del anticuerpo primario a una dilución 1:100 en PBS directamente sobre el cubreobjetos y colocar un parafilm M[®] del tamaño del cubreobjetos para dispersar el anticuerpo por toda la monocapa de células. Las muestras sin anticuerpo se incuban sólo con PBS. Incubar 1 h a 37° C o toda la noche a 4° C en una cámara húmeda.

11. Después de la incubación con el anticuerpo primario, lavar 3 veces con PBS por 10 min, en un agitador orbital.

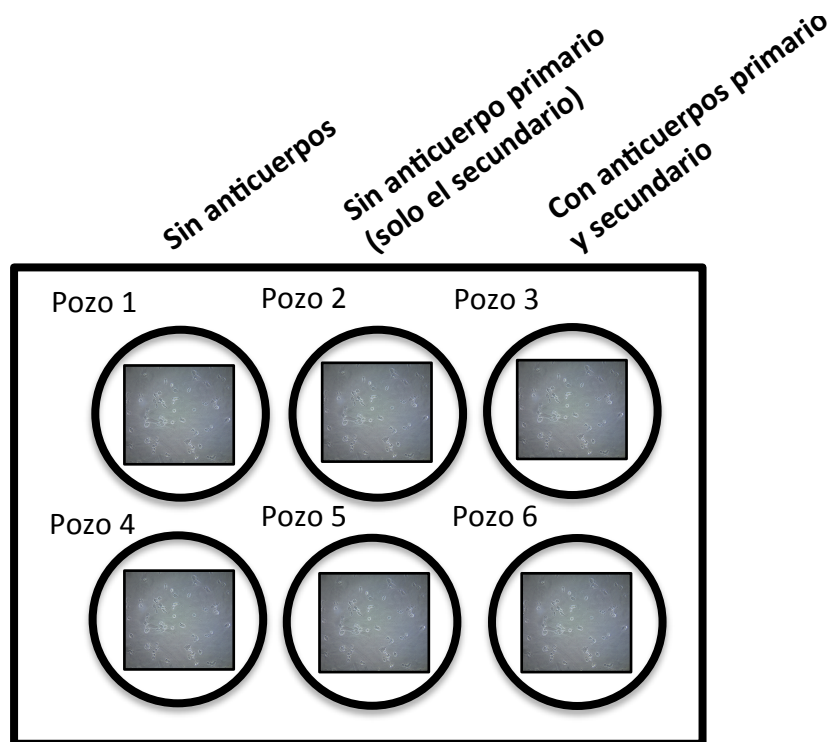


Fig. 4 Esquema que muestra el orden del procesamiento de las muestras para la inmunodetección. Los pozos 1 y 4 son los controles negativos del experimento; los pozos 2 y 5 son los controles negativos para evaluar la reacción basal del anticuerpo secundario; los pozos 3 y 6 son las muestras experimentales.

12. Eliminar el PBS e incubar con el anticuerpo secundario acoplado a HRP siguiendo el esquema de la Fig. 4. Agregar 30 μL de la solución del anticuerpo secundario a una dilución 1:300 en PBS directamente sobre el cubreobjetos y colocar un parafilm M[®] del tamaño del

cubreobjetos para dispersar el anticuerpo por toda la monocapa de células. Las muestras sin anticuerpo se incuban sólo con PBS. Incubar 1 h a 37° C en una cámara húmeda.

13. Lavar 3 veces con PBS por 10 min cada lavado utilizando un agitador orbital.

Revelado colorimétrico

1. Preparar la solución DAB para el revelado (*2-Solution DAB*): mezclar por inversión 1 mL de la solución amortiguadora que contiene H₂O₂ (A) y 1 gota de DAB (B) en un microtubo de 1.6 mL. Mantener en hielo cubierto de la luz.

2. Eliminar el PBS de uno de los pozos y adicionar 100 µL de la solución DAB directamente al cubreobjetos, monitorear la aparición de color marrón en las células (10 min de incubación aproximadamente). Una vez observado el color, eliminar la solución DAB y agregar 2 mL de PBS. Repetir este procedimiento en todos los pozos.

3. Una vez que todas las muestras fueron reveladas, eliminar el PBS y lavar una vez más con 2 mL de agua destilada durante 2 min. Eliminar completamente el agua y adicionar 200 µL de la solución de hematoxilina para contra-teñir los núcleos celulares. Incubar 1 min y lavar 2 veces con agua destilada.

4. Montar los cubreobjetos colocando una pequeña gota (50 µL aproximadamente) de la solución de PBS y glicerol 1:1 sobre un portaobjetos de vidrio. Cuidadosamente voltear el cubreobjetos sobre la gota, de tal forma que la monocapa celular quede en contacto con la solución de PBS y glicerol sobre el portaobjetos. Presionar ligeramente el cubreobjetos para eliminar burbujas.

5. Dejar secar la muestra y sellar los bordes con barniz.

6. Analizar los resultados en un microscopio óptico.

Análisis de resultados

Observe las células que fueron procesadas sin anticuerpos y las que se incubaron solo con el anticuerpo secundario. Identifique los núcleos. ¿Cuál es el color de los núcleos? ¿Existe algún otro color en las células? ¿Cuáles serían algunas de las causas posibles por las que

hay ausencia o presencia de un color o se observa más de un color? ¿Qué modificaciones haría al experimento?

Observe las células que fueron incubadas con ambos anticuerpos. Identifique los núcleos de las células y la localización de la proteína de interés.

¿Cuáles serían las modificaciones que podrían hacerse a la técnica cuando se utilizan anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos?

Describa cuáles son los objetivos de la fijación, la permeabilización y el bloqueo. ¿Cuál es la función de cada uno de los reactivos que se utilizaron en estos pasos?

¿Cuál es la función del H_2O_2 y por qué es necesario en una inmunocitoquímica?

Compare esta técnica con la técnica de *western blot* haciendo énfasis en sus similitudes y diferencias.

Referencias

1. Burry RW. Immunocytochemistry A Practical Guide for Biomedical Research. 5th ed. Estados Unidos: Springer; 2010.
2. Merighi A, Lossi L. Immunocytochemistry and related techniques. Neuromethods, Vol. 101. Estados Unidos: Humana Press; 2015.
3. Ganjei-Azar P, Nadji M. Color Atlas of Immunocytochemistry in Diagnostic Cytology. Estados Unidos: Springer; 2007.
4. del Brio León MA, Riera Rovira P. Manual de bases teórico-prácticas de inmunocitoquímica. España: Universidad de Oviedo; 1995.

Práctica 5. Cariotipo

Objetivos

1. Identificar los cromosomas humanos por sus características principales.
2. Determinar la fórmula cromosómica.
3. Distinguir entre el cariotipo normal de un hombre y una mujer.

Introducción

El cariotipo es un arreglo ordenado de los cromosomas de acuerdo a su tamaño, forma y patrón de bandeo. Cada especie cuenta con un número específico de cromosomas, por ejemplo la especie humana es diploide y tiene 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales, lo que da un total de 46 cromosomas. Los autosomas se numeran del 1 al 22 y se ordenan por su tamaño, del más grande al más chico, y por la posición del centrómero. El orden del tamaño aplica para todos los cromosomas excepto el cromosoma 21 que es más pequeño que el 22. El último par corresponde a los cromosomas sexuales (1).

Para el cariotipo generalmente se utilizan linfocitos obtenidos de sangre periférica. Los linfocitos son cultivados e inducidos a proliferar *in vitro* con un agente mitogénico como la fitohemaglutinina. Luego se detiene el ciclo celular en metafase con colchicina, para poder observar los cromosomas. Para que los cromosomas no se observen sobrepuestos entre sí, a las células se les aplica una solución hipotónica como citrato de sodio al 0.7% (hincha las células y permite la separación). Se adiciona un fijador de células (metanol:ácido acético 3:1) y finalmente se tiñen con un colorante como la solución de Giemsa. Se elige un campo donde se observen lo mejor posible todos los cromosomas, se fotografían, se imprimen, se recortan y se acomodan en el orden descrito (2).

Material y equipo necesario

Copias de cromosomas humanos

Copias de formato para cariotipo humano

Tijeras

Pegamento

Protocolo

👁️ Despejar la mesa y trabajar de forma ordenada, tener cuidado de no mezclar sus cromosomas con los de sus compañeros.

1. Distinguir las principales características de los cromosomas. Cada especie tiene un número definido de cromosomas y forma particular. Los cromosomas constan de dos cromátidas hermanas unidas por un centrómero (Fig. 1). Según la posición del centrómero, los cromosomas se clasifican en: metacéntricos (centrómero al centro, brazos iguales); submetacéntrico (centrómero más cerca de un extremo, brazos cortos y brazos largos); y acrocéntrico (centrómero muy próximo a un extremo, un brazo corto muy reducido). El índice centromérico (CI) indica qué tan al centro está el centrómero en porcentaje.

2. Observar los cromosomas, tratar de identificar los cromosomas homólogos. Identificar si son metacéntricos, submetacéntricos o acrocéntricos. Utilizar los cromosomas del ejercicio 1 o del ejercicio 2.

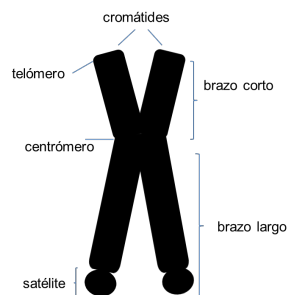


Fig. 1 Esquema de un cromosoma. Se pueden apreciar las cromátidas hermanas unidas por el centrómero. Este cromosoma es submetacéntrico por lo que se tienen brazos cortos (p) y brazos largos (q).

3. Identificación de los cromosomas. Para completar la identificación de los cromosomas se utilizan técnicas de tinción como es la tinción de Giemsa. Los cromosomas se ordenan en grupos de la A a la G (Fig. 2).

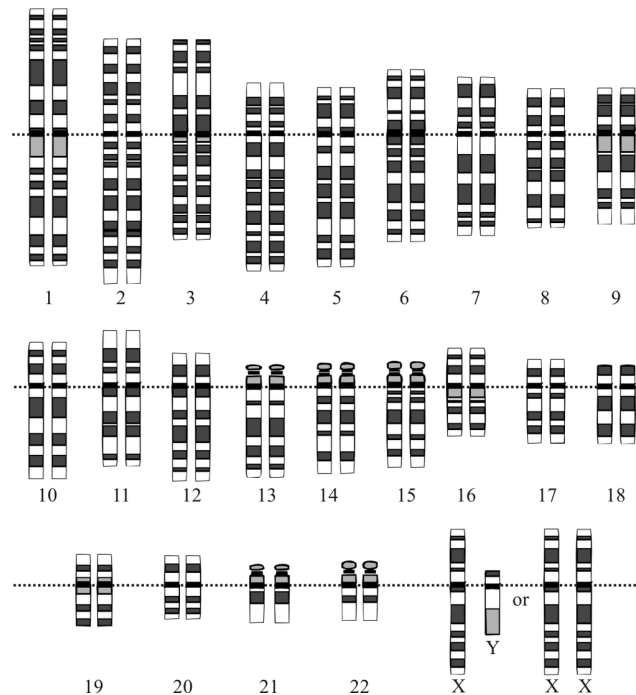


Fig. 2 Diagrama de cromosomas humanos (3). Grupo A: 1, 2 y 3; B: 4 y 5; C: 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12; D: 13, 14 y 15; E: 16, 17 y 18; F: 19 y 20 y G: 21 y 22. Los cromosomas X y Y no forman parte de estos grupos, o pueden incluirse el X en el grupo C y el Y en el grupo G.

El grupo A (cromosomas 1-3) contiene a los cromosomas más grandes y son metacéntricos, el cromosoma 1 (CI = 48.6%) y el cromosoma 2 (CI = 40%) son similares en tamaño, pero el cromosoma 1 tiene una constricción secundaria. El cromosoma 3 es 20% más pequeño (CI = 47.3%). El grupo B está formado por los cromosomas 4 y 5, y tienen un tamaño del 75% comparado con el grupo A y un CI = 27-28%, por lo que el brazo corto es un cuarto del cromosoma. Los cromosomas 4 y 5 son similares entre sí. El grupo C (cromosomas 6 a 12 y el X) contiene cromosomas de tamaño intermedio, sus centrómeros son metacéntricos o submetacéntricos. Son similares y por tanto difíciles de distinguir entre sí. CI son grandes para los cromosomas 6, 7, 11 y X, seguido por el cromosoma 9, y menores para los cromosomas 8, 10 y 12. El cromosoma 9 tiene una constricción secundaria. Los cromosomas del grupo D (13 al 15) tienen centrómeros acrocéntricos (CI=17-18%). Todos tienen un satélite por lo que son fáciles de distinguir. Los cromosomas del grupo E (16 a 18) son ligeramente menores a los del grupo D, el cromosoma 16 es metacéntrico (CI = 42%), los cromosomas 17 y 18 son submetacéntricos (CI = 32% y 27%, respectivamente).

El cromosoma 16 tiene una constricción secundaria. El grupo F (cromosomas 19 y 20) está constituido por cromosomas cortos con centrómeros metacéntricos, no es fácil distinguir uno de otro. El grupo G (cromosomas 21, 22 y el Y) contiene los dos autosomas más pequeños con satélites al final de sus brazos cortos. El cromosoma Y no tiene satélite. Posteriormente al establecimiento de los cariotipos se encontró que el cromosoma 21 es menor que el 20, por lo que se conserva el orden en los cariogramas. Se deben numerar los cromosomas de cada grupo; en mujeres deben ser: A = 6, B = 4, C = 16, D = 6, E = 6, F = 4 y G = 4, y en hombres A = 6, B = 4, C = 15, D = 6, E = 6, F = 4 y G = 5. Esta cuenta también indica el género de la muestra de sangre. Si no se encuentran modificaciones en el número de cromosomas de cada grupo, se considera que la célula es normal. Sin embargo, si el número es mayor o menor, existe alguna aberración (4).

4. Los cromosomas se deben ordenar por parejas, por tamaño, posición del centrómero y patrón de bandas (Fig. 3). Considerar que el brazo largo de cada cromosoma va hacia abajo. Contar el número total de cromosomas, tratar de ordenarlos según su grupo y pegarlos en el formato respectivo. Utilizar la figura 3 como ejemplo.

