

# **Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular**

**Segunda edición**

**11 de junio del 2019**

**Técnicas de Biología Molecular I, Lic. en Biología Molecular**

**Ingeniería Genética y Técnicas Moleculares, Lic. en Ingeniería Biológica**

**Biología Molecular, Lic. en Ingeniería Biológica**

**Autoras:**

Morena Avitia Cao Romero<sup>1</sup>

Elena Aréchaga Ocampo<sup>2</sup>

Ana Luisa Bravo de la Garza<sup>2</sup>

Claudia Haydée González de la Rosa<sup>2</sup>

Sylvie Le Borgne<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad (LANCIS), Instituto de Ecología, UNAM.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Naturales, División de Ciencias Naturales e Ingeniería, UAM, Unidad Cuajimalpa.

<sup>3</sup> Departamento de Procesos y Tecnología, División de Ciencias Naturales e Ingeniería, UAM, Unidad Cuajimalpa.

ISBN de la Primera Edición: 978-607-477-728-4

## Contenido

Prólogo.....	3
Recomendaciones generales de trabajo en el laboratorio.....	6
Práctica 1. Aislamiento de ADN genómico de células de mamífero.....	7
Práctica 2. Aislamiento de ADN genómico de levadura por el método de fenol cloroformo .....	20
Práctica 3. Aislamiento de ADN genómico de bacterias y levaduras en columna de sílica .....	29
Práctica 4. Extracción de ADN plasmídico “Miniprep” por lisis alcalina.....	37
Práctica 5. Aislamiento y purificación de ARN total de mamífero.....	48
Práctica 6. Aislamiento de ARN total de levaduras.....	57
Práctica 7. Aislamiento de ARN total de bacterias.....	65
Práctica 8. Cuantificación y estimación de la pureza de ácidos nucleicos.....	74
Práctica 9. Separación de ácidos nucleicos por electroforesis horizontal en gel de agarosa.....	81
Práctica 10. Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	93
Práctica 11. Reacción en cadena de la polimerasa “PCR” .....	102
Práctica 12. Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa “RT-PCR”..	112
Práctica 13. Extracción, purificación y precipitación de fragmentos de ADN.....	120
Práctica 14. Ligación de productos de PCR en un vector-T.....	130
Práctica 15. Preparación de células de <i>Escherichia coli</i> competentes.....	140
Práctica 16. Transformación de células de <i>Escherichia coli</i> .....	147
Práctica 17. Inducción de una proteína recombinante.....	156
Práctica 18. Separación de proteínas por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.....	164
Abreviaturas.....	176

## **Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular**

Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular .....	177
Primeros auxilios en cortes en la piel .....	184
Primeros auxilios en quemaduras .....	185

## Prólogo a la segunda edición

En junio del 2012 se publicó la primera edición de este *Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular* con la intención de elaborar un texto que fuera de utilidad para el estudio de la UEA “Biología Molecular” de la licenciatura de Ingeniería Biológica, en operación desde septiembre del 2008, abordando brevemente los fundamentos teóricos de algunas técnicas básicas utilizadas en el área. En aquel entonces, la unidad Cuajimalpa de la Universidad Autónoma Metropolitana se encontraba en instalaciones provisionales y la licenciatura en Biología Molecular tenía apenas 2 años de ser creada. Ahora, nos encontramos en instalaciones definitivas que cuentan con mejores espacios para la realización de prácticas de laboratorio, existen otras UEAs experimentales afines a este *Manual* en ambas licenciaturas y la matrícula ha aumentado. Por ello, decidimos hacer una revisión y actualización del *Manual*, aprovechando la experiencia de las autoras al impartir en varias ocasiones, UEAs afines en ambas licenciaturas.

El objetivo principal de esta segunda edición sigue siendo el alumno, para que tenga en sus manos las herramientas necesarias para comprender y aplicar los conocimientos de algunas de las materias más importantes en su formación: la Biología Molecular, la Ingeniería Genética y las Técnicas Moleculares, que forman parte del área de formación profesional en ambas Licenciaturas, por lo que esta nueva edición integra conocimientos prácticos con habilidades y destrezas específicas para el ejercicio profesional. El *Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular* complementará los conocimientos teóricos impartidos en el aula.

En esta ocasión, el *Manual* se ve enriquecido con nuevas prácticas experimentales, como las que contemplan como material biológico de partida a las células de mamífero, o las prácticas que contemplan la obtención, análisis o utilización de ARN a partir de diferentes tipos celulares. Por ello, además de su uso aprobado en la UEA “Biología Molecular”, se propone que el *Manual de prácticas de laboratorio de Biología*

*Molecular* se utilice como guía en 2 UEAs experimentales: “Ingeniería Genética y Técnicas moleculares” (clave 4602026) de la Lic. en Ingeniería Biológica y “Técnicas de Biología Molecular I” (clave 4603078) de la Lic. en Biología Molecular. Aunque esto ya se realiza en la práctica con la primera edición del *Manual*, sin duda con esta segunda edición se logra abarcar de mejor manera los contenidos de ambos programas de estudio.


En esta edición se han hecho algunos cambios para facilitar el logro del objetivo general. Por ejemplo, en cada práctica de laboratorio se desglosan los objetivos específicos que se persiguen y en ocasiones se muestran imágenes de los resultados de laboratorio obtenidos por alumnos en las UEAs experimentales previamente mencionadas.

Al igual que en la primera edición, cada práctica tiene una introducción seguida de materiales y equipos necesarios para su elaboración. Después, en la sección “Protocolo” se detalla paso a paso el procedimiento a seguir y en la sección “Análisis de resultados” se proporciona una orientación sobre los puntos importantes que se deben evaluar al finalizar la práctica. También hay una sección de “Cuestionario” donde se incluyen preguntas o ejercicios referentes a la práctica que reafirmarán lo aprendido. A continuación, en la sección “Soluciones”, se detalla la preparación de las soluciones utilizadas en cada práctica experimental. Debido a la heterogeneidad de los grupos en cuanto al número de equipos de alumnos que se integran en cada trimestre, se recomienda verificar el volumen de las soluciones a preparar, para promover el ahorro y evitar el desperdicio. Finalmente, aparecen las referencias bibliográficas utilizadas. En todas las prácticas se hace énfasis en la seguridad de los alumnos y se incluye al final del *Manual* una sección sobre “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

Algunas prácticas están organizadas de tal manera que el alumno utilizará las muestras obtenidas durante experimentos previos. Sin embargo, es importante mencionar que las prácticas propuestas son autocontenidas, por lo que el docente

podrá decidir el número y orden de las prácticas a realizar según la dinámica y circunstancias del grupo y el trimestre.

El *Manual* sugiere y hace referencia al uso de varios *kits* comerciales. Se cuidó que los kits seleccionados fueran de marcas comerciales conocidas y variadas. 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 todos los casos, los protocolos han sido estandarizados a la infraestructura con que cuentan los laboratorios experimentales de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería. Sin embargo, cualquiera de estos experimentos puede ser optimizado para equipos similares.

En cada una de las prácticas, el símbolo  indica acciones recomendadas en situaciones específicas y advierte al usuario sobre cuidados especiales.

## Recomendaciones generales de trabajo en el laboratorio

1. El alumno deberá leer la práctica completa y discutirla con el profesor antes de la realización de la misma.
2. Los útiles y objetos personales deberán ser colocados en la parte inferior de las mesas de trabajo.
3. El material con el que se trabajará deberá estar perfectamente limpio antes y después de la práctica.
4. Antes de preparar las mezclas de reacción en microtubos, se deberán etiquetar apropiadamente cada uno de los tubos con marcador indeleble y cubrir los rótulos con cinta adhesiva transparente.
5. Por ningún motivo debe alterarse el orden de adición de reactivos en la práctica.
6. Los reactivos se deben mantener tapados para evitar contaminación, vaporización de los mismos, o ambos.
7. Debe utilizarse sólo la cantidad requerida de reactivos. No está permitido regresar excedentes de reactivo al frasco de donde se extrajo el mismo.
8. Revisar la sección de Seguridad en el Laboratorio de Biología Molecular al final de este manual antes de iniciar cualquier Práctica. En particular, consultar la información sobre las sustancias peligrosas señaladas en cada Práctica.

# Práctica 1. Aislamiento de ADN genómico de células de mamíferos

## Objetivos

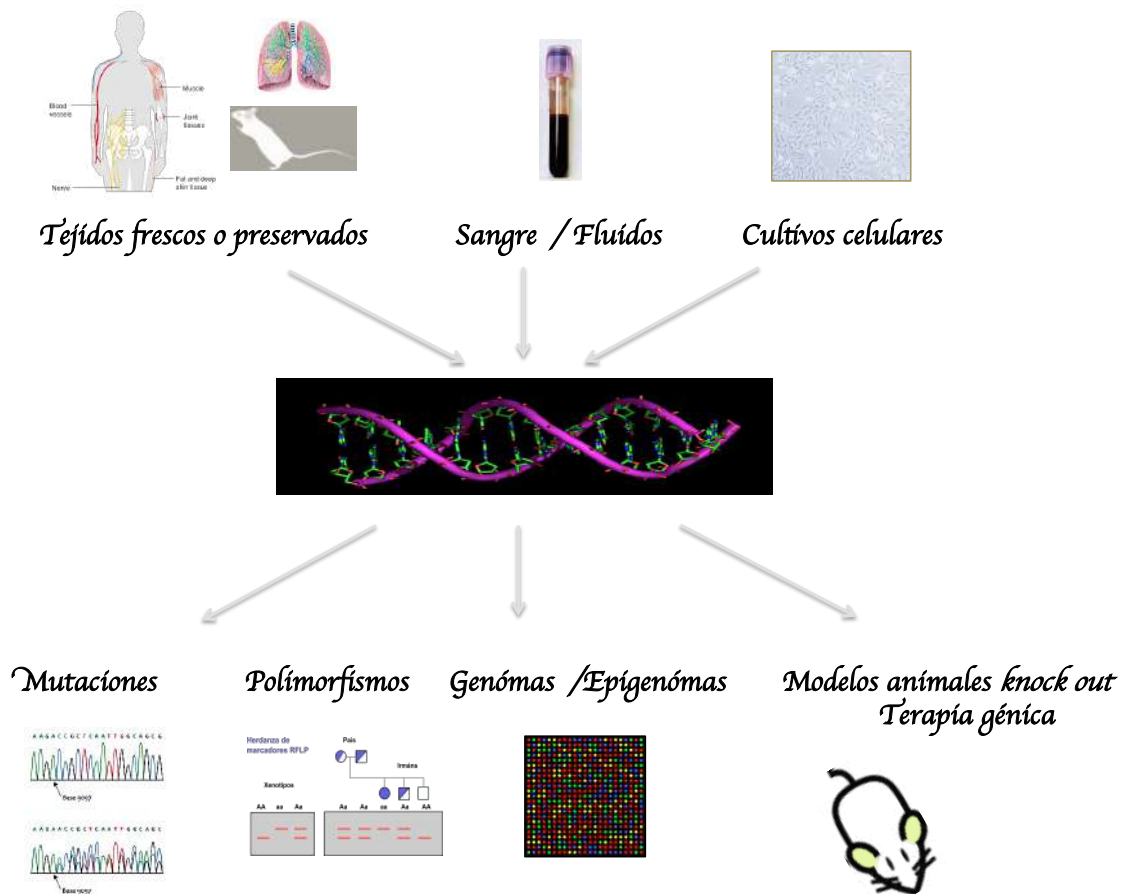
1. Aprender la importancia de la extracción y purificación de ADN genómico de células de mamífero.
2. Comprender los fundamentos de las técnicas de extracción y purificación de ADN genómico de células de mamífero.
3. Identificar las diferencias entre los métodos de extracción de ADN genómico de diferentes tipos celulares.
4. Comparar el método de extracción y purificación de ADN genómico convencional con el comercial.

## Introducción

La extracción y purificación de ADN obtenido a partir de células de mamífero es requerida para una gran variedad de aplicaciones en biología molecular, como el diagnóstico molecular, el análisis forense, la terapia génica, la clonación de genes, la genotipificación, la secuenciación de genes y genomas, la identificación de mutaciones y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), el análisis de metilación de ADN y los modelos de animales *knock out* (Figura 1). Constituye el punto de inicio para importantes análisis genéticos y genómicos enfocados en resolver problemas biomédicos, así como para investigación farmacológica y biotecnológica, entre otras. El ADN puede ser aislado directamente de tejidos preservados, tejidos vivos sólidos o líquidos, fluidos y cultivos celulares *in vitro*, tanto de cultivos primarios como de líneas celulares establecidas (Ausubel *et al.*, 2003). Experimentalmente, el ADN ha



El ADN es la biomolécula más utilizada para diversas técnicas de biología molecular que van desde la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), digestión con endonucleasas de restricción, polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (RFLP), *Southern blot*, inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y librerías genómicas, hasta las técnicas de análisis masivos como secuenciación masiva y microarreglos (Figura 1).



**Figura 1. Diagrama que muestra fuentes biológicas para la obtención del ADN de mamíferos y su utilidad en análisis genéticos y genómicos.**

Actualmente existen varios métodos para la extracción y purificación de ADN de mamíferos dependiendo de la fuente biológica disponible o su uso posterior:

- Órganos completos.
- Tejidos congelados o embebidos en parafina.
- Tejidos frescos o células obtenidas de hueso, sangre, saliva, lavados bronquiales, líquido amniótico, etc.
- Líneas celulares primarias o establecidas.
- Aplicación posterior (PCR, clonación, *Southern blot*, secuenciación tipo Sanger, secuenciación masiva, análisis de metilación).

Los protocolos tradicionales de extracción orgánica están basados en la solubilidad del ADN en agua y de los lípidos en fenol. Inicialmente, las células son disgregadas con detergentes para lisar las membranas y posteriormente debe producirse una digestión proteica con proteinasa K para la inactivación de las nucleasas celulares que podrían digerir el ADN. Esto asegura que la cantidad de ADN intacto obtenido sea la máxima. Subsecuentemente, el fenol es adicionado para separar del ADN los lípidos y las proteínas remanentes, mientras que el cloroformo es utilizado para facilitar la remoción del fenol (Ausubel *et al.*, 2003). El ADN puede ser purificado por precipitación con una mezcla de sales y etanol, y finalmente solubilizado en amortiguador de Tris y EDTA. Este protocolo tradicional de extracción orgánica de ADN es utilizado por muchos laboratorios pero actualmente existen diversos métodos comerciales de extracción no orgánica de ADN que son más rápidos y evitan la toxicidad por la exposición al fenol. Hay diversas casas comerciales como Thermo Scientific®, Qiagen®, Promega®, Sigma Aldrich®, Roche®, GE Healthcare Life Sciences® entre otras, que ofrecen una gran cantidad de kits para aislar ADN de diversas fuentes y cantidades de las muestras biológicas disponibles. También existen kits especiales para obtener ADN que se utilizará en PCR, técnicas de secuenciación masiva o inmunoprecipitaciones (Janecka, *et al.*, 2015).

La extracción de los ácidos nucleicos requiere la homogeneización de los tejidos y el lisado de las células. La homogeneización y la lisis celular deben ser lo suficientemente fuertes para disgregar el tejido y romper las membranas celulares pero suave para

preservar los ácidos nucleicos. El manejo previo a la extracción del ADN es diferente dependiendo de la fuente biológica, como a continuación se describe.

### **a. Extracción de ADN de tejidos frescos o embebidos en parafina**

Los especímenes de muestras de tejidos pueden ser almacenados por décadas, generalmente congelados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  o fijados con formalina y embebidos en parafina. A pesar de estos tratamientos, el ADN de este tipo de tejidos puede ser recuperado de manera eficiente. Después de la obtención del tejido, tan pronto como sea posible, éste debe ser congelado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para almacenarse en bancos de tejidos. Los tejidos que tengan restos de sangre deben lavarse con amortiguadores de fosfatos o solución salina previo a la congelación. Para aislar el ADN, el tejido debe mantenerse congelado en nitrógeno líquido y ser pulverizado en un mortero. El polvo debe resuspenderse en 1.2 mL de amortiguador de digestión (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS y 0.1 mg/mL proteinasa K) por cada 100 mg de tejido. Cuando se utilizan tejidos embebidos en parafina, éstos deben cortarse con un micrótopo en secciones de 5 a 10  $\mu\text{m}$  o ser microdisectados para obtener regiones particulares del corte histológico. Posteriormente, las secciones de tejidos deben ser tratadas con xileno para disolver la parafina del tejido y rehidratado con una serie de lavados con etanol. En ambos casos, las proteínas y enzimas deben ser digeridas con un tratamiento con proteinasa K. Después de estos tratamientos, la extracción del ADN puede hacerse con el método convencional de fenol/cloroformo o utilizando métodos comerciales (Janecka *et al.*, 2015).

Algunos de los kits que permiten obtener una alta calidad y aceptable cantidad de ADN a partir de tejido fresco o parafinado son: *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* (Qiagen), *ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep System* (Promega), *Tissue and cell genomic DNA purification kits* (Thermo scientific), *MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue)* (Roche).

### **b. Extracción de ADN de sangre periférica**

Para obtener el ADN por el método convencional de extracción orgánica a partir de muestras de sangre, es altamente recomendable eliminar los eritrocitos del paquete celular para obtener un ADN íntegro. Las muestras de sangre periférica deben colectarse en tubos con anticoagulante (EDTA) para obtener el paquete celular por centrifugación a 2,000 rpm durante 2 min. El plasma (sobrenadante) deberá retirarse y los eritrocitos deben eliminarse del paquete celular con una solución de lisis para eritrocitos que contiene  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , EDTA y  $\text{KHCO}_3$ . El paquete celular se lava 5 a 8 veces con la solución de lisis o hasta eliminar completamente los eritrocitos. A partir de las células sanguíneas puede obtenerse el ADN genómico con el método tradicional de extracción orgánica (Ausubel *et al.*, 2003). Cuando se utilizan kits comerciales, el ADN puede extraerse directamente de la muestra sanguínea sin necesidad de eliminar previamente los eritrocitos. Los métodos comerciales pueden ser: *DNAzol*<sup>®</sup> *BD* (Molecular Research Center, Inc), *DNeasy*<sup>®</sup> *Blood & Tissue Kits* (Qiagen) o *Maxwell*<sup>®</sup> *RSC Blood DNA Kit* (Promega).

### **c. Extracción de ADN a partir de cultivos celulares *in vitro***

Cuando se desea obtener ADN de células adherentes cultivadas *in vitro*, estas deben despegarse con tripsina y obtener el botón celular por centrifugación (2,500 rpm durante 5 min). En el caso de células no adherentes, el botón celular se obtiene directamente por centrifugación del cultivo. Se deben usar de 2 a  $5 \times 10^6$  células para obtener una buena cantidad de ADN. El botón celular se lava 2 veces con amortiguador de fosfatos antes de iniciar la extracción del ADN, ya sea con el método tradicional de extracción orgánica o con métodos comerciales. Los kits utilizados habitualmente para extracción de ADN de líneas celulares y cultivos primarios de mamífero son: *Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* (Sima-Aldrich), *Genomic DNA Extraction PureLink Kit* (Thermo Scientific).

### Material y equipo necesario

5 mL de sangre periférica en tubo BD vacutainer® con EDTA (proporcionado por el profesor)

Solución de lisis para eritrocitos

PBS

Etanol absoluto

Etanol al 70% (v/v) en agua Milli-Q™

Proteinasa K (20 mg/mL)

ARNasa A (100 mg/mL), opcional.

SDS al 10% (p/v)

Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)

Cloroformo

Acetato de sodio 0.2 M, pH 5.2

Amortiguador Tris EDTA (TE)

Agua Milli-Q™

Kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen) con las siguientes soluciones:

- Amortiguador AL
- Amortiguador AW1
- Amortiguador AW2
- Amortiguador AE

Centrífuga clínica

Microcentrífuga

Vórtex

Microtubos de 1.6 mL, nuevos y estériles

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

Incubadora a 55 °C

Campana de extracción

Hielo/contenedor

Micropipetas y puntas de 200  $\mu$ L y 1,000  $\mu$ L estériles

Congelador a -20 °C

### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consulte las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

👁 Utilice bata y guantes en todo momento.

#### ***a. Extracción de ADN de sangre con el método de extracción orgánica con fenol***

1. Centrifugar los 5 mL de sangre a 2,000 rpm durante 2 min.
2. Eliminar el plasma con la ayuda de una micropipeta.
3. Resuspender la pastilla en 3 mL de solución de lisis para eritrocitos y mezclar 5 veces por inversión.
4. Centrifugar a 2,000 rpm durante 2 min y eliminar el sobrenadante.
5. Repetir de 5 a 8 veces los pasos 3 y 4, hasta que la pastilla esté de color blanco.
6. Resuspender la pastilla en 2 mL de PBS y centrifugar a 1,500 rpm durante 5 min.
7. Eliminar completamente el PBS con la ayuda de una pipeta.
8. Resuspender la pastilla en 1 mL de acetato de sodio 0.2 M, pH 5.2.
9. Adicionar 125  $\mu$ L de SDS al 10% y 10  $\mu$ L de proteinasa K.
10. Mezclar e incubar a 55 °C durante 1 h.
11. En campana de extracción adicionar 600  $\mu$ L de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar durante 10 min.
12. Centrifugar a 3,500 rpm durante 5 min.
13. Recuperar la fase acuosa (superior) en un microtubo.

14. En campana de extracción adicionar 600  $\mu$ L de cloroformo.
  15. Centrifugar a 3,500 rpm durante 5 min.
  16. Recuperar la fase acuosa (superior) en otro microtubo.
  17. Adicionar 2 volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C).
  18. Después de la adición del etanol, la fibra de ADN será visible en el tubo. La fibra debe enrollarse con la ayuda de una punta de 1 mL y colocarlo en otro microtubo.
  19. Adicionar 1.2 mL de etanol al 70% frío y mezclar por inversión 5 veces.
  20. Centrifugar a 12,000 rpm durante 2 min.
  21. Eliminar completamente el etanol con micropipeta.
  22. Secar la pastilla a 55 °C o a temperatura ambiente en un lugar sin flujo de aire (aproximadamente 5 min).
  23. Resuspender en 100  $\mu$ L de TE e incubar a 55 °C durante 1 h.
  24. Almacenar el ADN a -20 °C
- 👁 La concentración y pureza del ADN obtenido será evaluada por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa, como se explica en las prácticas 8 y 9, respectivamente.

***b. Extracción de ADN de sangre con un método comercial utilizando DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)***

1. Tomar 100  $\mu$ L de sangre anticoagulada y colocarlo en un microtubo.
2. Adicionar 20  $\mu$ L de proteinasa K y 100  $\mu$ L de PBS.
3. Adicionar 200  $\mu$ L del amortiguador AL (sin adicionar etanol).
4. Mezclar inmediatamente con vórtex para producir una solución homogénea.
5. Incubar a 55 °C durante 10 min.
6. Adicionar 200  $\mu$ L de etanol absoluto y mezclar con vórtex hasta producir una solución homogénea.
7. Colocar la mezcla dentro de la columna (*DNeasy Mini spin column*), la cual deberá estar previamente colocada en un tubo colector.

8. Centrifugar a 8,000 rpm durante 1 min.
9. Descartar el tubo colector y el líquido en él y colocar la columna en un nuevo tubo colector.
10. Colocar 500  $\mu$ L del amortiguador AW1 dentro de la columna (el amortiguador AW1 debe estar previamente preparado con etanol absoluto).
11. Centrifugar a 8,000 rpm durante 1 min.
12. Descartar el tubo colector y el líquido en él y colocar la columna en un nuevo tubo colector.
13. Colocar 500  $\mu$ L del amortiguador AW2 dentro de la columna (el amortiguador AW2 debe estar previamente preparado con etanol absoluto).
14. Centrifugar a 14,000 rpm durante 3 min para secar la membrana de la columna y evitar tener etanol contaminante en pasos subsecuentes.
15. Si es necesario, se puede descartar el líquido en el tubo colector y centrifugar nuevamente la columna a 14,000 rpm durante 1 min.
16. Colocar cuidadosamente la columna en un microtubo.
17. Colocar 100  $\mu$ L de amortiguador AE dentro de la columna.
18. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
19. Centrifugar a 8,000 rpm durante 1 min para obtener el ADN.
20. Almacenar el ADN a -20 °C.

☞ Si se quiere ADN genómico libre de ARN se pueden adicionar 4  $\mu$ L de ARNasa A (100 mg/mL) e incubar a temperatura ambiente durante 2 min después del paso 2. Posteriormente se debe continuar normalmente con el paso 3.

☞ Para aumentar la cantidad de ADN, es recomendable repetir la elución como se describe en los pasos 17-19. Se puede utilizar el mismo microtubo u otro.

☞ La concentración y pureza del ADN obtenido será evaluada por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa, como se explica en las prácticas 8 y 9, respectivamente.



### Análisis de resultados

Observe y documente los cambios físicos de la muestra durante todo el proceso de extracción y purificación.

Describa las diferencias entre el método de extracción orgánica de ADN y el método de extracción y purificación de ADN con columnas.

Identifique y describa el fundamento de los tratamientos previos a la obtención del ADN dependiendo de las fuentes biológicas.

### Cuestionario

1. ¿Cuál es el fundamento de la extracción orgánica con fenol?
2. ¿Qué papel juega cada uno de los reactivos utilizados en el proceso de extracción y purificación convencional con fenol?
3. Describa el fundamento de la extracción y purificación de ADN por columnas.
4. ¿Qué es la proteinasa K y qué papel juega en la extracción de ADN?
5. Mencione 5 líneas celulares de mamíferos.

### Soluciones

👁 Utilice bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.

- Solución de lisis para eritrocitos,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  150 mM, EDTA 1 mM,  $\text{KHCO}_3$  10 mM (250 mL).

$\text{PM}_{\text{NH}_4\text{Cl}}$  53.45,  $\text{PM}_{\text{EDTA}}$  292.24,  $\text{PM}_{\text{KHCO}_3}$  100.12

Disolver la cantidad exacta de los componentes en 150 mL de agua Milli-Q™, ajustar el volumen a 250 mL. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca. Almacenar a temperatura ambiente.

- PBS: NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7.5 (1 L)

$PM_{NaCl}$  58.44,  $PM_{Na_2HPO_4}$  141.96,  $PM_{KH_2PO_4}$  136.086

Pesar 8 g de NaCl, 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Disolver en 800 mL de agua destilada y ajustar el pH a 7.5 con HCl. Aforar a 1 L con agua Milli-Q™. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca. Almacenar a temperatura ambiente. Antes de usar el ácido clorhídrico, consulte la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- Etanol al 70% (v/v) (50 mL)

Mezclar 35 mL de etanol absoluto grado biología molecular con 15 mL de agua Milli-Q™. Almacenar en un frasco de vidrio con tapón de rosca.

- SDS 10% (p/v) (5 mL)

Disolver 0.5 g de SDS en 4 mL de agua Milli-Q™ y agitar con agitador magnético en un baño de agua a 68 °C para favorecer la disolución. Ajustar el volumen a 5 mL. Guardar a temperatura ambiente.

- Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)

Será proporcionado por el profesor. Antes de usar el fenol y el cloroformo, consulte la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- Acetato de sodio 0.2 M, pH 5.2 (50 mL)

$PM_{Acetato\ de\ sodio}$  82.03

Disolver 0.82 g de acetato de sodio en 30 mL de agua destilada, ajustar el pH a 5.2 con ácido acético glacial y ajustar el volumen a 50 mL. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca. Almacenar a temperatura ambiente. Antes de usar

el ácido acético, consulte la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- EDTA 0.5 M, pH 8.0 (250 mL)

$PM_{EDTA}$  292.24

Agregar 46.52 g de EDTA en 150 mL de agua Milli-Q™, agitar vigorosamente con una barra magnética y ajustar el pH a 8.0 con NaOH (alrededor de 5 g de NaOH). Ajustar a un volumen de 250 mL. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca. Antes de usar el hidróxido de sodio, consulte la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- Amortiguador de Tris-HCl 1 M, pH 7.6 (100 mL)

$PM_{TrisHCl}$  121.14

Disolver 12.1 g de Tris base en 80 mL de agua Milli-Q™, ajustar el pH a 7.6 agregando alrededor de 4 mL de HCl concentrado. Ajustar el volumen a 100 mL. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca. Si al momento de utilizar esta solución tiene color amarillo, será necesario preparar una nueva. Antes de usar el ácido clorhídrico, consulte la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- TE (40 mL)

Calcular los volúmenes requeridos de las soluciones *stock* para preparar 40 mL de TE a las siguientes concentraciones finales:

- Amortiguador de Tris-HCl 10 mM, pH 7.6
- EDTA 1 mM

Almacenar a temperatura ambiente en un frasco de vidrio con tapón de rosca y esterilizar por autoclave.

- Proteinasa K (20 mg/mL)

Disolver 20 mg en 1 mL de agua destilada estéril en un microtubo de 1.6 mL estéril. Almacenar a 4 °C.

- ARNasa A (100 mg/mL)

Será proporcionada por el profesor. Descongelar, homogenizar y mantener en hielo.

### Referencias

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Estados Unidos: Wiley; 2003.

Janecka A, Adamczyk A, Gasińska A. Comparison of eight commercially available kits for DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. Anal Biochem; 2015; 476: 8-10.

Qiagen. DNeasy® Blood & Tissue Handbook. Disponible en: [http://diagnostics1.com/MANUAL/General\\_Qiagen.pdf](http://diagnostics1.com/MANUAL/General_Qiagen.pdf). Consultado agosto 19, 2017.

## Práctica 2. Aislamiento de ADN genómico de levadura por el método de fenol cloroformo

### Objetivos

1. Conocer los principales pasos para la obtención de ADN genómico a partir de una muestra biológica.
2. Obtener ADN genómico de levadura mediante un protocolo rápido de extracción con fenol y precipitación con etanol.
3. Explicar cada una de las etapas del protocolo.

### Introducción

La extracción y purificación de los ácidos nucleicos es el primer paso en la mayoría de los estudios de Biología Molecular. Para manipular o amplificar el ADN es necesario eliminar otros componentes celulares que pueden interferir con los experimentos, como proteínas, ARN y lípidos, sin dañar al ADN. El primero en aislar y purificar el ADN fue el químico suizo Johann Friedrich Miescher (1844-1895). En 1869, Miescher aisló varias moléculas ricas en fosfatos a partir del núcleo de los glóbulos blancos, las cuales llamó “nucleínas” (ácidos nucleicos). El protocolo original de Miescher era burdo y el ADN obtenido no era puro. La contaminación con proteínas era una de sus preocupaciones, por lo que modificó su protocolo agregando pepsina, una proteasa para digerir las proteínas presentes. Actualmente existen varios métodos para la extracción y purificación del ADN (Sambrook *et al.*, 2012), los cuales son seleccionados según:

- El tipo de ADN a extraer (ADN genómico, ADN mitocondrial, ADN plasmídico, etc.).

- El organismo de donde se extraerá (células animales, plantas, levaduras, bacterias, virus, etc.).
- El material de donde se va a extraer (órganos completos, tejidos, cultivos celulares, sangre, muestras ambientales, etc.).
- Los resultados deseados (rendimientos, pureza, tiempo de purificación, etc.).
- La aplicación posterior (amplificación, clonación, etc.).

### **a. Obtención de extractos celulares**

La obtención de ADN a partir de materiales biológicos requiere la homogeneización de los tejidos, en su caso, el lisado de las células y la inactivación de las nucleasas celulares que podrían digerir el ADN. Esto asegura que la cantidad de ADN intacto obtenido sea la máxima. La homogeneización y la lisis celular deben ser lo suficientemente fuertes para romper el tejido, la pared y las membranas celulares, pero ser suave para preservar el ADN. Los procesos más comunes son:

- Disrupción mecánica, por ejemplo, molienda, ruptura hipotónica o congelación-descongelación.
- Tratamiento químico, por ejemplo, la lisis con detergentes o agentes caotrópicos.
- Digestión enzimática, con enzimas hidrolíticas para romper la pared celular, como son lisozima, mutanolisina, zimolasa, liticasa o proteinasa K.

La ruptura celular y la inactivación de las nucleasas intracelulares deben ser simultáneas. Se puede utilizar una solución con detergentes para solubilizar las membranas celulares y sales caotrópicas fuertes para inactivar las nucleasas. El ADN y otros componentes celulares como lípidos, azúcares y proteínas, se disuelven en la solución de lisis. El ADN tiene carga negativa debido a los grupos fosfato de su estructura, y esta carga eléctrica es lo que hace soluble a esta molécula.

### **b. Extracción y purificación del ADN**

Uno de los métodos más comunes combina la separación de biomoléculas de acuerdo a su polaridad mediante extracción orgánica extracción y la precipitación de biomoléculas mediante la adición de alcoholes:

- Extracción con solventes para eliminar contaminantes. Un ejemplo es la combinación de fenol y cloroformo para eliminar proteínas y lípidos.
- Precipitación de los ácidos nucleicos con isopropanol o etanol, dado que el ADN es insoluble en altas concentraciones de sal y alcohol. El ADN precipitado forma unas finas hebras blancas, mientras que el resto de las sustancias permanecen disueltas (Herráez, 2012).

### **Material y equipo necesario**

Tubos de cultivo estériles (16 x 150 mm) con tapa de rosca

Medio YPD

Pipetas de vidrio graduadas de 5 mL estériles y propipeta

Asa microbiológica

Campana de flujo laminar

Campana de extacción

Incubadora a 30 °C con agitación orbital

Cultivo de levadura en medio sólido

Micropipetas y puntas de 200  $\mu$ L y 1,000  $\mu$ L estériles

Microtubos de 1.6 mL, nuevos y estériles

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

STES

Perlas de vidrio de ~0.4 mm de diámetro estériles

Amortiguador Tris EDTA (TE)

Fenol:cloroformo (1:1)

Etanol absoluto

Etanol al 70% (v/v)

Acetato de sodio 3 M pH 5.2

Microcentrífuga

Vórtex

Hielo/contenedor

Agua destilada

Agua Milli-Q™

Congelador a -20 °C

### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consultar las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

👁 Utilizar bata y guantes en todo momento.