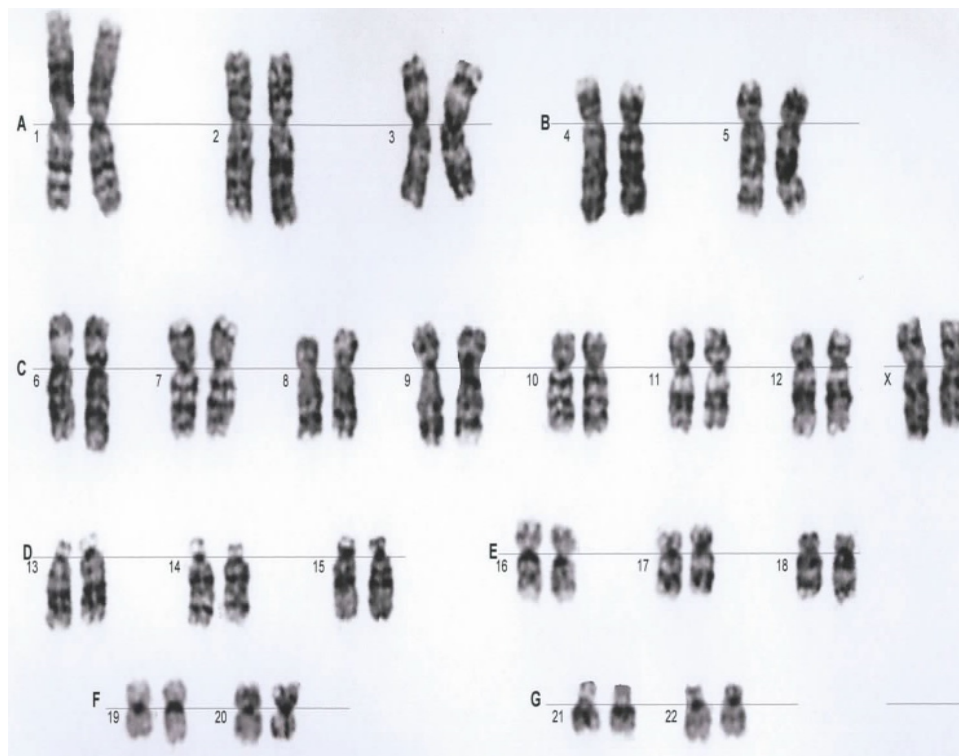


Fig. 3 Cariotipo humano donde se observan cromosomas humanos teñidos con Giemsa.

Ejercicio

Recortar, identificar y ordenar los cromosomas en el formato correspondiente (5, 6).



Formato para cariotipo humano (5).

1	2	3	4	5		
A			B			
C						
13	14	15	16	17	18	F
D			E			F
21	22	X	Y			
G		Cromosomas sexuales				
Fórmula cromosómica: _____						
Análisis realizado por: _____						
Fecha: _____						

Análisis de resultados

Reporte el número de cromosomas, su fórmula cromosómica y el sexo del paciente. Discuta acerca de las dificultades que tuvo para la identificación.

¿Por qué hay regiones que se tiñen y otras que no se tiñen con el colorante Giemsa?

¿Qué otras metodologías existen para hacer cariotipos? Explique su fundamento.

¿En qué fase del ciclo celular se realiza el cariotipo? ¿Cómo actúa la colchicina?

¿Qué tipo de mutaciones se pueden identificar con el cariotipo (puntuales, cromosómicas, deleciones, inversiones, translocaciones, etc.)? Justifique su respuesta.

¿Qué utilidad tiene realizar un cariotipo?

Referencias

1. Rodríguez RA. Manual de prácticas de genética y cuaderno de trabajo. México: UNAM Facultad de ciencias; 2005.
2. Lupold J. Chromosomes. Disponible en: http://home.comcast.net/~clupold96/notes%20pages/chromosomes_tips.htm. Consultado Enero 18, 2015.
3. National Institutes of Health / <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Karyotype.png> / CC-BY-SA-4.0
4. Awa AA. A manual for detecting stable chromosome aberrations by the conventional Giemsa staining method. Disponible en: http://www.rerf.jp/dept/genetics/giemsa_e.html. Consultado Enero 15, 2015.
5. UW Medicine. Cytogenetics Gallery. Disponible en: <http://www.pathology.washington.edu/galleries/Cytogallery/main.php?file=human%20karyotypes>. Consultado Enero 18, 2015.
6. Cell guidance systems. Karyotype Service for Human Cells. Disponible en: <http://www.cellgs.com/Shop/Services/Karyotyping/1192-Karyotype-Service-for-Human-Cells.html>. Consultado Enero 18, 2015.

Práctica 6. FISH (*Fluorescence in situ hybridization*)

Objetivos

1. Comprender las bases teóricas de la técnica de FISH e ilustrar sus aplicaciones y utilidad en los sistemas de salud para determinar la presencia de alteraciones cromosómicas asociadas a alguna condición genética.
2. Identificar e interpretar la amplificación cromosómica del gen *her2-neu* en células de cáncer de mama.

Introducción

En el año de 1986 la hibridación *in situ* de ácidos nucleicos revolucionó a la genética humana, dando lugar a la genética molecular. La técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés) se basa en la hibridación del ADN y en su detección por fluorescencia; lo cual permite examinar ácidos nucleicos endógenos o exógenos directamente (*in situ*) en núcleos en interfase o en una preparación cromosómica (1). La técnica de FISH localiza una secuencia única en un genoma por medio de una sonda específica (secuencia de ADN de cadena sencilla complementaria a la secuencia de interés). La sonda debe estar marcada con fluorescencia y ser lo suficientemente grande para generar una señal detectable por técnicas microscópicas y evitar la inespecificidad de hibridación al ADN (Fig. 1).

Existen distintos tipos de sondas:

- a) Sondas centroméricas o ADN satélite. Hibridan con la región centromérica del cromosoma. Son de utilidad para detectar alteraciones en el número de cromosomas en células en división o núcleos interfásicos. Son utilizadas para detectar trisomías.
- b) Sondas de pintado cromosómico. Son bibliotecas (*libraries*) de secuencias genómicas que abarcan todo un cromosoma o una determinada región. Son de utilidad para detectar alteraciones en el número de cromosomas pero sólo en células en metafase.
- c) Sondas de secuencia única. Hibridan con secuencias específicas a una banda cromosómica o a un gen. Son útiles para detectar la presencia de translocaciones

cromosómicas, por ejemplo, la t(9;22) en la leucemia mieloide crónica o la t(15;17) en la leucemia mieloide aguda que produce la proteína de fusión PML-RAR α . También permiten identificar células tumorales con una anomalía característica de estirpe o subtipo en una muestra clínica (2).

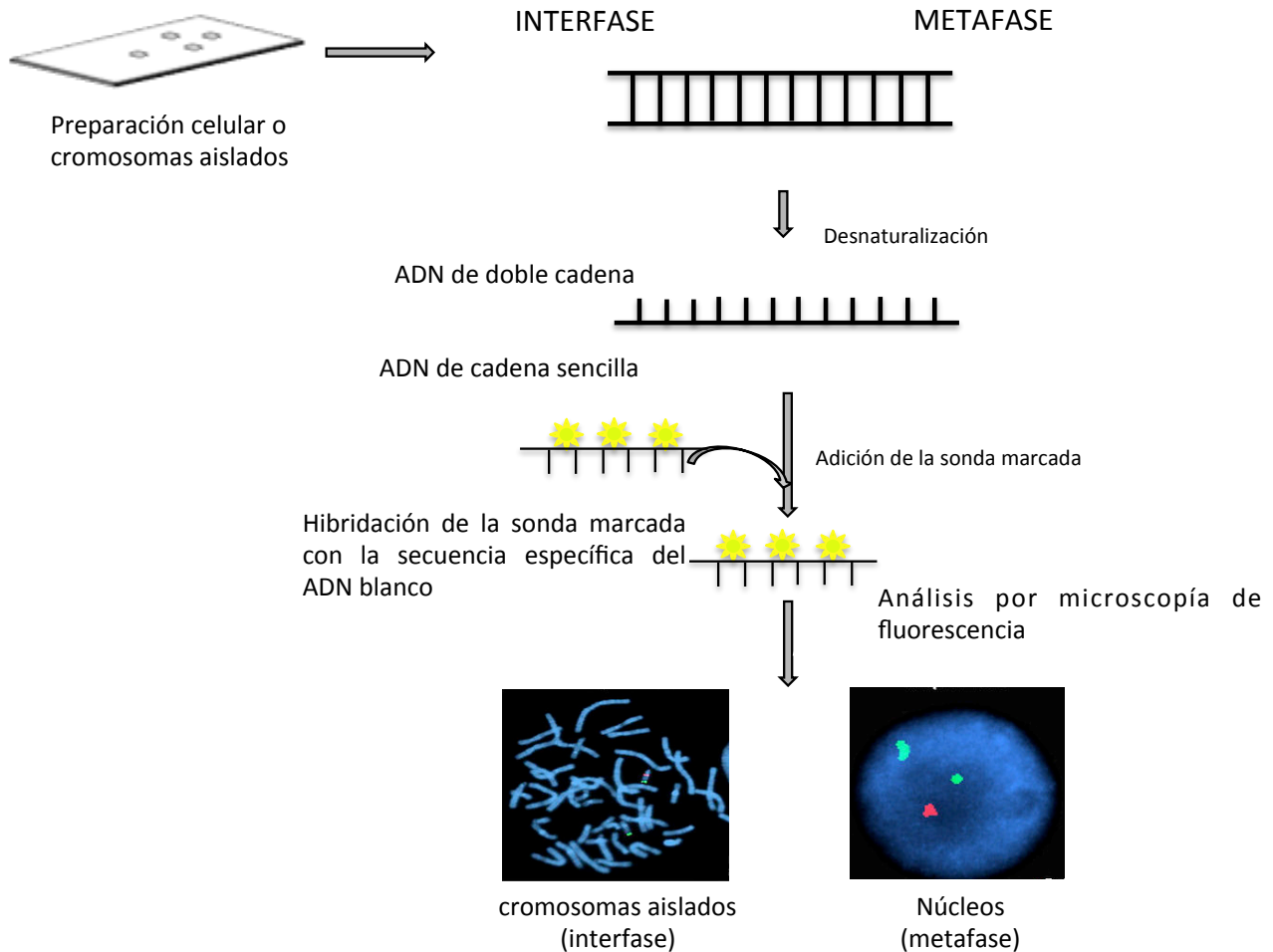


Fig 1. Esquema que muestra el método de FISH. La técnica puede hacerse sobre muestras citológicas, tejido embebido en parafina o cromosomas aislados. Inicialmente el ADN de la célula debe desnaturalizarse para permitir que la sonda de ADN marcada con fluorescencia hibride con su secuencia blanco. Los núcleos o cromosomas son contraídos con DAPI y los resultados de la hibridación se analizan por microscopía de fluorescencia. Imágenes de un resultado de FISH en interfase y metafase (3).

En resumen, la técnica de FISH se utiliza para la identificación de anomalías numéricas y estructurales en los cromosomas (tanto en núcleos en interfase como en metafase), la

caracterización de marcadores cromosomales, el seguimiento de efectos terapéuticos, la identificación de regiones en el genoma con eliminaciones o amplificaciones cromosómicas, la identificación de reordenamientos cromosómicos no aleatorios, la identificación del punto de ruptura molecular en una translocación cromosómica, la identificación de las regiones cromosómicas eliminadas, cartografías genéticas, la caracterización de células somáticas híbridas, la identificación de los genes amplificados, el estudio de reordenamientos genéticos y la comparación de genomas de dos especies biológicas para deducir relaciones evolutivas (4, 5).

En esta práctica se utilizará el kit de hibridación *HER2 FISH pharmDx™* (DAKO), el cual se utiliza en la determinación de la amplificación del gen *her2* en muestras tumorales de cáncer de mama. El kit consta de una sonda específica para HER2 marcada con rojo Texas, y una sonda específica para la región centromérica (CEN-17) marcada con FITC.

Material y equipo necesario

- 1 campana de flujo laminar nivel II de bioseguridad
- 2 tubos cónicos de 15 mL
- 1 microtubo de 200 μ L
- 10 portaobjetos de vidrio
- 10 cubreobjetos de vidrio
- 3 cajas con micropuntas (2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 200 a 1000 μ L)
- 3 micropipetas (P-1,000, P-200 y P-20)
- 3 vasos coplin
- 1 incubadora a 37° C
- 1 parrilla de calentamiento eléctrico
- 1 contenedor con hielo
- 1 pinza con punta fina
- 1 recipiente de plástico con tapa tipo tupperware®
- 1 microscopio de epifluorescencia (con filtros para DAPI, Texas Red y FITC).
- Parafilm M®

KCl 0.075 M

Solución fijadora (metanol:ácido acético glacial 3:1)

SSC 20x (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M, pH 7.0)

PBS (Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 2 mM, NaCl 137 mM pH 7.5)

Solución de formaldehído al 0.95 % con MgCl₂

Etanol al 70 %

Etanol al 85 %

Etanol al 100 %

Tween-20 al 0.05% en SSC 2X

Kit de hibridación *HER2 FISH pharmDx™* (DAKO). Incluye sondas para HER2/CEN-17, solución de pepsina y medio de montaje para fluorescencia con DAPI.

Cultivo de células de cáncer de mama MDA-MB-453 y MCF-7.

Medio de cultivo para las células MDA-MB-453 y MCF-7 (DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal de bovino)

Protocolo

Preparación de las células

👁 Utilice guantes en todo momento.

Esta parte del protocolo deberá hacerse en campana de flujo laminar nivel II de bioseguridad, 24 h antes de iniciar el protocolo.

1. En un tubo cónico de 15 mL resuspender de forma independiente 3×10^6 células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-453 en 5 mL de medio de cultivo DMEM-F12.
2. Centrifugar 10 min a 1500 rpm y eliminar el sobrenadante sin afectar al sedimento celular.
3. Resuspender las células en 2 mL de KCl 0.075 M precalentado a 37° C e incubar durante 5 min a 37° C.
4. Añadir 2 mL de solución fijadora gota a gota sin dejar de mezclar.
5. Centrifugar la suspensión durante 10 min a 1500 rpm; retirar el sobrenadante.
6. Resuspender las células en 2 mL de solución fijadora e incubar durante 5 min.

7. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 min; retirar el sobrenadante.
9. Resuspender el sedimento celular en la pequeña cantidad de líquido restante.
10. Verter una gota de la suspensión celular directamente sobre el portaobjetos. Obtener 4 portaobjetos por cada línea celular.
11. Dejar secar al aire completamente.