#### ***El día anterior a la práctica:***

1. Bajo condiciones de asepsia, inocular una asada de levadura en un tubo de cultivo de vidrio con 5 mL de medio YPD y dejar otro tubo de cultivo sin inocular como control.
2. Incubar a 30 °C durante toda la noche (14-16 h) con agitación orbital de 120 rpm.

#### ***El día de la práctica:***

1. Transferir 1.5 mL de cultivo a un microtubo de 1.6 mL en duplicado.
2. Centrifugar a 14,000 rpm durante 3 min colocando siempre las uniones de las tapas de los tubos hacia la parte externa del rotor.



3. Remover completamente el medio de cultivo de cada tubo con la ayuda de una micropipeta. Si es necesario, volver a centrifugar durante 30 s.
4. Resuspender perfectamente cada una de las pastillas en 50  $\mu\text{L}$  de STES mediante vórtex.
5. Agregar  $\approx 50$   $\mu\text{L}$  de perlas de vidrio y 20  $\mu\text{L}$  de TE a cada tubo.
6. En campana de extracción, agregar 60  $\mu\text{L}$  de fenol:cloroformo a cada tubo y agitar por vórtex durante 1 min.
  - El fenol es extremadamente tóxico y debe trabajarse en campana de extracción (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).
7. Centrifugar los tubos a 14,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente.
8. Recuperar las fases acuosas (superior) en dos microtubos.
9. Añadir dos volúmenes de etanol absoluto y 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M a cada tubo. Agitar por inversión y dejar reposar por 15 min en hielo.
10. Recuperar los precipitados por centrifugación a 14,000 rpm durante 10 min a 4 °C.
11. Remover los sobrenadantes por aspiración y enjuagar las pastillas con 1 mL de etanol al 70%.
12. Centrifugar los tubos a 13,000 rpm durante 5 min.
13. Eliminar los sobrenadantes por inversión lenta de los tubos con cuidado de no desprender las pastillas de ADN.
14. Agregar 1 mL de etanol 70% a cada tubo. Mezclar invirtiendo los tubos varias veces.
15. Centrifugar a 13,000 rpm durante 5 min.
16. Eliminar los sobrenadantes (ver punto 13) y secar las pastillas en un evaporador al vacío o al aire invirtiendo los tubos sobre un papel absorbente.
17. Disolver las pastillas suavemente sin vórtex en 50  $\mu\text{L}$  de TE.
18. Almacenar el ADN a -20 °C

👁️ La concentración y pureza del ADN obtenido será evaluada por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa, como se explica en las prácticas 8 y 9, respectivamente.

### **Análisis de resultados**

Observar y documentar los cambios físicos de la muestra durante todo el proceso de extracción y purificación.

Describir la diferencia entre las pastillas obtenidas de la centrifugación de la levadura, de la levadura lisada y después de la precipitación y lavado con etanol.

Explicar por qué es recomendado colocar los microtubos que se van a centrifugar con la unión de la tapa hacia la parte externa del rotor.

### **Cuestionario**

1. Mencionar dos medios de cultivo diferentes al YPD que podría utilizar para propagar levaduras.
2. ¿Qué son las nucleasas?
3. ¿Qué son la lisozima, la mutanolisina, la zimolasa, la liticosa y la proteinasa K?
4. ¿Qué papel juega cada uno de los reactivos utilizados en el proceso de extracción y purificación?
5. ¿Por qué se recupera el ADN en la fase acuosa después de la extracción con fenol:cloroformo?
6. Describir cuál es el objetivo de cada una de las siguientes etapas:
  - Lavado de las células
  - Adición de STES
  - Adición de fenol:cloroformo
  - Precipitación con etanol

## Soluciones

👁 Utilizar bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.

- Medio YPD (250 mL)

Mezclar 5 g de peptona, 2.5 g de extracto de levadura y 5 g de dextrosa en 250 mL de agua destilada. Esterilizar por autoclave y guardar a temperatura ambiente.

- EDTA 0.5 M, pH 8.0 (250 mL)

$PM_{EDTA}$  372.24

Agregar 46.52 g de EDTA en 150 mL de agua Milli-Q™, agitar vigorosamente con una barra magnética y ajustar el pH a 8.0 con NaOH (alrededor de 5 g de NaOH). Ajustar a un volumen de 250 mL. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca. Antes de usar el hidróxido de sodio, consultar la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- Amortiguador de Tris-HCl 1 M, pH 7.6 (100 mL)

$PM_{Tris}$  121.14

Disolver 12.1 g de Tris base en 80 mL de agua Milli-Q™, ajustar el pH a 7.6 agregando alrededor de 4 mL de HCl concentrado. Ajustar el volumen a 100 mL. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca. Si al momento de utilizar esta solución tiene color amarillo, será necesario preparar una nueva. Antes de usar el ácido clorhídrico, consultar la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- NaCl 5 M (50 mL)

$PM_{NaCl}$  58.44

Disolver 14.61 g de NaCl en 35 mL de agua Milli-Q™, agitar vigorosamente con una barra magnética y ajustar el volumen a 50 mL. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca. Guardar a temperatura ambiente.

- SDS 10% (p/v) (5 mL)

Disolver 0.5 g de SDS en 4 mL de agua Milli-Q™ y agitar con agitador magnético en un baño de agua a 68 °C para favorecer la disolución. Ajustar el volumen a 5 mL. Guardar a temperatura ambiente.

- STES (40 mL)

Calcular los volúmenes requeridos de las soluciones *stock* para preparar este amortiguador a las siguientes concentraciones finales (en agua Milli-Q™):

- Amortiguador de Tris-HCl 0.2 M, pH 7.6
- NaCl 0.5 M
- EDTA 10 mM
- SDS 0.1% (p/v)

Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca y conservar a 4 °C.

- TE (40 mL).

Calcular los volúmenes requeridos de las soluciones *stock* para preparar 40 mL de TE a las siguientes concentraciones finales:

- Amortiguador de Tris-HCl 10 mM, pH 7.6
- EDTA 1 mM

Almacenar a temperatura ambiente en un frasco de vidrio con tapón de rosca y esterilizar por autoclave.

- Acetato de sodio 3 M, pH 5.2 (10 mL)

$PM_{\text{Acetato de sodio}} 82.03$

Disolver 2.46 g de acetato de sodio en 7 mL de agua destilada, ajustar el pH a 5.2 con ácido acético glacial y ajustar el volumen a 10 mL. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca. Antes de usar el ácido acético, consultar la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- Fenol:cloroformo (1:1)

Será proporcionado por el profesor y deberá mantenerse en hielo. Antes de usar el fenol y el cloroformo, consultar la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

### Referencias

Sambrook J, Fritsch, EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4a ed. Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.

Herráez A. Texto ilustrado e interactivo de Biología molecular e Ingeniería genética. 2a ed. España: Elsevier; 2012.

## Práctica 3. Aislamiento de ADN genómico de bacterias y levaduras en columnas de sílica

### Objetivos

1. Describir los principales pasos para la obtención de ADN genómico a partir de un cultivo microbiano.
2. Conocer diferentes métodos comunes de purificación de ADN.
3. Obtener el ADN genómico de una bacteria gram positiva, una gram negativa y una levadura mediante un protocolo con kit comercial basado en el uso de una membrana de sílica.
4. Explicar cada una de las etapas del protocolo.

### Introducción

La obtención de ADN genómico microbiano altamente puro es requerida para diferentes aplicaciones como la secuenciación de genomas o la identificación y tipificación molecular de los microorganismos, entre otras.

Los pasos básicos de la extracción y purificación de ADN genómico a partir de cultivos microbianos son la obtención de una pastilla de biomasa por centrifugación, seguido de la lisis celular para liberar el ADN, la separación de proteínas y restos celulares (membranas) y finalmente el aislamiento, purificación y concentración del ADN.

Existen diferentes kits comerciales para aislar ADN genómico a partir de diferentes fuentes, los cuales son rápidos y además prescinden del uso de solventes orgánicos peligrosos como el fenol y el cloroformo. La presencia de fenol y cloroformo residual en las preparaciones de ADN puede afectar algunas aplicaciones posteriores como la PCR o la secuenciación.

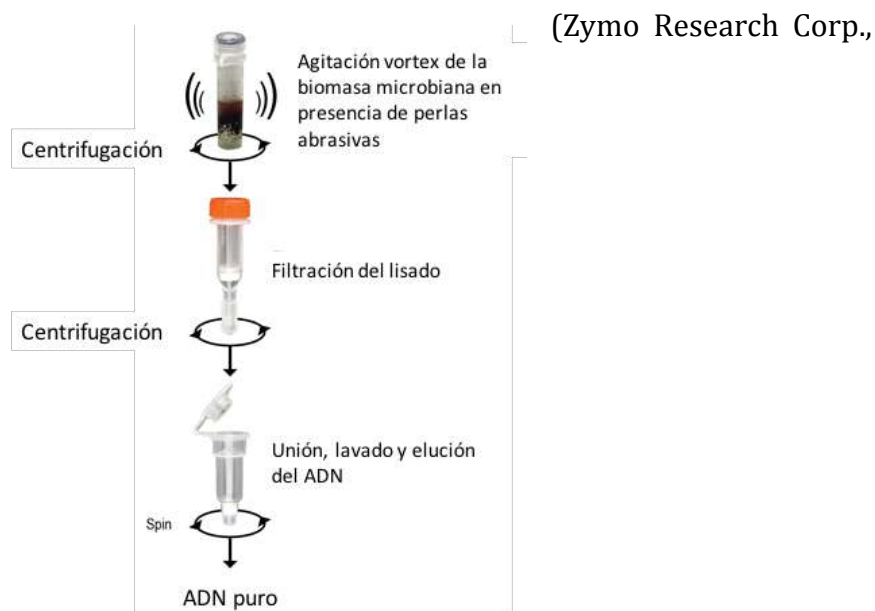
La extracción de los ácidos nucleicos a partir de cultivos microbianos requiere romper las células y al mismo tiempo inactivar las nucleasas celulares que podrían digerir el ADN. Las bacterias y los hongos poseen una pared celular que es una capa rígida protectora fuera de la membrana plasmática que da también forma a los microorganismos. Debido a las características de su pared, algunos microorganismos pueden ser difíciles de lisar como es el caso de las bacterias gram positivas y de algunos hongos (levaduras).

La pared celular bacteriana contiene un polímero característico llamado péptidoglicano, formado por la unión de los monosacáridos N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico en cadenas de diez a 65 azúcares, a su vez unidas por un péptido generalmente de cuatro aminoácidos. En las bacterias gram positivas, la capa de péptidoglicano es de 20 a 80 nm mientras que en bacterias gram negativas es solo de dos a siete nm. En cuanto a los hongos, un largo polímero de N-acetilglucosamina llamado quitina es el componente principal de la pared. Las diferentes cadenas de quitina se asocian mediante la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares produciendo un material muy resistente. Los hongos contienen entre 1 y 15% de quitina en su pared mientras que las levaduras, un tipo de hongo unicelular con un metabolismo fermentativo, contienen 1 a 2% de quitina en su pared (Madigan *et al.*, 2015).

Las células microbianas son generalmente lisadas mediante una combinación de fuerza mecánica con esferas abrasivas, calor, detergentes y enzimas líticas como proteasas o enzimas que degradan la pared celular, liberando el ADN y otros componentes celulares como lípidos, azúcares y proteínas, en la solución de lisis. Usualmente se adicionan también sales caotrópicas como el cloruro de guanidinio para desnaturalizar las proteínas con la consecuente inactivación de las nucleasas desde la primera etapa del protocolo. Los protocolos de purificación de ADN genómico microbiano con kits comerciales se basan generalmente en la adsorción selectiva de los ácidos nucleicos en minicolumnas de sílica en presencia de altas

concentraciones de ciertas sales, mientras que otras moléculas presentes en el extracto celular (principalmente proteínas y lípidos) no se adsorben. Este proceso es un tipo de cromatografía de adsorción en el cual los iones caotrópicos desplazan las moléculas de agua que rodean a los ácidos nucleicos y crean un entorno hidrofóbico alrededor del ADN permitiendo su unión a las membranas de sílica. Los ácidos nucleicos son posteriormente eluidos con agua o un amortiguador acuoso que recrea la capa hidratante alrededor del ADN permitiendo su desprendimiento de la membrana. La Figura 1 muestra los pasos del protocolo con el kit comercial utilizado en esta práctica

(Zymo Research Corp., 2017).



**Figura 1. Principales pasos de la purificación de ADN genómico con kit comercial.**

### Material y equipo necesario

Tubos de cultivo estériles (16 x 150 mm) con tapa de rosca



Cultivos de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* en sus respectivos medios sólidos

Medio YPD

Caldo nutritivo

Pipetas de vidrio graduadas de 5 mL estériles y propipeta

Asa microbiológica

Campana de flujo laminar

Incubadora a 30 °C con agitación orbital

Micropipetas y puntas de 200 µL y 1,000 µL estériles

Microtubos de 1.6 mL nuevos y estériles

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

Microcentrífuga

Vórtex

Hielo/contenedor

Agua destilada

Agua Milli-Q™

Congelador a -20 °C

Kit *Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep* (Zymo Research:  
<https://www.zymoresearch.eu>) con:

- Solución de lisis
- Amortiguador de unión
- Amortiguador de pre-lavado
- Amortiguador de lavado
- Amortiguador de elución
- Columnas y filtros Zymo-Spin
- Tubos colectores

### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consulte las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

- Utilice bata y guantes en todo momento.

#### ***El día anterior a la práctica:***

1. Bajo condiciones de asepsia, inocular las bacterias (*B. subtilis* y *E. coli*) y la levadura (*S. cerevisiae*) en sus respectivos tubos de cultivo con 5 mL de caldo nutritivo y medio YPD, respectivamente. Incluir controles negativos sin inocular.
2. Incubar a 30 °C durante toda la noche (14-16 h) con agitación orbital de 150 rpm.

#### ***El día de la práctica:***

1. Transferir 1.5 mL de cada cultivo a microtubos de 1.6 mL por duplicado.
2. Centrifugar a 13,000 rpm durante 1 min.
3. Remover completamente el medio de cultivo con la ayuda de una micropipeta. Si es necesario, volver a centrifugar durante 30 s para eliminar todo el líquido.
4. Resuspender las pastillas en 200 µL de agua Milli-Q™ mediante vórtex y pasarlas a tubos de lisis ZR BashingBead™.
5. Agregar 750 µL de solución de lisis a cada tubo.
6. Lisar las células mediante agitación con vórtex durante 5 min.
7. Centrifugar a 13,000 rpm durante 1 min.
8. Transferir 400 µL de los sobrenadantes a filtros de centrifuga Zymo-Spin™ IV (tapa naranja), colocados en tubos colectores, depositando la muestra en el centro de los filtros sin tocarlos.
9. Centrifugar a 7,000 rpm durante 1 min y desechar los filtros.

10. Agregar 1,200  $\mu\text{L}$  de amortiguador de unión a ADN a los filtrados en los tubos colectores y agitar mediante pipeteo repetido de un mismo volumen (800  $\mu\text{L}$ ).
  11. Transferir 800  $\mu\text{L}$  de cada mezcla a columnas Zymo-Spin™ IIC (tapa transparente incluida) colocados en tubos colectores.
  12. Centrifugar a 13,000 rpm durante 1 min.
  13. Desechar el líquido filtrado en los tubos colectores y repetir los pasos 11 y 12.
  14. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de amortiguador de pre-lavado a cada columna colocada en un nuevo tubo colector.
  15. Centrifugar a 13,000 rpm durante 1 min.
  16. Desechar el líquido filtrado y volver a colocar las columnas en los mismos tubos colectores.
  17. Agregar 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lavado a cada columna.
  18. Centrifugar a 13,000 rpm durante 1 min.
  19. Desechar el líquido filtrado y volver a colocar las columnas en los mismos tubos colectores.
  20. Centrifugar a 13,000 rpm durante 30 s.
  21. Transferir las columnas a microtubos de 1.6 mL y agregar 50  $\mu\text{L}$  de amortiguador de elución en el centro de la matriz de cada columna, sin tocarlas.
  22. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
  23. Centrifugar a 13,000 rpm durante 1 min para eluir el ADN.
  24. Almacenar el ADN a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 👁️ La concentración y pureza del ADN obtenido será evaluada por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa, como se explica en las prácticas 8 y 9, respectivamente.

### Análisis de resultados

Observar y documentar los cambios físicos de la muestra durante todo el proceso de extracción y purificación.

Describir detalladamente los fundamentos de cada paso realizado durante el aislamiento del ADN genómico con el kit utilizado.

Explique cómo podría comparar la calidad y la cantidad de ADN de levadura obtenido en la práctica anterior por el método tradicional y el obtenido aquí, siguiendo los protocolos descritos en la práctica 8.

### Cuestionario

1. ¿Qué enzimas se pueden utilizar para romper la pared de bacterias y cuáles son sus modos de acción?
2. ¿Qué enzimas se pueden utilizar para romper la pared de levaduras y cuáles son sus modos de acción?
3. Explicar lo que es un agente caotrópico.
4. Explicar de qué forma los siguientes criterios son importantes para lograr una buena extracción y purificación de ADN genómico de cualquier fuente: (1) extracción eficiente; (2) cantidad de ADN purificado suficiente; (3) remoción de contaminantes; (4) integridad del ADN.
5. Enlistar los factores que pueden influir en la selección de un kit comercial para la purificación de ADN genómico microbiano: (1) a partir de cultivos líquidos puros; (2) a partir de colonias en medio sólido; (3) a partir de superficies contaminadas; (4) a partir de heces y (5) a partir de suelos.

### Soluciones

👁 Utilizar bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.

- Medio YPD (250 mL)

Mezclar 5 g de peptona, 2.5 g de extracto de levadura y 5 g de dextrosa en 250 mL de agua destilada. Esterilizar por autoclave y guardar a temperatura ambiente.

- Caldo nutritivo (100 mL)

Mezclar 0.5 g de peptona y 0.3 g de extracto de carne en 100 mL de agua destilada. Esterilizar por autoclave y guardar a temperatura ambiente.

### Referencias

Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA, Brock T. Brock Biology of microorganisms. 14a ed. Estados Unidos: Pearson; 2015.

Zymo Research Corp. *Quick-DNA™* Fungal/Bacterial Miniprep Kit. Disponible en: <http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/88/d6005i.pdf>. Consultado octubre 20, 2017.

## Práctica 4. Extracción de ADN plasmídico “Miniprep” por lisis alcalina

### Objetivos

1. Conocer los fundamentos de la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina a partir de un cultivo de *Escherichia coli* (*E. coli*).
2. Explicar las diferentes etapas de la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina a partir de un cultivo de *E. coli*.
3. Realizar la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina a partir de un cultivo de *E. coli*.

### Introducción

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico, generalmente circular, de doble cadena, que se replican de manera independiente al ADN cromosómico. Los plásmidos aparecen de forma natural en las bacterias. Su tamaño varía entre 1 y más de 1,000 kpb. En bacterias, los plásmidos se asocian con la conjugación, (un mecanismo de transferencia horizontal de genes), con la resistencia a antibióticos, metales pesados, patogenicidad o biodegradación de compuestos. Los plásmidos utilizados en ingeniería genética se denominan vehículos o vectores y pueden ser utilizados para la clonación, clonación secundaria (o subclonación) o la expresión de genes, así como vector naveta (*shuttle*) para transferir un gen de un organismo a otro, entre otras aplicaciones.

El principal reto en la obtención de ADN plasmídico es la separación de éste del ADN genómico y del ARN de la bacteria. Se han desarrollado protocolos que producen extractos celulares en los que no solamente se eliminan proteínas y lípidos, sino que

también se elimina el ADN genómico, obteniéndose sólo el ADN plasmídico libre en solución. Dentro de estos protocolos se encuentran la desnaturalización alcalina con SDS, la precipitación sal-SDS y la ebullición rápida.

La desnaturalización alcalina con SDS es uno de los métodos más utilizados para obtener pequeñas cantidades de ADN plasmídico parcialmente purificado. Estas mini-preparaciones, llamadas “minipreps”, son generalmente utilizadas para analizar colonias recombinantes. Este método se basa en las diferencias que existen entre las propiedades de desnaturalización y renaturalización del ADN plasmídico y del ADN cromosómico (Sambrook *et al.*, 2012).

Bajo condiciones alcalinas (pH >11), tanto el ADN cromosómico como el ADN plasmídico son eficientemente desnaturalizados. La posterior neutralización rápida con ácido acético en presencia de SDS y altas concentraciones de sales, como el acetato de potasio, permite la formación de puentes de hidrógeno entre las bases de las cadenas sencillas y la renaturalización selectiva del ADN plasmídico. La renaturalización rápida del ADN plasmídico es posible debido a su menor tamaño, mientras que las bases en largos tramos de ADN cromosómico no pueden renaturalizarse correctamente. En este punto es importante que no se fragmente el ADN cromosómico por exceso de agitación de la muestra, ya que los fragmentos más cortos podrían aparearse y contaminar el ADN plasmídico (Ehrt y Schnappinger, 2003).

La sal de potasio del SDS es insoluble, por lo que parte de las proteínas y el detergente se agregan y precipitan, ayudando también a atrapar los fragmentos de ADN cromosómico de alto peso molecular. La separación de las fracciones solubles (ADN plasmídico) e insolubles (ADN cromosómico y desechos celulares) se lleva a cabo por centrifugación, obteniéndose así sólo el ADN plasmídico en solución, el cual es finalmente recuperado por precipitación con etanol (Figura 1).

Existen diferentes métodos para purificar el ADN plasmídico así obtenido, dentro de ellos se encuentran la adsorción selectiva sobre sílica en presencia de altas

concentraciones de sales o la cromatografía de intercambio iónico con membranas de celulosa modificada con grupos dietilaminoetilo.

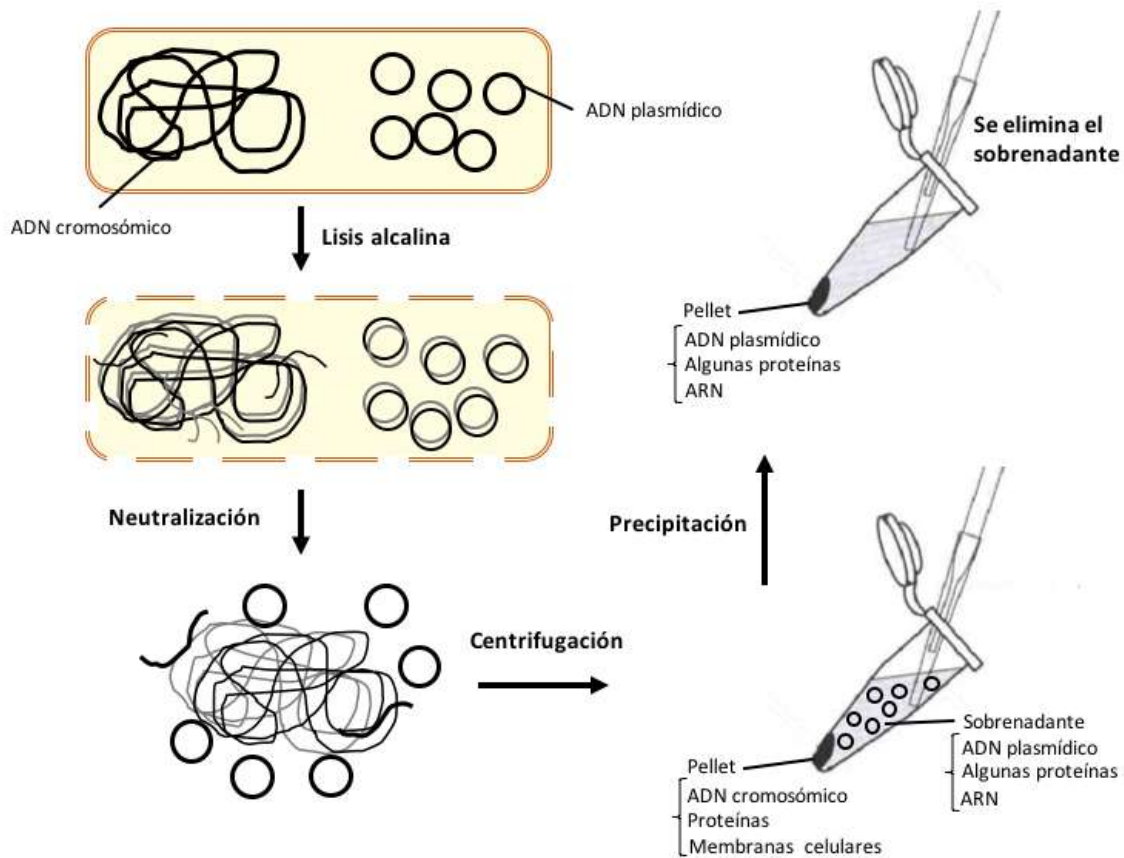


Figura 1. Obtención de ADN plasmídico por lisis alcalina con SDS.

### Material y equipo necesario

Cepa de *E. coli* transformada con un plásmido con resistencia a ampicilina (proporcionada por el profesor)

Medio 2YT

Ampicilina (100 mg/mL)

Solución Miniprep 1

Solución Miniprep 2



Solución Miniprep 3

NaOH 10 N

SDS 10% (p/v)

Agua Milli-Q™

Fenol:cloroformo (1:1)

Campana de extracción

Etanol absoluto

Etanol al 70% (v/v)

Acetato de sodio 3 M, pH 5.2

ARNasa A (10 µg/mL)

Hielo/contenedor

Microtubos de 1.6 mL, nuevos y estériles

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

Incubadora a 37 °C con agitación orbital

Asa microbiológica

Campana de flujo laminar

Microcentrífuga

Vórtex

Micropipeta y puntas de 200 µL y 1,000 µL estériles

Tubos de cultivo estériles (16 × 150 mm) con tapa de rosca

Pipetas de vidrio graduadas de 5 mL estériles

Propipeta para pipetas de vidrio

Congelador a -20 °C

### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consultar las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

- Utilizar bata y guantes en todo momento.

#### ***El día anterior a la práctica:***

1. Inocular la cepa de *E. coli* en tubos de cultivo con 5 mL de medio 2YT con ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL y preparar un tubo control sin inocular.
2. Incubar a 37 °C durante toda la noche (14-16 h) con agitación orbital de 200 rpm.

#### ***El día de la práctica:***

Antes de comenzar, preparar 2 mL de la Solución Miniprep 2 a partir de las soluciones *stock* concentradas:

- NaOH 0.2 N
- SDS 1%

Aforar a 2 mL con agua Milli-Q™ y dejar a temperatura ambiente. Antes de usar el hidróxido de sodio, revisa la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

1. Verter 1.5 mL del cultivo de *E. coli* en tres microtubos.
2. Centrifugar a 13,500 rpm durante 1 min.
3. Eliminar completamente el medio de cultivo con la ayuda de una micropipeta de 1,000 µL. Centrifugar nuevamente durante 1 min y quitar el medio de cultivo restante con la ayuda de una micropipeta de 200 µL.
4. Agregar 100 µL de la Solución Miniprep 1 fría a cada microtubo, agitar con vórtex hasta resuspender la pastilla.

5. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de la Solución Miniprep 2 a cada microtubo, mezclar invirtiendo rápidamente el microtubo 10 veces. Dejar en hielo.
6. En campana de extracción, agregar 150  $\mu\text{L}$  de la Solución Miniprep 3 fría a cada microtubo, mezclar con vórtex hasta resuspender. Dejar reposar en hielo durante 5 min.
  - La solución Miniprep 3 contiene ácido acético. El ácido acético es peligroso por inhalación y debe trabajarse en campana de extracción (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).
7. Centrifugar a 13,500 rpm durante 5 min.
8. Recuperar los sobrenadantes en otros microtubos. Evitar acarrear el precipitado.
9. En campana de extracción, añadir un volumen ( $\approx 450 \mu\text{L}$ ) de fenol:cloroformo 1:1 a cada microtubo y agitar con vórtex durante 1 min.
  - El fenol es extremadamente tóxico y debe trabajarse en campana de extracción (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).
10. Centrifugar a 13,500 rpm durante 2 min.
11. Recuperar la fase acuosa (fase superior) en otros microtubos. Evitar acarrear o tocar la interfase.
12. Añadir 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto con respecto al volumen de fase acuosa.
13. Agitar 10 veces por inversión y dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 min.
14. Centrifugar a 13,500 rpm durante 10 min.
15. Eliminar completamente los sobrenadantes por inversión, cuidando de no perder las pastillas.
16. Lavar las pastillas con 1,000  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, agitando los microtubos por inversión 5 veces.
17. Centrifugar a 13,500 rpm durante 5 min.

18. Eliminar completamente los sobrenadantes por inversión, cuidando de no perder las pastillas.
  19. Secar al aire durante aproximadamente 10 min (invertir el tubo con un ángulo de 45° sobre papel absorbente). En su caso, retirar las gotas de etanol al 70% con la ayuda de una micropipeta de 200  $\mu$ L para facilitar el secado.
  20. Resuspender cada pastilla en 50  $\mu$ L de solución de ARNasa A (10  $\mu$ g/mL) mediante vórtex e incubar a 37 °C durante 30 min.
  21. Almacenar las “minipreps” a -20 °C.
- 👁 La concentración y pureza del ADN obtenido será evaluada por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa, como se explica en las prácticas 8 y 9, respectivamente.

### **Análisis de resultados**

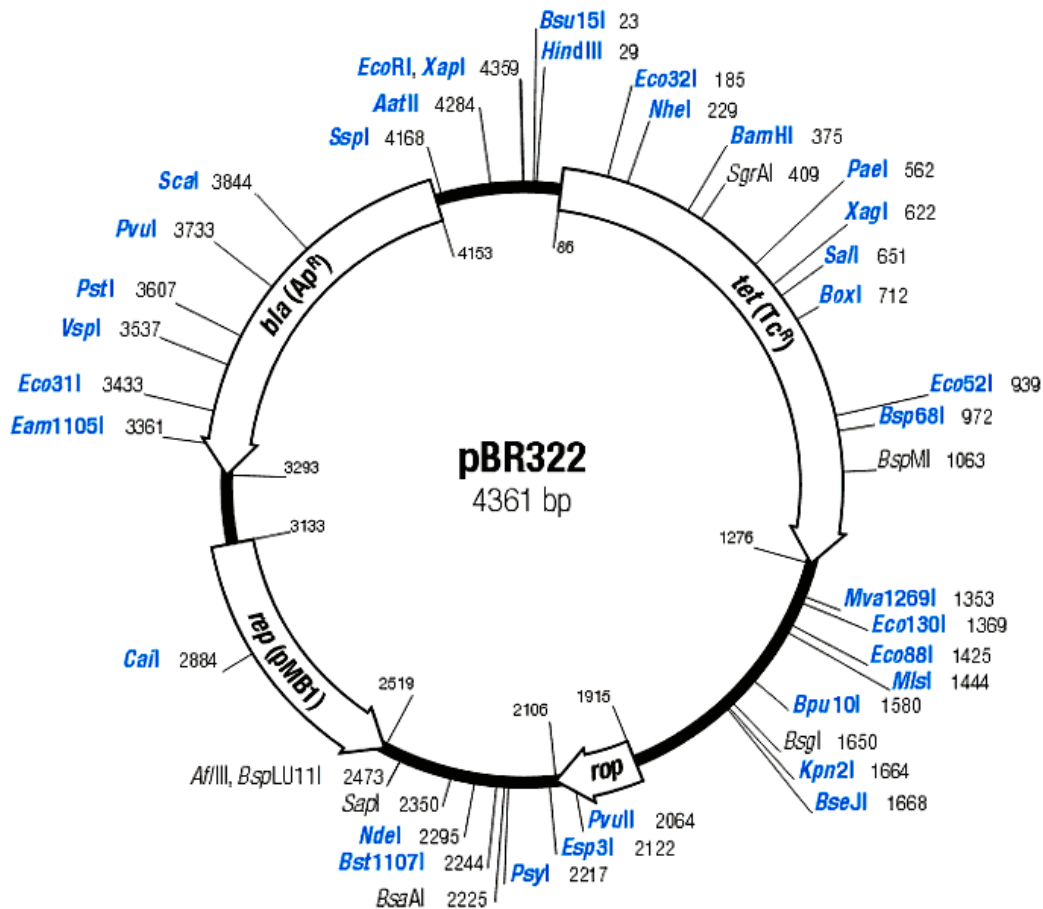
Observar y documentar los cambios físicos de la muestra durante todo el proceso de extracción y purificación.

Describir la diferencia entre las pastillas obtenidos de la centrifugación de las bacterias (paso tres), de las bacterias lisadas (paso ocho) y de la obtención de los ácidos nucleicos (paso 18).

### **Cuestionario**

1. ¿Por qué se le agrega un antibiótico al medio de cultivo para la propagación de la cepa de *E. coli* que contiene el plásmido?
2. Enliste y explique los fundamentos de cada una de las etapas de extracción y purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina.
3. ¿Por qué se debe evitar acarrear el precipitado en el paso ocho?
4. ¿Por qué se debe evitar acarrear la interfase en el paso 11?

5. A continuación se muestra el mapa del plásmido pBR322. Se indican los sitios de corte de diversas enzimas de restricción. Se indica también la posición y tamaño de



algunos genes como *bla* y *tet*.

- ¿Para qué codifican los genes *bla* y *tet*?
- ¿Cuáles son los tamaños de estos genes?
- Si se clona un gen en el sitio *Bam*HI, ¿tendrá el plásmido recombinante resistencia a la tetraciclina?

### Soluciones

- Utilizar bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.

- Medio 2YT (250 mL)

Mezclar 4 g de triptona, 2.5 g de extracto de levadura y 1.25 g de NaCl en 200 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7 con NaOH 5 M. Ajustar el volumen a 250 mL con agua destilada. Esterilizar por autoclave y guardar a temperatura ambiente.