Pretratamiento de las células fijadas en el portaobjetos

1. Sumergir los portaobjetos con las preparaciones celulares en SSC 2x (prepararla a partir de la solución *stock* 20x) durante 2 min a 37° C.
2. Aplicar sobre las preparaciones celulares la solución de pepsina a 4° C. Incubar por 10 min a temperatura ambiente.
3. Pasar el portaobjetos a PBS durante 5 min a temperatura ambiente.
4. Colocar el portaobjetos en la solución de formaldehído al 0.95% con MgCl₂ durante 5 min a temperatura ambiente.
5. Colocar el portaobjetos en PBS durante 5 min a temperatura ambiente.
6. Sumergir el portaobjetos en etanol al 70 % durante 1 min.
7. Sumergir el portaobjetos en etanol al 85 % durante 1 min seguido de etanol al 100 % por 1 min.
8. Dejar secar al aire.

Hibridación in situ

1. Descongelar las sondas fluorescentes en hielo (evitar exponerlas a la luz).
2. Colocar 10 µL de las sondas por cada muestra en un microtubo de 200 µL.
3. Precalentar las sondas y el portaobjetos con las células a 37° C durante 5 min.
4. Adicionar los 10 µL de las sondas sobre las preparaciones celulares y colocar cuidadosamente un parafilm M® para cubrir la muestra.
5. Desnaturalizar la muestra y las sondas simultáneamente calentando el portaobjetos a 82° C durante 2 min.
6. Hibridar en una cámara húmeda protegida de la luz a 45° C toda la noche, o como mínimo 2 h.

7. Quitar cuidadosamente el parafilm M[®] con la pinza y sumergir el portaobjetos en SSC 0.4x a 72° C durante 2 min sin agitar.
8. Dejar escurrir el portaobjetos y colocarlo en Tween-20 al 0.05% en SSC 2x durante 30 s a temperatura ambiente sin agitar.
9. Escurrir el portaobjetos y añadir 10 µL del medio de montaje para fluorescencia con DAPI sobre cada muestra.
10. Colocar un cubreobjetos evitando formar burbujas y dejar revelar el color en un lugar oscuro durante 10 min.
11. Visualizar con un microscopio de epifluorescencia (las muestras pueden almacenarse a 4° C en oscuridad hasta 7 días).

Análisis de resultados

Observe las células e identifique los núcleos. Identifique las señales en color verde y rojo. Explique a que corresponde cada señal. Cuente los núcleos positivos a las señales en rojo y verde en las células MDA-MB-453 y MCF-7. Determine el número de núcleos que hay en un campo y cuantas señales en rojo y verde hay en cada núcleo. Para calcular el ratio HER-2/CEN-17, cuente las señales rojas y verdes en 20 núcleos y divida el número de las señales rojas entre el número de las señales verdes.

Explique cuál debe ser la relación de la señal de la sonda de HER-2 y CEN-17 para dar un resultado positivo o negativo al FISH.

¿Por qué se utilizaron las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-453 para este experimento?

¿Cuál es la función de la pepsina en la técnica de FISH?

Referencias

1. Liehr T. Fluorescence in situ hybridization (FISH). Application guide. Estados Unidos: Springer; 2009.
2. Kumar GL, Zucker RM. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Imaging. En: Kumar GL, Rudbeck L. Immunohistochemical staining methods. 5th ed. Estados Unidos: Dako; 2009. 81-95.
3. © Tonelli AR, Kosuri K, Wei S, Chick D / https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AFish_analysis_di_george_syndrome.jpg / CC-BY-2.0
4. Bridger JM, Morris K. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH): Protocols and Applications (Methods in Molecular Biology). Estados Unidos: Springer; 2010.
5. Price CM. Fluorescence in situ hybridization. Blood Rev 1993; 2: 127-134.

Práctica 7. *Southern blot*

Objetivos

1. Explicar en qué consiste la hibridación de ácidos nucleicos.
2. Detallar cómo una molécula de ADN monocatenario se puede utilizar para detectar una secuencia de ADN de interés.
3. Ilustrar cómo se utiliza una sonda de ADN y un análisis de restricción para determinar la localización de una secuencia de interés.
4. Predecir en qué fragmento de restricción se hibridará una sonda, al conocer la secuencia de la sonda y del ADN genómico.
5. Realizar el marcaje de una sonda con biotina para detectar mediante quimioluminiscencia la presencia de una secuencia de interés.

Introducción

Southern blot se refiere a la transferencia de ADN previamente fragmentado con enzimas de restricción, de un gel de electroforesis a una membrana en la que se inmoviliza y por tanto permite una reproducción semipermanente del patrón de bandas en el gel. Además, es posible la detección selectiva de una secuencia blanco mediante la hibridación con sondas marcadas (1).

El nombre de la técnica procede del apellido de su inventor, Edwin M. Southern, en 1975. Posterior a la electroforesis, el ADN se trata con ácido para fragmentarlo (entre más pequeño, es más fácil de eluir del gel), seguido por desnaturalización alcalina (el ADN monocatenario se une más eficientemente a las membranas) y una subsecuente neutralización. Los métodos originales de transferencia se basan en la acción capilar colocando la membrana en contacto con el gel y papel absorbente apilado en la parte superior, para que el amortiguador de transferencia “mueva” el ADN a la membrana (Fig. 1).

Después de la transferencia, el ADN se inmoviliza de manera permanente con tratamiento térmico o *crosslinking* con luz UV. La membrana se incuba con una sonda monocatenaria

que formará un complejo estable y específico por complementaridad. Si el ADN tenía buena calidad y la digestión con enzimas de restricción fue completa, los fragmentos de interés se visualizarán en la película por autorradiografía o quimioluminiscencia (2).

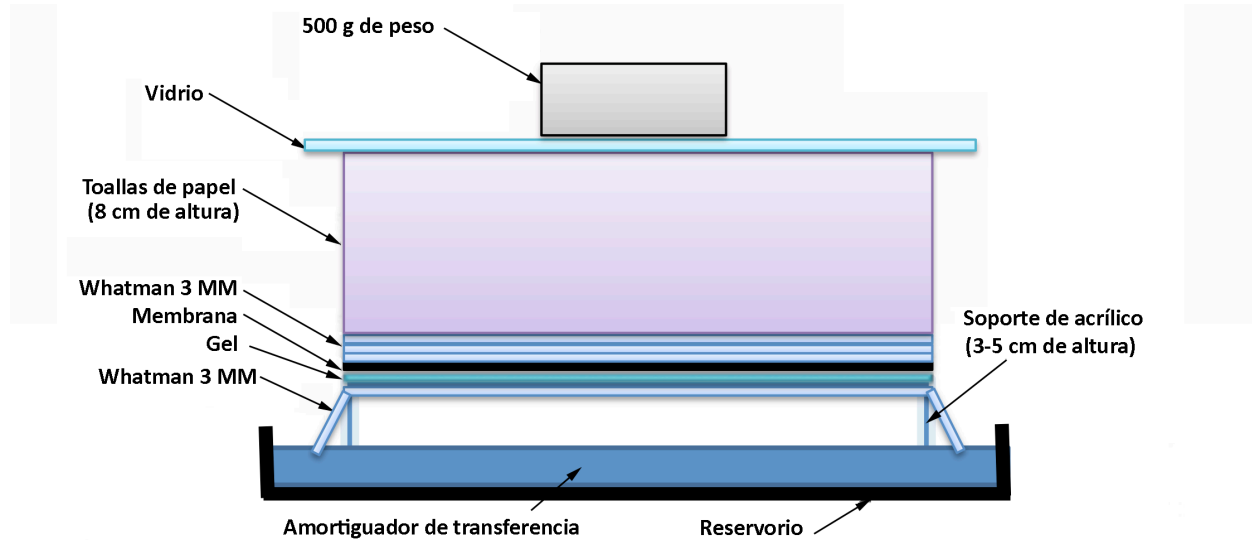


Fig. 1 Representación esquemática del acomodo para la transferencia del ADN por capilaridad.

El *Southern blot* se utiliza para analizar y comparar ADN recombinante, aislar genes cuya secuencia se conoce y estudiar secuencias reguladoras. Esta técnica también es útil para detectar alteraciones en el ADN que se extienden por una gran región y que no se amplifican fácilmente por PCR, tales como alteraciones estructurales y reordenamientos cromosómicos. Usando diferentes endonucleasas de restricción, se pueden detectar con el *Southern blot* polimorfismos en las secuencias de ADN de diferentes individuos (3).

En esta práctica se utilizará el kit *Biotin 3' End DNA Labeling* (Thermo Fisher Scientific), para incorporar de 1 hasta 3 ribonucleótidos biotinilados (biotina-11-UTP) en el extremo 3' del oligonucleótido de ADN. La biotinilación de ADN utiliza la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) para catalizar la incorporación de nucleótidos al extremo 3'-OH de ADN monocatenario. Posteriormente, se utilizará el kit *Chemiluminescent Nucleic Acid Detection* (Thermo Fisher Scientific) para revelar la hibridación. Este kit, además del luminol y la solución de peróxido, contiene un conjugado estable de HRP con estreptavidina (proteína que se unirá con gran afinidad a la biotina del oligonucleótido marcado).

Material y equipo necesario

- 1 transiluminador de luz UV (312 nm)
- 1 microcentrífuga
- 1 baño de agua a 37° C
- 1 charola para teñir el gel
- 1 soporte de acrílico del tamaño del gel
- 1 reservorio para la transferencia por capilaridad
- 1 contenedor con hielo
- 3 cajas con micropuntas (2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 200 a 1000 μ L)
- 3 micropipetas (P-1,000, P-200 y P-20)
- 1 caja para microtubos de 1.6 mL
- 3 microtubos de 1.6 mL estériles
- 2 charolas de revelado
- 1 casete de rayos X
- 1 bolsa transparente
- 1 pinza de disección simple
- 1 horno de hidridación
- 1 casete de rayos X
- Cuarto oscuro
- Papel filtro Whatmann® 3MM
- Toallas de papel absorbente
- Membrana de nitrocelulosa de 0.2 μ m
- Películas radiográficas
- Agua Milli-Q™ estéril
- Solución reveladora de radiografía
- Solución fijadora de radiografía
- Solución de bromuro de etidio (0.5 μ g/mL)
- HCl 0.25 N
- NaOH 0.25 M

Solución desnaturalizante (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M)

Solución neutralizante (Tris 0.5 M pH 7, NaCl 1.5 M)

Solución de transferencia (NH₄Ac 1 M, NaOH 0.02 M)

SSC 20x (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M, pH 7.0)

SDS 20%

Solución Denhardt's 50x (Ficol 1%, BSA 1%, Polivinil pirrolidona 1%)

Solución de pre-hibridación (formamida desionizada 50%, SSC 6X, SDS 1%, Denhardt's 5x, esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/mL). Prepararlo justo antes de su uso

Solución de enjuague (SSC 0.2x)

Solución de lavado (SSC 0.2x, SDS 0.1%)

EDTA 0.2 M, pH 8.0

Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)

1 gel de agarosa al 0.8% con las muestras a analizar. Para la electroforesis, se tendrá el carril 1 con marcador de peso molecular y los carriles 2 y 3 con ADN genómico cortado con diferentes enzimas de restricción)

Kit de marcaje con biotina de ADN

Kit de detección por quimioluminiscencia de ADN biotilado

Oligonucleótido para marcar (1 µM)

Protocolo

Transferencia del ADN

👁 Utilice guantes en todo momento

1. Teñir el gel con bromuro de etidio, fotodocumentar con una regla colocada a lo largo del gel de manera que después pueda ser identificada en la membrana la posición de las bandas.
2. Sumergir el gel por 15 min en HCl 0.25 N. Enjuagar con agua destilada.
3. Incubar el gel en agitación 2 x 20 min en solución de desnaturalización.
4. Incubar el gel en agitación 2 x 30 min en solución de neutralización.
5. Cortar la membrana a la medida del gel y sumergir en NaOH 0.25 M por 20 min.

6. Colocar el soporte de acrílico dentro del reservorio con solución de transferencia. Cubrir con 3 papeles filtro Whatman® 3MM cuyos extremos estén sumergidos en la solución de transferencia (actuarán como mechas para permitir que el líquido en el reservorio suba a través del gel hacia la pila de toallas de papel absorbente y seco).
7. Colocar el gel sobre el papel filtro (con la superficie superior hacia abajo). Encima colocar la membrana de forma precisa y al primer intento.
 - 👁️ Remover cualquier burbuja que se haya formado haciendo rodar una pipeta de vidrio sobre la superficie.
8. Cubrir con 3 papeles filtro Whatman® 3MM y una pila de ~4 cm de grosor de toallas de papel absorbente seco, todo cortado al mismo tamaño de la membrana (Fig. 1).
9. Cubrir con una placa de vidrio y poner encima 500 g de peso. Transferir por capilaridad toda la noche a temperatura ambiente.
10. Al día siguiente, marcar con lápiz los pozos en la membrana antes de retirar el gel para conocer su orientación.
 - 👁️ La membrana debe ser manejada siempre con pinzas sin dientes.
11. Sumergir la membrana en SSC 2x por 5 min, colocar sobre papel filtro Whatman® 3MM y permitir que se seque (puede incubarse 30 min a 80° C).
12. Envolver en plástico transparente y colocar en el transiluminador de luz UV por 10 min con el ADN hacia abajo.
13. Confirmar la transferencia con luz UV. Almacenar a temperatura ambiente hasta su uso.

Marcaje de la sonda

14. Descongelar los componentes del kit de marcaje en hielo a excepción del *stock* de la enzima TdT (20 U/ μ L), que deberá sacarse del congelador al momento de ser usada y regresarse a -20° C inmediatamente después.
15. Justo antes de usar, diluir suficiente enzima TdT con amortiguador 1x para cada reacción hasta una concentración de 1.5 U/ μ L; utilizar inmediatamente.
16. Preparar la mezcla de reacción de marcaje sobre hielo, de acuerdo a la Tabla 1 y en el orden indicado. Incluir los controles necesarios.
17. Mezclar suavemente e incubar a 37° C por 30 min.

Tabla 1. Componentes de la reacción de marcaje.

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración final
1. Agua libre de nucleasas	25	-
2. Amortiguador de reacción de TdT 5x	10	1x
3. Oligonucleótido (1 μM)	5	100 nM
4. Biotina-11-UTP (5 μM)	5	0.5 μM
5. TdT diluida (2 U/ μL)	5	0.15 U/ μL
Volumen total	50	-

18. Añadir 2.5 μL de EDTA 0.2 M para detener la reacción.
19. Añadir 50 μL de cloroformo:alcohol isoamílico a cada reacción para extraer la TdT.
20. Agitar en el vórtex la mezcla brevemente y centrifugar 2 min a máxima velocidad para separar las fases.
21. Retirar y almacenar a -20°C la fase superior (acuosa) que contiene el ADN marcado.