- Ampicilina (100 mg/mL)

Disolver 1 g de ampicilina en 10 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración con jeringa y filtro estéril. Repartir en microtubos de 1.6 mL estériles (1 mL de solución de ampicilina por tubo). Guardar a -20 °C.

- Glucosa 1 M (10 mL)

$PM_{\text{Glucosa}} 180.16$

Disolver 1.8 g de glucosa en agua Milli-Q™ y esterilizar por autoclave.

- Amortiguador de Tris-HCl 1 M pH 8 (100 mL)

$PM_{\text{Tris-HCl}} 121.14$

Disolver 12.1 g de Tris base en 80 mL de agua Milli-Q™. Ajustar a pH de 8 agregando alrededor de 4 mL de HCl concentrado. Dejar enfriar la solución a temperatura ambiente. Ajustar el volumen a 100 mL. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca. Si al momento de utilizar esta solución tiene color amarillo, será necesario preparar una nueva. Antes de usar el ácido clorhídrico, consultar la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- EDTA 0.5 M, pH 8.0 (250 mL)

$PM_{\text{EDTA}} 372.24$

Agregar 46.52 g de EDTA en 150 mL de agua Milli-Q™, agitar vigorosamente con una barra magnética y ajustar el pH a 8.0 con NaOH (alrededor de 5 g de NaOH). Ajustar a un volumen de 250 mL. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de

rosca. Antes de usar el hidróxido de sodio, consultar la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- Solución Miniprep 1

Calcular los volúmenes requeridos de las soluciones *stock* para preparar el volumen deseado de solución a las siguientes concentraciones finales en agua Milli-Q™. Esterilizar por autoclave. Guardar a 4 °C.

- Glucosa 50 mM
- Amortiguador de Tris-HCl 25 mM pH 8.0
- EDTA 10 mM pH 8.0

- NaOH 10 N (5 mL)

$PM_{\text{NaOH}} 40$

Preparar esta solución con precaución. Agregar con cuidado 2 g de NaOH en 3 mL de agua Milli-Q™, agitar continuamente. Colocar el vaso de precipitado en hielo. Cuando el NaOH se haya disuelto, aforar a 5 mL. Guardar a temperatura ambiente. No es necesario esterilizar.

- SDS 10% (p/v) (5 mL)

Disolver 0.5 g de SDS en 4 mL de agua Milli-Q™ y agitar con agitador magnético en un baño de agua a 68 °C para favorecer la disolución. Ajustar el volumen a 5 mL. Guardar a temperatura ambiente.

- Acetato de potasio 5 M (10 mL)

$PM_{\text{Acetato de potasio}} 98.14$

Disolver 4.9 g de acetato de potasio en agua Milli-Q™. Ajustar el volumen a 10 mL. Esterilizar por autoclave y guardar a temperatura ambiente.

- Solución Miniprep 3 (25 mL)

Calcular los volúmenes requeridos de las soluciones *stock* para preparar el volumen deseado de una solución 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato en agua Milli-Q™.

- Etanol al 70% (v/v) (50 mL)

Mezclar 35 mL de etanol absoluto grado biología molecular con 15 mL de agua Milli-Q™. Almacenar en un frasco de vidrio con tapón de rosca.

- ARNasa A (10 µg/mL)

Será proporcionada por el profesor. Mantener en hielo.

### Referencias

Sambrook J, Fritsch, EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4a ed. Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.

Ehrt S, Schnappinger D. Isolation of plasmids by alkaline lysis. En Casali N. & Preston A. (eds), *E. coli* Plasmid Vectors Methods and Applications, Methods in Molecular Biology. Estados Unidos: Humana Press; 2003.



## Práctica 5. Aislamiento y purificación de ARN total de mamífero

### Objetivos

1. Comprender los fundamentos de la extracción y purificación de ARN total de células de mamífero.
2. Realizar la extracción de ARN total a partir de un cultivo de células de mamífero.
3. Comparar diferentes métodos de extracción de ARN total.

### Introducción

Las moléculas de ARN participan y regulan la expresión genética. Actualmente es muy claro que mucho del genoma de mamíferos se transcribe a ARN, aunque sólo una pequeña fracción codifica para proteínas. Este conocimiento ha permitido paulatinamente un importante crecimiento en el campo de la investigación del ARN como un regulador central en procesos biológicos fundamentales o en su utilidad como una herramienta biotecnológica, terapéutica o diagnóstica. Existen diversos tipos de ARNs que tienen diferentes funciones biológicas en las células. Los ARNs más abundantes son los ribosomales (ARNr), los cuales representan entre el 80 al 90% de todos los ARNs, mientras que los ARN mensajeros (ARNm) y los ARN de transferencia (ARNt) representan entre el 2.5 al 5%. Se han descrito otros tipos de ARNs reguladores como los microARNs, ARNs largos no codificantes, ARN pequeños nucleolares y nucleares, entre otros (Rio *et al.* 2011).

El ARN es una biomolécula inestable, lo que hace difícil su manejo en el laboratorio, por lo tanto, el principal objetivo de la extracción del ARN es obtener moléculas intactas y mantenerlas así durante su posterior manipulación, ya que una vez que es

extraído de las células, el ARN tiene una vida media relativamente corta en comparación con el ADN. Se han descrito tres factores principales para la degradación del ARN: un pH alcalino, la presencia de metales divalentes y la actividad de ARNasas. Estas últimas son el factor más importante de degradación debido principalmente a su presencia ubicua en todos los tipos celulares, son termoestables y son capaces de adoptar su plegamiento nativo nuevamente después del calentamiento, además son difíciles de inactivar debido a que no necesitan cofactores. Los desnaturizantes fuertes se han utilizado para inhibir las ARNasas endógenas durante la obtención del ARN por lo que el éxito en la extracción de ARN se basa en las buenas técnicas de laboratorio y en técnicas libres de ARNasas. Es importante utilizar sólo materiales estériles y exclusivos para extracción de ARN, como frascos, puntas y microtubos (Rio *et al.*, 2011). El área de trabajo, las gradillas y las micropipetas debe ser previamente descontaminadas con soluciones como RNase AWAY® (Ambion) o RNaseZap® (Sigma), las cuales son soluciones de descontaminación superficial que destruyen las ARNasas. Todas las soluciones deben estar preparadas con agua libre de nucleasas o agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

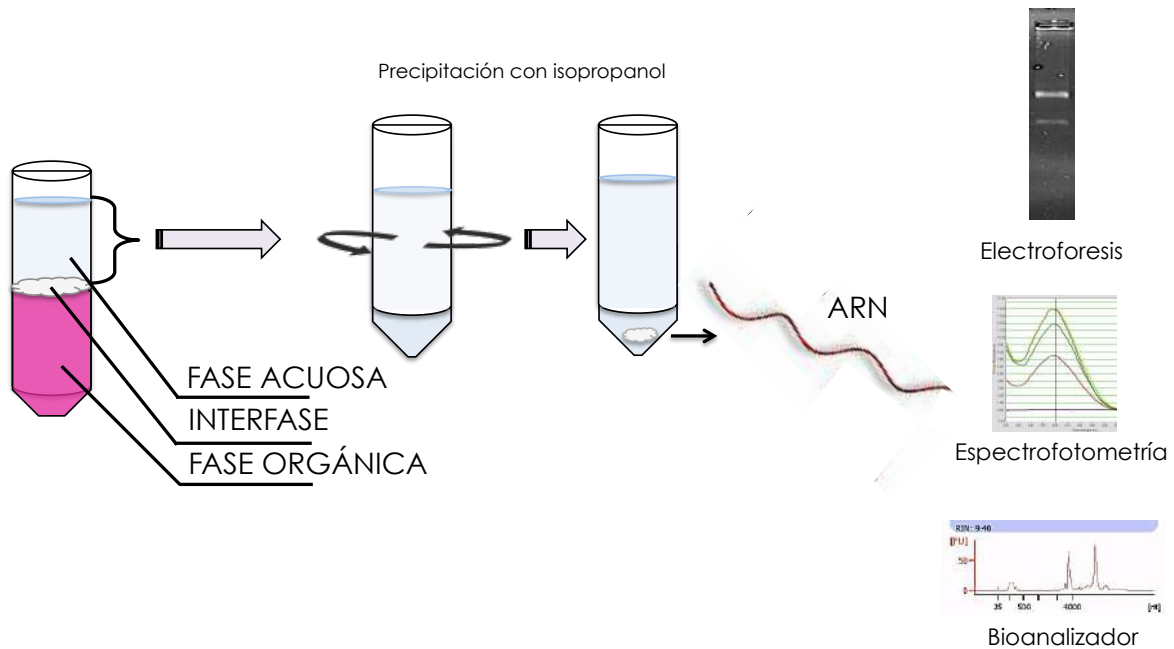
El primer paso en la purificación del ARN de muestras biológicas de mamíferos es la solubilización del material biológico del cual se va a realizar la extracción. Durante este proceso lo más importante es inactivar las nucleasas lo más rápido posible con una sal caotrópica como el isotiocianato de guanidina o con detergentes desnaturizantes como el SDS. De acuerdo a esto, las técnicas utilizadas para obtener ARN total son:

1. El método del TRIzol®.
2. Guanidina/Cloruro de Cesio (CsCl).
3. Guanidina/Cromatografía en columnas de sílica gel.
4. Fenol/SDS.

Una vez extraído y purificado, el ARN debe localizarse en una solución acuosa totalmente clara (Figura 1) y debe ser precipitado con etanol y mantenerse en frío

para promover una mejor precipitación. El ARN se obtendrá por centrifugación y la pastilla resultante deberá resuspenderse en agua libre de nucleasas o agua tratada con DEPC (Ausubel *et al.*, 2003).

La calidad y cantidad de ARN se evalúa por diversos métodos como electroforesis y técnicas espectrofotométricas. Recientemente, el método más utilizado para determinar la integridad del ARN es el análisis del Número de Integridad del ARN (RIN por sus siglas en inglés) utilizando un bioanalizador<sup>®</sup> basado en electroforesis capilar con chips (Rio *et al.*, 2011) (Figura 1).



**Figura 1. Diagrama que muestra el proceso de extracción y la evaluación de la calidad, cantidad e integridad de ARN.**

### Material y equipo necesario

TRIzol<sup>®</sup>

Cloroformo

Isopropanol

Etanol al 75% (v/v) en agua libre de nucleasas (o agua tratada con DEPC)

Agua libre de nucleasas (o agua tratada con DEPC)

RNase AWAY® (Ambion) o RNaseZap® (Sigma)

PBS

Cultivo de células de mamífero adherentes (proporcionado por el profesor)

Espátula de plástico estéril (*scraper*)

Microcentrífuga

Vórtex

Microtubos de 1.6 mL, nuevos y estériles

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

Hielo/contenedor

Micropipetas y puntas de 10, 200 y 1000  $\mu$ L estériles

PureLink® RNA Mini Kit con las siguientes soluciones:

- Amortiguador de lisis
- Amortiguador de lavado I
- Amortiguador de lavado II

2-mercaptoetanol

Campana de extracción

Ultracongelador a -80 °C

### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consulte las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

👁 Utilice bata y guantes en todo momento.

### ***El día anterior a la práctica:***

El profesor sembrará  $5 \times 10^6$  células de una línea celular de mamífero en cajas de Petri de cultivo de 60 mm e incubará a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h.

### ***El día de la práctica:***

Antes de iniciar es muy importante limpiar cuidadosamente la superficie de trabajo, las micropipetas y la centrifuga, con un inhibidor de RNasas comercial (RNase AWAY® o RNaseZap®) para prevenir la degradación del ARN durante el procedimiento de extracción y purificación.

#### ***a. Extracción de ARN con el método de TRIzol®***

1. Eliminar el medio de cultivo de las células en la caja de Petri.
2. Lavar el cultivo celular 2 veces con 2 mL de PBS.
3. Eliminar completamente el PBS con la ayuda de una micropipeta.
4. Adicionar 1 mL de TRIzol® (ThermoFisher Scientific) sobre la monocapa celular y despegar las células con una espátula de plástico estéril (*scraper*).
- 👁 El TRIzol® es tóxico y debe trabajarse en campana de extracción (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).
5. Recuperar la suspensión celular con ayuda de una micropipeta y colocarla en un microtubo.
6. Homogenizar la suspensión celular durante 2 min con pipeteo constante.
7. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
8. Adicionar 200 µL de cloroformo.
9. Mezclar con un vórtex durante 15 s.
10. Incubar a temperatura ambiente durante 3 min.
11. Centrifugar a 14,000 rpm durante 15 min a 4 °C.
12. Transferir cuidadosamente la fase acuosa a otro microtubo, evitando tocar la fase orgánica.

13. Adicionar un volumen de isopropanol a la fase acuosa (v/v).
  14. Incubar a temperatura ambiente durante 15 min.
  15. Centrifugar a 14,000 rpm durante 20 min a 4 °C.
  16. Eliminar el isopropanol con ayuda de una micropipeta, evitando tocar la pastilla.
  17. Adicionar 800 µL de etanol al 75%.
  18. Agitar en un vórtex durante 1 min.
  19. Centrifugar a 7,500 rpm durante 5 min a 4 °C.
  20. Eliminar completamente el etanol con ayuda de una micropipeta.
  21. Secar la pastilla dejando el microtubo abierto durante 10 min a temperatura ambiente.
  22. Resuspender la pastilla de ARN en 30 µL de agua libre de nucleasas (o agua tratada con DEPC).
  23. Almacenar el ARN a -80 °C.
- 👁 La concentración y pureza del ARN obtenido será evaluada durante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa, como se explica en las prácticas 8 y 9, respectivamente.

***b. Extracción de ARN con un método comercial, PureLink® RNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific)***

1. Eliminar el medio de cultivo de las células en la caja de Petri.
2. Lavar el cultivo celular 2 veces con 2 mL de PBS.
3. Eliminar completamente el PBS con la ayuda de una micropipeta.
4. Adicionar 300 µL de amortiguador de lisis previamente preparado con 1% de 2-mercaptoetanol sobre la monocapa celular y despegar las células con una espátula de plástico estéril (*scraper*).
5. Recuperar la suspensión celular con ayuda de una micropipeta y colocarla en un microtubo.
6. Homogenizar la suspensión celular durante 2 min con pipeteo constante.

7. Centrifugar el homogenizado durante 5 min a 2,600 rpm.
8. Recuperar el sobrenadante en un microtubo.
9. Adicionar 1 volumen de etanol al 75%.
10. Mezclar con vórtex durante 30 s.
11. Transferir 700  $\mu\text{L}$  de la mezcla anterior a la columna previamente colocada sobre un tubo colector.
12. Centrifugar a 12,000 rpm durante 15 s a temperatura ambiente.
13. Descartar la solución filtrada colectada en el tubo y reinsertar la columna.
14. Repetir los pasos 11, 12 y 13 hasta completar la unión para toda la mezcla de lisis.
15. Adicionar 700  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lavado I a la columna.
16. Centrifugar a 12,000 rpm durante 15 s a temperatura ambiente.
17. Descartar la solución filtrada colectada en el tubo y reinsertar la columna en un nuevo tubo colector.
18. Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lavado II a la columna (el amortiguador II debe estar preparado previamente con etanol, de acuerdo con la cantidad indicada en el frasco)
19. Centrifugar a 12,000 rpm durante 15 s a temperatura ambiente.
20. Descartar la solución centrifugada colectada en el tubo y reinsertar la columna en el mismo tubo colector.
21. Repetir los pasos 18, 19 y 20.
22. Centrifugar a 12,000 rpm durante 2 min para secar la membrana de la columna.
23. Desechar el tubo colector e insertar la columna en un microtubo para elución.
24. Adicionar de 30 a 100  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas o nucleasas en el centro de la columna evitando tocar la membrana.
25. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
26. Centrifugar a 12,000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente.
27. Desechar la columna y almacenar el ARN colectado en el microtubo a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

👁️ La concentración y pureza del ARN obtenido será evaluada por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa, como se explica en las prácticas 8 y 9, respectivamente.

### **Análisis de resultados**

Describa detalladamente los fundamentos de cada paso realizado durante la extracción de ARN con el método del TRIzol®.

Observe y documente los cambios físicos de la muestra durante todo el proceso de extracción y purificación con el método del TRIzol®.

Discuta cuál es el fundamento de la extracción de ARN por columna.

Documente y discuta los pros y contras de los dos métodos descritos en la práctica.

### **Cuestionario**

1. ¿Cuál es el efecto del pH y los metales divalentes en la estabilidad del ARN?
2. ¿Qué son las ARNasas?
3. ¿Cuál es la función del DEPC sobre las ARNasas?
4. ¿Cuáles son los componentes del TRIzol®?
5. ¿Qué papel juega cada uno de los reactivos utilizados en el proceso de extracción y purificación del ARN total por el método del TRIzol®?
6. Mencione al menos 2 kits comerciales que se utilicen para extraer diferentes tipos de ARN. Indique el fundamento de los kits de acuerdo a las características de los ARNs que serán obtenidos.

### **Soluciones**

👁️ Utilice bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.



- PBS: NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7.5 (1 L)

PM<sub>NaCl</sub> 58.44, PM<sub>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></sub> 141.96, PM<sub>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></sub> 136.086

Pesar 8 g de NaCl, 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Disolver en 800 mL de agua destilada y ajustar el pH a 7.5 con HCl. Aforar a 1 L con agua Milli-Q™. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca. Almacenar a temperatura ambiente. Antes de usar el ácido clorhídrico, consulte la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- Agua tratada con DEPC (1 L)

Agregar 1 mL de DEPC a 1 L de agua bidestilada, colocar en un frasco de vidrio con tapa de rosca estéril e incubar a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente, esterilizar por autoclave y almacenar a 4 °C.

- Etanol al 75% (v/v) (50 mL)

Mezclar 37.5 mL de etanol absoluto grado biología molecular con 12.5 mL de agua libre de nucleasas (o agua tratada con DEPC). Almacenar en un frasco de vidrio con tapón de rosca.

### Referencias

Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nielsen TW. RNA: A Laboratory Manual. Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2011.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Estados Unidos: Wiley; 2003.

Life Technologies. PureLink® RNA Mini Kit. Disponible en: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink\\_rna\\_mini\\_kit\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_rna_mini_kit_man.pdf). Consultado agosto 23, 2017.

## Práctica 6. Aislamiento de ARN total de levaduras

### Objetivos

1. Conocer y comprender los fundamentos del aislamiento y purificación de ARN total de un cultivo de levadura.
2. Aislar y purificar ARN de una levadura utilizando un kit comercial.
3. Identificar y explicar cada etapa de la extracción del ARN utilizando un kit comercial.

### Introducción

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se estudia con frecuencia como modelo de los organismos eucariontes. Es un buen modelo para estudios genéticos, tanto por su fácil manipulación, como por la cada vez mayor cantidad de información genómica y genética que está disponible en bases de datos públicas (Xiao, 2006). Un paso esencial para poder usar las levaduras como organismo modelo es la habilidad de obtener su material genético. En particular, el análisis del ARN es central para el entendimiento detallado de la expresión génica (Evans, 1996).

Uno de los retos de aislar ácidos nucleicos a partir de células de levaduras es la presencia de la pared celular. Los dos métodos generales para superar dicha dificultad son primero crear esferoplastos (células desprovistas de su pared) y luego aislar los ácidos nucleicos de ellos (Cryer, 1975) o usar un agitador de tipo vórtex en combinación con cuentas de vidrio para romper la pared celular (Hoffman, 1987). El método descrito aquí utiliza las cuentas de vidrio y el vórtex para llevar a cabo la lisis mecánica de las células. Dicho método, además de ser más rápido y sencillo, ofrece la ventaja de que no es necesaria la utilización de enzimas como zimolasa o liticasa para lograr la lisis (Xiao, 2006).

El método general para la extracción de ARN es relativamente sencillo, sin embargo, su dificultad radica en mantener el ARN libre de contaminación por ribonucleasas exógenas (ARNasas) para así conservar su integridad. De esta manera, para evitar la degradación del ARN durante su aislamiento y la purificación es necesario usar guantes todo el tiempo debido a que existen ARNasas presentes en la piel. El equipo y las superficies que se manejen con las manos desprotegidas pueden contaminarse y, debido a que las ARNasas son enzimas extremadamente estables, la contaminación puede volverse un problema persistente difícil de eliminar inclusive esterilizando el material por calor húmedo o seco. Idealmente, lo recomendado es contar con un área de trabajo y equipos exclusivos para el aislamiento de ARN y, en dicha área, deberán mantenerse los materiales como puntas y microtubos, que deberán abrirse y manipularse siempre con guantes. Es muy importante utilizar siempre materiales previamente esterilizados y asegurarse de que el agua utilizada en la preparación de soluciones sea agua libre de nucleasas. Una buena alternativa, si no se cuenta con un área exclusiva para el trabajo con ARN, es siempre limpiar el área de trabajo, gradillas, pipetas, etc., con una solución comercial como RNase AWAY® (Ambion) o RNaseZap® (Sigma) para destruir las ARNasas.

Durante la realización de este protocolo, las condiciones de centrifugación no se especifican en rpm. Algunos procedimientos necesitan condiciones de centrifugación muy precisas, que se especifican en términos de fuerza centrífuga relativa (RCF por sus siglas en inglés, *Relative Centrifugal Force*), expresada en unidades de gravedad ( $\times g$ ). Muchas microcentrífugas sólo ofrecen la posibilidad de programar la velocidad en revoluciones por minuto (rpm). En estos casos será necesario hacer una conversión entre RCF y rpm para asegurarse de usar la velocidad de centrifugación correcta. La relación entre rpm y RCF es la siguiente:

$$\text{RCF } (g) = (1.118 \times 10^{-5}) R S^2$$

R = radio del rotor en centímetros

S = velocidad en rpm

Es importante que en el caso de que no se cuente con una centrífuga que se pueda programar en RCF, el alumno se asegure de hacer las conversiones de velocidad necesarias antes de iniciar con el protocolo de extracción.

### Material y equipo necesario

Cultivo de *S. cerevisiae* en medio sólido (proporcionado por el profesor)

Medio YPD

Matraz Erlenmeyer de 125 mL

Pipetas de vidrio graduadas de 25 mL estériles y propipeta

Asa microbiológica

Campana de flujo laminar

Incubadora a 30 °C con agitación orbital

RNAlater®

RNase AWAY® (Ambion) o RNaseZap® (Sigma)

Etanol absoluto

Kit *ZR Fungal/Bacterial RNA MiniPrep*® (Zymo Research) con las siguientes soluciones:

- Amortiguador de lisis ARN
- Amortiguador de preparación ARN
- Amortiguador de lavado ARN
- Agua libre de ADNasas/ARNasas

Vórtex

Microcentrífuga

Micropipetas y puntas de 20 µL, 200 µL y 1,000 µL estériles

Microtubos de 1.6 mL, nuevos y estériles

Tubo cónico de 50 mL, nuevo y estéril

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

Hielo/contenedor

Ultracongelador a -80 °C

### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consulte las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

👁 Utilice bata y guantes en todo momento.

#### *El día anterior a la práctica:*

1. Inocular la levadura en el matraz de 125 mL con 25 mL de medio YPD. Incluir un control negativo sin inocular.
2. Incubar a 30 °C durante toda la noche (14-16 h) con agitación orbital de 150 rpm.

#### *El día de la práctica:*

Antes de iniciar es muy importante limpiar cuidadosamente la superficie de trabajo, las micropipetas y la centrífuga, con un inhibidor de RNasas comercial (RNase AWAY® o RNaseZap®) para prevenir la degradación del ARN durante el procedimiento de extracción y purificación.

1. Tomar 20 mL del cultivo de levadura y agregar 2.5 mL de RNA-later®. Homogeneizar por inversión.
2. Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min.
3. Retirar el sobrenadante con ayuda primero de una pipeta serológica de 25 mL y luego de una micropipeta, teniendo cuidado de no tocar la pastilla.

4. Resuspender la pastilla en 1,600  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lisis ARN y transferir 800  $\mu\text{L}$  de la mezcla a dos tubos de lisis ZR BashingBead™ para realizar la purificación en duplicado.
5. Asegurar los tubos de lisis ZR BashingBead™ horizontalmente sobre el vórtex con cinta adhesiva. Encender el vórtex a máxima velocidad durante 10 min.
6. Centrifugar durante 1 min a 12,000  $\times g$ .
7. Colocar dos columnas de filtrado (Zymo-Spin™ IIC, previamente marcadas por el profesor) sobre dos tubos colectores y transferir a cada una de las columnas 400  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante.
8. Cerrar las tapas de las columnas de filtrado y centrifugar durante 30 s a 8,000  $\times g$ .
9. Desechar los filtros y conservar los filtrados en los tubos colectores.
10. Con ayuda de la micropipeta, medir el volumen de los filtrados presentes en los tubos colectores.
11. Calcular el equivalente al 80% del volumen del filtrado y agregar esa cantidad de etanol absoluto (por ejemplo, 320  $\mu\text{L}$  de etanol deberán adicionarse a un volumen de 400  $\mu\text{L}$  de filtrado). Mezclar suavemente por pipeteo.
12. Colocar dos columnas nuevas de filtrado (Zymo-Spin™ IIC, previamente marcadas por el profesor) en dos tubos colectores y transferir a éstas la totalidad de las mezclas de filtrado y etanol.
13. Cerrar las tapas de las columnas de filtrado y centrifugar durante 30 s a 12,000  $\times g$ .
14. Desechar los filtrados y agregar 400  $\mu\text{L}$  de amortiguador de preparación ARN a cada una de las columnas de filtrado.
15. Cerrar las columnas y centrifugar durante 1 min a 12,000  $\times g$ .
16. Desechar los filtrados y colocar las columnas de filtrado otra vez en los mismos tubos colectores.
17. Agregar 800  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lavado ARN y centrifugar durante 30 s a 12,000  $\times g$ .

18. Desechar el líquido filtrado y colocar las columnas de filtrado otra vez en los mismos tubos colectores.
  19. Repetir el paso 17 y 18, con 400  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lavado ARN para cada columna.
  20. Centrifugar las columnas de filtrado durante 2 min a 12,000  $\times g$ .
  21. Remover con cuidado las columnas de filtrado y colocarlas en dos microtubos.
  22. Agregar 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas directamente en el centro de cada columna.
  23. Dejar reposar durante 1 min a temperatura ambiente.
  24. Centrifugar durante 30 s a 10,000  $\times g$ .
  25. Desechar las columnas y conservar el ARN eluido a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 👁 La concentración y pureza del ARN obtenido será evaluada por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa, como se explica en las prácticas 8 y 9, respectivamente.

### **Análisis de resultados**

Describe detalladamente los fundamentos de cada paso realizado durante la extracción de ARN con el kit utilizado.

Observe y documente los cambios físicos de la muestra durante todo el proceso de extracción y purificación.

Discuta cuál es el fundamento de la extracción de ARN con la columna utilizada.

### **Cuestionario**

1. ¿Qué son los esferoplastos?
2. Además de la lisis mecánica, ¿qué otros procedimientos se pueden utilizar para hacer la lisis celular de levaduras?

3. Además del procedimiento de extracción utilizando kits comerciales, ¿qué otros métodos de extracción de ARN de levaduras existen? Describa brevemente.
4. ¿Qué es el RNAlater® y cuál es su función?
5. ¿Qué precauciones deben tomarse durante el procedimiento de extracción para asegurar la integridad del ARN?
6. ¿Cómo debe conservarse el ARN una vez purificado?
7. ¿Cómo se podría purificar específicamente el ARN mensajero de levadura a partir del ARN total obtenido aquí?

### Soluciones

👁 Utilice bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.

- Medio YPD (250 mL)

Mezclar 5 g de peptona, 2.5 g de extracto de levadura y 5 g de dextrosa en 250 mL de agua destilada. Esterilizar por autoclave y guardar a temperatura ambiente.

### Referencias

Cryer DR, Eccleshall R, Marmur J. Isolation of yeast DNA. *Methods Cell Biol* 1975; 12: 39-44.

Evans IH. *Methods in Molecular Biology*, vol. 53: Yeast Protocols: Methods in Cell and Molecular Biology. Estados Unidos: Humana Press Inc; 1996.

Hoffman CS, Winston F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 1987; 57: 267-272.

Xiao W. *Methods in Molecular Biology*, vol. 313: Yeast Protocols. Estados Unidos: Humana Press Inc; 2006.



Zymo Research Corp. ZR-Fungal/Bacterial RNA MiniPrep®. Disponible en: <http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/158/r2014i.pdf>. Consultado octubre 15, 2017.

## Práctica 7. Aislamiento de ARN de bacterias

### Objetivos

1. Conocer los fundamentos de la extracción y purificación de ARN total de un cultivo de *E. coli*.
2. Identificar y explicar cada etapa de la extracción del ARN utilizando un kit comercial.
3. Realizar la extracción y purificación del ARN de *E. coli*.

### Introducción

La extracción de biomoléculas como el ARN es un método crucial utilizado en biología molecular. Se puede extraer de cualquier material biológico como tejidos o células vivas o conservados. A diferencia del ADN, el ARN es transitorio, frágil, elusivo y difícil de recuperar. Generalmente, la purificación exitosa de ácidos nucleicos requiere de 4 pasos importantes: la disrupción efectiva de las células; la desnaturalización de complejos de nucleoproteínas; la inactivación de las ARNasas; y la eliminación de contaminantes (Doyle, 1996). En el caso particular del ARN, debe de estar libre de proteínas, carbohidratos, lípidos y especialmente de ADN (Buckingham, 2007), ya que la calidad y la integridad del ARN aislado afectará directamente los resultados de las técnicas posteriores (Cseke, 2005).

Con respecto al ADN, el ARN es una molécula inestable, ya que el enlace C-OH de la ribosa es más reactivo que el enlace C-H de la desoxirribosa. Además, tiene una vida media muy corta una vez que ha sido extraído de las células (Brooks, 1998). Es necesario tener mucho cuidado y precaución durante la extracción de ARN ya que es susceptible a la degradación enzimática (Buckingham, 2007). El ARN es especialmente inestable debido a la ubicuidad de las ARNasas, las cuales están presentes en todos los

tejidos, así como en todas las bacterias y hongos del ambiente (Buckingham, 2007; Brooks, 1998). La inhibición de las RNAsas durante los protocolos de aislamiento y purificación de ARN se logra con desnaturalizantes fuertes como el tiocianato de guanidina, ya que las RNAsas pueden volver a obtener su estructura terciaria después de la desnaturalización por calor y son difíciles de inactivar porque no requieren de cofactores (Doyle, 1996).

El primer método reportado para la extracción de ARN con isotiocianato de guanidina es muy laborioso (Ulrich, 1977), por lo que fue reemplazado por una técnica de un solo paso desarrollada por Chomczynski y Sacchi (1987) conocido como extracción con tiocianato de guanidina – fenol – cloroformo, en el cual el homogeneizado es extraído con fenol/cloroformo a un pH bajo.

El tiocianato de guanidina es un agente caotrópico utilizado para la desnaturalización de las proteínas. El principio de este método es que el ARN es separado del ADN después de su extracción con una solución ácida que contiene tiocianato de guanidina, acetato de sodio, fenol y cloroformo (Chomczynski, 2006). En condiciones ácidas, el ARN permanecerá en la parte superior o fase acuosa, mientras que el ADN y las proteínas se encontrarán en la interfase o en la fase orgánica. La recuperación de ARN total se realiza por precipitación con isopropanol.

La purificación basada en fases sólidas es utilizada en la mayoría de los kits comerciales disponibles en el mercado. Este método permite purificar el ARN con mayor eficiencia y velocidad que los métodos convencionales (Esser, 2005). Muchos de los problemas asociados a la extracción líquido-líquido, como la separación incompleta de las fases, pueden ser evitados.

El principio de la utilización de fases sólidas es que el ARN es absorbido en esta por interacciones de unión de los átomos de hidrógeno con una matriz hidrofílica bajo condiciones caotrópicas, por intercambio iónico bajo condiciones acuosas o por mecanismos de exclusión molecular. La absorción es dependiente del pH y la concentración salina del amortiguador.

Los cuatro pasos que involucran la extracción en fase sólida son la lisis celular, la absorción en el soporte, el lavado y la elución. La purificación en fase sólida es comúnmente realizada en columnas que operan bajo la fuerza centrífuga (Gjerse, 2009) y como soportes sólidos se utilizan matrices de sílica, partículas de vidrio, tierra de diatomeas o resinas de intercambio iónico.

La etapa inicial del proceso de extracción en fase sólida es el acondicionamiento del soporte para que la muestra pueda absorberse. Esto se realiza mediante la utilización de un amortiguador a un pH particular que convierte la superficie del soporte o ciertos grupos funcionales del mismo en una forma química particular que lo hace afín al ARN. Posteriormente, la muestra que ha sido extraída por lisis celular es depositada en la columna. Si el pH y la concentración de sales de la solución de unión son las adecuadas, el ARN es absorbido en el soporte. Otros compuestos, como proteínas y ADN, que podrían también tener afinidad con la superficie del soporte, son removidos por un agente competitivo presente en el amortiguador de lavado. En la etapa de elución, el ARN se remueve del soporte con agua y es colectado con una mayor pureza (Gjerse, 2009). Normalmente, para las etapas de lavado y elución se requiere centrifugar o filtrar con vacío para realizar la separación de los compuestos.

Tanto el ADN como el ARN pueden ser purificados utilizando los mismos soportes y su unión es favorecida por la presencia de sales caotrópicas y etanol. Sin embargo, la elución de cada uno de éstos dependerá del pH de la solución de elución que se utilice. El ADN es más estable y se disuelve más rápido en amortiguadores con pH entre 8 y 9, mientras que el ARN se disuelve mejor a pH ácidos, por lo que el agua a pH de 4 a 5 es el diluyente más utilizado en estos casos.

## Material y equipo necesario

Cultivo de *E. coli* en medio sólido (proporcionado por el profesor)

Beta-mercaptoetanol

Etanol absoluto

Amortiguador Tris EDTA (TE)

Agua inyectable

Lisozima (1 mg/mL)

Microcentrífuga

Micropipetas y puntas de 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 1,000  $\mu$ L estériles

Microtubos de 1.6 mL, nuevos y estériles

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

Vórtex

Matraz Erlenmeyer de 125 mL

Pipetas de vidrio graduadas de 25 mL y propipeta

Asa microbiológica

Campana de flujo laminar

Incubadora a 37 °C con agitación orbital

Tubo cónico de 50 mL, nuevo y estéril

Kit *RNeasy® Mini* (Qiagen) con las siguientes soluciones:

- Amortiguador RLT
- Amortiguador RW1
- Amortiguador RPE
- Agua libre de ARNasa

Hielo/contenedor

Ultracongelador a -80 °C

### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consulte las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

👁 Utilice bata y guantes en todo momento.

#### ***El día anterior a la práctica:***

1. Bajo condiciones de asepsia, inocular las bacterias en el matraz Erlenmeyer con 25 mL de medio LB.
2. Incubar a 37 °C durante toda la noche (14-16 h) con agitación orbital de 250 rpm.

#### ***El día de la práctica:***

1. Tomar 20 mL de cultivo y centrifugar a 8,000 rpm durante 10 min.
2. Resuspender la pastilla en 100  $\mu$ L de lisozima (1 mg/mL) y colocar en un microtubo de 1.6 mL.
3. Incubar a 30 °C agitando periódicamente con vórtex hasta observar un aumento en la viscosidad de la muestra.
4. Agregar 350  $\mu$ L de amortiguador RLT con 3.5  $\mu$ L de beta-mercaptoetanol y mezclar vigorosamente con vórtex.
5. Adicionar 250  $\mu$ L de etanol absoluto. Mezclar suavemente durante pipeteo.
6. Colocar una columna *RNeasy spin* en un tubo colector y transferir a ésta, hasta 700  $\mu$ L de la mezcla de lisado, incluyendo cualquier precipitado que se pueda haber formado.
7. Cerrar la tapa del tubo en la boca de la columna y centrifugar durante 45 s a 10,000 rpm.
8. Desechar el filtrado. Si se tiene más mezcla de lisado, repetir desde el paso 6 hasta agotar el lisado.

9. En el mismo tubo colector y columna, agregar 700  $\mu\text{L}$  de amortiguador RW1.
  10. Cerrar la tapa del tubo en la boca de la columna y centrifugar durante 45 s a 10,000 rpm. Desechar el líquido filtrado.
  11. Colocar la columna en el mismo tubo colector y agregar 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador RPE.
  12. Cerrar la tapa y centrifugar durante 2 min a 10,000 rpm.
  13. Colocar la columna en un microtubo nuevo y agregar 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasa directamente sobre la membrana de la columna.
  14. Dejar reposar durante 2 min a temperatura ambiente.
  15. Cerrar la tapa y centrifugar durante 1 min a 10,000 rpm.
  16. Desechar la columna y conservar el ARN eluido a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 👁 La concentración y pureza del ARN obtenido será evaluada por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa, como se explica en las prácticas 8 y 9, respectivamente.

### **Análisis de resultados**

Describe detalladamente los fundamentos de cada paso realizado durante la extracción de ARN bacteriano.

Observe y documente los cambios físicos de la muestra durante todo el proceso de extracción y purificación.

Discuta cuál es el fundamento de la extracción de ARN con la columna utilizada.

### **Cuestionario**

1. ¿Cuántos tipos de ARN hay y en qué proporción se encuentran en la célula procariota?

2. Además de la lisozima, ¿qué otros procedimientos se pueden utilizar para lisar bacterias?
3. ¿Qué estrategia se puede realizar para evitar la degradación del ARN intracelular si la muestra no es procesada inmediatamente después de ser colectada?
4. Durante el procesamiento de las muestras, ¿qué enzima debe de ser inhibida para obtener una concentración y calidad adecuada de ARN?
5. Analizando el protocolo utilizado en esta práctica, ¿cuáles son los componentes principales de cada uno de los amortiguadores utilizados en cada etapa?
6. Una vez aislado y purificado el ARN, ¿cómo debe conservarse para su utilización posterior?

### Soluciones

👁 Utilice bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.

- Medio LB (250 mL)

Mezclar 2.5 g de triptona, 1.25 g de extracto de levadura y 2.5 g de NaCl en 200 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7 con NaOH 5 M. Ajustar el volumen a 250 mL con agua destilada. Esterilizar por autoclave y guardar a temperatura ambiente.

- Lisozima (1 mg/mL)

Será proporcionada por el profesor. Descongelar, homogenizar y mantener en hielo.

- EDTA 0.5 M, pH 8.0 (250 mL)

$P_{\text{MEDTA}} 372.24$

Agregar 46.52 g de EDTA en 150 mL de agua Milli-Q™, agitar vigorosamente con una barra magnética y ajustar el pH a 8.0 con NaOH (alrededor de 5 g de NaOH). Ajustar a un volumen de 250 mL. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de



rosca. Antes de usar el hidróxido de sodio, consulte la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- Amortiguador de Tris-HCl 1 M, pH 7.6 (100 mL)

PM<sub>Tris</sub> 121.14

Disolver 12.1 g de Tris base en 80 mL de agua Milli-Q™, ajustar el pH a 7.6 agregando alrededor de 4 mL de HCl concentrado. Ajustar el volumen a 100 mL. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca. Si al momento de utilizar esta solución tiene color amarillo, será necesario preparar una nueva. Antes de usar el ácido clorhídrico, consulte la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- TE (40 mL)

Calcular los volúmenes requeridos de las soluciones *stock* para preparar 40 mL de TE a las siguientes concentraciones finales:

- Amortiguador de Tris-HCl 10 mM, pH 7.6
- EDTA 1 mM

Almacenar a temperatura ambiente en un frasco de vidrio con tapón de rosca y esterilizar por autoclave.

### Referencias

Brooks G. Biotechnology in healthcare: An introduction to biopharmaceuticals. Reino Unido: Pharmaceutical Press; 1998.

Buckingham L, Flaws ML. Molecular diagnostics: Fundamentals, methods and clinical applications. Estados Unidos: FA Davis; 2007.

Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* 2006; 1(2): 581-585.

Cseke LJ, Kaufman PB, Podila GK, Tsai C-J. *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*. 2a. ed. Estados Unidos: CRC Press; 2005.

Doyle K. *The source of discovery: Protocols and applications guide*. Estados Unidos: Promega; 1996.

Esser K-H, Marx WH, Lisowsky T. Nucleic acid-free matrix: regeneration of DNA binding columns. *BioTechniques* 2005; 39: 270-271.

Gjerse DT, Hoang L, Hornby D. *RNA purification and analysis: Sample preparation, extraction, chromatography*. Alemania: Wiley-VCH; 2009.

Qiagen. RNeasy® Mini Handbook. Disponible en: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>. Consultado septiembre 1, 2017.

Ullrich A, Shine J, Chirgwin J, Pictet R, Tischler E, Rutter WJ, Goodman HM. Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* 1977; 196: 1313-1319.

## Práctica 8. Cuantificación y estimación de la pureza de ácidos nucleicos

### Objetivos

1. Conocer los principios básicos de la determinación de la concentración y pureza del ADN y ARN por espectrofotometría.
2. Realizar la cuantificación por espectrofotometría de muestras de ADN y ARN, y estimar su pureza.

### Introducción

La técnica común para cuantificar los ácidos nucleicos y evaluar su pureza es por medición de la densidad óptica (DO) o absorbancia (A). La lectura de absorbancia se realiza a 260 nm ( $A_{260}$ ), longitud de onda en la que los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorción de luz. El valor obtenido permite estimar la concentración de ADN o ARN en la solución. Para asegurarse de que los números obtenidos sean confiables, la lectura de la  $A_{260}$  debe estar entre 0.1 y 1.0.

Sin embargo, durante el método de extracción de ADN o ARN no siempre es posible la eliminación total de ácidos nucleicos contaminantes, es decir, la muestra de ADN puede estar contaminada con ARN y viceversa. Cuando se cuantifican las muestras extraídas se debe tomar en cuenta que las moléculas contaminantes pueden estar presentes en la solución por lo que pueden contribuir con la medición total a 260 nm y dar como consecuencia la sobreestimación de la cantidad del ácido nucleico deseado. Por otra parte, los aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas absorben a 280 nm, y también pueden contribuir a la medición total a 260 nm si se encuentran presentes en la solución. La guanidina es un agente caotrópico comúnmente empleado

en la extracción y purificación del ADN y ARN que también incrementa la absorbancia a 260 nm. Esto quiere decir que si sólo se toma el valor de  $A_{260}$  para calcular la concentración, la cantidad de ADN o ARN se sobreestimarán (Ausubel *et al.*, 2003). Para evaluar la pureza de los ácidos nucleicos por espectrofotometría, se debe medir la absorbancia desde 230 nm hasta 320 nm con el objetivo de detectar otros posibles contaminantes en la solución. El cálculo más común para evaluar la pureza consiste en determinar la relación entre la  $A_{260}$  y la  $A_{280}$ . Un ADN y un ARN de buena calidad deberá tener una relación  $A_{260}/A_{280}$  entre 1.7 y 2.0; cuanto menor sea esta relación, mayor es la cantidad de contaminantes presentes (Sambrook *et al.*, 2012) (Tabla 1).

**Tabla 1. Relación de absorbancias  $A_{260}/A_{280}$  para estimar la pureza del ADN.**

Proteínas (%)	Ácidos nucleicos (%)	$A_{260}/A_{280}$
100	0	0.57
90	10	1.32
80	20	1.59
70	30	1.73
60	40	1.81
50	50	1.87
40	60	1.91
30	70	1.94
20	80	1.97
10	90	1.98
0	100	2.00

Una alta absorbancia alrededor de los 230 nm puede indicar la presencia de compuestos orgánicos o sales caotrópicas. La relación entre  $A_{260}$  y  $A_{230}$  puede ayudar a evaluar el nivel de estas sales arrastradas durante la purificación del ADN. Cuanto menor sea esta relación, mayor será la concentración de sales presentes. Como referencia, valores de  $A_{260}/A_{230}$  mayores a 1.5 indican que el grado de pureza de los

ácidos nucleicos en solución es adecuado. Las lecturas a 320 nm podrían indicar si hay turbidez en la solución, otra indicación de una posible contaminación. Por lo tanto, analizar las lecturas del espectrofotómetro entre 230 nm y 320 nm da mayor información de la calidad de la muestra (Sambrook *et al.*, 2012).

La concentración del ADN puede ser estimada ajustando la  $A_{260}$  con la medición de turbidez, multiplicándolo por el factor de dilución y la relación  $A_{260}$  de 1.0 = 50 µg/mL de ADN puro:

$$\text{Concentración ADN (}\mu\text{g/mL)} = (A_{260}-A_{320}) \times (\text{factor de dilución}) \times 50$$

Para determinar la concentración de ARN se toma una relación de  $A_{260}$  de 1.0 = 40 µg/mL de ARN puro:

$$\text{Concentración ARN (}\mu\text{g/mL)} = (A_{260}-A_{320}) \times (\text{factor de dilución}) \times 40$$

El rendimiento total obtenido se calcula multiplicando la concentración del ácido nucleico por el volumen total de muestra:

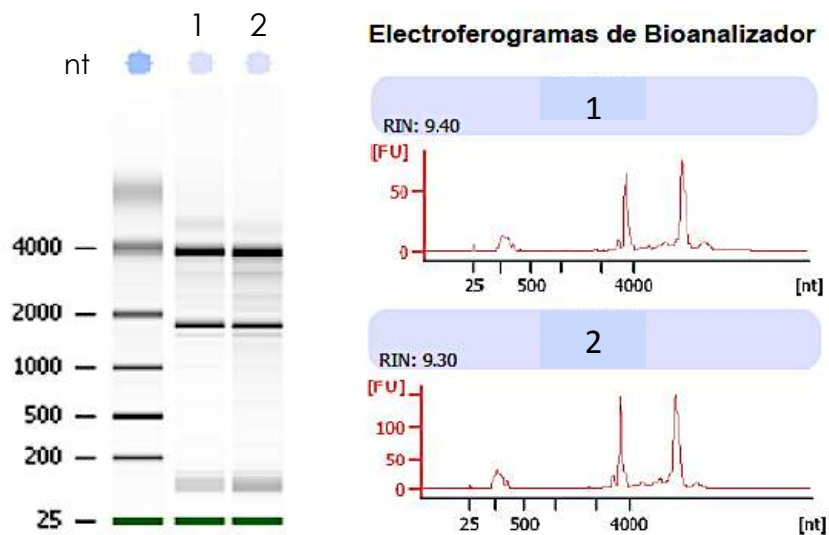
$$\text{Rendimiento ADN o ARN (}\mu\text{g)} = (\text{Concentración ADN o ARN}) \times (\text{volumen total de la muestra})$$

La pureza de la muestra se obtiene mediante la relación  $A_{260}/A_{280}$ , después de ajustar con el valor de turbidez:

$$\text{Pureza ácido nucleico (}A_{260}/A_{280}\text{)} = (A_{260}-A_{320}) / (A_{280}-A_{320})$$

La concentración y el rendimiento de ADN y ARN también pueden determinarse por electroforesis en gel (Rio *et al.*, 2011). La intensidad de la banda del ADN o de las dos bandas de ARN se compararán con la de un estándar que tenga un peso molecular cercano al de la muestra problema. De tal forma que si se cargan en el gel 2 µL de la muestra de ADN sin diluir y la banda tiene una intensidad similar a la del estándar de 100 ng, entonces la concentración de ADN en la solución es de 50 ng/µL (100 ng / 2 µL). La misma relación de volumen/concentración se hace cuando se cuantifica ARN. Además de determinar la concentración de ácidos nucleicos en la muestra, la electroforesis permite determinar la integridad de los ácidos nucleicos (Rio *et al.*, 2011).

Actualmente la electroforesis capilar es uno de los métodos más utilizados para evaluar la cantidad y calidad del ARN. Este método se basa en el uso de chips con microcanales en los cuales se lleva a cabo la separación electroforética, se requieren pequeñas cantidades de ARN y los resultados son obtenidos y analizados en un software que estima la cantidad de los tipos más abundantes de ARN. La relación entre los ARN 28S y 18S nos proporciona el Número de Integridad del ARN conocido como RIN (por sus siglas en inglés). Un RIN cercano a 10 indica una excelente calidad del ARN (Rio et al; 2011), como se muestra en la Figura 1.



**Figura 1. Determinación de la calidad de dos muestras de ARN por electroforesis capilar con un bioanalizador. Se muestra la imagen del gel y los electroferogramas.**

### Material y equipo necesario

Muestras de ADN genómico, ADN plasmídico y ARN total obtenidas previamente

Espectrofotómetro UV-Vis

Celdas para espectrofotómetro (rango de ultravioleta, para volúmenes de 1 mL)

Agua Milli-Q™

Micropipetas y puntas de 20  $\mu$ L y 1,000  $\mu$ L

Microtubos de 1.6 mL, nuevos y estériles

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

Hielo/contenedor

### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consulte las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

- Utilice bata y guantes en todo momento.
- 1. Descongelar en hielo las muestras de ADN y ARN.
- 2. Agitar suavemente las muestras (no usar vórtex).
- 3. Tomar 5  $\mu$ L de cada muestra y colocarlos en microtubos previamente rotulados.
- 4. Agregar 995  $\mu$ L de agua Milli-Q™.
- El ARN puede diluirse en 95  $\mu$ L de agua para poder hacer una medición más exacta.
- 5. Homogenizar las diluciones por agitación con vórtex.
- 6. Verter las soluciones en las celdas de espectrofotometría.
- 7. Ajustar a cero con 1,000  $\mu$ L de agua Milli-Q™ como blanco (0% absorbancia).
- 8. Hacer un barrido entre 230 nm y 320 nm. En caso de no poder realizar barridos, registrar los valores de absorbancia a 230 nm, 260 nm, 270 nm, 280 nm y 320 nm.
- 9. Realizar los cálculos necesarios para obtener la concentración de las muestras de ácidos nucleicos.
- La integridad de los ácidos nucleicos será evaluada por electroforesis en gel de agarosa, como se explica en la práctica 9.

### Análisis de resultados

Registre los diferentes valores de DO en la siguiente tabla.

Absorbancia	ADN genómico	ADN plasmídico	ARN total
230 nm			
260 nm			
270 nm			
280 nm			
320 nm			

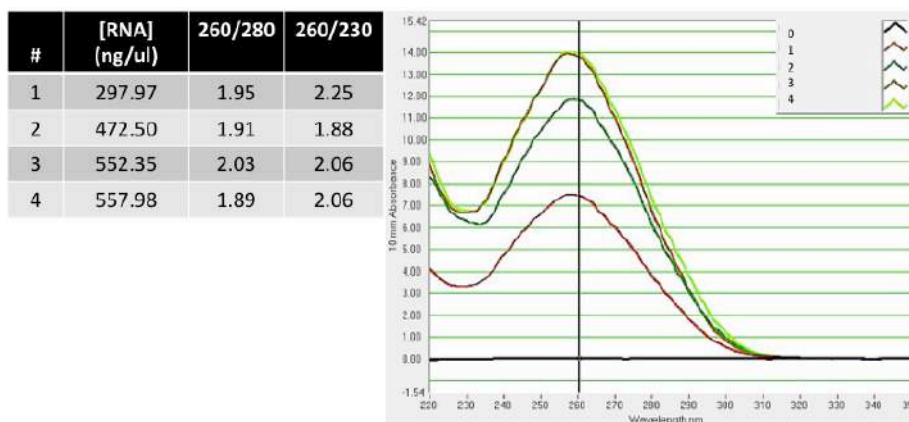
Obtenga la concentración y el rendimiento de cada muestra. Evalúe la pureza de cada una de las muestras. Con ayuda de la Tabla 1, infiera la concentración de proteínas en caso de encontrarse en las muestras.

### Cuestionario

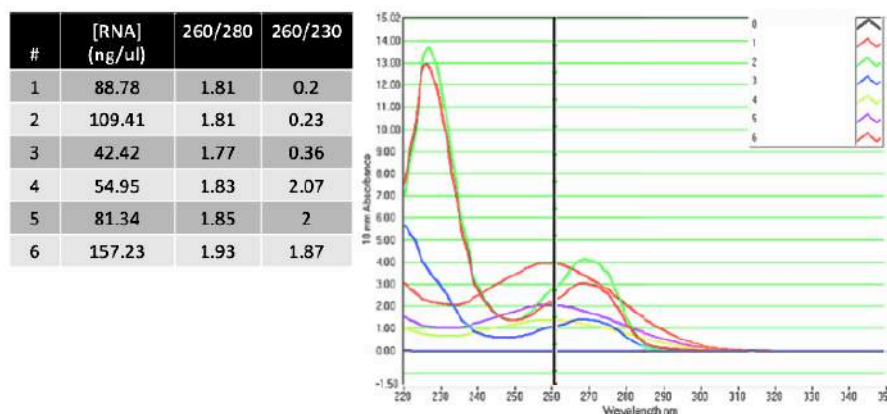
1. ¿Por qué se recomienda medir la absorbancia a 280 nm?
2. Espectrofotométricamente no es posible distinguir una muestra pura de ADN a una contaminada con ARN. Proponga un método que permita observar esta contaminación.
3. De acuerdo a los datos espectrofotométricos, se puede determinar si una muestra de ARN está contaminada con proteínas, fenol o ADN. Proponga los métodos adecuados para resolver cada uno de estos tipos de contaminación.
4. Haga un análisis y discusión de los resultados obtenidos por espectrofotometría mostrados en las imágenes A) y B). Discuta las diferencias entre los resultados mostrados en las dos imágenes.



A)



B)



## Referencias

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Estados Unidos: Wiley; 2003.

Sambrook J, Fritsch, EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4a ed. Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.

Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nielsen TW. RNA: A Laboratory Manual. Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2011.

## Práctica 9. Separación de ácidos nucleicos por electroforesis horizontal en gel de agarosa

### Objetivos

1. Describir los principios básicos de la electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.
2. Realizar una electroforesis horizontal de ácidos nucleicos en geles de agarosa.
2. Comprender las principales aplicaciones de la electroforesis horizontal de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

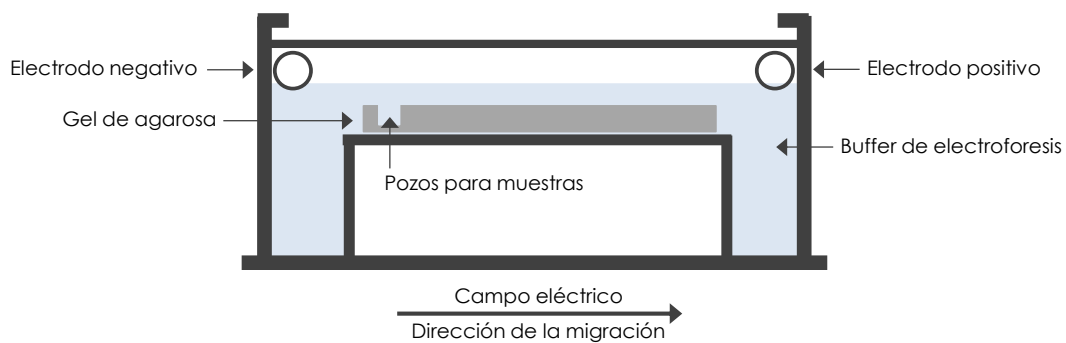
### Introducción

La electroforesis es el proceso de movimiento de moléculas cargadas en una solución al aplicar un campo eléctrico. Debido a que las moléculas en un campo eléctrico se mueven a una velocidad dependiente de su carga, forma y tamaño, la electroforesis se ha desarrollado ampliamente para la separación de diversas biomoléculas. Como es una herramienta analítica simple y relativamente rápida, se utiliza para el análisis y la purificación de moléculas grandes como proteínas y ácidos nucleicos o de moléculas pequeñas como azúcares, aminoácidos, péptidos y nucleótidos (Sambrook *et al.*, 2012).

La electroforesis de macromoléculas se realiza normalmente aplicando un volumen pequeño de la muestra en una matriz porosa (Figura 1). Bajo la influencia del voltaje aplicado, las diferentes moléculas presentes en la muestra se moverán a través de la matriz a diferentes velocidades. Al final se podrá observar la separación de las moléculas detectadas como bandas en distintas posiciones dentro de la matriz. La

matriz puede estar compuesta por diferentes materiales como papel, acetato de celulosa, agarosa o poliacrilamida (Sambrook *et al.*, 2012).

En la cámara de electroforesis el gel se coloca entre dos cámaras que contienen el amortiguador y la conexión eléctrica entre las dos cámaras se realiza a través del gel. Debido a que los ácidos nucleicos tienen carga negativa, los pozos que contienen a las muestras se colocan del lado del electrodo negativo para que estos migren hacia el lado positivo (Figura 1).



**Figura 1. Unidad de electroforesis horizontal en geles de agarosa**

Los ácidos nucleicos son comúnmente separados en geles de agarosa, la cual es un polisacárido altamente purificado, derivado del agar. La velocidad de migración de los ácidos nucleicos en matrices de agarosa está determinada por los siguientes factores:

- Tamaño molecular. Las moléculas más grandes migran más lentamente porque su fricción de arrastre es mayor y porque se mueven a través de los poros del gel con mayor dificultad que las moléculas pequeñas.
- Forma o conformación. El ADN súper-enrollado migra más rápido que el ADN lineal.
- Concentración de agarosa. Al disminuir la concentración de agarosa, los poros del gel son más grandes y las moléculas migrarán con mayor velocidad.
- Amortiguador de electroforesis. La movilidad electroforética de los ácidos nucleicos es influenciada por la composición y la fuerza iónica del amortiguador de electroforesis. En ausencia de iones (agua desionizada) la conductividad eléctrica es mínima y los ácidos nucleicos migran lentamente. Si se utiliza un amortiguador con

una fuerza iónica demasiado alta, la conductividad eléctrica será muy buena, aún con voltajes moderados pero se generarían grandes cantidades de calor, lo que podría fundir el gel y desnaturalizar o degradar los ácidos nucleicos.

- Voltaje aplicado. La fuerza fundamental del movimiento por electroforesis es el voltaje aplicado al sistema. La velocidad de las moléculas es directamente proporcional al gradiente de voltaje (Rio, 2011). Hay dos ecuaciones eléctricas importantes en la electroforesis. La primera es la ley de Ohm:

$$V = IR \quad \text{o} \quad I = V/R$$

La ley de Ohm relaciona el voltaje (V) medido en volts (V), la corriente (I) medida en amperes (A) y la resistencia (R) medida en ohms ( $\Omega$ ).

La segunda ecuación fundamental en la electroforesis es la ecuación de potencia (P) medida en watts (W), la cual describe la cantidad de calor producida en un circuito:

$$P = VI \quad \text{o} \quad P = I^2R \quad \text{o} \quad P = V^2/R$$

Con voltajes bajos, la velocidad de migración de los fragmentos de los ácidos nucleicos es proporcional al voltaje aplicado. Sin embargo, el intervalo efectivo de separación disminuye al incrementarse el voltaje, por lo que no debe de aplicarse más de 8 V/cm. Durante la electroforesis, el voltaje y la corriente son proporcionados por una fuente de poder y los electrodos y el amortiguador y el gel actúan como resistencia en el sistema (Sambrook *et al.*, 2012).

Algunos de los problemas más comunes cuando se separan ácidos nucleicos por electroforesis en geles de agarosa son:

- Bandas poco definidas. Puede ocurrir cuando la agarosa no gelifica adecuadamente, causando que los pozos estén mal formados (presencia de burbujas o tiempo de polimerización insuficiente); también puede deberse a que el gel se haya preparado con agua y no con amortiguador, o bien, a que se hayan cargado grandes cantidades de ADN o ARN en el pozo. La degradación de los ácidos nucleicos también se observa como un “barrido” a lo largo de todo el carril, debido a la presencia de fragmentos más cortos de diferentes longitudes (Sambrook *et al.*, 2012).

- Ausencia de bandas. Puede deberse a que la muestra se haya salido del gel por corrimiento excesivo o porque los cables fueron colocados incorrectamente en sus electrodos respectivos. También puede ocurrir cuando se cargan cantidades inferiores al límite de detección del método utilizado para su visualización.
- Bandas tenues. Este problema se puede presentar si la muestra no ingresa completamente al pozo, o bien si el pozo fue perforado accidentalmente con la punta de la micropipeta al cargar la muestra. También puede deberse a una tinción incorrecta.
- Separación insuficiente de las bandas. Ocurre por corrimiento insuficiente o porcentaje de agarosa incorrecto (Rio, 2011).

La Tabla 1 muestra concentraciones de agarosa usadas para separar fragmentos de ácidos nucleicos en los rangos indicados.

**Tabla 1. Concentraciones de agarosa según la longitud de los fragmentos a separar.**

Concentración del gel de agarosa (% p/v)	Longitud del fragmento (pb)
0.5	25,000 - 2,000
0.7	10,000 - 800
1.0	8,000 - 500
1.2	5,000 - 400
1.5	3,000 - 200
2.0	2,000 - 100

### Material y equipo necesario

Agarosa grado Biología Molecular

Amortiguador TBE 5X

Amortiguador TBE 0.5X

Amortiguador de carga 5X

Muestras de ácidos nucleicos de diferentes tamaños a concentraciones conocidas

Marcadores de ADN

Solución de bromuro de etidio (10 mg/mL) o de SYBR® Green 10,000X

Agua Milli-Q™

Agua destilada

Matraces Erlenmeyer de 20 mL

Cámaras de electroforesis horizontal, charolas y peines

Fuente de poder

Micropipetas y puntas de 20 µL estériles

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

Parafilm® M

Hielo/contenedor

Horno de microondas

Transiluminador UV

Fotodocumentador

### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consulte las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

👁 Utilice bata y guantes en todo momento.

1. Limpiar y secar las charolas de preparación de geles y los peines con agua destilada y ensamblarlos. Colocar las charolas en una superficie horizontal y nivelada.
2. Acomodar los peines en cada charola a 0.5 -1.0 mm del fondo de ellas.
3. Preparar en un matraz Erlenmeyer, 50 mL de una solución de agarosa al 0.7% (p/v), en otro al 1.2% y finalmente en un tercero al 1.5% en TBE 0.5X. Disolver la

agarosa calentando las mezclas en horno de microondas. Verificar que la agarosa esté completamente disuelta por medio de agitación.

☞ La solución de agarosa se calienta mucho y puede hervir violentamente si se calienta por largos periodos en el horno de microondas.

4. Dejar enfriar las soluciones de agarosa por debajo de 60 °C.

5. Verter la agarosa tibia en cada charola nivelada y esperar a que solidifique.

6. Remover cuidadosamente los peines y montar los geles con cada charola en las cámaras de electroforesis.

7. Verter el TBE 0.5X en las cámaras hasta cubrir el gel (~1 mm por encima del gel).

8. Descongelar en hielo las muestras de ADN, ARN y los marcadores de ADN.

9. En un segmento de Parafilm® M, mezclar las muestras de ADN, ARN y los marcadores de ADN con el amortiguador de carga 5X y agua Milli-Q™ hasta un volumen final de 12 µL.

☞ Calcular los volúmenes de ADN, ARN, agua y amortiguador de carga 5X para tener cantidades finales de ADN de 1 µg/pozo, 500 ng de ARN/pozo y una concentración final 1X del amortiguador de carga.

10. Utilizando la micropipeta, cargar lentamente los marcadores de ADN en el pozo correspondiente al primer carril y último carril de cada gel.

☞ No tocar el fondo del pozo con la punta para evitar perforar el gel. Evitar burbujear con la micropipeta mientras se coloca la muestra para que ésta no se salga del pozo.

11. De la misma forma, cargar las muestras de ADN y ARN en los pozos siguientes (registrar el orden de las muestras en los pozos).

12. Cerrar las cámaras de electroforesis y aplicar una corriente de 85 V.

☞ Si la cámara se coloca adecuadamente, se observará la formación de burbujas en los electrodos.

13. Cuando el azul de bromofenol, contenido en el amortiguador de carga, haya migrado lo suficiente (~¾ partes del gel), apagar la fuente de poder y sacar el gel de la cámara.

14. Teñir los geles en una solución de agua Milli-Q™ con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) o SYBR® Green I 1X durante 30 min. Utilizar una charola específica para la tinción y usar un volumen de agua suficiente para cubrir el gel. Si se utiliza SYBR® Green I, la charola se debe proteger de la luz.

👁 El bromuro de etidio es un agente mutagénico y debe manejarse con cuidado, utilice guantes para manipular cualquier material o solución que contenga este químico. Hay que evitar que se derrame la solución de bromuro de etidio o la solución de tinción o tener contacto directo con éstas. En caso de derrame sobre ojos y piel, lavar abundantemente con agua durante 15 minutos usando una ducha de seguridad o un lavajos. En caso de derrame, secar la zona con papel absorbente y limpiar con abundante agua hasta eliminar toda traza de esta sustancia. La punta que contiene bromuro de etidio debe ser descartada en un recipiente especial para material contaminado con bromuro de etidio. La solución de tinción puede ser re-usada varias veces durante un mes hasta descartarse en un contenedor especial para su posterior descontaminación. Consulte el apartado de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual.

15. Examinar los geles en el transiluminador UV a 254 nm y fotodocumentar.

👁 La luz UV es mutagénica, por lo que su exposición debe ser mínima y empleando siempre protección para cara, ojos y manos. Consulte el apartado de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual.

👁 Para análisis de ADN, el TBE 0.5X puede ser reutilizado hasta 5 veces. Después de su uso, colocarlo en una botella distinta a la del TBE que no se ha utilizado. Para análisis de ARN, se recomienda preparar el gel y el TBE 0.5X con agua estéril cada vez que se requiera, para evitar que se degrade durante la electroforesis.



### Análisis de resultados

Compare la información que se puede obtener a partir de los ácidos nucleicos al ser evaluados con electroforesis o con espectrofotometría.

Identifique las bandas obtenidas en cada carril y discuta si se obtuvo el resultado esperado.

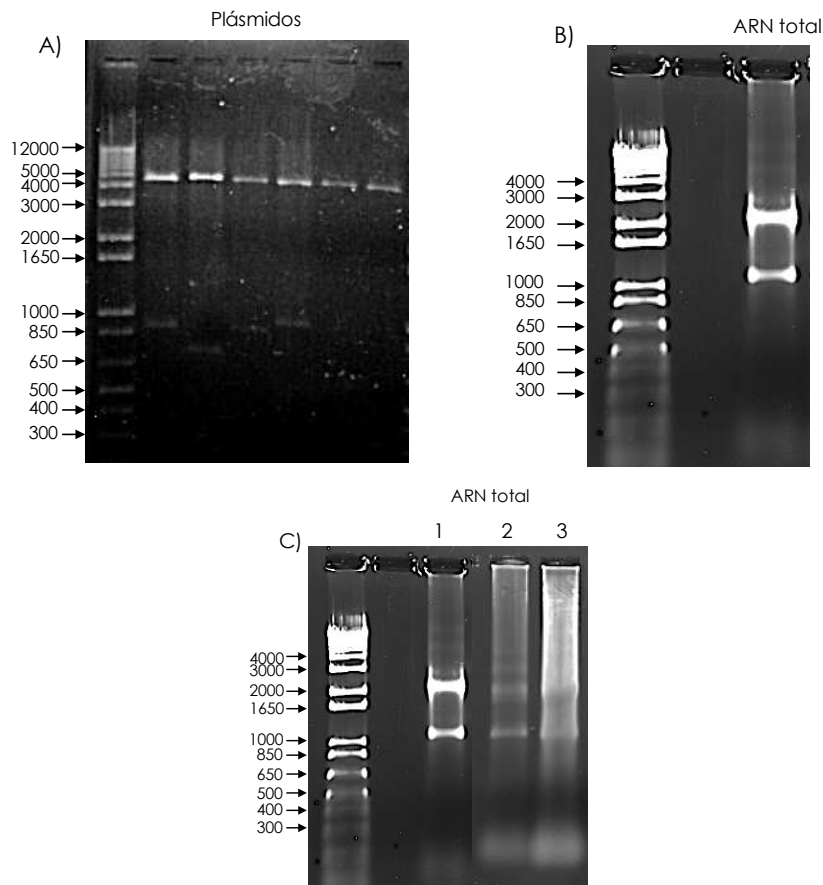
Contraste las imágenes obtenidas con los geles a diferente concentración de agarosa.