Hibridación

22. Humedecer la membrana con SSC 6x por 15 min e introducir al horno de hibridación.
23. Pre-hibridar con rotación por 4 h a 68°C con 10 mL de la solución de pre-hibridación.
24. Agregar todo el ADN marcado e hibridar con rotación por 16 h a la temperatura de alineamiento del oligonucleótido.
25. Retirar la membrana del horno y enjuagar con la solución correspondiente por 5 min a temperatura ambiente.
26. Lavar con la solución correspondiente por 2 h a la temperatura de alineamiento del oligonucleótido marcado.
27. Enjuagar con SSC 2X a temperatura ambiente y colocar dentro de una bolsa transparente hasta su uso.

Revelado por quimioluminiscencia

28. Calentar lentamente el amortiguador de bloqueo y el amortiguador de lavado 4x a 37°C (ambos incluidos en el kit de detección por quimioluminiscencia de ADN biotinilado)

29. Incubar la membrana con 16 mL del amortiguador de bloqueo por 15 min con agitación suave.
30. Preparar una mezcla de 16 mL de amortiguador de bloqueo con 50 μ L del conjugado estreptavidina-HRP (*stabilized streptavidin-horseradish peroxidase conjugate*).
31. Decantar el amortiguador de bloqueo de la membrana y añadir los 16 mL de la mezcla previa. Incubar por 15 min con agitación suave.
32. Preparar 100 mL de buffer de lavado 1X.
33. Enjuagar brevemente con 20 mL de amortiguador de lavado 1x.
34. Lavar cuatro veces con 20 mL de amortiguador de lavado 1x con agitación suave (5 min cada vez).
35. Incubar con 30 mL del amortiguador equilibrador de sustrato (*substrate equilibration buffer*) por 5 min con agitación suave.
36. Preparar la solución de sustrato (*substrate working solution*) mezclando 6 mL de luminol con 6 mL de la solución de peróxido (proteger de la luz).
37. Decantar el amortiguador equilibrador de sustrato de la membrana y eliminar el exceso de líquido con papel absorbente.
38. Cubrir la membrana con la solución de sustrato e incubar por 5 min sin agitación.
39. Decantar la solución de sustrato y eliminar el exceso de líquido con papel absorbente. No permitir que la membrana se seque.
40. Colocar una bolsa transparente dentro del casete de rayos X e introducir la membrana (evitar burbujas o arrugas).
41. Dentro del cuarto oscuro, colocar una película radiográfica encima de la membrana, cerrar el casete y después de 2 min retirar y sumergir en solución reveladora, solución fijadora y agua (2 min en cada una).
- 👁 Las películas de rayos X se velan si se exponen a la luz blanca.
42. En caso de ser necesario, colocar una segunda película radiográfica variando el tiempo de exposición según el resultado inicial obtenido.

Análisis de resultados

Compare la placa de rayos X con el gel teñido e identifique la banda de interés. Suponiendo que apareciera más bandas de las deseadas, o bien, que no se viera ninguna, ¿cuáles serían algunas de las razones posibles? ¿cómo podría determinar cuál de ellas es la correcta? ¿qué controles agregaría al experimento?

Discuta sobre el uso de sondas de ácidos nucleicos marcados con biotina. Explique la reacción enzimática realizada por la TdT y el uso de UTP en el kit de marcaje. Esquematice la reacción enzimática que permite la detección por quimioluminiscencia en esta práctica.

Mencione al menos 4 factores que influyen en la tasa de hibridación.

¿Qué es la formamida desionizada? ¿Para qué sirve la solución Denhardt's y el esperma de salmón?

¿Cuál es la concentración de agarosa que debe contener el gel con el ADN que se someterá a *Southern blot*? ¿De qué grosor es lo máximo recomendable?

¿Cuánto ADN genómico se recomienda utilizar para un análisis de *Southern blot*?

¿En qué casos se puede omitir el tratamiento con ácido del gel de agarosa? ¿De qué depende el tiempo que dura la transferencia?

¿Porqué se recomienda estandarizar el tiempo y la longitud de onda de la luz UV para realizar el *crosslinking*? Detalle un protocolo para realizar la estandarización.

¿A qué se refiere la astringencia? Mencione un ejemplo de una solución de lavado con alta astringencia y en qué casos se requiere.

El *Southern blot* todavía se considera el estándar de oro para detectar la clonalidad* de una amplia gama de enfermedades malignas linfoides. ¿Qué es lo que detecta y cómo se realiza? Las membranas que se utilizan para *Southern blot* se distinguen por tener diferentes características, como la capacidad de unión (μg de ácidos nucleicos/ cm^2), la fuerza tensil, el tipo de ácido nucleico que fijan, etc. Investigue los factores que influyen en la elección del

* Clonalidad, indica que todas las células cancerosas se derivan de una célula primigenia mutada.

tipo de membrana a usar y realice un cuadro comparativo que contraste las diferentes características de al menos 4 tipos de membranas.

Referencias

1. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. 5th ed. Estados Unidos: John Wiley & Sons; 2002.
2. Bruns DE, Ashwood ER, Burtis CA. Fundamentals of Molecular Diagnostics. Estados Unidos: Saunders Elsevier; 2007.
3. Nigam A, Ayyagari A. Lab Manual in biochemistry, immunology and biotechnology. India: Tata McGraw-Hill; 2007.

Práctica 8. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Objetivos

1. Reflexionar sobre la relevancia de los polimorfismos genéticos en el diagnóstico molecular de enfermedades y en la identificación de individuos.
2. Integrar principios básicos de biología molecular para la comprensión de los RFLPs.
3. Contrastar las diferentes formas de realizar un análisis de RFLPs.

Introducción

Hay numerosos sitios de restricción en el ADN genómico. Algunos son muy constantes, lo que significa que están siempre presentes en el mismo locus en todas las moléculas homólogas de la especie. Sin embargo, otros sitios de restricción son ocasionales o facultativos, es decir, exhiben polimorfismo tanto intra-individual (cada individuo diploide es portador de 2 moléculas homólogas para cada par de cromosomas), como entre individuos (1). Estos polimorfismos se heredan como marcadores dialélicos (+, presencia del sitio, -, ausencia del sitio) y cada persona tiene uno de los 3 genotipos posibles: + / +, + / -, - / -. Cuando el ADN genómico se digiere con endonucleasas de restricción, la presencia o ausencia de un sitio de restricción conduce a variaciones en el tamaño de los fragmentos generados (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP). Estas variaciones son visibles por *Southern blot* si se utiliza una sonda genómica, o bien, en un gel de electroforesis si la región que abarca el polimorfismo se amplifica por PCR antes de la digestión (Fig. 1). Si el polimorfismo está estrechamente vinculado al locus de una enfermedad hereditaria monogénica, los RFLPs permiten el diagnóstico indirecto por análisis de la co-transmisión de las mutaciones y el RFLP ligado con el gen. Además, algunas enfermedades monogénicas son causadas por una mutación que crea o elimina un sitio de restricción, creando un nuevo patrón de fragmentos de restricción que permiten distinguir el alelo mutante del alelo normal.

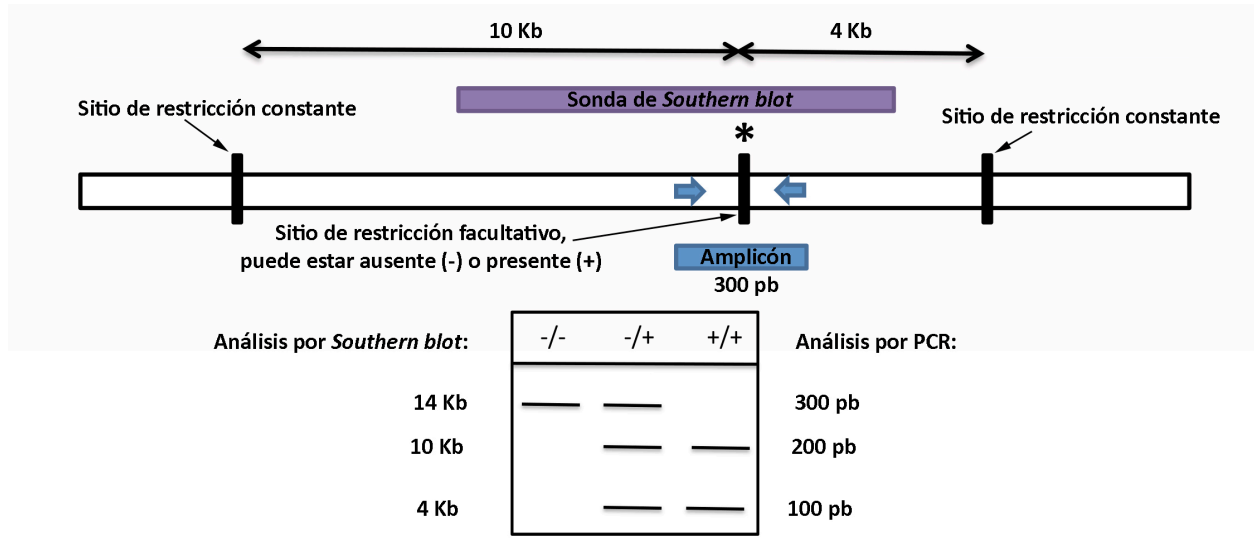


Fig. 1 Visualización de un RFLP en personas homocigotas y heterocigotas. Las flechas azules indican la localización de cebadores, a 200 pb (izq.) y 100 pb (der.) del sitio de restricción facultativo (*).

Los RFLPs también permiten analizar regiones hipervariables como las repeticiones en tándem de número variable (VNTR por su acrónimo en inglés) también conocidas como minisatélites. Con esta metodología pueden ser identificados polimorfismos caracterizados por muchas copias de la misma secuencia con una longitud de 9 hasta 90 pares de bases (2), resultando en cambios en la longitud conforme más copias son incorporadas (Fig. 2).

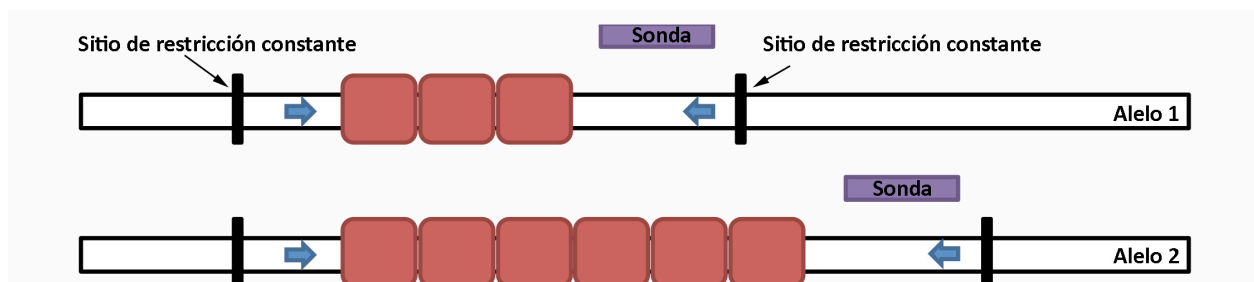


Fig. 2 Análisis de VNTRs por RFLPs. El alelo 1 contiene 3 repetidos (cuadrados en rojo) y el alelo 2 contiene 6 repetidos. Los rectángulos morados indican el lugar donde la sonda de Southern blot hibridará. Las flechas azules indican dónde podrían localizarse los cebadores en caso de realizar el análisis de VNTRs por PCR.

En un locus VNTR dado, un individuo tiene una probabilidad muy pequeña de tener el mismo número de repeticiones en dos sitios homólogos y 2 individuos tienen una probabilidad casi nula de tener el mismo genotipo para varios marcadores VNTRs. La huella dactilar de ADN (DNA *fingerprinting*) propuesta por Jeffreys en 1985 para propósitos forenses, es un análisis de VNTRs por RFLP visualizado por *Southern blot* (3).

Material y equipo necesario

1 cámara de electroforesis horizontal
1 fuente de poder
1 incubadora con temperatura controlada a 37° C
1 fotodocumentador con luz UV
1 vórtex
1 microcentrífuga
1 contenedor con hielo
3 cajas con micropuntas (2 a 20 µL, 20 a 200 µL y 200 a 1000 µL)
3 micropipetas (P-1,000, P-200 y P-20)
1 caja para microtubos de 1.6 mL
1 charola para teñir el gel
6 microtubos de 1.6 mL estériles
Parafilm® M
Agarosa grado Biología Molecular
TBE 1x (Tris 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH 8.0)
Amortiguador de carga 5x (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilen-cianol, 30% glicerol)
Enzima de restricción *EcoRI*
Amortiguador de restricción 10x para *EcoRI*
Marcador de peso molecular
Agua Milli-Q™ estéril
Solución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL) o de SYBR® Green I 1x o similar

Muestras de ADN del individuo en estudio y de controles homocigotos y heterocigotos para el sitio de restricción facultativo (se sugiere utilizar 2 plásmidos, uno con 2 sitios *EcoRI* y otro con 3, para que simulen ser productos de PCR de una región que incluya el polimorfismo de un sitio de restricción).

Muestra de ADN encontrada en una escena del crimen y muestras de ADN de sospechosos. Se sugiere utilizar 5 plásmidos con varios sitios de restricción para *EcoRI*, que simulen ser ADN genómico de diferentes personas, similar a lo utilizado en (4).

Protocolo

RFLP por sitio de restricción facultativo

👁 Utilice guantes en todo momento

1. Rotular 6 tubos: i) control negativo (ADN del individuo en estudio, sin enzima), ii) control positivo (ADN diferente al del individuo en estudio pero con el sitio de restricción presente), iii) muestra heterocigota para el sitio de restricción, iv) muestra homocigota para la presencia del sitio de restricción, v) muestra homocigota para la ausencia del sitio de restricción, y vi) muestra de ADN del individuo en estudio.

2. Realizar las mezclas de reacción de acuerdo a la Tabla 1, calculando el volumen de ADN y de agua que debe ser agregado en cada microtubo, siguiendo el orden indicado:

Tabla 1. Componentes de las reacciones de digestión.

Reactivo	Ctl. neg.	Ctl. pos.	+/-	+/+	-/-	Exp.
1. Agua libre de nucleasas						
2. Amortiguador 10x	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
3. ADN 100 ng						
4. <i>EcoRI</i> 20,000 U/mL	-	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Volumen total	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

- ☞ Las enzimas deben sacarse del congelador al momento de ser usadas y mantenerse en hielo. Deben regresarse al congelador inmediatamente después de su uso.
- 3. Mezclar los componentes golpeando suavemente los microtubos con el dedo.
- 4. Centrifugar los microtubos por 5 s para que el líquido quede en el fondo del tubo.
- 5. Incubar las reacciones a 37° C por 2 horas.
- 6. Agregar 5 µL de amortiguador de carga 5x a cada microtubo y centrifugar por 5 s.
- 7. Cargar los marcadores de peso molecular en los pozos correspondientes al primer y último carril de un gel de agarosa a concentración adecuada, de acuerdo con el tamaño esperado de los fragmentos de restricción.
- 8. Cargar las digestiones en los pozos vacíos.
- 9. Cerrar la cámara de electroforesis y aplicar una corriente de 85 V.
- 10. Cuando el azul de bromofenol haya migrado lo suficiente (~ $\frac{3}{4}$ partes del gel), apagar la fuente de poder y sacar el gel de la cámara.
- 11. Teñir los geles con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) o SYBR® Green I 1x durante 30 min.
- 12. Visualizar las bandas y digitalizar la imagen con el fotodocumentador.

Análisis de VNTR por RFLP

- ☞ Utilice guantes en todo momento
- 1. Rotular 6 tubos: muestra de ADN genómico encontrada en una escena del crimen (Q) y muestras de ADN de sospechosos (K1, K2, K3, K4 y K5).
- 2. Realizar las mezclas de reacción de acuerdo a la Tabla 2, calculando el volumen de ADN y de agua que debe ser agregado en cada microtubo y siguiendo el orden indicado.

Tabla 2. Componentes de las reacciones de digestión.

Reactivo	Q	K1	K2	K3	K4	K5
1. Agua libre de nucleasas						
2. Amortiguador 10x	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
3. ADN 100 ng						
4. <i>EcoRI</i> 20,000 U/mL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Volumen total	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

3. Mezclar los componentes golpeando suavemente los microtubos con el dedo.
4. Centrifugar los microtubos por 5 s para que el líquido quede en el fondo del tubo.
5. Incubar las reacciones a 37° C por 2 horas.
6. Agregar 5 µL de amortiguador de carga 5x a cada microtubo y centrifugar por 5 s.
7. Cargar los marcadores de peso molecular en los pozos correspondientes al primer y último carril de un gel de agarosa a concentración adecuada, de acuerdo con el tamaño esperado de los fragmentos de restricción.
8. Cargar las digestiones en los pozos vacíos.
9. Cerrar la cámara de electroforesis y aplicar una corriente de 85 V.
10. Cuando el azul de bromofenol haya migrado lo suficiente ($\sim 3/4$ partes del gel), apagar la fuente de poder y sacar el gel de la cámara.
- 👁 En el análisis de VNTR por RFLP clásico (*DNA fingerprinting*), el siguiente paso sería realizar el *Southern blot*, para después incubar con sondas que hibriden con los fragmentos de ADN que contienen los minisatélites en estudio.
11. Teñir los geles con bromuro de etidio o SYBR® Green I 1x durante 30 min.
12. Visualizar las bandas y digitalizar la imagen con el fotodocumentador.

Análisis de resultados

Compare los patrones de restricción en cada uno de los carriles de los geles de agarosa.

En algunas familias, un sitio de restricción polimórfico puede ser utilizado como marcador para seguir la herencia de un alelo mutante. En estas familias, ¿a qué personas se les debe analizar el ADN?, ¿cuáles serían los controles?

¿Por qué el análisis de marcadores de ligamiento (*linkage marker*) para diagnóstico prenatal no es 100% fiable? ¿Qué se puede hacer para aumentar la certeza del diagnóstico?

En el análisis de VNTRs por RFLPs, ¿cuáles muestras tienen el mismo número de sitios de restricción para *EcoRI*?, ¿algunas de ellas parecen provenir de la misma fuente?

El análisis de VNTR por RFLP usando sondas de un solo locus (SLP, *single locus probe*) fue el método predominante de tipificación de ADN en la mayoría de los laboratorios forenses en la década de 1990. ¿Cuántos y cuáles *loci* genéticos se analizaban? ¿Cuál era el promedio

de discriminación para estadounidenses de raza blanca? ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de este análisis?

El análisis de microsatélites ahora se realiza casi exclusivamente por PCR. Describa cómo se lleva a cabo sin utilizar enzimas de restricción.

El análisis de la diversidad genética de una secuencia de repetición es útil en la medicina forense y también constituye la base para el diagnóstico genético de enfermedades hereditarias donde la amplificación de una secuencia de repetición corresponde a la mutación patógena. Mencione ejemplos de estas enfermedades e indique en qué casos se debe recurrir hoy en día al *Southern blot* para su análisis.

Referencias

1. Serre JL, Heath I, Heath S. Diagnostic techniques in genetics. Inglaterra: John Wiley & Sons; 2006.
2. Coleman WB, Tsongalis GJ. Molecular diagnostics for the clinical laboratorian. 2th ed. Estados Unidos: Humana; 2010.
3. Carracedo A. Forensic DNA typing protocols. Estados Unidos: Humana; 2010.
4. Bio-Rad Laboratories, Inc. Biotechnology Explorer™ Forensic DNA Fingerprinting Kit. Disponible en: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/literature/1660077EDU.pdf>. Consultado Enero 05, 2015.

Práctica 9. qPCR (*quantitative PCR*)

Objetivos

1. Conocer las bases teóricas de la técnica de PCR en tiempo real, sus aplicaciones y su utilidad en el campo de la salud, la industria biotecnológica y la investigación.
2. Determinar la cuantificación relativa de un gen de interés utilizando PCR en tiempo real.

Introducción

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una reacción enzimática que da como resultado la síntesis de una gran cantidad del número de copias de una secuencia específica de ADN a partir de una mezcla de diferentes moléculas de ADN. Con la introducción de instrumentos especializados, la PCR en tiempo real o cuantitativa [*quantitative PCR* (qPCR por sus siglas en inglés)] ha llegado a ser el método más sensible para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos (1). Usando la especificidad y sensibilidad de la PCR combinada con la medición directa de la molécula blanco utilizando cebadores marcados con fluorescencia, sondas o moléculas fluorescentes intercalantes en el ADN, se mejoró la detección y cuantificación de ácidos nucleicos. Técnicamente, la PCR en tiempo real es la colección de señales fluorescentes de una o más PCR's a lo largo de los ciclos de amplificación. Por lo tanto, la PCR en tiempo real se refiere a la conversión de la señal fluorescente a valores numéricos. La PCR y RT-PCR (Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa) en tiempo real miden la cantidad de fluorescencia de una molécula que corresponde a la cantidad de ADN o ARN inicial (2-4). Las moléculas fluorescentes que se utilizan de manera convencional pueden ser moléculas pequeñas que se unen al ADN de doble cadena (SYBR® Green) y que se incorporan a las moléculas de ADN recién sintetizadas durante la PCR. También se utilizan sondas con doble marcaje fluorescente (un reportero en el extremo 5' y un inhibidor en el extremo 3' de la sonda). En este método, la actividad nucleasa 5' de la Taq polimerasa escinde la sonda separando espacialmente al reportero fluorescente 5' del inhibidor 3', resultando en la emisión del reportero fluorescente (2). La cantidad de fluorescencia que se mide en un equipo de PCR

en tiempo real corresponde con la degradación de la sonda fluorescente de doble marcaje o con la incorporación de la molécula pequeña en tiempo real (Fig. 1).

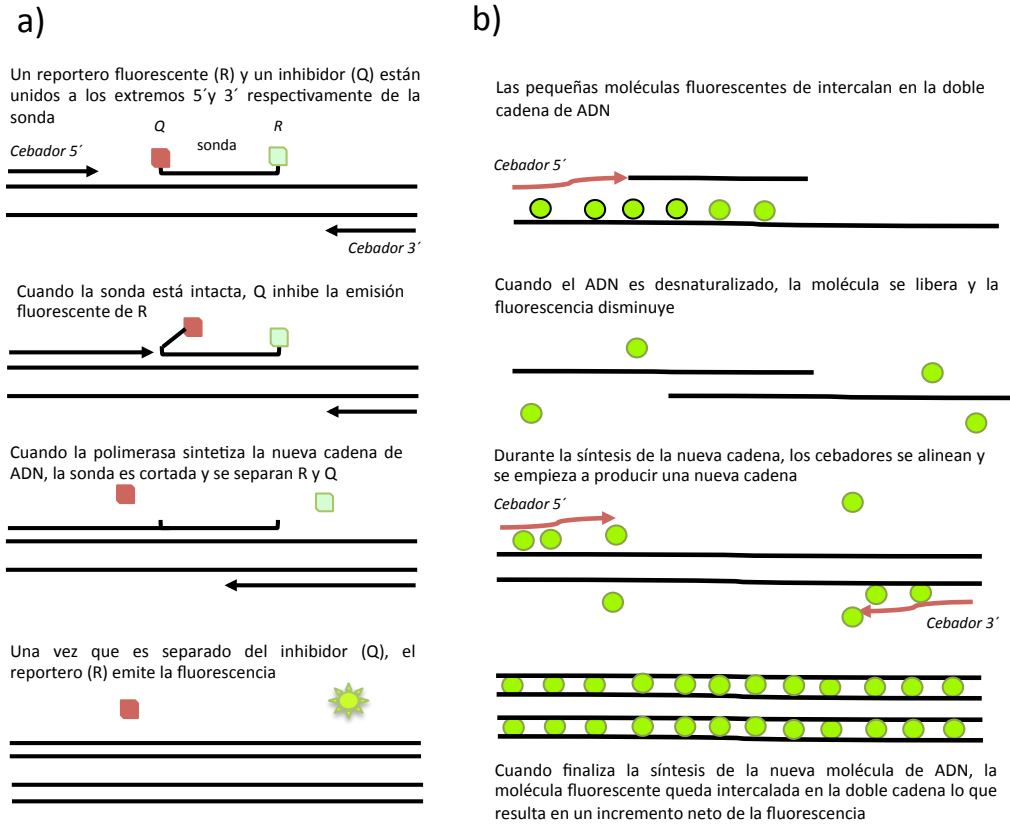


Fig. 1 Esquema que muestra la función de las moléculas fluorescentes que se utilizan para la técnica de PCR en tiempo real. En a) la función de las sondas fluorescentes y en b) las pequeñas moléculas intercalantes. La especificidad de la técnica es mayor cuando se utilizan las sondas comparado con el uso de intercalantes.

Estos datos se representan en gráficas de amplificación (Fig. 2). Un valor Ct corresponde al ciclo de amplificación de la PCR en el cual la emisión de fluorescencia del reportero interseca un nivel umbral establecido de forma arbitraria para todas las muestras en la parte exponencial de las curvas. Como se indica anteriormente, el valor de Ct puede correlacionarse con los niveles iniciales del ADN o del ARNm. Una mayor cantidad de moléculas de ácidos nucleicos iniciales dará como resultado menores valores de Ct, debido a que se necesitan menos ciclos de PCR para llegar al umbral de fluorescencia (Fig. 2). La PCR en tiempo real es una técnica utilizada para evaluar cuantitativamente la abundancia

inicial de moléculas empleadas como plantilla de amplificación en cada reacción. Por ejemplo, se ha utilizado para la genotipificación, la cuantificación de cargas virales en pacientes y la evaluación de número de copias de genes en un tejido tumoral. Sin embargo, el uso más común para esta tecnología ha sido estudiar los niveles de expresión génica mediante el acoplamiento con la transcripción reversa (qRT-PCR) (5, 6).

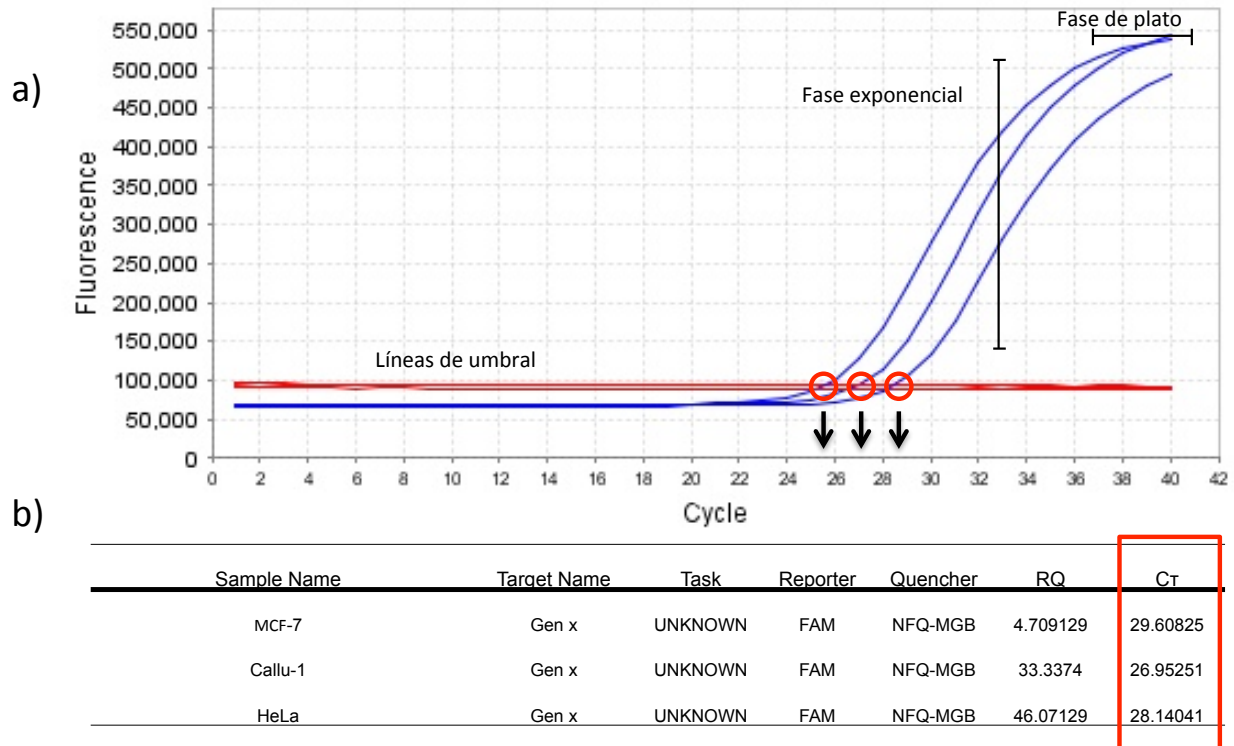


Fig. 2 Imagen de una gráfica de amplificación de PCR en tiempo real. Se muestra el número de ciclos de la PCR en el eje de las X y la fluorescencia de la reacción de amplificación en el eje de las Y, la cual es proporcional a la cantidad de producto amplificado en el tubo. En la gráfica a) se muestran dos fases: una exponencial en la cual el producto de PCR se duplica en cada ciclo; y otra fase no exponencial o de meseta en la cual los componentes de la reacción van consumiéndose y llegan a ser limitados. En b) se muestra una ventana de los datos de Ct.