### Cuestionario

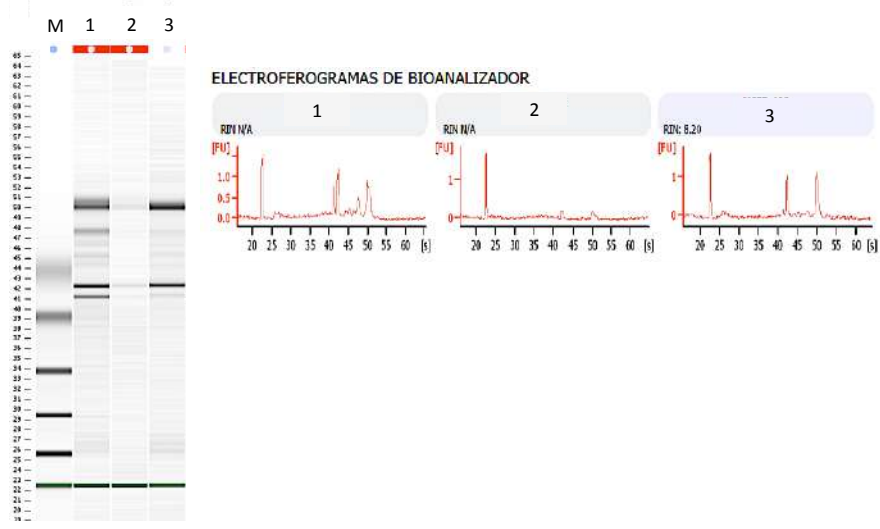
1. El voltaje sugerido para la electroforesis en gel de agarosa es de 1 a 5 V/cm.
  - a. Explique a que se refiere esta relación.
  - b. En la cámara utilizada en esta práctica se aplicaron 85 V. Calcule los V/cm a los que corresponde.
  - c. ¿Cuál es el intervalo de voltajes que pueden ser aplicados en la cámara utilizada? (para ello, calcular el voltaje correspondiente a 1 y 5 V/cm).
2. ¿Qué otras macromoléculas pueden ser separadas por electroforesis en gel? ¿Cuál es el polímero más utilizado para cada una de esas macromoléculas?
3. Mencione tres tipos de agarosa disponibles comercialmente y sus características.
4. Además del azul de bromofenol, ¿qué otro colorante se utiliza en los amortiguadores de carga?
5. ¿Que tipos de geles se pueden utilizar para separar ARN?
6. En las siguientes imágenes se muestran algunos resultados obtenidos en la UEA Técnicas de Biología Molecular I de la Licenciatura en Biología Molecular.
  - a) Evalúe las imágenes de los geles A) y B) al comparar la migración de las bandas de cada carril y comente el efecto de la concentración de agarosa.
  - b) Determine el tamaño aparente de cada banda.

c) Indique qué tipo de ARN corresponde a las bandas obtenidas en el gel mostrado en la figura C).

d) Con base en la respuesta anterior, describa detalladamente la imagen del gel y discuta la calidad del ARN obtenido.

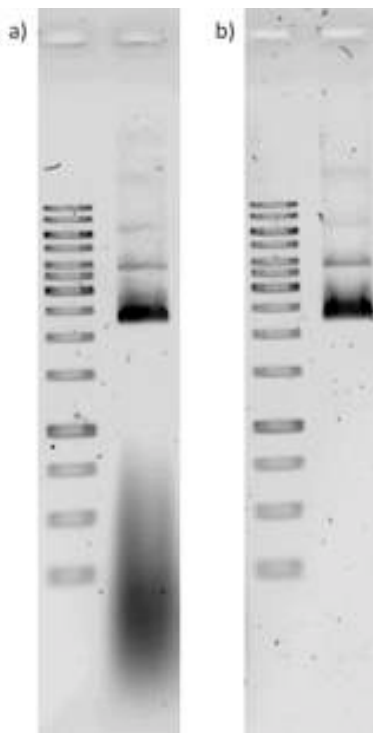


7. Describa y explique los siguientes resultados obtenidos con electroforesis capilar usando un bioanalizador®.



8. En las siguientes fotografías se muestran el resultado de la electroforesis de 2 “minipreps” de un mismo plásmido en un gel de agarosa. Indique cuáles bandas corresponden al ADN plasmídico.

En a) se observa una mancha de ácidos nucleicos en la parte inferior del gel, la cual no se observa en b). ¿Qué pudo haber pasado en la preparación a) comparado con la b)?



### Soluciones

👁 Utilice bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.

- EDTA 0.5 M, pH 8.0 (250 mL)

$PM_{EDTA}$  372.24

Agregar 46.52 g de EDTA en 150 mL de agua Milli-Q™, agitar vigorosamente con una barra magnética y ajustar el pH a 8.0 con NaOH (alrededor de 5 g de NaOH). Ajustar a un volumen de 250 mL. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca. Antes de usar el hidróxido de sodio, consulte la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- TBE 5X

Disolver 27 g de Tris base y 13.75 g de ácido bórico en 300 mL de agua Milli-Q™. Agregar 10 mL de la solución *stock* de EDTA 0.5 M, pH 8.0. Ajustar el volumen a 500 mL. Guardar a temperatura ambiente. Antes de usar el ácido bórico, consulte la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

$PM_{Tris\ base}$  121.14

- TBE 0.5X

Mezclar 50 mL de TBE 5X con 450 mL de agua Milli-Q™, o bien, puede reutilizar TBE 0.5X si se ha usado menos de 5 veces

- Amortiguador de carga 5X

Será proporcionado por el profesor. Homogenizar y mantener a temperatura ambiente.

- Solución de bromuro de etidio (10 mg/mL) o de SYBR® Green I 1X

Serán preparadas por el profesor. Antes de usar el bromuro de etidio o el SYBR® Green I, consulte la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

### Referencias

Sambrook J, Fritsch, EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4a ed. Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.

Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nielsen TW. RNA: A Laboratory Manual. Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2011.

## Práctica 10. Digestión de ADN con enzimas de restricción

### Objetivos

1. Describir las principales características y aplicaciones de las enzimas de restricción de tipo II utilizadas en Biología Molecular.
2. Definir los reactivos que se deben utilizar en las reacciones de digestión por una o varias enzimas de restricción, incluyendo los controles negativos.
3. Realizar la digestión de un ADN plasmídico con enzimas de restricción de tipo II.
4. Interpretar los resultados obtenidos por medio de electroforesis en un gel de agarosa.

### Introducción

Las enzimas de restricción o endonucleasas de restricción de tipo II son enzimas que reconocen secuencias de ADN cortas y específicas. Estas secuencias son palindrómicas, es decir, que la secuencia de nucleótidos en las dos cadenas complementarias de un segmento de ADN es la misma si se lee en la dirección 5' a 3'. Estas enzimas cortan el ADN de doble hebra dentro de las secuencias de reconocimiento (Figura 1). Las enzimas de restricción son producidas por muchas especies de bacterias y algunas arqueas como una forma de protegerse de infecciones virales destruyendo el ADN viral desde su entrada a la célula (Ausubel *et al.*, 2003).

La especificidad de cada una de las enzimas de restricción puede ser considerada como su característica más interesante. Aún y cuando todas las enzimas de restricción se pueden unir a secuencias no específicas, bajo las condiciones adecuadas la diferencia de la velocidad de corte del sitio de mayor especificidad es mucho más alta

respecto a la velocidad de corte de la misma enzima en su segundo mejor sitio de unión. Sin embargo, en condiciones no óptimas, las velocidades de corte entre los sitios cambian fuertemente para muchas enzimas. Esta pérdida de fidelidad o el incremento de cortes en sitios similares al sitio afín, se conoce como actividad *star* (estrella). Cada enzima de restricción tiene requerimientos específicos para alcanzar su actividad óptima. Las condiciones ideales de almacenamiento y de reacción favorecen la mejor actividad y la mayor fidelidad en las funciones particulares de cada enzima. Las condiciones como la temperatura, el pH, la utilización de cofactores, la composición del amortiguador y la fuerza iónica, afectan a la actividad y estabilidad enzimática.

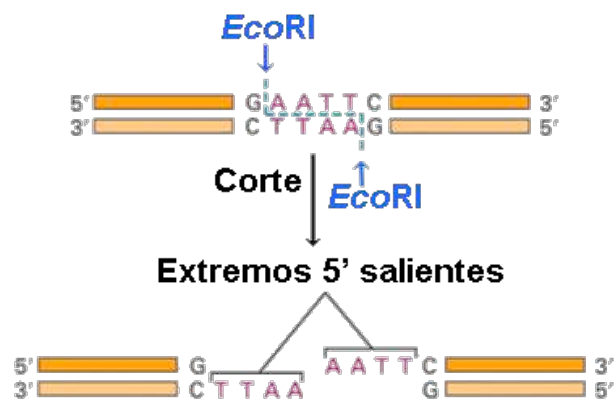


Figura 1. Digestión de ADN con la enzima de restricción *EcoRI*.

Las condiciones para llevar a cabo una reacción de digestión de forma óptima incluyen:

- pH. La mayoría de las enzimas de restricción se utilizan a pH de entre 7.2 y 8.5. Un pH fuera de rango puede provocar actividad *star*.
- $Mg^{2+}$ . Las enzimas de restricción comerciales solo requieren  $Mg^{2+}$  como cofactor. Las enzimas de restricción son relativamente insensibles a la concentración de  $Mg^{2+}$ . Sin embargo, la presencia de otros iones metálicos, especialmente el  $Mn^{2+}$ , puede provocar actividad *star*.

- Seroalbúmina bovina (BSA). Es utilizada en los amortiguadores de almacenamiento y se puede adicionar a la reacción de digestión para estabilizar la enzima. La BSA puede proteger a las enzimas de restricción de las proteasas y de factores ambientales como el calor, la tensión superficial u otras sustancias que puedan interferir con su actividad. La adición de 0.1 mg/mL de BSA puede aumentar de 1.5 a 6 veces la actividad enzimática.
- Glicerol. Se adiciona al amortiguador de almacenamiento para evitar la congelación de la enzima a -20 °C. El congelar y descongelar repetidamente las enzimas de restricción puede reducir su actividad. La concentración de glicerol no debe ser mayor del 5% (p/v) al momento de hacer la reacción de digestión.
- Temperatura de incubación. La mayoría de las enzimas de restricción muestran actividad máxima a 37 °C. Son pocas las enzimas que requieren temperaturas menores o mayores. Generalmente la temperatura de incubación de la enzima refleja la temperatura de crecimiento del microorganismo del cual se obtuvo.
- Volumen. Las soluciones viscosas de ADN impiden la difusión de la enzima y puede reducir la actividad enzimática. Las soluciones de ADN muy diluidas se pueden encontrar por debajo de la  $K_m$  de la enzima y se afecta su actividad. Para determinar el volumen ideal de la reacción de restricción, se debe considerar la fuerza iónica y la concentración final de glicerol. Los volúmenes de reacción recomendados son de 10 a 50  $\mu\text{L}$  por cada  $\mu\text{g}$  de ADN.

Los sustratos (ADN) más comúnmente utilizados en la digestión con enzimas de restricción son:

- ADN plasmídico: comparado con el ADN lineal, la digestión completa del ADN plasmídico requiere más unidades de enzima debido a su súper-enrollamiento o al número de sitios por digerir (dependiendo del tamaño y secuencia del plásmido).
- ADN genómico: la digestión se dificulta debido a la metilación del ADN y a la viscosidad de la muestra. El ADN genómico se digiere con mayor eficiencia en



concentraciones mínimas de 1 µg por cada 50 a 200 µL. Para mejorar la actividad enzimática se puede calentar la muestra a 65 °C o agregar BSA a la reacción.

- Productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): El ADN amplificado por PCR puede ser digerido con enzimas de restricción que tienen sitios de reconocimiento adentro de la secuencia amplificada o en la región de los cebadores. La cantidad de unidades enzimáticas necesarias debe ser balanceada con el número total de sitios para asegurar la digestión completa. La actividad de la enzima en el extremo de un fragmento o cerca de él puede ser menor o, incluso, en ocasiones, nula. Se recomienda adicionar bases extra en el extremo de los *primers* (New England Biolabs: <https://international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/cleavage-close-to-the-end-of-dna-fragments>).

Además de la forma y fuente del ADN, es importante considerar también la pureza de las muestras. Dependiendo del método de extracción y purificación del ADN, la muestra puede tener contaminantes que afecten a la digestión enzimática. Los contaminantes son de diferentes tipos. Las proteínas pueden contener nucleasas que degradan al ADN en presencia de iones  $Mg^{2+}$ . La presencia de trazas de solventes como el fenol, cloroformo o etanol puede conducir a la desnaturalización de las enzimas. Las sales como CsCl y NaCl pueden disminuir la actividad enzimática. El EDTA puede quelar los iones  $Mg^{2+}$  y disminuir la actividad de las enzimas de restricción.

La nomenclatura para denominar a las enzimas de restricción consiste en tres letras que representan el nombre genérico y específico del organismo del cual se aisló; por ejemplo, *EcoRI* toma su nombre de *Escherichia coli*, “R” es la cepa y el número romano “I” indica que fue la primera que se descubrió en esta bacteria (Perera *et al.*, 2002).

### Material y equipo necesario

ADN del plásmido pBR322 en concentración conocida

Enzimas *EcoRV* y *PstI*

Amortiguador de restricción 10X para *EcoRV* y *PstI*

BSA (10 mg/mL)

Marcador de ADN

Agua Milli-Q™ estéril

Incubadora a 37°C

Vórtex

Microtubos de 1.6 mL, nuevos y estériles

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

Micropipetas y puntas de 2 µL, 20 µL y 200 µL

Hielo/contenedor

Lo necesario para analizar las reacciones de digestión por electroforesis horizontal en gel de agarosa, descrito en la práctica 9.

### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consultar las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

👁 Utilizar bata y guantes en todo momento.

1. Rotular cuatro microtubos: uno para *EcoRV*, otro para *PstI*, otro para la doble digestión y otro para el control negativo (es decir, sin enzima).
2. Calcular el volumen de ADN que debe emplearse para tener 1 µg de ADN por reacción (la concentración del ADN será determinada en la práctica 8).
3. Calcular los volúmenes de enzima, amortiguador, BSA y agua que deben agregarse a cada reacción para un volumen final de 50 µL y reportarlas en la Tabla 1.

Las enzimas *EcoRV* y *PstI* funcionan adecuadamente en el mismo amortiguador. Se necesitan 10 unidades de enzima por 1 µg de ADN y de BSA se requieren 100 µg/mL para cada reacción.

**Tabla 1. Componentes de la reacción de digestión.**

Reactivo	Digestión <i>EcoRV</i>	Digestión <i>PstI</i>	Digestión <i>EcoRV</i> y <i>PstI</i>	Control negativo
Agua Milli-Q™				
Amortiguador (10X)				
BSA (10 mg/mL)				
ADN				
<i>EcoRV</i> (10 U/µL)				
<i>PstI</i> (10 U/µL)				
Volumen total	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

4. Descongelar el amortiguador y la BSA a temperatura ambiente, homogeneizar y luego colocar los microtubos en hielo. Descongelar el ADN en hielo.

☞ Las enzimas deberán sacarse del congelador al momento de ser usadas y mantenerse en hielo. Regresarlas al congelador inmediatamente después de su uso.

5. Agregar los ingredientes para hacer la mezcla de reacción en cada microtubo comenzando por el agua, seguido del amortiguador, de la BSA, del ADN y finalmente, terminar por las enzimas. En el microtubo “control negativo” agregar agua en vez de enzima.

☞ Cambiar las puntas siempre que cambies de reactivo, o si de forma accidental la punta toca el líquido de uno de los tubos. Ante cualquier duda, ¡cambiar la punta!

6. Mezclar los componentes golpeando suavemente los tubos con el dedo o dar un pulso en la centrífuga a los microtubos durante 5 s para hacer que el líquido quede en el fondo del tubo.

7. Incubar las reacciones a 37 °C durante 1-2 h.

8. Visualizar las cuatro reacciones de digestión por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X como descrito en la práctica 9.

👁️ Dependiendo del tamaño de los fragmentos esperados, el porcentaje de agarosa sugerido puede variar.

### Análisis de resultados

Evaluar la imagen del gel al comparar las bandas en cada carril. Determinar el peso molecular aparente de cada banda y comparar las bandas observadas en el gel con las bandas esperadas de acuerdo al mapa de restricción del plásmido pBR322 (<https://international.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/dna-sequences-and-maps-tool>).

### Cuestionario

1. ¿Qué son los sistemas de restricción-modificación bacterianos?
2. Dar un ejemplo de secuencia de ADN palindrómica.
3. Observar las secuencias de los dos fragmentos de ADN mostrados a continuación, en los que por simplificación se representa una sola cadena:

Fragmento 1 5'-CAGTGATCTCGAATTCGCTAGTAACGTT-3'

Fragmento 2 5'-TCATGAATTCCTGGAATCAGCAAATGCA-3'

Escribir las secuencias con dos cadenas. Si ambos fragmentos fueran tratados con una enzima de restricción cuyo sitio de reconocimiento fuera G↓AATTC, indicar qué tipo de corte se provocaría (romo o con extremos salientes o cohesivos), el número de fragmentos y el tamaño de los fragmentos que se obtendrían para cada caso.

Fragmento 1

Fragmento 2

Tipo de corte:

Tipo de corte:

Nº de fragmentos:

Nº de fragmentos:

Tamaño de cada fragmento:

Tamaño de cada fragmento:

4. Escribir la procedencia, las secuencias de los sitios de reconocimiento, el sitio del corte, y el resultado de la digestión para cada una de las siguientes enzimas de restricción siguiendo el ejemplo de *Xba*I:

Enzima	Procedencia	Sitio de reconocimiento 5'→ 3'	Sitio de corte	Resultado de la digestión del lado 5'	Resultado de la digestión del lado 3'
<i>Xba</i> I	<i>Xanthomonas badrii</i>	TCTAGA	T↓CTAGA	T	CTAGA
<i>Hind</i> III					
<i>Bam</i> HI					
<i>Pst</i> I					
<i>Sal</i> I					

5. ¿Cuál es el número de fragmentos que se obtendrían después de la digestión de la siguiente secuencia, con las enzimas *Eco*RI, *Hind* III y *Sal*I? (considerar digestiones por separado).

5'ATCAGGAAGCTTCCGGCCGCTCGCTCTGTTCCGGCCGTCAACTGGAATTCTTCGCCCCGCAT  
AGTAGGCCCGCACCTTGGGGTTCGACCGCCGCCACAGCGGCGGGATCAGCGCCAGCACCACC  
ATCCCGGCATAAGCTTGCTGGGCATCTGCGGGCTATCGTCAGAATTCGGGAGTCGACCTGA  
TAGGGGCGTTTGGCGAATTCATGATGGTCGGAATGCCGTTGCAGATGGAACAGGACCAAGC  
TTGGTGAAGACGAAGTTGCTGTTCCAAACATA-3'

6. Indicar el número y tamaño de los fragmentos que se obtendrían después de digerir el ADN del plásmido pBR322 con las enzimas *Not*I, *Eco*RV y *Hinc*II (considerar digestiones por separado). La secuencia del plásmido puede ser obtenida de GenBank con el número de acceso J01749 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/J01749.1>).

### Soluciones

👁 Utilizar bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.

- Amortiguador de restricción 10X para *EcoRI* e *HindIII*

Será proporcionado por el profesor. Debe ser descongelado, homogenizado y mantenido en hielo.

- BSA (1 mg/mL)

Será proporcionada por el profesor. Descogelar, homogenizar y mantener en hielo.

### Referencias

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Capítulo 3. Estados Unidos: Wiley; 2003.

Perera J, Tormo A, García JL. Ingeniería genética. Volumen I. Preparación, análisis, manipulación y clonaje del DNA. Capítulo 5. España: Síntesis; 2002.

## Práctica 11. Reacción en cadena de la polimerasa “PCR”

### Objetivos

1. Comprender las bases teóricas de la técnica de PCR.
2. Definir los reactivos que se deben utilizar en cada reacción de PCR, incluyendo el control negativo.
3. Conocer un termociclador e introducir los parámetros necesarios para llevar a cabo correctamente una PCR.
4. Discutir los resultados obtenidos por medio de electroforesis en un gel de agarosa.

### Introducción

En 1983, el bioquímico Kary Mullis desarrolló esta técnica de Biología Molecular que desde entonces ha revolucionado la investigación biológica y médica, lo que le llevó a recibir el premio Nobel de Química de 1993. Esta técnica, denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), transformó a la Biología Molecular en una herramienta de investigación multidisciplinaria. Muchas de las técnicas de Biología Molecular usadas antes de la invención de la PCR para amplificar fragmentos de ADN eran muy laboriosas, consumían mucho tiempo y requerían un alto nivel de especialización técnica, por lo que en algunos campos de la Biología no era práctico ni rentable su uso (Farrell y Taylor, 2006).

La PCR es una técnica que replica enzimáticamente al ADN *in vitro*, permitiendo que una pequeña cantidad de moléculas de ADN (molde) sean amplificadas selectivamente de manera exponencial (Figura 1). Una de las principales razones por las cuales la PCR es una herramienta tan poderosa es su simplicidad y especificidad.

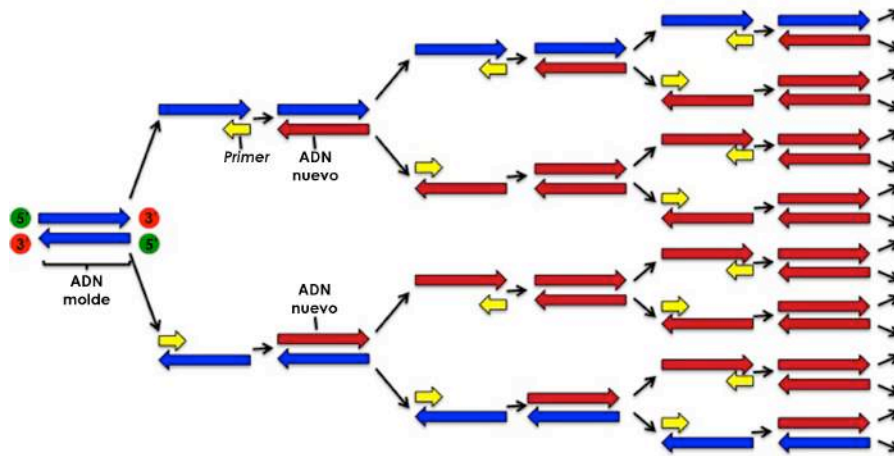


Figura 1. Amplificación exponencial del ADN por PCR.

El primer paso crítico es la selección del ácido nucleico a partir del cual se amplificará la secuencia de interés; a este ácido nucleico suele llamársele molde. Por lo general, la PCR está diseñada para permitir la amplificación selectiva de una secuencia específica de ADN blanco dentro de un conjunto heterogéneo de secuencias. El siguiente punto a considerar es la selección de *primers* o cebadores. Para amplificar selectivamente una secuencia de ADN es necesario diseñar dos cebadores de unos 18 a 25 nucleótidos de largo, que sean complementarios a las secuencias que flanquean a la secuencia blanco. Para reducir la posibilidad de que los cebadores se enlacen en otros sitios del ADN que no sean los deseados, es necesario tomar en cuenta varias consideraciones en su diseño:

- Composición de bases. El contenido de GC debe ser de 40 a 60% con una distribución uniforme de los 4 nucleótidos A, T, C y G.
- Temperatura de fusión ( $T_m$ ). Es la temperatura a la cual el 50% del ADN está desnaturizado. Los valores de  $T_m$  calculados para los dos cebadores usados juntos no deben variar en más de 5 °C.
- Secuencias terminales 3'. No deben ser secuencias complementarias a alguna región del otro cebador utilizado en la misma reacción.



- Secuencias autocomplementarias. Deben evitarse repeticiones invertidas o cualquier secuencia autocomplementaria de más de 3 pb de largo.

La PCR estándar consiste en una serie de ciclos de 3 reacciones sucesivas:

- Desnaturalización. Se ajusta a una temperatura de 93 a 95 °C para el ADN genómico.
- Alineamiento (*annealing*). A temperatura variable (entre 45 a 65 °C) de acuerdo con la T<sub>m</sub> de los cebadores (por lo regular la temperatura de alineamiento se ajusta a 5 °C menos respecto a la T<sub>m</sub> calculada). En esta fase los dos cebadores se hibridan con sus respectivas secuencias complementarias en el molde.
- Síntesis o polimerización. De manera característica alrededor de 70 a 75 °C (temperatura óptima a la cual trabaja la enzima). La ADN polimerasa empleada es termoestable, por lo que no se afecta por los pasos de desnaturalización.

Las cadenas recién sintetizadas pueden servir a su vez como moldes para la síntesis del nuevo ADN, lo que da lugar a una reacción en cadena con un incremento exponencial del producto (Ausubel *et al.*, 2002).

Una desventaja evidente de la PCR es el tamaño limitado de los productos de la amplificación: es cada vez más difícil obtener una amplificación eficiente a medida que aumenta la longitud del producto deseado. Sin embargo, recientemente se comercializan ADN polimerasas capaces de amplificar fragmentos incluso superiores a 30 kpb.

La PCR tuvo gran impacto en 4 áreas principales de la Biología Molecular: el mapeo de genes, la clonación, la secuenciación de ADN y la detección de genes. La PCR es ahora utilizada como una herramienta de diagnóstico médico de enfermedades infecciosas o para detectar mutaciones específicas que pueden causar enfermedades genéticas, en las investigaciones criminales para identificar a los sospechosos a nivel molecular, en pruebas de paternidad y en la secuenciación del genoma humano, por mencionar algunos usos (Bruns *et al.*, 2007).

### Material y equipo necesario

Microtubos de 0.2 mL, nuevos y estériles

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

Micropipetas y puntas de 2  $\mu$ L y 20  $\mu$ L estériles

Muestra de ADN molde a concentración conocida (se recomienda un ADN plasmídico con un inserto que pueda ser amplificado con cebadores comerciales universales como los derivados de secuencias de M13)

Agua Milli-Q™ estéril

Amortiguador de PCR 10X

MgCl<sub>2</sub> 25 mM

dNTP's 1.5 mM

Cebador 5' a 50  $\mu$ M

Cebador 3' a 50  $\mu$ M

*Taq* ADN polimerasa (5 U/ $\mu$ L)

Hielo/contenedor

Termociclador

Vórtex

Microcentrífuga

Congelador a -20 °C

Lo necesario para analizar las reacciones de PCR por electroforesis horizontal en gel de agarosa, descrito en la práctica 9.

## Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consulte las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

☞ Utilice bata y guantes en todo momento.

1. Rotular 2 microtubos de 0.2 mL: uno para la reacción de PCR experimental y otro para el control negativo. Mantener siempre los tubos en hielo.

2. Descongelar los reactivos necesarios (excepto la *Taq* polimerasa) y mantener en hielo. Agitar los reactivos con vórtex, excepto el ADN y la enzima. Antes de abrir los reactivos, dar un pulso en la microcentrífuga durante 5 s para hacer que el líquido quede en el fondo del microtubo.

☞ Sacar la polimerasa del congelador al momento de usarla y mantenerla en hielo en todo momento. Regresar la enzima al congelador inmediatamente después de usarla.

3. En los microtubos de 0.2 mL sobre hielo, agregar los reactivos para hacer el coctel de reacción. Seguir el orden indicado en la Tabla 1, comenzando por el agua. Cerciorarse que los reactivos se coloquen en el fondo de los microtubos.

**Tabla 1. Componentes del coctel de reacción de PCR.**

Componente	Experimental	Control negativo
Agua Milli-Q™	Completar a 50 µL	Completar a 50 µL
Amortiguador 10X	5 µL	5 µL
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4 µL	4 µL
Cebador 5' 50 µM	5 µL	5 µL
Cebador 3' 50 µM	5 µL	5 µL
dNTP's 1.5 mM	15 µL	15 µL
ADN molde	χ µL*	-
<i>Taq</i> ADN polimerasa 5 U/µL	0.5 µL	0.5 µL

\* Calcular el volumen necesario para tener 50 ng de ADN en la reacción.

- Mezclar los componentes golpeando suavemente los tubos con el dedo y dar un pulso en la microcentrífuga durante 5 s para hacer que el líquido quede en el fondo del microtubo y se mezclen todos los componentes.
- Programar el termociclador con las condiciones de amplificación necesarias, siguiendo como guía la Tabla 2 y colocar los microtubos en el equipo.

**Tabla 2. Condiciones de amplificación.**

Fase	No. ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	1	94 °C	3 min
Desnaturalización	25 a 35	94 °C	30 s
Alineamiento		Tm de los cebadores	30 s
Polimerización		72 °C	1 min por c/kpb a amplificar <sup>§</sup>
Extensión final	1	72 °C	7 min

<sup>§</sup> El tamaño del amplicón esperado será proporcionado por el profesor.

6. Al terminar la reacción, visualizar lo amplificado por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X como fue descrito en la práctica 9. No olvidar cargar un carril con marcador de ADN. Utilizar el 10% de cada reacción de PCR.

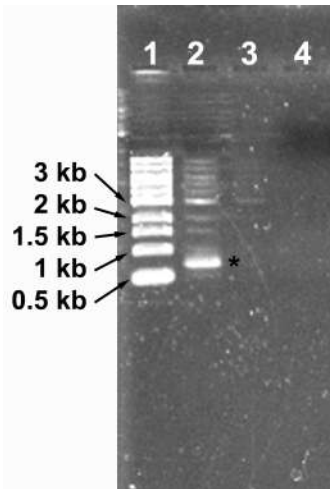
☞ Dependiendo del tamaño de los fragmentos esperados, el porcentaje de agarosa sugerido puede variar.

7. Almacenar las reacciones de PCR a -20 °C.

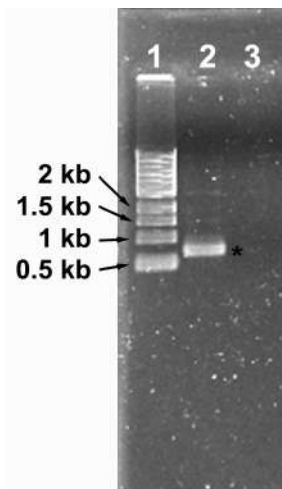
### Análisis de resultados

Describe detalladamente la imagen del gel y determine el tamaño aparente del producto de la PCR (amplicón) obtenido, comparándolo con el marcador de ADN. Ahora compare el tamaño aparente con el tamaño esperado. Discuta las posibilidades si es que obtiene más bandas de las esperadas. Describe lo que observa en el carril del control negativo y discuta las posibilidades si es que obtiene bandas en ese carril.

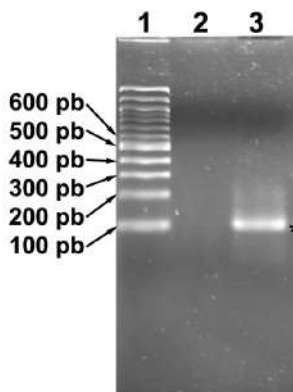
En las siguientes imágenes se muestran algunos resultados obtenidos en la UEA Técnicas de Biología Molecular I de la Licenciatura en Biología Molecular.



Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de un producto de PCR de 687 pb, teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de ADN; carril 2, muestra de la reacción de PCR experimental; carril 3, no se cargó muestra; carril 4, muestra de la reacción de PCR control negativo. Durante el cargado del marcador de ADN en el carril 1, los carriles 2 y 3 se contaminaron, por lo que se observa un bandeo que coincide con las bandas del marcador de ADN. El producto de PCR del tamaño esperado se indica con un asterisco.



Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de un producto de PCR de 687 pb, teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de ADN; carril 2, muestra de la reacción de PCR experimental; carril 3, muestra de la reacción de PCR control negativo. En el carril 2 se observa el producto de PCR del tamaño esperado (indicado con un asterisco) y productos de amplificación inespecíficos. La falta de definición de las bandas se debe a que la electroforesis se realizó a alto voltaje y por poco tiempo.



Electroforesis en gel de agarosa al 2% de un producto de PCR de 103 pb, teñido con bromuro de etidio. Carril 1, marcador de ADN; carril 2, muestra de la reacción de PCR control negativo; carril 3, muestra de la reacción de PCR experimental. En el carril 3 se observa el producto de PCR del tamaño esperado (indicado con un asterisco).

## Cuestionario

1. ¿Por qué los cebadores tienen entre 20 y 30 nucleótidos de largo? Toma en cuenta las posibilidades combinatorias.
2. ¿Por qué la temperatura de alineamiento depende de la secuencia de los cebadores?
3. Explique por qué la longitud precisa de la secuencia de ADN molde no llega a ser amplificada hasta el tercer ciclo. Realiza un dibujo que explique tu respuesta.
4. Un fragmento de ADN humano de 3 kpb será amplificado por PCR. El tamaño del genoma es  $3 \times 10^9$  pb. ¿Qué fracción del ADN total constituye la secuencia blanco antes de la amplificación? ¿Qué fracción del ADN total constituye la secuencia blanco después de 10 ciclos de PCR?
5. Un investigador planea usar la PCR para amplificar parte de una secuencia de ADN mostrada abajo, resaltada en negritas. Escribe la secuencia de los cebadores que deben utilizarse (de 20 nucleótidos), incluida su polaridad 5' y 3'.

5'ACAGAGCACCAGCTCTGAGGAACTCGTCCCAAGCCCCCATCTCCACTTCCTCCCCCTCGA  
GTGTACAAACCCTGCTTCGTCTGCCAGGACAAATCATCAGGGTACCACTATGGGGTCAGCG  
CCTGTGAGGGATGTAAGGGCTTTTTCCGCAGAAGTATTCAGAAGAATATGATTTACTTGTG  
TCACCGAGATAAGAAGTGTGTTATTAATAAAGTCACCAGGAATCGATGCCAATACTGTCTGA  
CTCCAGAAGTGCTTTGAAGTGGGAATGTCCAAAGAATCTGTCAGGAATGACAGGAACAAG  
AAAAAGAAGGAGACTTCGAAGCAAGAATGCACAGAGAGCTATGAAATGACAGCTGAGTT  
**GGACGATCTCACAGAGAAGATCCGAAAAGCTCACCAGGAACTTTCCCTTCACTCTGCC**  
**AGCTGGGTAAATACACCACGAATTCCAGTGCTGACCATCGAGTCCGACTGGACCTGGG**  
**CCTCTGGGACAAATTCAGTGAAGTGGCCACCAAGTGCATTATTAAGATCGTGGAGTTT**  
**GCTAAACGTCTGCCTGGTTTTCACTGGCTTGACCATCGCAGACCAAATTACCCTGCTGAA**  
**GGCCGCCTGCCTGGACATCCTGATTCTTAGAATTTGCACCAGGTATACCCAGAACAAG**  
**ACACCATGACTTTCTCAGACGGCCTTACCCTAAATCGAACTCAGATGCACAATGCTGG**  
**ATTTGGTCTCTGACTGACCTTGTGTTACCTTTGCCAACCAGCTCCTGCCTTTGGAAA**  
**TGGATGACACAGAAACAGGCCTTCTCAGTGCCATCTGCTTAATCTGTGGAGACCGCCA**

**GGACCTTGAGGAACCGACAAAAGTAGATAAGCTACAAGAACCATTGCTGGAAGCACTA  
AAAATTTATATCAGAAAAAGACGACCCAGCAAGCCTCACATGTTTCCAAAGATCTTAA  
TGAAAATCACAGATCTCCGTAGCATCAGTGCTAAAGGTGCAGAGCGTGTAATTACCTTGA  
AAATGGAAATTCCT-3'**

## Soluciones

👁 Utilice bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.

- Amortiguador de PCR 10X

Será proporcionado por el profesor. Descongelar, homogenizar y mantener en hielo.

- MgCl<sub>2</sub> 25 mM

Será proporcionado por el profesor. Descongelar, homogenizar y mantener en hielo.

- dNTP's 1.5 mM

Serán proporcionados por el profesor. Descongelar, homogenizar y mantener en hielo.

- Cebador 5' a 50 μM

Será proporcionado por el profesor. Descongelar, homogenizar y mantener en hielo.

- Cebador 3' a 50 μM

Será proporcionado por el profesor. Descongelar, homogenizar y mantener en hielo.

## Referencias

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Short Protocols in Molecular Biology. 5a ed. Estados Unidos: Wiley; 2002.

Bruns DE, Ashwood ER, Burtis CA. Fundamentals of molecular diagnostics. Estados Unidos: Elsevier Health Sciences; 2007.

Farrell SO, Taylor LE. Experiments in biochemistry: a hands-on approach: a manual for the undergraduate laboratory. 2a ed. Estados Unidos: Thomson Brooks/Cole; 2006.



## Práctica 12. Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa “RT-PCR”

### Objetivo

1. Comprender las bases teóricas de la técnica de RT-PCR.
2. Identificar las diferencias entre las técnicas de PCR y RT-PCR.
3. Realizar una reacción de RT-PCR.
4. Analizar los resultados obtenidos por medio de electroforesis en un gel de agarosa.

### Introducción

A partir del descubrimiento de la transcriptasa reversa, una enzima viral capaz de sintetizar una cadena de ADN a partir de una cadena de ARN (proceso conocido como transcripción reversa) se han perfeccionado sucesivamente métodos experimentales para detectar y cuantificar ARNs (desde los ARNm hasta ARNs no codificantes). Así se desarrolló la RT-PCR (Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa), una variante de la PCR que permite detectar y cuantificar una molécula específica de ARN (Rio *et al.*, 2011). Debido a su simplicidad, especificidad y sensibilidad, la RT-PCR representa hoy en día una de las técnicas imprescindibles en la biología molecular. En general hay tres tipos de ensayos de RT-PCR: cualitativa (de punto final); semicuantitativa y cuantitativa. Actualmente la RT-PCR cuantitativa, conocida como RT-PCR (RT-qPCR), es una de las herramientas de biología molecular más poderosas para determinar la presencia y el número de moléculas de un ARN en una célula (Sambrook *et al.*, 2012).

La RT-PCR cualitativa o de punto final es utilizada para determinar si un ARN en particular se encuentra en una muestra biológica; en otras palabras, si un gen se está

expresando en una célula en particular o bajo una condición determinada. Por lo tanto, la importancia de la RT-PCR radica en que es una técnica para estudiar la expresión de genes a través de la identificación de los ARNs que producen (Zamorano *et al.*, 1996). La detección de un ARN específico es inicialmente llevada a cabo mediante la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del molde de ARN. Este proceso se lleva a cabo por transcripción reversa (RT). Subsecuentemente, el ADNc de interés es amplificado exponencialmente por PCR convencional (Figura 1).

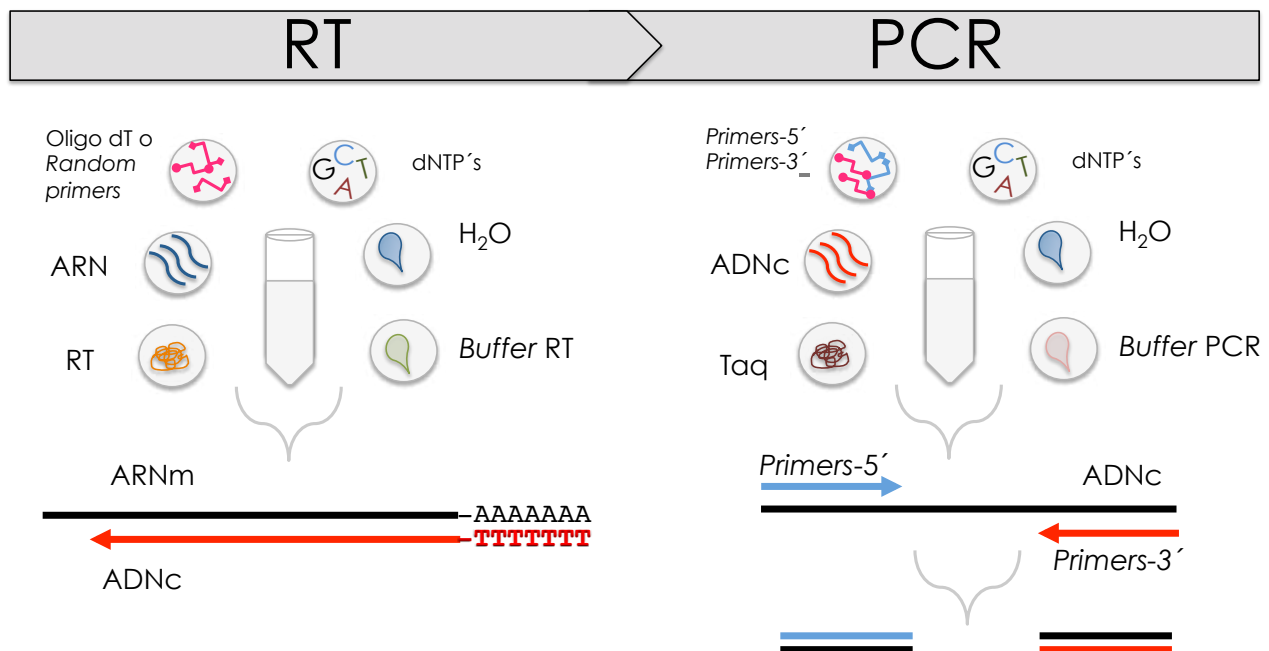


Figura 1. Esquema que muestra el proceso de RT-PCR.

### Material y equipo necesario

- Microtubos de 0.2 mL, nuevos y estériles
- Rejilla para microtubos
- Guantes de látex o nitrilo
- Micropipetas y puntas de 2 µL y 20 µL estériles

Muestra de ARN total a concentración conocida

Agua Milli-Q™ estéril o agua libre de nucleasas

Transcriptasa reversa (15 U/μL)

Amortiguador de RT 10X

Oligo(dT)<sub>15</sub> o *Random Primers* (0.5 μg/μL)

MgCl<sub>2</sub> 25 mM

dNTP's 10 mM

Hielo/contenedor

Termociclador

Vórtex

Congelador a -20 °C

Lo necesario para realizar reacciones de PCR, descrito en la práctica 11.

Lo necesario para analizar las reacciones de RT-PCR por electroforesis horizontal en gel de agarosa, descrito en la práctica 9.

### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consulte las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

👁 Utilice bata y guantes en todo momento.

#### ***a. Reacción de Transcripción Reversa (RT)***

1. Rotular 2 microtubos de 0.2 mL: uno para la reacción de RT experimental y otro para el control negativo. Mantener siempre los microtubos en hielo hasta colocarlos en el termociclador.

2. Descongelar los reactivos necesarios (excepto la transcriptasa reversa) y mantener en hielo. Agitar los reactivos con vórtex, excepto el ARN y la enzima. Antes de abrir los

reactivos, dar un pulso en la microcentrífuga durante 5 s para hacer que el líquido quede en el fondo del microtubo.

☞ Sacar la transcriptasa reversa del congelador al momento de usarla y mantenerla en hielo en todo momento. Regresarla al congelador inmediatamente después.

3. En los microtubos de 0.2 mL sobre hielo, agregar los reactivos para hacer el primer coctel de reacción (primera reacción). Seguir el orden indicado en la Tabla 1. Cerciorarse que los reactivos se coloquen en el fondo de los microtubos.

**Tabla 1. Componentes del coctel de la primera reacción de RT.**

Componente	Experimental	Control negativo
Agua Milli-Q™	Completar a 20 µL	Completar a 20 µL
ARN total	$\chi$ µL*	-
Oligo(dT) <sub>15</sub> o <i>Random Primers</i> (0.5 µg/µL)	1 µL	1 µL
dNTP's 10 mM	1 µL	1 µL

\* Calcular el volumen necesario para tener 1 µg de ARN total en la reacción.

4. Mezclar los componentes golpeando suavemente los tubos con el dedo y dar un pulso en la microcentrífuga durante 5 s para hacer que el líquido quede en el fondo del microtubo y se mezclen todos los componentes.

5. Programar el termociclador con las condiciones de pre-amplificación necesarias, siguiendo como guía la Tabla 2.

**Tabla 2. Condiciones de pre-amplificación de la primera reacción**

Fase	No. ciclos	Temperatura	Tiempo
Si se usa Oligo-(dT) <sub>15</sub>			
Pre-amplificación	1	70 °C	10 min
Paro de pre-amplificación	1	4 °C	2-4 min
Si se usan <i>Random Primers</i>			
Pre-amplificación	1	65 °C	5 min
Paro de pre-amplificación	1	0 °C	2-4 min

6. Colocar los microtubos en el termociclador y llevar a cabo la primera reacción.
7. Después de finalizar la primera reacción, colocar los tubos en hielo y agregar al correspondiente microtubo el resto de los componentes que se muestran en la Tabla 3 (segunda reacción).

**Tabla 3. Componentes del coctel de la segunda reacción de RT.**

Componente	Experimental	Control negativo
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4 µL	4 µL
Amortiguador RT 10X	2 µL	2 µL
Transcriptasa reversa (15 U/µL)	1 µL	1 µL

8. Mezclar los componentes golpeando suavemente los tubos con el dedo y dar un pulso en la microcentrífuga durante 5 s para hacer que el líquido quede en el fondo del microtubo y se mezclen todos los componentes.
9. Programar el termociclador con las condiciones de amplificación, siguiendo como guía la Tabla 4 y colocar los microtubos en el equipo.

**Tabla 4. Condiciones de amplificación de la segunda reacción.**

Fase	No. ciclos	Temperatura	Tiempo
Si se usa Oligo-(dT) <sub>15</sub>			
Amplificación	1	42 °C	60 min
Paro de amplificación	1	4 °C	~
Si se usan <i>Random Primers</i>			
Pre-amplificación	1	4 °C	10 min
Primera amplificación	1	15 °C	10 min
Amplificación	1	42 °C	20 min
Terminación	1	70 °C	15 min
Paro de amplificación	1	4 °C	~

10. Una vez finalizada la reacción de RT, el ADNc obtenido se almacena a -20 °C o bien, se utiliza para amplificar por PCR. En la Tabla 5 se muestran los componentes de la reacción de PCR. La reacción de PCR se lleva a cabo siguiendo las condiciones indicadas en la práctica 11.

11. Al terminar la reacción de PCR, visualizar lo amplificado por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X como fue descrito en la práctica 9. No olvide cargar un carril con marcador de ADN. Utilice el 10% de cada reacción de PCR.

👁 Dependiendo del tamaño de los fragmentos esperados, el porcentaje de agarosa sugerido puede variar.

**Tabla 5. Componentes del coctel de la reacción de PCR**

Componente	Experimental	Control negativo RT	Control negativo PCR
Agua Milli-Q™	Completar 50 µL	Completar 50 µL	Completar 50 µL
Amortiguador 10X	5 µL	5 µL	5 µL
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4 µL	4 µL	4 µL
Cebador 5' 50 µM	5 µL	5 µL	5 µL
Cebador 3' 50 µM	5 µL	5 µL	5 µL
dNTP's 1.5 mM	15 µL	15 µL	15 µL
ADNc	1 µL	1 µL	-
<i>Taq</i> polimerasa 5 U/µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL

### Análisis de resultados

Describe detalladamente la imagen del gel y determine el tamaño aparente del producto de la PCR (amplicón) comparándolo con el marcador de ADN. Discuta las posibilidades si es que obtiene más bandas de las esperadas. Describe lo que observa

en el carril de los controles negativos y discuta las posibilidades si es que se obtienen bandas en esos carriles.

### Cuestionario

1. ¿Qué tipos de ARNs pueden estudiarse con la técnica de RT-PCR?
2. ¿Cuáles son las diferencias entre oligo(dT)<sub>15</sub> y *random primers*?
3. ¿Por qué las condiciones de preamplificación y amplificación es distinto cuando se utiliza oligo(dT)<sub>15</sub> y *random primers*?
4. ¿Cuál es el fundamento de las variantes de la RT-PCR cuantitativa y semi-cuantitativa?
5. ¿Cómo se lleva a cabo la RT-PCR de un solo paso?

### Soluciones

👁 Utilice bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.

- Amortiguador de RT 10X

Será proporcionado por el profesor. Descongelar, homogenizar y mantener en hielo.

- MgCl<sub>2</sub> 25 mM

Será proporcionado por el profesor. Descongelar, homogenizar y mantener en hielo.

- dNTP's 10 mM

Serán proporcionados por el profesor. Descongelar, homogenizar y mantener en hielo.

- Oligo(dT)<sub>15</sub> o *Random Primers* (0.5 µg/µL)

Será proporcionado por el profesor. Descongelar, homogenizar y mantener en hielo.

**Referencias**

Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nielsen TW. RNA: A Laboratory Manual. Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2011.

Sambrook J, Fritsch, EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4a ed. Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.

Zamorano PL, Mahesh VB, Brann DW. Quantitative RT-PCR for neuroendocrine studies. A minireview. Neuroendocrinology; 1996; 63(5): 397-407.



## Práctica 13. Extracción, purificación y precipitación de fragmentos de ADN

### Objetivos

1. Explicar dos métodos de purificación de ADN: extracción con fenol seguido de precipitación con etanol y purificación con membranas de sílica.
2. Realizar la purificación de un producto de PCR con fenol y precipitación con etanol.
3. Realizar la purificación de un producto de PCR con membrana de sílica.
4. Interpretar los resultados obtenidos por medio de electroforesis en un gel de agarosa y espectrofotometría UV.

### Introducción

#### a. Extracción orgánica con fenol y precipitación de ADN con etanol

Las proteínas contaminantes presentes en soluciones de ADN durante la preparación de ADN genómico, plasmídico o después de reacciones enzimáticas como digestiones con enzimas de restricción, ligaciones, PCR u otras, pueden ser eliminadas por extracción con una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico. La adición de este alcohol promueve la separación de la fase no polar (orgánica) y la fase polar (acuosa) al actuar como antiespumante. El fenol desnatura las proteínas y como no es miscible en agua secuestra a las proteínas desnaturadas en la interfase, mientras que durante este proceso el ADN permanece en la fase acuosa (Ausubel *et al.*, 2003).

El fenol es un solvente menos polar que el agua. El ADN es una molécula polar debido a las cargas negativas de sus grupos fosfato. Las proteínas están constituidas por cadenas de aminoácidos, algunos de los cuales son apolares y otros polares. En el citoplasma de las células y en soluciones acuosas las proteínas exponen residuos

polares en su superficie. En presencia de un solvente menos polar que el agua, como el fenol, las proteínas se desnaturalizan exponiendo sus residuos apolares (Figura 1).

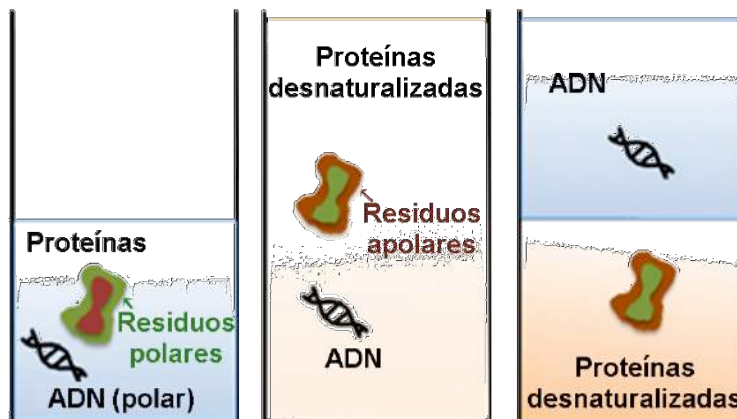


Figura 1. Principio de la extracción con fenol.

Las densidades del agua y del fenol son muy similares, por lo que es difícil separarlos. El cloroformo es ligeramente soluble en agua, es miscible en fenol y tiene una alta densidad, por lo que ayuda a la separación de ambas fases al aumentar la densidad de la fase orgánica. El alcohol isoamílico es utilizado en la mezcla para prevenir la formación de espuma y así poder detectar con mayor facilidad la interfase entre la fase orgánica y acuosa.

El ADN es recuperado en la fase acuosa y se puede concentrar por precipitación con etanol. El etanol deshidrata el ADN y deja expuestos los grupos fosfato cargados negativamente. Contra-iones como el  $\text{Na}^+$  se unen a los grupos fosfato reduciendo las fuerzas de repulsión entre las moléculas y permitiendo la formación de un precipitado. Por lo tanto, la precipitación del ADN por etanol sólo puede llevarse a cabo en presencia de cationes disponibles y en cantidad suficiente para neutralizar la carga de los residuos de fosfato expuestos (Sambrook *et al.*, 2006).

### b. Separación de ADN por adsorción sobre sílica

El ADN puede ser purificado aprovechando su capacidad de unirse a partículas o membranas de sílica en presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas (Figura 2).

La unión del ADN a la sílica se lleva a cabo por un proceso de deshidratación en presencia de sales caotrópicas y por formación de puentes de hidrógeno que compiten con fuerzas de repulsión electrostáticas débiles (Figura 2). Las altas concentraciones de sales favorecerán la unión específica del ADN a la sílica mientras las otras moléculas presentes, como proteínas, por ejemplo, permanecen en solución y pasan a través de las membranas sin unirse. Posteriormente, las sales e impurezas presentes se eliminan mediante lavados con una solución conteniendo etanol. Finalmente, el ADN es liberado al pasar una solución acuosa con baja fuerza iónica como amortiguador TE o agua.

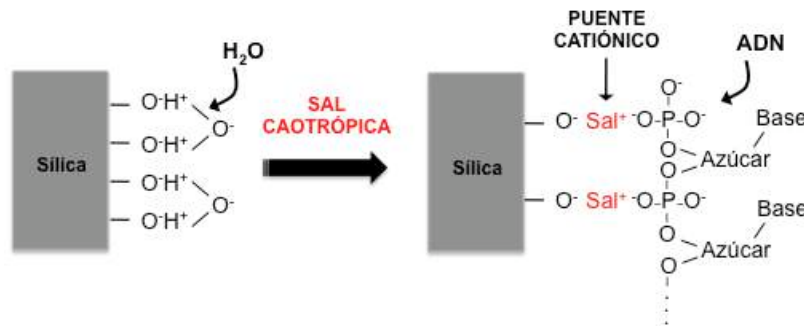


Figura 2. Adsorción de ADN sobre sílica.

### Material y equipo necesario

Vórtex

Microcentrífuga

Hielo/contenedor

Micropipetas y puntas de 200  $\mu$ L y 1,000  $\mu$ L

Microtubos de 1.6 mL, nuevos y estériles

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

Campana de extracción

Producto de PCR

Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)

Acetato de sodio 3 M, pH 5.2

Etanol absoluto

Etanol al 70% (v/v)

Amortiguador Tris EDTA (TE)

Evaporador al vacío

Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega: <https://worldwide.promega.com>) con las siguientes soluciones:

- Solución de unión a la membrana
- Solución de lavado de membrana
- Agua libre de nucleasas

Lo necesario para cuantificar por espectrofotometría, los productos de PCR purificados, descrito en la práctica 8.

Lo necesario para analizar por electroforesis horizontal en gel de agarosa, los productos de PCR purificados, descrito en la práctica 9.

### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consulte las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual). En particular el fenol es extremadamente tóxico, puede causar quemaduras severas y daño en la ropa.

👁 Utilice bata y guantes en todo momento.

***a. Extracción con fenol y precipitación con etanol***

1. Colocar en duplicado 50  $\mu\text{L}$  de producto de PCR en un microtubo de 1.6 mL.
2. Completar a 400  $\mu\text{L}$  con agua Milli-Q™ estéril.
3. Agregar en campana de extracción un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).
4. Agitar en vórtex vigorosamente durante 10 s.
5. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min.
6. Con mucho cuidado, remover la fase acuosa (superior) con una punta de pipeta de 200  $\mu\text{L}$  y verterla en un microtubo nuevo. La fase orgánica puede ser identificada por su color amarillo.
7. Agregar 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M, pH 5.2.
8. Agitar con vórtex durante 5 s.
9. Agregar 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío (calculado después de la adición del acetato de sodio).
10. Agitar con vórtex durante 5 s.
11. Incubar en hielo durante 5 min.
12. Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 min.
13. Eliminar el sobrenadante por inversión lenta del microtubo con cuidado de no desprender las pastillas de ADN.
14. Agregar 1 mL de etanol al 70% (v/v) a cada microtubo. Mezclar por inversión varias veces.
15. Centrifugar a 13,000 rpm durante 5 min.
16. Eliminar el sobrenadante por inversión lenta del microtubo con cuidado de no desprender las pastillas de ADN.
17. Secar la pastilla en un evaporador al vacío o al aire invirtiendo los tubos sobre un papel absorbente.
18. Resuspender las pastillas en 50  $\mu\text{L}$  de TE en cada duplicado.

19. Cuantificar por medio de espectrofotometría, los productos de PCR purificados, como fue descrito en la práctica 8.
20. Visualizar por medio de electroforesis en un gel de agarosa, los productos de PCR purificados, como descrito en la práctica 9.
  - ⑧ Dependiendo del tamaño de los productos de PCR purificados, elegir el porcentaje de agarosa apropiado.
21. Conservar el ADN a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

***b. Purificación con columna de sílica***

1. Ensamblar y rotular un microtubo colector y una *SV Minicolumn* en duplicado por cada muestra.
2. Agregar 100  $\mu\text{L}$  de la Solución de unión a la membrana a 100  $\mu\text{L}$  de producto de PCR en un microtubo de 1.6 mL.
3. Mezclar mediante vórtex durante 5 s.
4. Dar un breve pulso de centrifugación para bajar el líquido en el microtubo.
5. Transferir la mitad de la mezcla (100  $\mu\text{L}$ ) a cada *SV Minicolumn* previamente rotulada. Depositar la mezcla en el centro de la membrana, teniendo cuidado de no tocarla.
6. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
7. Centrifugar a 14,000 rpm durante 1 min (16,000 $\times g$ ).
8. Remover la *SV Minicolumn* y eliminar por decantación el líquido del microtubo colector.
9. Colocar nuevamente la *SV Minicolumn* en el mismo microtubo colector.
10. Lavar la columna con 700  $\mu\text{L}$  de Solución de lavado de membrana, teniendo cuidado de no tocar la membrana.
11. Centrifugar a 14,000 rpm durante 1 min.
12. Remover la *SV Minicolumn* y eliminar por decantación el líquido del microtubo colector.

13. Colocar nuevamente la *SV Minicolumn* en el mismo microtubo colector.
14. Repetir el lavado con 500  $\mu$ L de Solución de lavado de membrana.
15. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min.
16. Remover la *SV Minicolumn* y eliminar por decantación el líquido del microtubo colector.
17. Colocar nuevamente la *SV Minicolumn* en el mismo microtubo colector y centrifugar de nuevo a 14,000 rpm durante 1 min, dejando abierta la tapa del microtubo para permitir la evaporación del etanol residual.
18. Transferir la *SV Minicolumn* a un microtubo de 1.6 mL nuevo.
19. Agregar 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas en el centro del filtro sin tocar la membrana con la punta de la micropipeta.
20. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
21. Centrifugar a 14,000 rpm durante 1 min para eluir el ADN.
22. Repetir la elución en microtubos nuevos.
23. Desechar las *SV Minicolumn*. El ADN purificado se encuentra ahora en los microtubos.
24. Cuantificar por medio de espectrofotometría, los productos de PCR purificados, como fue descrito en la práctica 8.
25. Visualizar por medio de electroforesis en un gel de agarosa, los productos de PCR purificados, como descrito en la práctica 9.
- 👁️ Dependiendo del tamaño de los productos de PCR purificados, elegir el porcentaje de agarosa apropiado.
26. Conservar el ADN a -20 °C.

### **Análisis de resultados**

Observar y documentar los cambios físicos de la muestra durante todo el proceso de extracción y purificación.

Cuantificar y evaluar la calidad y pureza del ADN obtenido después de la precipitación con etanol y después de la purificación con sílica (ambas eluciones). Comparar y discutir estos resultados.

### Cuestionario

1. Definir y contrastar solvente polar y solvente apolar.
2. Dibujar la estructura del fenol y explicar por qué el fenol es un solvente menos polar que el agua.
3. Apartar de las proteínas desnaturalizadas, ¿qué otros compuestos celulares pueden ser eliminados por el fenol?
4. ¿Qué compuestos celulares son eliminados por el cloroformo?
5. Explicar cada paso de la extracción de ADN con fenol y su precipitación con etanol.
6. Mencionar dos ejemplos de sales caotrópicas y dibujar su estructura.
7. Explicar cuál es la función de cada una de las soluciones utilizadas en la purificación del ADN con sílica.
8. ¿Qué estrategia propondría, utilizando el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*, para purificar un fragmento de ADN específico a partir de un producto de PCR en el cual aparecen varias bandas?

### Soluciones

👁 Utilizar bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.

- Etanol al 70% (v/v) (50 mL)

Mezclar 35 mL de etanol absoluto grado biología molecular con 15 mL de agua Milli-Q™. Almacenar en un frasco de vidrio con tapón de rosca.



- Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)

Será proporcionado por el profesor. Antes de usar el fenol y el cloroformo, consultar la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- Acetato de sodio 3 M pH 5.2 (10 mL)

$PM_{\text{Acetato de sodio}} 82.03$

Disolver 2.46 g de acetato de sodio en 7 mL de agua destilada, ajustar el pH a 5.2 con ácido acético glacial y ajustar el volumen a 10 mL. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca. Antes de usar el ácido acético, consultar la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- EDTA 0.5 M, pH 8.0 (250 mL)

$PM_{\text{EDTA}} 372.24$

Agregar 46.52 g de EDTA en 150 mL de agua Milli-Q™, agitar vigorosamente con una barra magnética y ajustar el pH a 8.0 con NaOH (alrededor de 5 g de NaOH). Ajustar a un volumen de 250 mL. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca. Antes de usar el hidróxido de sodio, consultar la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- Amortiguador de Tris-HCl 1 M, pH 7.6 (100 mL)

$PM_{\text{Tris}} 121.14$

Disolver 12.1 g de Tris base en 80 mL de agua Milli-Q™, ajustar el pH a 7.6 agregando alrededor de 4 mL de HCl concentrado. Ajustar el volumen a 100 mL. Esterilizar por autoclave en un frasco de vidrio con tapón de rosca. Si al momento de utilizar esta solución tiene color amarillo, será necesario preparar una nueva. Antes de usar el ácido clorhídrico, consultar la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- TE (40 mL)

Calcular los volúmenes requeridos de las soluciones *stock* para preparar 40 mL de TE a las siguientes concentraciones finales:

- Amortiguador de Tris-HCl 10 mM, pH 7.6
- EDTA 1 mM

Almacenar a temperatura ambiente en un frasco de vidrio con tapón de rosca y esterilizar por autoclave.

### Referencias

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. Estados Unidos: Wiley; 2003.

Promega. Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Technical Bulletin. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/products/dna-purification-quantitation/dna-fragment-purification/wizard-sv-gel-and-pcr-clean-up-system/?catNum=A9281>.

Consultado septiembre 24, 2017.

Sambrook J, Russell DW. Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform. Cold Spring Harbor Protocols. Disponible en: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.prot4455.full>. Consultado septiembre 10, 2017.

## Práctica 14. Ligación de productos de PCR en un vector-T

### Objetivos

1. Explicar los principios básicos de la tecnología del ADN recombinante, a través del ejemplo de la ligación de un producto de PCR en un vector-T.
2. Comprender las características que debe tener el inserto del “control positivo” en un ensayo de ligación.
3. Conocer la utilidad de un control *background* en un ensayo de ligación con vector-T.
4. Describir las características principales del vector-T, incluyendo la localización del sitio múltiple de clonación y su relación con la selección de colonias blancas y azules.

### Introducción

Muchas veces es conveniente clonar el producto de la PCR en un sistema de clonación basado en células para conseguir grandes cantidades de ADN y permitir una diversidad de análisis (por ejemplo, en estudios de expresión del producto amplificado). Hay al menos tres estrategias de clonación en plásmidos para ADN amplificado mediante PCR (Sambrook *et al.*, 2012):

a) Modificar los cebadores de la PCR, diseñando extensiones de alrededor de 10 nucleótidos con sitios de restricción apropiados en el extremo 5'. Los nucleótidos extra no forman pares de bases con el ADN molde durante la amplificación, pero conforme avanza la reacción de PCR, las extensiones presentes en los cebadores pasan a formar parte del amplicón; con posterioridad puede digerirse el producto de PCR amplificado y el vector de clonación con las enzimas de restricción. Así, se generan extremos complementarios del inserto y vector que pueden ser unidos mediante un

proceso denominado ligación. Las ADN ligasas requieren como sustrato dos extremos de ADN: un extremo 5' (portador de un grupo fosfato) y un extremo 3' (grupo hidroxilo de la desoxirribosa). La reacción se produce a partir de sustratos de doble cadena (dsDNA), siendo muy poco eficiente con cadenas sencillas aisladas (ssDNA). La ligasa puede unir tanto extremos romos como extremos cohesivos (esta última situación es mucho más favorable).

b) Emplear la estrategia T/A: varias polimerasas termoestables, incluida la polimerasa *Taq*, tienen actividad de transferasa de desoxinucleotidilo terminal que modifica de modo selectivo fragmentos generados mediante PCR al añadir un nucleótido aislado, por lo general adenina, a los extremos 3' de los fragmentos de ADN amplificados. Los extremos salientes resultantes pueden dificultar la clonación de los productos de la PCR, por lo que suelen utilizarse vectores con residuos T salientes en su sitio múltiple de clonación (vector-T), facilitando la clonación. Una vez que el ADN de interés es ligado a un vector-T, puede cortarse para liberar el inserto mediante enzimas de restricción apropiadas contenidas en el sitio de clonación múltiple del vector y transferirse a otros plásmidos que pueden tener usos especializados.

c) En un vector con extremos romos se clona un producto de PCR generado por una ADN polimerasa con actividad de autocorrección (actividad de exonucleasa 3'→5'), como la *Pfu*, que deja extremos romos al eliminar los nucleótidos aislados salientes con su actividad exonucleasa. Otra variante es el empleo de enzimas para eliminar los extremos salientes como la polimerasa T4, cuando el producto de PCR es generado por una ADN polimerasa sin actividad de autocorrección.

No todas las polimerasas termoestables generan fragmentos con extremos salientes A en 3'. En la siguiente Tabla 1 se enlistan las propiedades de varias enzimas ADN polimerasas usadas comúnmente.

**Tabla 1. Propiedades de enzimas ADN polimerasas termoestables utilizadas comúnmente.**

Característica	<i>Taq</i>	<i>Tfl</i>	<i>Tth</i>	<i>Tli</i>	<i>Pfu</i>	<i>Pwo</i>
Extremos de ADN resultantes	3'A	3'A	3'A	Romo	Romo	Romo
Actividad exonucleasa 5'→3'	si	si	si	no	no	no
Actividad exonucleasa 3'→5'	no	no	no	si	si	si

En esta práctica de laboratorio nos enfocaremos en la estrategia T/A, usando un vector-T para clonar los productos de PCR obtenidos en la práctica previa. Debido al uso de *Taq* polimerasa, los productos de PCR contienen en sus extremos 3' un desoxinucleótido de adenina. En Biología Molecular, el desarrollo de vectores-T ha sido extenso (Zhou *et al.*, 1995). Hay dos formas de generar un vector linearizado que contenga extremos cohesivos 3' de una sola base (un residuo de timidina):

- 1) Digerir el vector con una enzima de restricción que reconozca dos sitios para que produzca extremos cohesivos de una sola base (por ejemplo, *XcmI* o *AhdI*) y asegurar que la base sea timina.
- 2) Digerir el plásmido con una enzima que deje extremos romos (por ejemplo, *SmaI* o *PvuII*) y después adicionar al 3' la timidina mediante una reacción con *Taq* polimerasa, solo en presencia de dTTPs.