Material y equipo necesario

1 termociclador para qPCR

3 cajas con micropuntas (2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 200 a 1000 μ L)

2 micropipetas (P-200 y P-20)

1 gradilla para microtubos
1 vórtex
1 contenedor con hielo
Microtubos de 200 μ L estériles
Agua libre de nucleasas
Placas de reacción de 96 pozos *MicroAmp Optical* (Invitrogen)
Tapas *MicroAmp Optical* (Invitrogen)
Microcentrífuga
Muestra de ADN que contenga el gen de interés
SYBR® Green ER™ qPCR *SuperMix Universal* (Invitrogen)
Cebador 5' a 10 μ M
Cebador 3' a 10 μ M

Protocolo

Preparación de la mezcla de PCR

👁 Utilice guantes en todo momento. Es recomendable amplificar segmentos cortos (50-150 pares de bases) de la secuencia de interés para obtener mejores resultados. Descongelar y mantener todos los reactivos necesarios en hielo.

1. Etiquetar microtubos de 200 μ L y hacer la mezcla de reacción de la muestra problema (tumoral), la muestra de referencia (no tumoral), un control de carga (β -actina) y un control negativo (sin ADN) de acuerdo a la tabla 1 (La cantidad de ácido nucleico molde varía: 10^7 copias de ADN plasmídico, 100 ng of ADN genómico o el ADNc generado de 1 μ g de ARN total). Todas las muestras deberán evaluarse por triplicado.
2. Colocar los 50 μ L de cada una de las muestras y del control negativo en los pozos de la placa de reacción de 96 pozos *MicroAmp Optical*.
3. Cubrir la placa de 96 pozos con las tapas *MicroAmp Optical* y mantener en hielo hasta colocar la placa en el termociclador de tiempo real.
4. Cerciorarse que las muestras están en el fondo de los pozos sin que haya salpicaduras ni burbujas en los lados o las tapas.

👁 No escribir sobre las tapas ni manipular su superficie.

Tabla 1. Componentes de la reacción de qPCR para un volumen final de reacción de 50 μ L.

Reactivo	Volumen	Concentración final
1. SYBR®GreenER™ qPCR <i>SuperMix Universal</i>	25 μ L	1X
2. Cebador 5' 10 μ M	1 μ L	200 nM
3. Cebador 3' 10 μ M	1 μ L	200 nM
4. ROX <i>Reference Dye</i> (opcional)	1 μ L-0.1 μ L	50 nM
5. ADN molde	5-10 μ L	
6. Agua libre de nucleasas	Llevar a 50 μ L	

Condiciones de la PCR en el equipo de Tiempo Real

- Colocar la placa en el equipo, abrir una nueva ventana de configuración de placa para asignar el tipo de muestra a cada pozo (muestra problema, muestra de referencia, control de carga y control negativo por triplicado).
- Seleccionar: Modo PCR en tiempo real, SYBR® green y volumen de reacción de 50 μ L.
- Programar los ciclos de amplificación para la PCR:
 - Primer ciclo: Desnaturalización a 95°C por 10 min.
 - Siguientes 40 ciclos: Desnaturalización a 95°C por 15 s
 - Hibridación y extensión a 60°C por 30 s
- Indicar en el equipo los pozos correspondientes a la muestra problema, control de carga y control negativo. Es importante asignar un número a las muestras en la ventana *Plate Setup* del software. Cada pozo debe recibir un número único en el campo *Replicate*. Las réplicas de la misma muestra deben recibir el mismo número.
- Iniciar los ciclos de amplificación.

Interpretación de las gráficas de amplificación

Una vez completada la amplificación, analizar los datos obteniendo los valores Ct de cada muestra y aplicar los métodos Δ Ct, o $\Delta\Delta$ Ct, usando los valores del gen de referencia:

Ct = Ciclo en el cual se cuenta con una cantidad detectable de ADN, es decir, que intersecta el umbral de fluorescencia basal

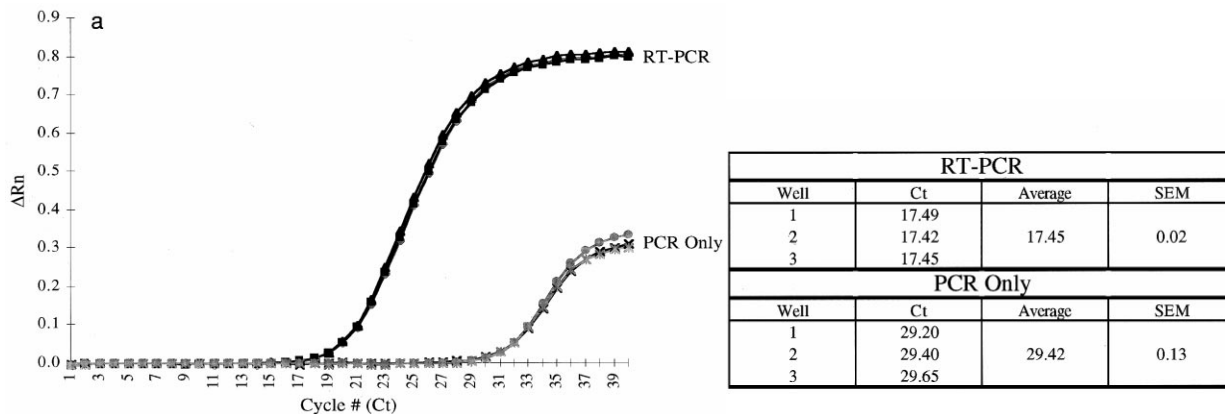
$\Delta Ct = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen control } (\beta\text{-actina})$

Para el cálculo de $\Delta\Delta Ct$:

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ células sin estímulo} - \Delta Ct \text{ células con estímulo}$

Análisis de resultados

Determine los valores relativos de expresión del gen de interés. ¿Cuál es la diferencia entre el método ΔCt y $\Delta\Delta Ct$ usando genes de referencia? ¿Cómo se realiza una cuantificación absoluta de un gen por PCR en tiempo real? Explique el análisis del gen X con base en la siguiente figura y explique qué significa la curva de RT-PCR y PCR *only*



Referencias

1. Biassoni R, Raso A. Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols. Estados Unidos: Humana Press; 2014.
2. Fraga D, Meulia T, Fenster S. Real-Time PCR. En: Gallagher SR, Wiley EA. Current Protocols Essential Laboratory Techniques. Estados Unidos: John Wiley & Sons; 2008.
3. Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. Anal Biochem 1999; 270: 41-49.

Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular II

4. Bio-Rad Laboratories, Inc. Real-Time PCR, Applications guide. Disponible en: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf. Consultado Enero 05, 2015.
5. Life Technologies, Inc. Real-time PCR handbook. Disponible en: <http://www.genequantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>. Consultado Enero 05, 2015.
6. Rodríguez M, Rodríguez W. PCR en tiempo real. Disponible en: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf. Consultado Enero 05, 2015.

Práctica 10. Transfección

Objetivos

1. Conocer cómo se mantiene un cultivo de células de mamífero.
2. Realizar la transfección de un gen reportero.
3. Cuantificar la eficiencia de transfección.

Introducción

Transfectar consiste en la transferencia de material genético en células eucariontes. Esta transferencia puede tener diversas funciones entre ellas: seguir con genes reporteros la expresión de una proteína, inhibir o modificar la expresión de genes, inducir la expresión de genes nuevos, generar controles experimentales para diagnóstico, etc. La transfección se utiliza con fines experimentales o terapéuticos. Cuando se utiliza con fines terapéuticos se denomina, terapia génica. La terapia génica comenzó con la idea de corregir directamente la causa de enfermedades con origen genético, especialmente enfermedades monogénicas que causan la deficiencia de alguna proteína (1). Esta idea se ha ido consolidando debido al avance de las ciencias genómicas, particularmente a la secuenciación del Genoma Humano. El conocer todos los genes que contiene el genoma, podría coadyuvar al entendimiento del origen de muchas enfermedades.

Una vez que se conocen el o los genes defectuosos asociados a alguna enfermedad, los retos de la terapia génica son: la eficiencia en la transferencia de genes, la especificidad de la transferencia y el control de la duración de la expresión de los genes. En relación a la eficiencia de la transferencia genética, se han generado diversos vectores o sistemas los cuales se dividen en virales y no virales. Los sistemas virales son los más eficientes hasta el momento, ya que cuentan con la maquinaria seleccionada evolutivamente para transferir genes. No obstante, también tienen desventajas asociadas a la capacidad reducida para el tamaño de los genes que pueden contener y a la activación del sistema inmune. Los sistemas no virales son sistemas sintéticos que no son tan eficientes, pero que tienen una mayor capacidad para contener genes grandes y no activan al sistema inmune (2). Entre los

sistemas no virales se encuentra los liposomales, los cuales tienen grupos químicos con carga positiva que les permiten unirse al ADN que tiene carga negativa. Los sistemas liposomales como la Lipofectamina® 2000 entre otros, permiten la transferencia de plásmidos hasta el núcleo de las células blanco, con lo cual éstos pueden transcribirse y luego traducirse obteniéndose la proteína de interés. Los sistemas liposomales encapsulan los plásmidos protegiéndolos de la degradación y permiten la entrada a través de la membranas celulares al fundirse con ellas.

Una forma común de monitorear la transferencia de genes es el uso de genes reporteros. Los primeros genes reporteros eran de carácter enzimático, como la β -galactosidasa o la cloranfenicol acetiltransferasa, que en presencia de su sustrato generaban algún precipitado de color. El descubrimiento de la proteína verde fluorescente (GFP) revolucionó varios campos de la biología, ya que permite corroborar la expresión del gen directamente (3).

Material y equipo necesario

Microscopio invertido de epifluorescencia

Campana de flujo laminar nivel II de bioseguridad

Medio de cultivo DMEM-F12 con 10% de suero

Plásmido pGreenLantern (4)

Lipofectamina® 2000

Caja de 24 pozos para cultivo de células eucariontes

Tripsina 0.05%

Cámara de Neubauer

Incubadora a 37°C con 5% CO₂ y atmósfera húmeda

Bomba de vacío con trampa para líquidos y manguera para aspirar

PBS

Cajas para tubos cónicos de 15 mL

Tubos cónicos de 15 mL

Azul de tripano 0.4%

Células de mamífero transfectables

Microtubos de 1.5 mL estériles

3 cajas con micropuntas (2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 200 a 1000 μ L)

Cajas para microtubos

Medio Opti-MEM®

Microscopio invertido de contraste de fase

Micropipetas

Guantes

Alcohol al 70%

Protocolo

👁 Utilice guantes en todo momento y trabaje con técnica aséptica. Todo el material que se utilice con las células debe estar estéril. Antes de colocar cualquier objeto en la campana de flujo laminar se debe desinfectar con alcohol al 70%, eso incluye las manos cubiertas con guantes. Cualquier derrame dentro de la campana debe ser limpiado con alcohol al 70% inmediatamente.

Preparación de las células

1. Remover todo el medio de cultivo por aspiración y lavar la monocapa con PBS para remover el suero.
2. Retirar el PBS por aspiración y colocar suficiente tripsina sobre el cultivo para cubrir la monocapa; regresar la caja de cultivo a la incubadora por 5 min aproximadamente.
3. Observar las células en el microscopio invertido para verificar que se separen de la superficie. Cuando el proceso está completo, las células deben estar en suspensión y su apariencia debe ser redondeada. La tripsina causa daño celular por lo que el tiempo de exposición deber ser el mínimo.
4. Colectar las células en un tubo de 15 mL con medio con suero.
5. Centrifugar las células a 3500 rpm por 5 min a 4° C.
6. Aspirar cuidadosamente el sobrenadante evitando resuspender la pastilla de células.

7. Resuspender las células con medio de cultivo, el volumen dependerá del tamaño de la pastilla de células (2-5 mL).
8. Realizar al menos dos diluciones de las células resuspendidas con azul de tripano en un microtubo en una proporción 1:1.
9. Colocar el cubre objetos sobre la cámara de Neubauer y llenar cada lado de la cámara con 10 μ L de la dilución, esperar 2 min y comenzar a contar. Una dilución correcta es aquella en la que se pueden observar de 20-50 células por cuadrante. Recordar que la precisión en esta técnica depende de una buena dilución (bien mezclada), sin burbujas, que se realicen conteos de varios cuadrantes y se comparen los resultados.
10. Contar de 2 a 4 cuadrantes de los marcados con el número 1 en la figura 1. Multiplicar el número de células blancas en un cuadrante (o el promedio de ellos) por el factor de dilución y finalmente multiplicar por 10,000 (no considere las células azules que están muertas). El resultados será igual al número de células/mL.

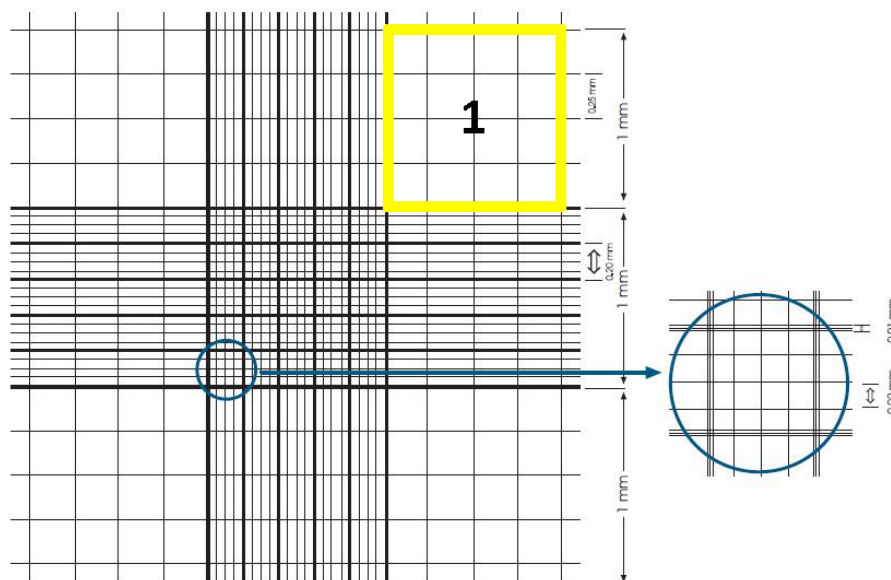


Fig. 1 Cámara de Neubauer (5), donde se aprecian sus distintos cuadrantes y los tamaños de los mismos.

Ejemplo: 50 células en un cuadrante \times 2 (dilución) \times 10,000 = 1,000,000 células por mililitro. Si se desea conocer el total de células, multiplicar este número por el número de mililitros de muestra que haya obtenido.

11. Después de obtener el número de células, se deben colocar 400,000 células por pozo con 0.5 mL de medio completo. Esta permitirá una densidad entre el 50-80% de confluencia el día de la transfección.

Transfección (6)

1. Al día siguiente de la siembra de células, preparar 0.5 µg de DNA en 50 µL de Opti-MEM® en un microtubo por cada pozo de células.
2. Diluir 2 µL de Lipofectamina® 2000 en 50 µL of Opti-MEM® para cada uno de los pozos. Mezclar ambas diluciones e incubar por 5 min para obtener una mezcla de transfección.
3. Cada pozo deberá tener 250 µL de medio (puede tener suero y antibióticos) antes de agregar los 100 µL de la mezcla de transfección. No olvidar poner en un pozo sólo ADN pero sin lipofectamina, y otro con lipofectamina pero sin ADN, como controles negativos.
4. Incubar las células a 37° C en una incubadora de CO₂ humidificada; la transfección se comprobará al cabo de uno a tres días.

Eficiencia de transfección

1. Observar las células en un microscopio de epifluorescencia con un aumento de 20X. Se deben emplear los filtros adecuados para observar GFP (excitación 400 nm o 475 nm y emisión 509 nm).
 2. Tomar una foto en fondo claro con contraste de fases y contar el número total de células en ese campo.
 3. Cambiar a los filtros de fluorescencia sin mover el campo, tomar otra foto y contar el número de células verdes. Con estos datos calcular la eficiencia de transfección, obteniendo el porcentaje de células transfectadas (células expresando la GFP). Se deben evaluar al menos tres campos y obtener el promedio.
- 👁️ Se pueden utilizar distintas relaciones de lipofectamina y plásmido y luego comparar las eficiencias de transfección en las distintas condiciones.

Análisis de resultados

Presente las fotografías de las transfecciones y compare la eficiencia de la transfección en las distintas condiciones utilizadas. Observe si el sistema de transferencia daña a las células transfectadas.

Compare y explique ventajas y desventajas entre distintos sistemas para transferir genes; realice una tabla. Discuta qué es la terapia génica *in vivo* y *ex vivo*, y si los sistemas de transferencia son igualmente útiles en ambos tipos de terapia. Describa brevemente los avances principales en la terapia génica en humanos y también sus problemas.

Referencias

1. Genetic Science Learning Center. Gene Therapy. Disponible en: <http://learn.genetics.utah.edu/content/genetherapy/> Consultado Enero 13, 2015.
2. Mintzer MA, Simanek EE. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem Rev* 2009; 109: 259-302.
3. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 509-544.
4. PGREEN LANTERN™-1, a superior green fluorescent protein mammalian cell transfection reporter.
<http://tools.lifetechnologies.com/content/Focus/Focus%20Volume%2018%20Issue%202.pdf>. Consultado agosto 11, 2015.
5. © SantiBadia / https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Reticulo_Neubauer.jpg / CC-BY-SA-4.0
6. Life Technologies. Lipofectamine® 2000 Reagent. Disponible en: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/Lipofectamine_2000_Reag_protocol.pdf. Consultado Enero 13, 2015.

Práctica 11. Silenciamiento de genes con ARN de interferencia

Objetivos

1. Experimentar la inhibición de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) mediante la técnica de ARN de interferencia.
2. Discutir las técnicas para evaluar la eficiencia de los siRNAs (del inglés *short interfering RNA*).
3. Conocer y discutir los fundamentos y aplicaciones terapéuticas de los siRNAs.

Introducción

Uno de los avances más importantes en la biología de las últimas décadas ha sido el descubrimiento de moléculas de ARN que regulan la expresión de genes. El mecanismo celular del ARN de interferencia (ARNi) es responsable del silenciamiento de genes a nivel post-transcripcional y actúa directamente sobre el ARN mensajero (ARNm) que reconoce como blanco (1). Este es un mecanismo celular endógeno y con su descubrimiento se hizo evidente que es un proceso molecular que modula la expresión genética en un tiempo y espacio determinado. El uso de ARNi exógenos o sintéticos de manera experimental, se ha convertido en una herramienta valiosa para estudiar la función de los genes en todos los eucariontes superiores. Para conseguir el silenciamiento de genes, las moléculas pequeñas de ARNi de doble cadena (siRNA; del inglés *short interfering RNA*) tienen que ser introducidos de manera eficiente en el citoplasma de las células. En general hay dos tipos de ensayos experimentales: los ensayos transitorios, donde la expresión del gen se interfiere sólo temporalmente; y los estables en donde los genes son interferidos permanentemente en las células o el organismo. En el primer caso se utilizan siRNA sintetizados químicamente que son transfectados a las células y funcionan solo por un tiempo corto, generalmente de 24 a 96 h. La observación experimental muestra que el silenciamiento de genes es más eficiente cuando se transfectan los intermediarios de doble

cadena a la célula, a diferencia de la introducción del ARNi maduro (RNA de cadena sencilla) (Fig. 1). Para el segundo ensayo se requiere que la célula incorpore a su genoma los elementos necesarios para fabricar una molécula de ARN de doble cadena que llegue hasta el citoplasma. Esto se logra utilizando vectores o plásmidos que producen el siRNA (2). Los siRNAs se transfectan a las células como moléculas de doble cadena con una estructura de tallo y asa. Esta conformación es reconocida por una maquinaria de endonucleasas que cortarán el siRNA, y producirán una molécula pequeña de ARNi funcional de una sola cadena de 18 a 22 nucleótidos. Esta molécula reconocerá a su ARNm blanco para unirse a él por complementariedad e inducir su degradación o inhibir el proceso de traducción (Fig. 1) (2,3).

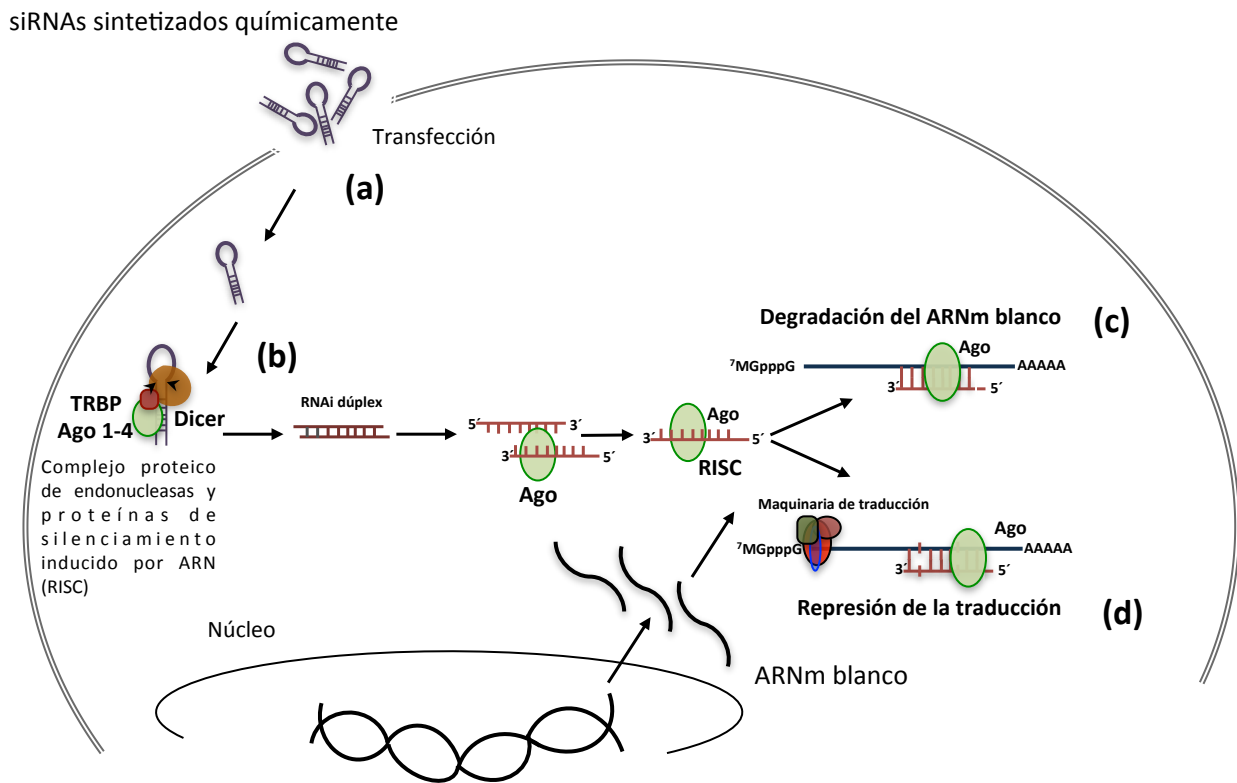


Fig. 1 Mecanismo de silenciamiento de genes por siRNAs. Los siRNAs son transfectados a las células como precursores de doble cadena (a). En el interior de la célula, los siRNAs son reconocidos por la maquinaria de endonucleasas y el complejo RISC/AGO2 (b), y son procesados para dar origen a moléculas de RNAi que reconocen mRNA específicos. Los RNAi inducen la degradación (c) o inhiben la traducción (d) del ARNm.

La técnica de siRNA es actualmente la estrategia experimental más utilizada para estudios funcionales de genes en muchos organismos como plantas, animales, insectos y células infectadas con virus. En medicina, la interferencia de genes tiene aplicación en la inhibición de la síntesis de proteínas que permiten la replicación de patógenos intracelulares y proteínas que se relacionan con enfermedades humanas. Los siRNAs actualmente representan una estrategia terapéutica en diversas patologías incluyendo el cáncer y enfermedades producidas por virus como el virus de la inmunodeficiencia humana o el virus de la hepatitis C, con la finalidad de evitar la expresión de genes asociados con el desarrollo o progresión de la enfermedad (1-3).

Material y equipo necesario

- 1 campana de flujo laminar, nivel II de bioseguridad
- 1 caja de 96 pozos para cultivos de celulares adherentes
- 3 cajas con micropuntas (2 a 20 μ L, 20 a 200 μ L y 200 a 1000 μ L)
- 3 micropipetas (P-1,000, P-200 y P-20)
- 3 microtubos estériles de 200 μ L
- 1 incubadora a 37° C
- 1 agitador orbital
- 1 microscopio invertido de epifluorescencia
- 1 contenedor para hielo
- 1 pinza con punta fina
- 1 cámara de Neubauer
- Parafilm M®
- PBS (Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 2 mM, NaCl 137 mM pH 7.5)
- Línea celular de mamífero, adherente, que expresen la proteína GFP de manera estable, sembrada en caja Petri al 100% de confluencia
- Medio de cultivo adecuado para la línea celular
- Suero fetal de bovino (SFB)
- Mezcla de antibióticos (penicilina 10,000 U/mL y estreptomycin 10,000 μ g/mL).

Tripsina 0.05% en medio de cultivo

siPORT™ Neo FX™ transfection agent (Ambion AM4510)

siRNA anti-GFP (Ambion AM4626)

siRNA *scramble* (Ambion AM4613)

Paraformaldehído al 4% en PBS

DAPI 0.5 µg/mL en PBS

Protocolo

Preparación de los cultivos de células adherentes

☞ Utilice guantes en todo momento. Esta parte del protocolo deberá hacerse 24 h antes de iniciar el protocolo, en campana de flujo laminar nivel II de bioseguridad.

1. Cosechar las células con tripsina como en la práctica 10 y resuspender en 0.5 mL de medio de cultivo
2. Estimar el número total de células mediante conteo en una cámara de Neubauer.
3. Sembrar 6,000 células por pozo en cajas de 96 pozos. Las células deberán estar resuspendidas en 200 µL de medio de cultivo suplementado con 5% de SFB.
4. Cultivar las células durante 24 h a 37°C en una incubadora de CO₂ humidificada.

Transfección del siRNA

☞ Esta parte del protocolo deberá hacerse en campana de flujo laminar nivel II.

1. En 3 microtubos estériles de 200 µL colocar 1.5 µL de *siPORT™ Neo FX™ transfection agent*. En el tubo 1 adicionar 9 pmol del siRNA anti-GFP, en el tubo 2 adicionar 9 pmol del siRNA *scramble* (control negativo) y el tubo 3 no llevará siRNAs. Llevar todos los tubos a un volumen final de 300 µL con medio de cultivo libre de SFB (Fig. 2).
2. Incubar durante 20 min a temperatura ambiente.
3. Aspirar el medio de cultivo de cada pozo de la caja de 96 pozos que contiene las células.
4. Adicionar 100 µL del tubo 1 a los pozos 1, 2 y 3 de la caja (Fig. 2), posteriormente hacer lo mismo con el tubo 2 colocando 100 µL de la mezcla a los pozos 4, 5 y 6 y finalmente colocar 100 µL del tubo 3 a los pozos 7, 8 y 9.