Existen en el mercado al menos dos vectores-T muy utilizados: el pGEM®-T de la compañía Promega y el vector pCR™II de ThermoFisher. Ambos son vectores-T lineales con una única timidina 3'-terminal en ambos extremos. La T- saliente en el sitio de inserción mejora la eficiencia de ligación de los productos de PCR porque previene la recircularización del vector y provee un nucleótido saliente compatible para los productos de PCR generados por polimerasas como la *Taq*.

Otras características que comparten son:

- Confieren resistencia a ampicilina a las bacterias transformadas con este plásmido.

- El sitio múltiple de clonación está dentro del marco abierto de lectura de la región codificante del péptido  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*).

El promotor de *lacZ* se desreprime por IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido, análogo de lactosa) ya que se une al represor LacI inactivándolo. La producción de  $\beta$ -galactosidasa en presencia de IPTG resulta en la formación de colonias azules en medio con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido), pues la enzima lo hidroliza produciendo un compuesto azul insoluble. Al clonar un fragmento de ADN dentro del sitio múltiple de clonación se interrumpe el marco abierto de lectura de *lacZ*. La inactivación del péptido  $\alpha$  por inserción, permite la identificación de las colonias recombinantes que crecen de color blanco en medio con IPTG y X-gal.

Consideraciones generales para la clonación de productos de PCR:

- En primer lugar, una alícuota de la reacción de PCR se debe analizar en un gel de agarosa antes de ser usado en la reacción de ligación, para verificar que se tiene un solo producto de PCR del tamaño adecuado. Posteriormente, es deseable proceder a su purificación. En la actualidad, existen kits comerciales que no requieren de este paso.
- Una vez purificado el producto de PCR, se puede proceder a la reacción de ligación con el vector-T para formar una nueva molécula recombinante. Se recomienda iniciar con una relación molar inserto:vector de 3:1, pero puede ser optimizada (Promega, 2015). Obviamente, se trata de proporciones de número de moléculas, no de cantidad en peso. Por ejemplo, en 1  $\mu$ g de un vector de 10 kpb hay diez veces menos moléculas que en 1  $\mu$ g de un inserto de 1 kpb. Para calcular la cantidad apropiada en ng del producto de la PCR para incluir en la reacción de ligación, se puede usar la siguiente ecuación:

$$\frac{(\text{ng del vector})(\text{kb del inserto})}{\text{kb del vector}} \times \text{relación molar inserto:vector} = \text{ng del inserto}$$

### Material y equipo necesario

Microtubos de 1.6 mL, nuevos y estériles

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

Micropipetas y puntas de 2  $\mu$ L y 20  $\mu$ L estériles

Producto de PCR único, purificado y cuantificado (obtenido en la práctica 13)

Agua Milli-Q™ estéril

Kit pGEM®-T (Promega, <https://worldwide.promega.com>) con las siguientes soluciones:

- Amortiguador 2X
- Vector pGEM®-T (50 ng/ $\mu$ L)
- Inserto del control positivo (4 ng/ $\mu$ L)
- T4 ADN Ligasa (3 U/ $\mu$ L)

Vórtex

Microcentrífuga

Hielo/contenedor

Congelador a -20 °C

### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consulte las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

👁 Utilice bata y guantes en todo momento.

1. Rotular 3 microtubos de 1.6 mL: uno para la reacción experimental, otra para el control *background* (sin inserto) y otra para el control positivo. Dejarlos en hielo.

2. Descongelar los componentes del kit (excepto la ligasa) y mantener en hielo. Agitar el amortiguador 2X con vórtex. Antes de abrir los reactivos, dar un pulso en la microcentrífuga durante 5 s para hacer que el líquido quede en el fondo del tubo.

☞ Sacar la ligasa del congelador al momento de usarla y mantenerla en hielo en todo momento. Regresar la enzima al congelador inmediatamente después de usarla.

3. En los microtubos de 1.6 mL sobre hielo, agregar los ingredientes para hacer el coctel de reacción. Seguir el orden indicado en la Tabla 2, comenzando por el agua. Cerciorarse que los ingredientes se coloquen en el fondo de los microtubos.

4. Mezclar los componentes golpeando suavemente los tubos con el dedo y dar un pulso en la microcentrífuga durante 5 s para hacer que el líquido quede en el fondo del microtubo y se mezclen todos los componentes.

**Tabla 2. Componentes de los cocteles de reacción de ligación.**

Componente	Experimental	Control <i>background</i>	Control positivo
Agua Milli-Q™	Completar a 10 µL	3 µL	1 µL
Amortiguador 2X	5 µL	5 µL	5 µL
Vector pGEM®-T (50 ng/µL)	1 µL	1 µL	1 µL
Producto de PCR purificado	$\chi$ µL*	-	-
Inserto del control positivo (4 ng/µL)	-	-	2 µL
T4 ADN Ligasa (3 U/µL)	1 µL	1 µL	1 µL

\* Se aconseja iniciar con una relación molar inserto:vector de 3:1.

5. Incubar las reacciones a 4 °C durante toda la noche (14-16 h).

6. Guardar a -20 °C hasta su uso.



### Análisis de resultados

Prediga el resultado de la ligación cuando se usa un producto de PCR que no ha sido purificado.

Mencione cómo podría detectar que en el producto de PCR hubiera un componente inhibidor de la ligación.

Discuta qué pasaría si la relación molar usada en la ligación fuera diferente a la sugerida.

Prediga qué tipo de moléculas recombinantes tiene en cada una de sus reacciones, incluyendo la orientación del inserto, así como su capacidad de realizar una  $\alpha$  complementación.

Sugiera métodos para evaluar la eficiencia de las reacciones de ligación.

Mencione estrategias para mejorar la eficiencia de las reacciones de ligación.

### Cuestionario

1. Considere los datos de la siguiente tabla, que corresponden a productos de PCR de 1.2 kpb, purificados por columna de sílica.

	Concentración (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
Muestra 1	20.5	0.41	0.21	1.96	0.95
Muestra 2	50.0	1.00	0.54	1.83	0.99
Muestra 3	9.8	0.19	0.09	1.98	0.64
Muestra 4	45.1	0.90	0.44	2.01	0.74

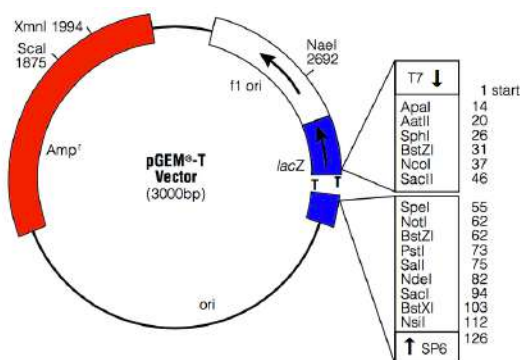
Elija una de ellas para realizar una ligación con el vector pGEM<sup>®</sup>-T y argumente su decisión. Calcule el volumen que requiere para tener una relación molar inserto:vector de 3:1

2. ¿Cuál es el porcentaje máximo de colonias azules que podemos observar en el control positivo, antes de considerar que la ligación ha fallado?

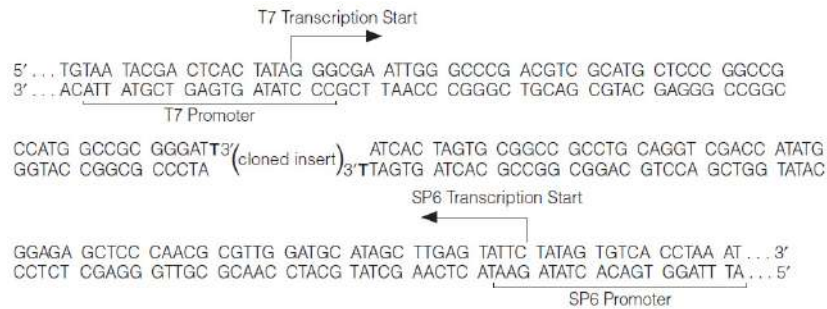
3. ¿Cuál es el tamaño de los fragmentos de restricción después de la digestión con *NaeI* y *NotI* del siguiente producto de PCR clonado en el vector pGEM®-T? ¿En qué casos afecta la orientación del inserto en el tamaño de los fragmentos de restricción?

5'ACAGAGAGCTATGAAATGACAGCTGAGTTGGACGATCTCACAGAGAAGATCCGAAAAGC  
 TCACCAGGAACTTTCCCTTCACTCTGCCAGCTGGGTAAATACACCACGAATTCAGTGCT  
 GACCATCGAGTCCGACTGGACCTGGGCCTCTGGGACAAATTCAGTGAACCTGGCCACCAAGT  
 GCATTATTAAGATCGTGGAGTTTGCTAAACGTCTGCCTGGTTTCACTGGCTTGACCATCGC  
 AGACCAAATTACCCTGCTGAAGGCCGCTGCCTGGACATCCTGATTCTTAGAATTTGCACC  
 AGGTATACCCAGAACAAGACACCATGACTTTCTCAGACGGCCTTACCCTAAATCGAACTC  
 AGATGCACAATGCTGGATTTGGTCCTCTGACTGACCTTGTGTTTACCTTTGCCAACCAGCTC  
 CTGCCTTTGGAAATGGATGACACAGAAACAGGCCTTCTCAGTGCCATCTGCTTAATCTGTG  
 GAGACCGCCAGGACCTTGAGGAACCGACAAAAGTAGATAAGCTACAAGAACCATTGCTGGA  
 AGCACTAAAAATTTATATCAGAAAAAGACGACCCAGCAAGCCTCACATGTTTCCAAAGATC  
 TTAATGAAAATCACAGATCTCCGTAGCATCAGTGCTAAAGGTGCAGAGCGTGTAATTACCT  
 TGAAAATGGAAATTCCT-3'

Mapa del vector pGEM®-T:



Secuencia del vector pGEM<sup>®</sup>-T en el sitio de clonación:



4. ¿Qué cebadores se podrían utilizar para confirmar la presencia y orientación en el vector pGEM<sup>®</sup>-T del inserto mencionado en la pregunta anterior?
5. ¿Por qué con el control *background* podríamos observar colonias azules? Considere la linealidad de la molécula.
6. ¿Por qué con la ligación experimental podríamos observar colonias azules que contienen el vector correctamente ligado al inserto?

### Soluciones

👁 Utilice bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.

- Amortiguador 2X

Será proporcionado por el profesor. Descongelar, homogenizar y mantener en hielo.

### Referencias

Sambrook J, Fritsch, EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4a ed. Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.

Zhou MY, Clark SE, Gomez-Sanchez CE. Universal cloning method by TA strategy. Biotechniques 1995; 19: 34-35.

Promega. Technical Manual. pGEM<sup>®</sup>-T and pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems. Disponible en: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf>. Consultado agosto 2, 2017.

## Práctica 15. Preparación de células de *Escherichia coli* competentes

### Objetivos

1. Entender el significado de la competencia bacteriana.
2. Comprender la diferencia entre la competencia natural y la competencia artificial.
3. Preparar células *E. coli* competentes con el método de polietilenglicol y  $Mg^{2+}$ .

### Introducción

La transferencia lateral de genes entre bacterias contribuye a su adaptación a diversos entornos, y a largo plazo a la evolución bacteriana. Desafortunadamente para el humano, esto puede permitir la resistencia a los antibióticos y la consecuente propagación indeseable de patógenos. Se conocen tres mecanismos de transferencia lateral de genes en bacterias: la conjugación, la transducción y la transformación. La conjugación y la transducción requieren de estructuras específicas para la transferencia del ADN de las células donantes a las células receptoras: los pili conjugativos y las cápsides del bacteriófago, respectivamente. Sin embargo, la transformación ocurre en células receptoras con la competencia genética para interiorizar ADN libre presente en el medio. Este fenómeno ocurre de forma natural en muchas bacterias, pero la eficacia del proceso varía enormemente de unas especies a otras y no todas las especies bacterianas lo realizan, como es el caso de *E. coli*<sup>1</sup>. Para

---

<sup>1</sup> Publicaciones recientes han demostrado que *E. coli* puede expresar una competencia genética modesta en ciertas condiciones que pueden surgir en su entorno (Etchuuya *et al.*, 2011).

que la transformación tenga lugar, la bacteria tiene que encontrarse en el llamado estado de competencia, que ocurre en determinadas condiciones fisiológicas; en este estado, la bacteria presenta alteraciones en su pared y membrana celulares, que permiten la entrada de ácidos nucleicos en la célula (Etchuuya *et al.*, 2011).

La maquinaria de interiorización del ADN utilizada durante la transformación natural está constituida por complejos multiprotéicos que todavía están siendo caracterizados, especialmente en bacterias Gram-negativas, donde el ADN transformante tiene que cruzar dos membranas y la capa de peptidoglicano, antes de entrar en el citoplasma, donde puede recombinarse con el genoma o bien establecerse como un plásmido. Se cree que la mayoría de las bacterias competentes de forma natural contienen una maquinaria de interiorización del ADN que tiene la forma de un pseudopili, el cual transporta el ADN desde el medio extracelular hacia el periplasma en una primera etapa y luego lo transloca a través de la membrana interna en la segunda etapa (Matthey y Blokesch, 2016).

La competencia para la transformación puede ser inducida de forma artificial en el laboratorio, por exposición a altas concentraciones de iones bivalentes (como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), por electroporación, por tratamiento con polietilenglicol o por biobalística, entre otros métodos. La preparación de células competentes en el laboratorio es indispensable para poder introducirles material genético. Los factores que pueden afectar a la preparación de células competentes son el tipo de especies iónicas presentes en el medio, el tipo de cepa bacteriana utilizada y el tiempo de incubación. El mecanismo exacto por el cual el cloruro de calcio u otros tratamientos químicos permiten la competencia sigue siendo una incógnita, aunque algunos autores sugieren que el calcio facilita la adsorción del ADN sobre la superficie celular. Independientemente del método usado, no todas las células del cultivo se hacen competentes. En esta práctica, células de *E. coli* se harán competentes siguiendo el procedimiento de Chung *et al.* 1989.

**Material y equipo necesario**

*Stock* de *E. coli* DH5 $\alpha$  crioconservada en glicerol (proporcionada por el profesor)

Hielo/contenedor

Microcentrífuga

Incubadora con agitación orbital a 37 °C

Autoclave

Espectrofotómetro

Celdas para espectrofotómetro (para volúmenes de 1 mL)

Congelador -80 °C

Asa microbiológica

Micropipetas y puntas de 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 1,000  $\mu$ L estériles

Frasco de vidrio de 500 mL

Matraz Erlenmeyer de 250 mL

Microtubos de 1.6 mL, nuevos y estériles

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

Medio LB

Medio LB-agar

Ampicilina (100 mg/mL)

X-gal (50 mg/mL)

IPTG (100 mM)

Medio TSS

Cajas de Petri de ~ 90 mm de diámetro

Campana de flujo laminar

### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consulte las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

👁 Utilice bata y guantes en todo momento.

#### ***El día anterior a la práctica:***

1. Preparar 250 mL de medio LB-agar y esterilizar en autoclave. Esperar a que baje la temperatura del medio a 65 °C aproximadamente.
  2. Dentro de la campana de flujo laminar, verter el medio en 2 cajas de Petri (aproximadamente 30 mL/caja). Evitar la formación de burbujas.
  3. Al medio restante, agregar ampicilina (1 mL/L), IPTG (1 mL/L) y X-gal (1 mL/L). Después de mezclar, verter el medio en cajas de Petri rotuladas adecuadamente.
- 👁 Para esta práctica, sólo requeriremos una caja de Petri con LB-agar. Las demás se utilizarán en la siguiente práctica.
4. Todavía en la campana de flujo laminar, dejar solidificar el agar sin la tapa de la caja de Petri (para evitar la condensación sobre ellas).
  5. Bajo condiciones de asepsia, estriar con el asa microbiológica la cepa de *E. coli* en una caja de Petri con LB-agar solidificado. Almacenar el resto de las cajas de Petri a 4 °C hasta su uso.
  6. Incubar la cepa de *E. coli* a 37 °C durante toda la noche (14-16 h).

#### ***El día de la práctica:***

1. Tomar una única colonia e inocularla en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 65 mL de medio LB.
2. Incubar a 37 °C con agitación orbital de 250 rpm hasta alcanzar una  $A_{600}$  de 0.4 a 0.45



👁️ Tomar una muestra de 1 mL del cultivo bacteriano cada 45 min aproximadamente para medir la DO a 600 nm en el espectrofotómetro previamente calibrado con el medio LB sin inocular. Aproximadamente tardará 3-6 h en llegar a la DO deseada. Es muy importante que la absorbancia del cultivo no sea mayor a 0.5. Precalear el medio LB a 37 °C puede acortar el tiempo de incubación.

3. Centrifugar a 2,500 rpm durante 15 min a 4 °C.
4. Eliminar completamente el medio de cultivo y resuspender gentilmente en 6 mL de medio TSS a 4 °C.
5. Alicuotar en microtubos de 1.6 mL, con 1 mL cada uno. Mantener en hielo hasta su uso, o almacenar a -80°C hasta su uso.

### **Análisis de resultados**

Registra los diferentes valores de DO obtenidos y gráficelos contra el tiempo. Explica el comportamiento de la gráfica e indica las fases del crecimiento.

Discuta qué pasaría si el cultivo bacteriano creciera hasta alcanzar una A600 de 0.6 o mayor.

Menciona qué otros tratamientos existen para inducir o mejorar la competencia artificial en *E. coli*. Analiza los iones presentes en dichos tratamientos.

### **Cuestionario**

1. ¿Cuándo fue publicada por primera vez la competencia artificial de *E. coli*?
2. ¿Cómo puede comprobar que las bacterias preparadas en esta práctica son competentes?
3. Comparativamente con el método de exposición a altas concentraciones de calcio, ¿cómo se considera el método utilizado en esta práctica en cuanto a la eficiencia de

inducción de competencia artificial? Mencione ventajas y desventajas del método utilizado.

### Soluciones

👁 Utilice bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.

- Medio LB (250 mL)

Mezclar 2.5 g de triptona, 1.25 g de extracto de levadura y 2.5 g de NaCl en 200 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7 con NaOH 5 M. Ajustar el volumen a 250 mL con agua destilada. Esterilizar por autoclave y guardar a temperatura ambiente.

- Medio LB-agar (250 mL)

Mezclar 2.5 g de triptona, 1.25 g de extracto de levadura y 2.5 g de NaCl en 200 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7 con NaOH 5 M. Ajustar el volumen a 250 mL con agua destilada. Agregar 3.75 g de agar y esterilizar por autoclave. Esperar a que baje la temperatura del medio a 65 °C aproximadamente y preparar las cajas de Petri.

- Ampicilina (100 mg/mL) (10 mL)

Disolver 1 g de ampicilina en 10 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración con jeringa y filtro estéril. Repartir en microtubos de 1.6 mL estériles (1 mL de solución de ampicilina por tubo). Guardar en congelación a -20 °C.

- X-gal (50 mg/mL)

Será proporcionado por el profesor. Descongelar, homogenizar y mantener en hielo.

- IPTG (100 mM)

Será proporcionado por el profesor. Descongelar, homogenizar y mantener en hielo.

- Medio TSS (100 mL)

Mezclar 1 g de triptona, 0.5 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl, 10 g de polietilenglicol (PM<sub>Polietilenglicol</sub> 3350), 5 mL de dimetilsulfóxido y 5 mL de MgCl<sub>2</sub> (1 M) en 70 mL de agua destilada estéril. Mezclar hasta disolver. Ajustar el pH a 6.5. Ajustar el volumen a 100 mL con agua destilada estéril. Esterilizar por filtración con jeringa y filtro estéril de 0.2 µm. Almacenar a 4 °C hasta por 6 meses. Antes de usar el dimetilsulfóxido, consulte la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

### Referencias

Etchuuya R, Ito M, Kitano S, Shigi F, Sobue R, Maeda S. Cell-to-Cell Transformation in *Escherichia coli*: A Novel Type of Natural Transformation Involving Cell-Derived DNA and a Putative Promoting Pheromone. PLoS ONE 2011; 6: e16355.

Matthey N, Blokesch M. The DNA-Uptake Process of Naturally Competent *Vibrio cholerae*. Trends in Microbiology 2016; 24: 98-110.

Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1989; 86: 2172-2175.

## Práctica 16. Transformación de células de *Escherichia coli*

### Objetivos

1. Entender los principios básicos de la transformación de células de *E. coli*.
2. Realizar transformaciones por estrés térmico de células *E. coli* competentes.
3. Calcular la eficiencia de transformación.
4. Realizar una selección de colonias blancas/azules sobre un medio selectivo de antibiótico.

### Introducción

La clonación de genes, fragmentos de genes u otras secuencias de ADN es una parte fundamental de la Biología Molecular. Para estudiar la función de una secuencia de ADN en particular, se requiere su manipulación. Existen dos métodos para lograr esto, la PCR que permite amplificar secuencias específicas de ADN *in vitro*, y la utilización de enzimas de restricción y de modificación para “cortar y pegar” fragmentos de ADN en vectores para diversos propósitos. Los vectores con fragmentos de ADN de interés pueden ser replicados utilizando células vivas, más comúnmente *E. coli*. La transformación se lleva a cabo cuando el vector es introducido a células de *E. coli* competentes. Como se mencionó en la práctica previa, la competencia de una célula es el estado en el cual la célula es capaz de capturar ADN del medio (Strachan y Read, 2004).

La transformación artificial permite la introducción de fragmentos de ADN foráneo, generalmente plásmidos, en la bacteria *E. coli*. El tratamiento con iones de calcio o con polietilenglicol, permite obtener células competentes de *E. coli*, es decir, células más

permeables capaces de captar ADN del medio. Solo un pequeño porcentaje de las células serán transformadas. Por lo tanto, las células deben ser sembradas en un medio selectivo para seleccionar las transformantes. Usualmente los plásmidos contienen un gen de resistencia a un antibiótico que permite esta selección. Sólo aquellas células que contengan el vector podrán crecer en el medio que contiene el antibiótico. Después de la transformación, las colonias bacterianas resultantes son analizadas mediante la digestión del vector por enzimas de restricción para determinar la presencia del fragmento (inserto) correcto, o bien, por PCR usando cebadores que flanquean el inserto.

La elección de las colonias transformadas puede ser aún más simple al utilizar el sistema de selección basado en el gen *lacZ* mencionado en la práctica “Ligación de productos de PCR en un vector-T”, con cepas de *E. coli* con un gene *lacZ* inactivo, incompleto en su extremo 5'. Esta mutación elimina parte del gen de la  $\beta$ -galactosidasa, dejando la parte que codifica para el denominado péptido  $\omega$  de esta enzima. Por otro lado, el vector utilizado debe contener la parte faltante del gen *lacZ*, codificando el péptido  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa. Una vez que el vector está dentro de la bacteria, el plásmido produce el péptido  $\alpha$  y la cepa de *E. coli* produce el péptido  $\omega$ , los dos péptidos se completan, produciendo una  $\beta$ -galactosidasa funcional. A esto se le llama  $\alpha$  complementación. Si las bacterias transformadas se inoculan en agar con X-gal e IPTG, las colonias presentan una coloración azul como resultado de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, indicando la complementación de la bacteria por el plásmido (Krebs *et al.*, 2011).

Los métodos de selección blanco/azul utilizan plásmidos con sitios múltiples de clonación dentro de la secuencia que codifica para el péptido  $\alpha$ . Los plásmidos que tienen interrumpida la secuencia del péptido  $\alpha$  por la inserción de un fragmento de ADN producen un péptido  $\alpha$  no funcional incapaz de llevar a cabo la complementación  $\alpha$ . Entonces, los plásmidos con inserto son diferenciados por el color blanco de sus

colonias (Figura 1). Las cepas JM109, DH5 $\alpha$  y XL-1 Blue son ejemplos de cepas de *E. coli* que se utilizan para selección blanco/azul (Kreuzer y Massey, 2008).

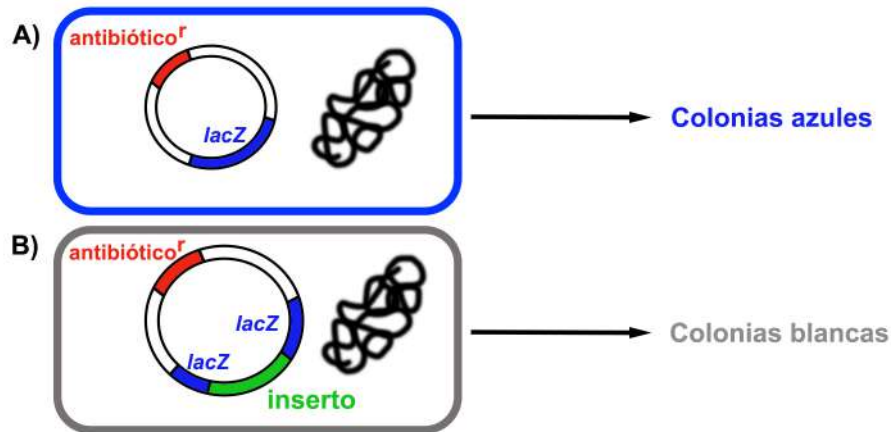


Figura 1. Selección blanco/azul en células de *E. coli* transformadas con A) vector sin inserto y B) vector con inserto

### Material y equipo necesario

6 microtubos con 200  $\mu$ L de células de *E. coli* competentes con calcio (cepa para  $\alpha$  complementación proporcionados por el profesor) o bien, 6 microtubos con 1 mL de células de *E. coli* competentes preparadas en la práctica 15.

Stock de *E. coli* DH5 $\alpha$  crioconservada en glicerol (proporcionada por el profesor)

Microtubo de 1.6 mL, nuevos y estériles

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

Hielo/contenedor

Baño de agua a 42 °C

Plásmido circular con gen de resistencia a ampicilina (proporcionado por el profesor)

Reacciones de ligación de la práctica 14

Matraz Erlenmeyer de 100 mL estéril

Microcentrífuga

Incubadora con agitación orbital a 37 °C

Micropipetas y puntas de 20 µL, 200 µL y 1,000 µL estériles

Medio LB

8 cajas de Petri de ~90 mm de diámetro con medio LB-agar preparadas en la práctica previa

Perlas de vidrio estériles (~3 mm de diámetro)

Campana de flujo laminar clase II

Asa microbiológica

### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consulte las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

👁 Utilice bata y guantes en todo momento.

#### ***El día anterior a la práctica:***

Bajo condiciones de asepsia, inocular con la cepa bacteriana 10 mL de medio LB en un matraz Erlenmeyer de 100 mL estéril e incubar a 37 °C durante toda la noche (14-16 h) con agitación orbital de 250 rpm.

#### ***El día de la práctica:***

1. Atemperar todas las cajas de Petri con LB-agar preparadas en la práctica 15.
2. Mantener los 6 microtubos de células competentes en hielo, uno para cada transformación. Homogenizar las células golpeando ligeramente el microtubo sin dispersar las células en las paredes. NOTA: Nunca agitar las células en vórtex.
3. Bajo condiciones de asepsia, tomar 200 µL del cultivo bacteriano y colocarlos en un microtubo estéril (células **no** competentes).

4. Marcar los microtubos de las células correspondientes a cada transformación:
  - A. Control negativo de transformación (células **no** competentes)
  - B. Control positivo de transformación (células competentes)
  - C. Ligación control *background* (células competentes)
  - D. Ligación control positivo (células competentes)
  - E. Ligación experimental (células competentes)
  - F. Control de antibiótico (células competentes)
  - G. Control de células (células competentes)
5. A los microtubos A y B, agregar 1 ng del plásmido circular. Agregar los 10  $\mu$ L de cada reacción de ligación realizada en la práctica 14 en el microtubo adecuado (C, D y E). A los microtubos F y G agregar 10  $\mu$ L de agua estéril (no se les agrega ADN). Homogenizar suavemente como en el paso 2.
6. Incubar en hielo durante 30 min.
7. Incubar en un baño de agua a 42 °C durante 1 min. No agitar.
8. Inmediatamente después, incubar en hielo durante 2 min.
9. Agregar a cada microtubo 600  $\mu$ L de medio LB precalentado a 37 °C.
10. Incubar a 37 °C durante 1.5 h con agitación orbital de 250 rpm.
11. Centrifugar durante 3 min a 3000 rpm.
12. En la campana de flujo laminar, descartar el sobrenadante necesario para resuspender las pastillas en 400  $\mu$ L de medio de cultivo.
13. Con ayuda de las perlas de vidrio, inocular cada caja de Petri con las pastillas resuspendidas, como se indica a continuación:
  - A. Control negativo de transformación    caja con ampicilina, IPTG y X-Gal
  - B. Control positivo de transformación    caja con ampicilina, IPTG y X-Gal
  - B'. Control positivo de transformación    caja con ampicilina, IPTG y X-Gal  
(dilución 1:10, es decir 40  $\mu$ L del cultivo + 360  $\mu$ L de medio LB)
  - C. Ligación control *background*            caja con ampicilina, IPTG y X-Gal
  - D. Ligación control positivo                caja con ampicilina, IPTG y X-Gal



E. Ligación experimental	caja con ampicilina, IPTG y X-Gal
F. Control de antibiótico	caja con ampicilina, IPTG y X-Gal
G. Control de células	caja <b>sin</b> ampicilina, IPTG y X-Gal

14. Retirar las perlas de vidrio e incubar las cajas a 37 °C durante toda la noche (14-16 h).

15. Incubar a 4 °C durante al menos 1 h y luego contar las colonias blancas y azules.

16. Almacenar a 4 °C.

### Análisis de resultados

Interprete los resultados obtenidos en cada una de las transformaciones. Por ejemplo, ¿aportan la misma información los 2 controles positivos? Si se obtuvieran unidades formadoras de colonias (UFC) en la caja F, ¿siguen siendo válidos los resultados obtenidos en el resto de las cajas de Petri? Si no se obtienen UFC en la caja G, ¿siguen siendo válidos los resultados obtenidos en el resto de las cajas de Petri?

Calcule la eficiencia de transformación utilizando el plásmido circular (control positivo de transformación). Verifique que el resultado sea congruente con el sembrado 1:10 de la misma transformación.

Ejemplo de cálculo: 200 µL de células competentes son transformadas con 0.1 ng de plásmido y cultivadas en 1,000 µL de medio LB. Se siembra la totalidad de este cultivo en una caja de Petri. Se obtienen 200 UFC. La eficiencia de transformación es:

$$200 \text{ UFC} / 0.1 \text{ ng} = 2 \times 10^6 \text{ UFC} / \mu\text{g de ADN}$$

En la siguiente tabla reporte los resultados de las transformaciones realizadas.

Tabla 1. Resultados de las transformaciones.

	Número de colonias blancas	Número de colonias azules
A. Control negativo de transformación		
B. Control positivo de transformación		
B'. Control positivo de transformación (1:10)		
C. Ligación control <i>background</i>		
D. Ligación control positivo		
E. Ligación experimental		
F. Control de antibiótico		
G. Control de células		

En la Figura 2 se muestran algunos resultados obtenidos en la UEA Técnicas de Biología Molecular I de la Licenciatura en Biología Molecular.

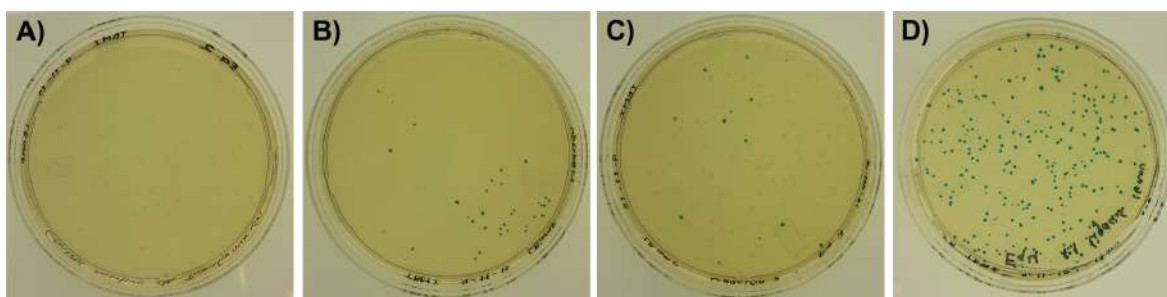


Figura 2. Resultado representativo de la práctica de transformación. En A) control positivo de transformación, con 94 colonias blancas (eficiencia de transformación de  $9.4 \times 10^5$  UFC/ $\mu$ g); B) ligación control *background*, con 36 colonias azules; C) ligación control positivo, con 132 colonias blancas y 16 colonias azules; d) Ligación experimental, en una relación molar 13:1, con 276 colonias blancas y 272 colonias azules.

## Cuestionario

1. ¿Por qué se recomienda usar células competentes con una eficiencia de transformación de  $1 \times 10^8$  UFC/  $\mu\text{g}$  de ADN?
2. ¿Por qué las colonias azules suelen ser más pequeñas que las colonias blancas?
3. ¿Qué podría ocurrir si las cajas de Petri con LB, ampicilina, IPTG y X-Gal tienen más de 1 mes de preparación?
4. ¿Cuáles pueden ser las razones para obtener menos del 10% de colonias blancas con la ligación control positivo?
5. ¿Cuáles pueden ser las razones para obtener un bajo número de colonias blancas con la ligación experimental?
6. ¿Se podría utilizar lactosa en vez de IPTG? Argumente su respuesta
7. ¿Cuáles son las ventajas de la electroporación comparado con la transformación con choque térmico?

## Soluciones

👁 Utilice bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.