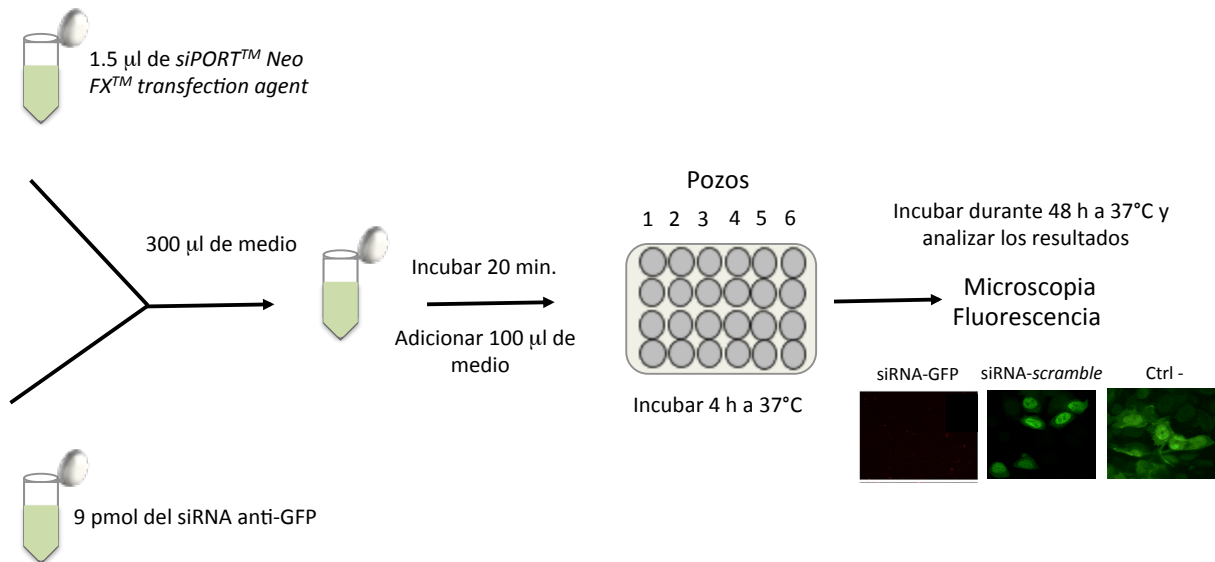


Fig. 2 Esquema que muestra el método de transfección de siRNAs para interferir la expresión de la GFP. Inicialmente el agente de transfección y el siRNA deben ser mezclados para formar un complejo. Posteriormente esta mezcla se incorpora a un cultivo celular para permitir la transfección del siRNA a las células. Las células se incuban durante 48 h para permitir la interferencia de la expresión genética y los resultados se analizan por microscopía de fluorescencia. Como control se utilizan una mezcla de siRNAs (*scrambled*) y el agente de transfección sin siRNAs.

5. Incubar las células a 37°C en una incubadora de CO₂ humidificada durante 4 h.
6. Después del periodo de incubación, reemplazar el medio de transfección con medio convencional suplementado con 10% de SFB y 1% de antibióticos y mantener las células a 37°C en una incubadora de CO₂ humidificada durante 48 h.
7. Después de 48 h de crecimiento, lavar las células 2 veces con PBS y fijar con 4 % de paraformaldehído en PBS durante 15 min.
8. Lavar 2 veces con PBS.
9. Adicionar 10 µL de DAPI en cada pozo y observar en un microscopio invertido de epifluorescencia para evaluar los resultados de la interferencia genética con siRNAs (Fig. 2).

Análisis de resultados

Observe las células que no fueron transfectadas con el siRNA anti-GFP o que fueron transfectadas con el siRNA *scramble*. Identifique los núcleos e identifique la señal de la proteína verde fluorescente (GFP).

Observe las células problema (las que fueron transfectadas con el siRNA anti-GFP). Identifique los núcleos de las células e identifique la GFP.

¿Cuáles otras técnicas podrían utilizarse para evaluar la eficiencia de la interferencia de genes con siRNAs? Describa brevemente los procedimientos a partir de esta técnica.

Diseñe un siRNA para la GFP.

Referencias

1. Engelke D. RNA Interference (RNAi): The Nuts & Bolts of RNAi Technology. Estados Unidos: DNA press LLC; 2004.
2. López T, Silva D, López S, Arias C. RNA de interferencia: el silencio de los genes. Disponible en: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_10.pdf. Consultado Enero 03, 2015.
3. Zhang J, Hua ZC. Targeted gene silencing by small interfering RNA-based knock-down technology. *Curr Pharm Biotechnol* 2004; 5: 1-7.

Abreviaturas

A	Amperes
Ab	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BSA	Albúmina sérica bovina
CI	Índice centromérico
cm	Centímetros
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
E	Campo eléctrico
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
g	Gramos
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (proteína verde fluorescente)
h	Horas
HRP	Peroxidasa de rábano
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
L	Litros
Luz UV	Luz ultravioleta
M	Molar
min	Minutos
mL	Militros
mM	Milimolar
nM	Nanomolar

Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular II

nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
p/v	Peso/volumen
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
pmol	Picomoles
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativa
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
ARNi	ARN de interferencia
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
siRNAs	<i>Short interfering RNA</i> (ARN interferente corto)
SFB	Suero fetal de bovino
TdT	Transferasa terminal de desoxinucleótidos
UEA	Unidad de Enseñanza Aprendizaje
UTP	Uracil trifosfato
V/cm	Volts por centímetro
v/v	Volumen/volumen
VNTR	Número variable de repeticiones en tándem
WB	<i>Western blot</i>
μL	Microlitros
μM	Micromolar

Soluciones

Práctica 1. Toma de muestras y evaluación microscópica

Cloruro de sodio al 0.9 %

Para 100 mL, pesar 0.9 g de NaCl y añadir el agua destilada hasta disolver

Medio de dilución Weigman

Pesar 50 g de bicarbonato sódico y disolver en 500 mL de agua destilada. Añadir 10 mL de formaldehído al 35 % y aforar a un litro con agua destilada.

Solución Dacie

Añadir 10 mL de formaldehído al 40 % en 990 mL de citrato trisódico al 3 %.

Solución para diluir leucocitos

Añadir 1.5 mL de ácido acético y 10 gotas de violeta de genciana a 40 mL de agua destilada. Mezclar y aforar a 50 mL con agua destilada.

Práctica 2. *Western blot*

Amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %)

Para 1 L de amortiguador de transferencia, disolver 3.0275 g de Tris y 14.413 g de glicina en 800 mL de agua destilada. Agregar 200 mL de metanol.

Solución de Ponceau

Para preparar 100 mL, pesar 2 g de rojo de Ponceau S y disolverlos en 100 mL de ácido tricloroacético al 30 % (30 mL de ácido tricloroacético en 70 mL de agua).

TBS-T (Tris 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tritón x-100 0.1 %)

Para preparar 1 L, agregar a 829 mL de agua destilada, 20 mL de solución *stock* de Tris 1 M (disolver 121.1 g de Tris en 1 L de agua destilada, ajustar el pH a 7.5 con HCl), 150 mL de solución *stock* de NaCl 1 M (disolver 29.22 g de NaCl en 500 mL de agua destilada) y 1 mL de tritón x-100.

Solución bloqueadora (TBS-T con 5 % de leche sin grasa)

Disolver 5 g de leche descremada en polvo en TBS-T. Aforar a 100 mL.

Práctica 3. ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Solución bloqueadora (Tris 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween-80 0.01%, BSA 0.2%)

Para preparar 1 L, agregar a 830 mL de agua destilada, 20 mL de solución *stock* de Tris 1 M (disolver 121.1 g de Tris en 1 L de agua destilada, ajustar el pH a 7.5 con HCl), 150 mL de solución *stock* de NaCl 1 M (disolver 29.22 g de NaCl en 500 mL de agua destilada), 0.1 mL de Tween-80 y 2 g de BSA.

Solución de lavado (Tris 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween-80 0.9%)

Para preparar 1 L, agregar a 179 mL de agua destilada, 20 mL de solución *stock* de Tris 1 M (disolver 121.1 g de Tris en 1 L de agua destilada, ajustar el pH a 7.5 con HCl), 150 mL de solución *stock* de NaCl 1 M (disolver 29.22 g de NaCl en 500 mL de agua destilada) y 9 mL de Tween-80.

Solución sustrato (Ácido cítrico 48.6 mM, Na₂HPO₄ 102.8 mM, H₂O₂ 0.024%, O-fenilenediamina 7.4 mM)

Para preparar 100 mL, mezclar 0.934 g de ácido cítrico, 14.6 g de fosfato de sodio dibásico y 0.8 g de O-fenilenediamina en 80 mL de agua destilada. Agregar 80 µL del *stock* de H₂O₂ al 30% y aforar a 100 mL. Proteger de la luz.

Amortiguador de bicarbonato-carbonato 0.1 M, pH 9.6

Para preparar 1 L, mezclar 45.3 mL de bicarbonato de sodio 0.1 M (disolver 84 g de NaHCO_3 en agua destilada hasta completar 1 L) con 18.2 mL de carbonato de sodio 0.1 M (disolver 106 g de Na_2CO_3 anhidro en agua destilada hasta completar 1 L).

Ácido sulfúrico 1 M

Para preparar 1 L, tomar 945.7 mL de agua destilada en un frasco de vidrio y añadir 54.3 mL de H_2SO_4 . Preparar en campana de extracción.

Práctica 4. Inmunolocalización

PBS (Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 2 mM, NaCl 137 mM, pH 7.5)

Para preparar 1 L, pesar 8 g de NaCl, 1.44 g de Na_2HPO_4 y 0.24 g de KH_2PO_4 . Disolver en 800 mL de agua destilada y ajustar el pH a 7.5 con HCl. Aforar a 1 L con agua destilada.

Paraformaldehído al 4% en PBS

Pesar 4 g de paraformaldehído y disolver en 100 mL de PBS, caliente la solución entre 40 y 50° C hasta que el paraformaldehído esté disuelto (no sobrecalentar) y dejar enfriar. Preparar en campana de extracción.

Tritón x-100 al 0.1% en PBS

Para preparar 100 mL, tomar 80 mL de PBS y agregar 100 μL de tritón X-100. Disolver y aforar a 100 mL con PBS.

Peróxido de hidrógeno al 3% en metanol

Para preparar 10 mL, tomar 1 mL del *stock* de H_2O_2 al 30% y aforar a 10 mL con metanol.

Albumina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS

Para preparar 100 mL, añadir 1 g de BSA a 100 mL de PBS y almacenar a 4° C.

Solución de PBS/glicerol 1:1 (v/v)

Para preparar 2 mL, mezclar 1 mL de PBS y 1 mL de glicerol.

Práctica 6. FISH (*Fluorescence in situ hybridization*)

Cloruro de potasio 0.075 M

Para preparar 50 mL, pesar 279.6 mg de KCl y disolverlos en 50 mL de agua destilada.

Solución fijadora (metanol:ácido acético glacial 3:1)

Tomar en campana 30 mL de metanol y mezclarlos con 10 mL de ácido acético glacial.

SSC 20x (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M, pH 7.0)

Para preparar 1 L, pesar 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio. Disolver en 800 mL de agua destilada y ajustar el pH a 7 con HCl. Aforar a 1 L con agua destilada y esterilizar con autoclave.

PBS (Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 2 mM, NaCl 137 mM, pH 7.5)

Para preparar 1 L, pesar 8 g de NaCl, 1.44 g de Na₂HPO₄ y 0.24 g de KH₂PO₄. Disolver en 800 mL de agua destilada y ajustar el pH a 7.5 con HCl. Aforar a 1 L con agua destilada.

Solución de formaldehído al 0.95% con MgCl₂

Para 40 mL, disolver 1 mL de formaldehído al 37 % y 0.18 g de MgCl₂ en 39 mL de amortiguador PBS. Preparar en campana de extracción.

Etanol al 85 %

Tomar 88.5 mL de etanol al 96% y aforar a 100 mL con agua destilada.

Tween-20 al 0.05 % en SSC 2X

Para 20 mL, agregar 2 mL de SSC 20X en 15 mL de agua destilada, disolver 10 μ L de Tween-20 y aforar a 20 mL con agua destilada.

Práctica 7. Southern blot

Ácido clorhídrico 0.25 N

Para preparar 250 mL, colocar 62 mL de agua destilada en un frasco de vidrio y añadirle 5.13 mL de HCl concentrado. Aforar a 250 mL con agua destilada. Preparar en campana de extracción.

Hidróxido de sodio 0.25 M

Agregar 0.798 g de NaOH en 700 mL de agua destilada, agitar continuamente. Cuando el NaOH se haya disuelto, aforar a 1 L. Guardar a temperatura ambiente.

Solución desnaturalizante (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M)

Para preparar 1 L, pesar 111.85 g de NaCl, 20 g de NaOH y diluir en 1 L de agua destilada.

Solución neutralizante (Tris 0.5 M pH 7.0, NaCl 1.5 M)

Para preparar 1 L, añadir 111.85 g de NaCl y disolver en 500 mL de Tris 1 M pH 7.0. Aforar a 1 L.

Solución de transferencia (NH_4Ac 1 M, NaOH 0.02 M)

Para preparar 1 L, pesar 77 g de NH_4Ac y 0.8 g de NaOH. Disolverlos en agua destilada y aforar a 1 L.

SSC 20x (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M, pH 7.0)

Para preparar 1 L, pesar 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio. Disolver en 800 mL de agua destilada y ajustar el pH a 7 con HCl. Aforar a 1 L con agua destilada y esterilizar con autoclave.

SDS 20%

Disolver 20 g de SDS en 80 mL de agua destilada y agitar con agitador magnético en un baño de agua a 68° C para favorecer la disolución, en caso de ser necesario ajustar el pH a 7.2 con una solución de HCl, y ajustar el volumen a 100 mL. Guardar a temperatura ambiente. No es necesario esterilizar.

Solución Denhardt's 50x (Ficol 1%, BSA 1%, PVP 1%)

Para preparar 50 mL de solución, pesar 0.5 g de Ficoll, 0.5 g de BSA y 0.5 g de PVP y diluir en 50 mL de agua desionizada. Esterilizar por filtración.

Solución de pre-hibridación (formamida desionizada 50%, SSC 6X, SDS 1%, Denhardt's 5x, esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/mL)

Para preparar 20 mL, mezclar 10 mL de formamida desionizada, 6 mL de SSC 20X, 1 mL de SDS 20%, 2 mL de solución de Denhardt's y 200 µL de esperma de salmón a 10 mg/mL (recién desnaturalizado a 96° C por 5 min) y aforar a 20 mL con agua destilada.

Solución de enjuague (SSC 0.2x)

Para preparar 20 mL, añadir 200 µL de SSC 20x y aforar a 20 mL con agua destilada.

Solución de lavado (SSC 0.2x, SDS 0.1%)

Para preparar 20 mL, añadir 200 µL de SSC 20X y 100 µL de SDS 20 % a 18 mL de agua destilada, mezclar y aforar a 20 mL con agua destilada.

EDTA 0.5 M, pH 8.0

Agregar 46.52 g de EDTA en 200 mL de agua destilada, agitar vigorosamente con una barra magnética y ajustar el pH a 8.0 con NaOH (alrededor de 5 g de NaOH). Aforar a 250 mL con agua destilada. Esterilizar por autoclave.

Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1)

Colocar 24 mL de cloroformo en un frasco de vidrio y añadir 1 mL de alcohol isoamílico. Preparar en campana de extracción.

Práctica 8. RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

TBE 1x (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0)

Disolver 10.8 g de Tris base y 5.5 g de ácido bórico en 300 mL de agua destilada. Agregar 10 mL de la solución *stock* de EDTA 0.5 M pH 8.0. Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.

Agradecimientos

Durante el desarrollo de este trabajo, Arantxa López-Vallejo López fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con número de registro 22062, al cual hace presente su agradecimiento.