- Medio LB (250 mL)

Mezclar 2.5 g de triptona, 1.25 g de extracto de levadura y 2.5 g de NaCl en 200 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7 con NaOH 5 M. Ajustar el volumen a 250 mL con agua destilada. Esterilizar por autoclave y guardar a temperatura ambiente.

**Referencias**

Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. Methods in molecular biology and genetic engineering. En Lewin's Genes X. 10a ed. Estados Unidos: Jones and Bartlett Publishers; 2011.

Kreuzer H, Massey A. Molecular biology and biotechnology: a guide for teachers. 3a ed. Estados Unidos: ASM; 2008.

Strachan T, Read AP. Amplificación del DNA: clonación de DNA por PCR y basada en células. En Genética Humana. 3a ed. México: McGraw-Hill; 2004.

## Práctica 17. Inducción de una proteína recombinante

### Objetivos

1. Explicar los componentes de un sistema de expresión de proteínas recombinantes en bacterias.
2. Describir los usos potenciales de las proteínas de fusión.
3. Realizar la inducción de la expresión de un gen heterólogo en células de *E. coli*.
4. Registrar el crecimiento microbiano por turbidimetría durante la inducción.

### Introducción

En Biología Molecular es común estudiar la composición, estructura y, en lo posible, la función de proteínas. Ahora es posible producir grandes cantidades de proteínas seleccionadas usando la tecnología del ADN recombinante. En general, un ADN híbrido o recombinante se prepara al insertar el gen que deseamos expresar en un vector y luego se transfiere dentro de una célula hospedera (“host”) donde la proteína deseada es sintetizada. Este procedimiento ha sido usado en la producción de cientos de proteínas con propósitos científicos, médicos e industriales. En la Tabla 1 se enlistan algunos ejemplos de los productos proteicos obtenidos por métodos de ADN recombinante (Glick *et al.*, 2010).

Las células bacterianas han sido ampliamente usadas como células hospederas para la producción de proteínas recombinantes a gran escala. El gen clonado que contiene el mensaje para la proteína deseada es incorporado dentro de un vector de expresión que tiene todas las secuencias de control transcripcional y traduccional necesarias (Figura 1).

Tabla 1. Ejemplos de proteínas recombinantes y sus usos.

Proteína	Uso
Insulina humana	Tratamiento de diabetes
Activador tisular de plasminógeno	Tratamiento en infarto cardiaco y embolias
Eritropoyetina	Estimula la producción de eritrocitos en anemia
Interferones	Tratamiento en cánceres y agente antiviral
Factor natriurético auricular	Reduce la presión sanguínea
Trastuzumab	Anticuerpo monoclonal anticancerígeno

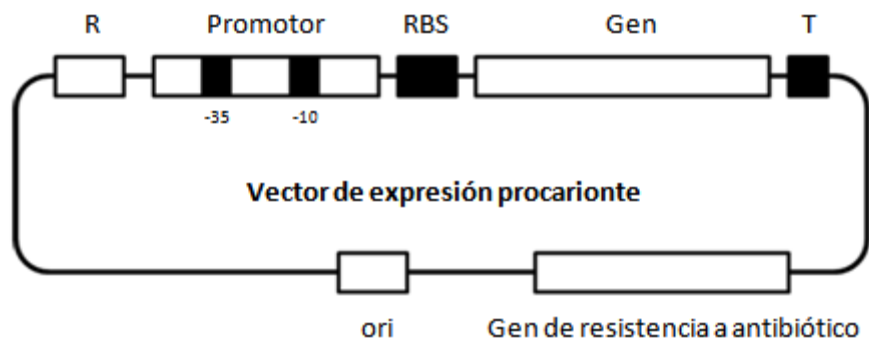


Figura 1. Componentes de un vector de expresión procarionte típico. El gen contiene la secuencia codificante para la proteína. Los componentes esenciales incluyen el promotor, el sitio de unión de ribosoma (RBS), el gen regulador (R) y el terminador transcripcional (T). Dos marcadores de selección ampliamente utilizados son amp (resistencia a ampicilina) y kan (resistencia a kanamicina). Ori se refiere al origen de replicación del vector.

Si las señales apropiadas para la expresión del gen están presentes, es posible sobreexpresar la proteína deseada a una concentración que puede representar hasta el 40% en peso de la proteína total de la bacteria. Sin embargo, esta sobreexpresión puede causar dificultades en el crecimiento bacteriano, inestabilidad plasmídica o incluso, la proteína extraña puede ser tóxica para la bacteria. Además, en ocasiones las células bacterianas concentran las proteínas extrañas dentro de cuerpos de inclusión

insolubles en donde las proteínas están presentes en forma desnaturalizada y agregada. Muchos de estos problemas pueden ser minimizados o eliminados al etiquetar (*tagging*) la proteína deseada con una proteína de origen bacteriano, lo cual se logra al insertar dentro del vector un fragmento de ADN que codifique una proteína bacteriana. Así, la bacteria puede reconocer a la proteína extraña como propia (la etiqueta frecuentemente se agrega en el extremo N-terminal de la proteína de interés). Estas proteínas modificadas son llamadas proteínas híbridas o de fusión. Si es necesario, la etiqueta puede ser eliminada de la proteína deseada después de la purificación (Farrel y Taylor, 2006).

Otra forma de disminuir los problemas asociados a la expresión de proteínas extrañas en las células bacterianas, es restringir al mínimo la expresión basal, es decir, utilizar un sistema inducible de expresión proteica. Esto se puede lograr si la enzima encargada de la transcripción del gen, la ARN polimerasa, reconoce al promotor del vector sólo en presencia de un inductor, por ejemplo IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido). La adición de IPTG al cultivo en crecimiento induce la transcripción del ADN blanco bajo el control de promotores derivados del promotor *lac*.

Las etiquetas en las proteínas tienen otros usos, además del mencionado previamente: pueden ser útiles para facilitar la purificación, para identificar a la proteína de interés, para incrementar la probabilidad de actividad biológica por afectar la solubilidad en el citoplasma o para exportar al periplasma. Varios vectores comerciales contienen diferentes secuencias adyacentes al sitio de clonación que codifican péptidos “etiqueta” y que pueden desarrollar varias de estas funciones cuando se fusionan con la proteína de interés. La elección de los sitios de clonación depende de la combinación de etiquetas deseadas y la localización de éstas en el extremo N-terminal, C-terminal o ambos, de la proteína de interés. Ejemplos de estos sistemas de expresión para proteínas de fusión son los vectores pET de Clontech y los vectores pGEX de la compañía GE Healthcare Life Sciences (GE Healthcare Life Sciences, 2014).

En esta práctica induciremos la expresión de la proteína glutatión S-transferasa (GST) en *E. coli*, usando un vector pGEX.

### Material y equipo necesario

Matraces Erlenmeyer de 100 y 250 mL estériles

Microcentrífuga

Incubadora a 37 °C con agitación

Espectrofotómetro

Celdas para espectrofotómetro (para volúmenes de 1 mL)

Congelador -20 °C

Campana de flujo laminar clase II

Asa microbiológica

Micropipetas y puntas de 200 µL y 1,000 µL estériles

Pipetas de vidrio graduadas de 10 mL estériles y propipeta

Microtubos de 1.6 mL, nuevos y estériles

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

Hielo/contenedor

Bacterias de *E. coli* BL21 transformadas con un vector pGEX

Medio LB

Solución de ampicilina (100 mg/mL)

Solución de IPTG (100 mM)



### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consulte las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

- Utilice bata y guantes en todo momento.

#### *El día anterior a la práctica:*

Bajo condiciones de asepsia, inocular con la cepa bacteriana 20 mL de medio LB con ampicilina a 100 µg/mL en un matraz Erlenmeyer de 100 mL estéril y dejar durante 14-16 h a 37 °C en agitación (250 rpm).

#### *El día de la práctica:*

1. Agregar 2.5 mL del cultivo bacteriano a 25 mL de medio LB a 37 °C con ampicilina en un matraz Erlenmeyer de 250 mL estéril (para asegurar una aireación adecuada, llenar los frascos hasta sólo el 20% de su capacidad).

2. Incubar a 37 °C con agitación orbital de 250 rpm hasta alcanzar una  $A_{600}$  de entre 0.6 a 1.0.

• Tomar una muestra de 1 mL del cultivo bacteriano cada 30 min para medir la DO a 600 nm en el espectrofotómetro previamente calibrado con el medio LB sin inocular. Aproximadamente tardará 1 h en llegar a la DO deseada.

3. Tomar una muestra de 1.5 mL del cultivo bacteriano (sin inducción) en un microtubo estéril y mantenerla en hielo hasta su procesamiento posterior.

4. Agregar el IPTG al cultivo (concentración final de 1 mM) y continuar la incubación en agitación a 37 °C.

5. Tomar una muestra de 1 mL del cultivo bacteriano cada 30 min durante 4 h para medir la DO.

6. Al cumplirse las 4 h de inducción, tomar una muestra de 1.5 mL del cultivo bacteriano en un microtubo estéril y mantenerla en hielo.
7. Centrifugar las muestras (sin inducción y con 4 h de inducción) a 13,000 rpm durante 3 min a 4 °C.
8. Retirar el sobrenadante con una micropipeta. Almacenar las 2 pastillas a -20 °C hasta su análisis por electroforesis.

### Análisis de resultados

Registre los diferentes valores de DO obtenidos y gráficalos contra el tiempo. Explica el comportamiento de la gráfica e indica las fases del crecimiento.

Discuta qué pasaría si el cultivo bacteriano creciera a 30 °C en vez de a 37 °C, o si el tiempo de inducción fuera menor o mayor a 4 h, o si usara una cepa DH5α en vez de una cepa BL21.

Prediga qué tipo de proteínas tiene en cada una de sus pastillas. Sugiera métodos para corroborar la expresión de la proteína heteróloga.

Mencione estrategias para solucionar altos niveles de expresión basal de GST.

### Cuestionario

1. ¿Por qué es importante la aireación durante la inducción de la expresión de una proteína recombinante?
2. Explique por qué es importante agregar el inductor cuando el cultivo bacteriano ha llegado a una DO mayor a 0.6 pero menor a 1.0
3. ¿Qué consecuencias tendría el no agregar ampicilina al cultivo bacteriano?
4. ¿Cuáles son las ventajas de producir una proteína de fusión con GST?
5. ¿De qué organismo proviene el gen *gst* del vector pGEX? ¿Cuáles son las características de esta proteína?

6. Si el vector pGEX tuviera clonada una secuencia de 1,200 pb en el marco de lectura adecuado, entre los sitios de restricción *Bam*HI y *Xho*I, ¿cuál sería la masa molecular de la proteína y dónde tendría la etiqueta?
7. ¿Cuál es el rendimiento máximo y el rendimiento promedio del sistema pGEX? ¿De qué depende?

### Soluciones

👁 Utilice bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.

- Medio LB (250 mL)

Mezclar 2.5 g de triptona, 1.25 g de extracto de levadura y 2.5 g de NaCl en 200 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7 con NaOH 5 M. Ajustar el volumen a 250 mL con agua destilada. Esterilizar por autoclave y guardar a temperatura ambiente.

- Solución de ampicilina (100 mg/mL) (10 mL)

Disolver 1 g de ampicilina en 10 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración con jeringa y filtro estéril. Repartir en microtubos de 1.6 mL estériles (1 mL de solución de ampicilina por tubo). Guardar en congelación a -20 °C.

- Solución de IPTG (100 mM)

Será proporcionada por el profesor. Descongelar, homogenizar y mantener en hielo.

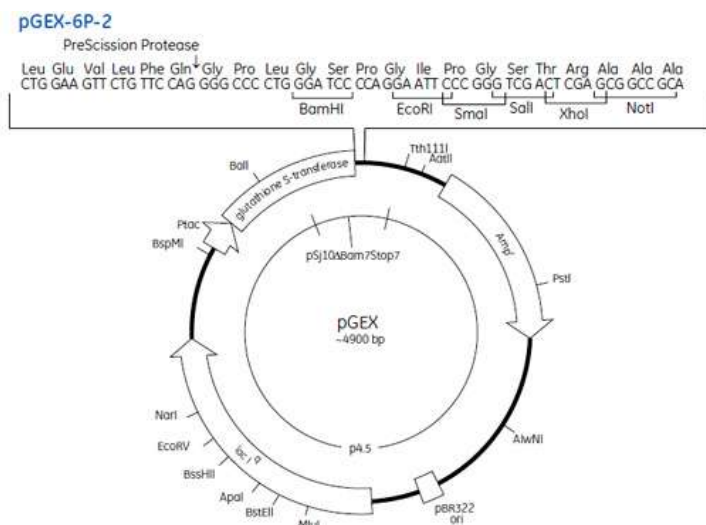
## Referencias

Farrell SO, Taylor LE. Experiments in biochemistry: a hands-on approach: a manual for the undergraduate laboratory. 2a ed. Estados Unidos: Thomson Brooks/Cole; 2006.

GE Healthcare Life Sciences. GST Gene Fusion System Handbook. Disponible en: [http://proteins.gelifesciences.com/~media/protein-purification-ib/documents/handbooks/gst\\_gene\\_fusion\\_system\\_handbook.pdf?la=en](http://proteins.gelifesciences.com/~media/protein-purification-ib/documents/handbooks/gst_gene_fusion_system_handbook.pdf?la=en). Consultado agosto 20, 2017.

Glick BR, Pasternak JJ, Patten CL. Molecular Biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA. 4a ed. Estados Unidos: ASM Press; 2010.

## Mapa de un vector pGEX



## Práctica 18. Separación de proteínas por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida

### Objetivos

1. Describir los fundamentos de la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.
2. Explicar las principales aplicaciones de la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.
3. Realizar una separación de proteínas por electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante.
4. Interpretar los resultados obtenidos de la inducción de expresión de una proteína heteróloga en células de *E. coli*.

### Introducción

Como se mencionó previamente en la práctica 9, la electroforesis es una técnica de separación basada en la migración diferencial de especies cargadas en un medio conductor de la corriente eléctrica, bajo la influencia de un campo eléctrico. La separación electroforética depende de la densidad de carga de las moléculas y de su tamaño. Las proteínas se separan comúnmente sobre un soporte sólido de poliacrilamida. Los geles formados por polimerización de acrilamida tienen gran poder de resolución para proteínas de pequeño a moderado tamaño (hasta  $1 \times 10^6$  Daltons) y tienen mínimas interacciones con las moléculas que migran a través de ellos.

Los geles de poliacrilamida se preparan con acrilamida, que actúa como el radical libre de polimerización, y N,N'-metilen-bis-acrilamida, que es el agente entrecruzante (*cross-linking*). La polimerización química es controlada por un sistema iniciador de catálisis: persulfato de amonio y N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED). El primero es un catalizador de la polimerización que se descompone espontáneamente formando radicales sulfatos. El TEMED es otro catalizador, que forma radicales estables en presencia de radicales sulfatos, lo que contribuye a que la reacción de propagación no se extinga (Farrell y Taylor, 2006).

La separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida puede llevarse a cabo en 2 condiciones:

- Condiciones no desnaturizantes. La separación se hace en función de la carga y del tamaño de las proteínas.
- Condiciones desnaturizantes. La separación se hace en función del tamaño, debido a la pérdida de la estructura tridimensional de las proteínas por la acción de agentes desnaturizantes que provocan desplegamiento y confieren una carga uniforme. Es el método más utilizado.

El agente desnaturizante utilizado es el detergente dodecil sulfato sódico (SDS), que rompe las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria para producir cadenas polipeptídicas lineales cubiertas con moléculas de SDS cargadas negativamente. El SDS se une a regiones hidrofóbicas de las proteínas desnaturizadas en una relación constante de cerca de 1.4 g de SDS por gramo de proteína. La molécula de detergente enmascara la carga nativa de la proteína, obteniéndose la misma densidad de carga en todas las proteínas, prácticamente constante, por lo que sólo diferirán en su longitud. Además, todos los complejos tendrán carga negativa y migrarán en el mismo sentido. En estas condiciones también se utiliza un agente reductor de enlaces disulfuro, el  $\beta$ -mercaptoetanol, que asiste en el proceso de desnaturización proteica (Bio-Rad, 2006).

Otra variante de la electroforesis en geles de poliacrilamida, es la electroforesis en geles discontinuos, en los que se tienen 2 secciones: una inferior o gel separador y una superior o gel concentrador; los amortiguadores usados para preparar las 2 secciones del gel son de diferente fuerza iónica y pH. El gel concentrador tiene un tamaño de poro mayor, no restrictivo, en un amortiguador de pH aproximadamente de 6.8, mientras que el pH del gel separador es aproximadamente de 8.8. Este sistema es el más utilizado porque permite mayor resolución.

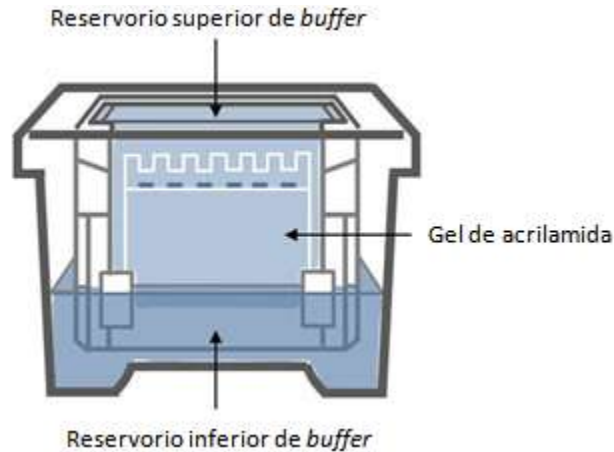
El poder de resolución de un gel depende de las concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida (Tabla 1).

**Tabla 1. Concentración de acrilamida según el peso molecular de las proteínas a separar.**

Porcentaje de acrilamida* recomendado (p/v)	Rango del peso molecular de las proteínas (Da)
>15%	<10,000
10-15%	10,000 - 80,000
5-10%	20,000 - 150,000
3-5%	>100,000

\*Relación acrilamida:bis-acrilamida, 37.5:1(p/p)

El gel es preparado entre dos placas de vidrio que están separadas por espaciadores, lo que permite un grosor uniforme de 0.5 a 2 mm. Se inserta un peine plástico en la parte superior que permitirá formar los pozos para colocar las muestras. Posteriormente el gel se coloca en una cámara vertical, entre dos reservorios de amortiguadores separados. El reservorio superior usualmente contiene el cátodo (-) y el inferior el ánodo (+) (Figura 1).



**Figura 1. Cámara de electroforesis vertical**

Como las proteínas no tienen color, se suele agregar azul de bromofenol a la muestra, colorante que permite monitorear la electroforesis. Al finalizar la electroforesis, las proteínas en los geles de poliacrilamida pueden teñirse con azul de Coomassie, uno de los colorantes más empleados para este fin (Thermo Fisher Scientific, 2015).

Quizá el inconveniente más importante de la electroforesis en geles de poliacrilamida es la preparación de los geles, porque el monómero de acrilamida es neurotóxico y carcinogénico, por lo que debe manejarse con cuidado, utilizando guantes para manipular cualquier solución que contenga este químico.

### **Material y equipo necesario**

Muestras de pastillas bacterianas obtenidas en la práctica 17

Marcador de peso molecular para proteínas

Micropipetas y puntas de 20  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$  y 1,000  $\mu\text{L}$

Cámara de electroforesis vertical (los volúmenes para la preparación de los geles en esta práctica están calculados para una cámara Mini-Protean® Tetra Cell de la marca Bio-rad, <https://www.bio-rad.com>)



Módulo de ensamble, vidrios con separador de 1.5 mm y peine (Mini-Protean® Tetra Cell de la marca Bio-rad, <https://www.bio-rad.com>)

Papel filtro (~5 cm x 5 cm)

Fuente de poder

Vórtex

Agitador para teñir geles

Transiluminador de luz blanca

Termoblock a 95 °C (o baño maría)

Hielo/contenedor

Charolas para tinción

Agua destilada

Tubo cónico de 50 mL

Tubo cónico de 15 mL

Microtubos de 1.6 mL, nuevos y estériles

Rejilla para microtubos

Guantes de látex o nitrilo

Acrilamida/bis-acrilamida 30:0.8

Amortiguador de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Amortiguador de Tris-HCl 1 M pH 6.8

Solución SDS 10% (p/v)

N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)

Persulfato de amonio (PSA) al 10% (p/v)

Amortiguador de carga para proteínas 4X

Amortiguador de corrida

Solución de Coomassie

Solución desteñidora

### Protocolo

Antes de iniciar la práctica, consulte las recomendaciones de seguridad especificadas para cada sustancia utilizada (ver “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular” al final del manual).

☞ Utilice bata y guantes en todo momento.

1. Verificar que los vidrios (con separadores de 1.5 mm), el peine y el módulo de ensamble se encuentren limpios y secos.

2. Con ayuda del profesor, colocar los vidrios en el módulo de ensamble. Después acomodar el peine y hacer una marca sobre el vidrio a 0.3 cm por debajo de los dientes del peine.

3. Preparar la siguiente solución monomérica del gel separador combinando los siguientes ingredientes (mezclar suavemente para evitar la formación de burbujas en un tubo cónico de 50 mL):

i.	Agua destilada	2.3 mL
ii.	Acrilamida/bis-acrilamida	5.0 mL
iii.	Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 mL
iv.	Solución SDS 10%	0.1 mL
v.	PSA 10%	0.1 mL
vi.	TEMED	4 $\mu$ L

☞ La acrilamida y la bis-acrilamida son extremadamente tóxicas. Antes de usarlas, consulte la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

☞ El PSA y el TEMED deben agregarse hasta el final, volver a mezclar e inmediatamente continuar con el siguiente paso, puesto que una vez que se añaden, se inicia la polimerización. Antes de usar el TEMED, consulte la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

4. Agregar poco a poco la solución al espacio entre los vidrios, hasta la marca previamente realizada.

5. Agregar lentamente agua destilada con una micropipeta para cubrir la solución monomérica.

👁 Se debe evitar la presencia de oxígeno en la solución del gel separador, porque inhibe la polimerización al bloquear los radicales libres.

6. Esperar a que el gel solidifique (aproximadamente 30 min).

7. Secar con papel filtro el agua añadida en el paso 5. Cuidar de no dañar el gel.

8. Preparar la solución monomérica del gel concentrador combinando los siguientes ingredientes (mezclar suavemente para evitar la formación de burbujas en un tubo cónico de 15 mL):

i.	Agua destilada	2.70 mL
ii.	Acrilamida/bis-acrilamida	0.67 mL
iii.	Tris-HCl 1.0 M pH 6.8	0.50 mL
iv.	Solución SDS 10%	0.04 mL
v.	PSA 10%	0.04 mL
vi.	TEMED	4 $\mu$ L

👁 El PSA y el TEMED deben agregarse hasta el final, volver a mezclar e inmediatamente continuar con el siguiente paso.

9. Agregar poco a poco la solución al espacio entre los vidrios, hasta llegar al borde.

10. Colocar el peine (de 10 dientes, grosor 1.5 mm), cuidando de no atrapar ninguna burbuja, porque pueden provocar distorsión en la superficie del gel.

11. Esperar a que el gel solidifique (aproximadamente 15 min).

👁 En este punto el gel puede ser almacenado a 4 °C toda la noche, envuelto en un papel humedecido con agua y dentro de una bolsa, para mantenerlo hidratado.

12. Con ayuda del profesor, colocar el gel en la cámara de electroforesis.

13. Llenar la cámara superior con amortiguador de corrida hasta cubrir el gel (~3 mm por encima del gel) y la cámara inferior hasta la señal marcada en el contenedor.

14. Descongelar las muestras de pastillas bacterianas obtenidas en la práctica 17 y resuspender rápidamente con 200  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga, primero usando la micropipeta y luego usando el vórtex. Hervir a 95  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 min.
15. Centrifugar a 13,000 rpm durante 3 min. Colectar el sobrenadante en nuevos microtubos.
16. Retirar cuidadosamente el peine y cargar lentamente el marcador de peso molecular en el pozo #1 y el resto de las muestras en los pozos adyacentes.
  - ☞ El volumen necesario de marcador de peso molecular puede cambiar dependiendo de la marca comercial. Evitar burbujear con la micropipeta mientras se coloca la muestra para que ésta no se salga del pozo.
17. De la misma forma, cargar 35  $\mu\text{L}$  de cada una de las 2 muestras de proteínas totales obtenidas en la práctica previa. En los pozos restantes cargar el mismo volumen de amortiguador de carga para proteínas.
  - ☞ Si un pozo se queda vacío, la muestra adyacente se extenderá lateralmente.
18. Con ayuda del profesor, cerrar la cámara de electroforesis y aplicar una corriente de 90 V durante 3 h.
  - ☞ Si la cámara se coloca adecuadamente, se observará la formación de burbujas en los electrodos.
19. Cuando el colorante llegue al extremo inferior del gel, apagar la fuente de poder y sacar el gel de la cámara.
20. Teñir el gel con la solución de Coomassie durante 30 min en agitación. Usar un volumen suficiente para cubrir el gel.
21. Retirar la solución de Coomassie (ésta se puede reutilizar) y cubrir ahora con la solución desteñidora.
22. Dejar en agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 h.
23. Desechar la solución desteñidora y enjuagar el gel con abundante agua.
24. Visualizar las proteínas en el gel con la luz blanca del transiluminador y fotodocumentar.

### Análisis de resultados

Compare el patrón de bandas proteicas de cada carril en el gel. Determine qué diferencias existen entre la muestra obtenida antes de agregar IPTG y la muestra obtenida después de 4 h de haber agregado el inductor.

Grafique la curva patrón de los pesos moleculares de las proteínas del marcador.

Identifique la banda a la cual corresponde la proteína GST y determine el peso molecular aparente. Discuta si el peso molecular observado es igual a lo reportado para esta proteína y considere la posibilidad de observar dímeros de esta proteína.

Discuta alternativas para purificar a la proteína GST que acaba de inducir.

En caso necesario, discuta las posibles razones por las cuáles no se pudiera detectar a la proteína GST, como el método de detección, las condiciones de cultivo o los errores experimentales.

### Cuestionario

1. ¿Cuál es la concentración porcentual (p/v) de acrilamida/bisacrilamida del gel separador que se usó en la práctica? ¿y del gel concentrador?
2. En una electroforesis de proteínas desnaturizante, ¿cuáles podrían ser las causas de que la corriente eléctrica sea igual a cero y las muestras no migren a través del gel?
3. ¿Cómo se observan las proteínas en el gel cuando la electroforesis genera mucho calor y cómo se puede evitar?
4. En una electroforesis de proteínas desnaturizante, ¿cuál podrían ser la causa de que una proteína en particular no migrara hacia el ánodo? ¿Cómo se puede solucionar?
5. Menciona otros métodos de detección de proteínas de fusión a GST, así como la situación experimental en que se utilizan.

### Soluciones

👁 Utilice bata y guantes en todo momento para preparar las soluciones.

- Solución *stock* de SDS 10% (p/v) (5 mL)

Disolver 0.5 g de SDS en 4 mL de agua Milli-Q™ y agitar con agitador magnético en un baño de agua a 68 °C para favorecer la disolución. Ajustar el volumen a 5 mL. Guardar a temperatura ambiente.

- Amortiguador de carga para proteínas 4X

Mezclar los siguientes componentes en el orden mencionado:

- Agua destilada	3.1 mL
- Tris-HCl 1 M, pH 6.8	2.4 mL
- Glicerol	4.0 mL
- SDS	0.8 g
- Azul de bromofenol	4.0 mg
- $\beta$ -mercaptoetanol	0.5 mL

Almacenar a temperatura ambiente en frasco ámbar. Antes de usar el  $\beta$ -mercaptoetanol, revisa la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- Amortiguador de Tris-HCl 1 M, pH 6.8 (50 mL)

$PM_{\text{Tris}}$  121.14

Disolver 6.05 g de Tris base en 30 mL de agua Milli-Q™. Ajustar a pH de 6.8 agregando HCl 6 N. Ajustar el volumen a 50 mL y guardar a temperatura ambiente. Antes de usar el ácido clorhídrico, consulte la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- Acrilamida:bis-acrilamida 30:0.8 (50 mL)

Disolver 15 g de acrilamida y 0.4 g de bis-acrilamida en 30 ml de agua Milli-Q™. Aforar a 50 mL. Filtrar con filtro de 0.45 µm y guardar a temperatura ambiente en frasco ámbar. Antes de usar la acrilamida, revisa la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- Amortiguador de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 (50 mL)

PM<sub>Tris</sub> 121.14

Disolver 9.07 g de Tris base en 30 mL de agua Milli-Q™, ajustar pH a 8.8 con HCl 6 N. Aforar a 50 mL y guardar a temperatura ambiente. Antes de usar el ácido clorhídrico, revisa la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- PSA 10% (p/v) (1 mL)

Disolver 100 mg de persulfato de amonio en 1 mL de agua destilada. Utilice un microtubo de 1.5 mL. Almacenar a -20 °C. Antes de usar el PSA, revisa la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- Amortiguador de corrida, Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 0.1% (p/v) (1 L)

Disolver 3.025 g de Tris base, 14.4 g de Glicina y 1 g de SDS en 500 mL de agua destilada. Aforar a 1 L y almacenar a temperatura ambiente.

- Solución de Coomassie

Mezclar los siguientes componentes en el orden mencionado:

- Agua destilada	21.5 mL
- Metanol	25 mL
- Ácido acético	3.5 mL
- Azul de Coomassie	0.15 g

Almacenar a temperatura ambiente en un tubo cónico de 50 mL forrado con papel aluminio. Esta solución se puede reutilizar. Antes de usar el azul de Coomassie, revisa la sección de “Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular”.

- N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)

Será proporcionado por el profesor. Mantener en hielo.

- Solución desteñidora

Mezclar los siguientes componentes en el orden mencionado:

- Agua destilada 63 mL
- Etanol 30 mL
- Ácido acético 7 mL

Almacenar a temperatura ambiente.

### Referencias

Bio-Rad. Mini-Protean® Tetra Cell: instruction manual. Disponible en: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296D.pdf>.

Consultado agosto 5, 2017.

Farrell SO, Taylor LE. Experiments in biochemistry: a hands-on approach: a manual for the undergraduate laboratory. 2a ed. Estados Unidos: Thomson Brooks/Cole; 2006.

Thermo Fisher Scientific. Protein gel electrophoresis technical handbook. Disponible en:

<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/protein-gel-electrophoresis-technical-handbook.pdf>. Consultado agosto 4, 2017.



## Abreviaturas

A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Nucleasa de ADN
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Nucleasa de ARN
ARNm	ARN mensajero
BSA	Seroalbúmina bovina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HCl	Ácido clorhídrico
kpb	Kilopares de bases
LB	Medio Luria-Bertani
min	Minuto
pb	Pares de bases
PBS	Solución Salina Amortiguada por Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RCF	Fuerza centrífuga relativa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción Reversa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TE	Amortiguador de Tris y EDTA
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
μL	Microlitros
V	Volts

## Seguridad en el laboratorio de Biología Molecular

### *Consideraciones generales*

- Averiguar las propiedades físicas y químicas de todas las sustancias que se van a utilizar en un protocolo antes de iniciar. Identificar las potencialmente nocivas para la salud.
- Conocer los riesgos y el manejo adecuado de sustancias que se utilizarán durante el desarrollo de las prácticas.
- Evitar el contacto de sustancias con la piel; usar bata y guantes para proteger la ropa y el cuerpo en todo momento.
- Si entra en contacto con alguna sustancia peligrosa, contactar inmediatamente con el encargado de la seguridad en el laboratorio. Asegúrese de que el encargado de la seguridad en el laboratorio conozca la sustancia involucrada.
- Conocer y acatar los procedimientos para desechar sustancias químicas y biológicas.
- Manejar con cuidado los ácidos y bases concentrados, utilizar lentes de protección y guantes apropiados, y eventualmente una pantalla para proteger toda la cara, recordar que siempre se debe adicionar ácido al agua y no al revés, para evitar la proyección del líquido.
- Nunca pipetear soluciones con la boca, siempre utilizar un bulbo o una propipeta.
- Manejar los solventes dentro de una campana de extracción.
- Tomar precauciones al manejar las fuentes de poder y cámaras de electroforesis para evitar incendios y choques eléctricos.
- Los hornos de microondas y las autoclaves deben ser manejados con cuidado, en particular, no cerrar completamente las tapas de las botellas.
- Tener cuidado al manejar herramientas cortantes como tijeras, agujas, pipetas Pasteur, etc.

- Todo líquido corporal debe tratarse como potencialmente contagioso, por lo que debes trabajar de forma ordenada y desechar cuidadosamente todos los materiales biológicos, utilizando los contenedores adecuados marcados como biológico-infecciosos.
- En caso de un derrame de sustancias peligrosas, elimine todas las fuentes de ignición. Con la protección adecuada, se debe absorber o cubrir la sustancia derramada con tierra seca, arena u otro material no combustible, para transferirlo a contenedores.
- En caso de un derrame de sustancias peligrosas sobre su ropa o calzado, debe quitárselos y aislarlos.

### ***Sustancias peligrosas***

- Ácido acético. Líquido inflamable y corrosivo. Puede encenderse por calor, chispas o llamas. Los vapores pueden viajar a fuentes de ignición y encender. Los contenedores pueden explotar cuando se calientan. Puede causar efectos tóxicos si se inhala o se ingiere. El contacto con la sustancia puede causar quemaduras graves en la piel y los ojos. El fuego producirá gases irritantes, corrosivos y tóxicos. Los vapores pueden causar mareos o asfixia. En caso de contacto con la sustancia, lave inmediatamente la piel o los ojos con agua corriente durante al menos 20 minutos y acuda al servicio médico. Los efectos de la exposición a la sustancia (inhalación, ingestión o contacto con la piel) pueden no presentarse inmediatamente. Manejar con guantes y lentes de protección en la campana de extracción.

- Ácido bórico. Oxidante. Puede acelerar la combustión cuando está involucrado en un incendio. Los contenedores pueden explotar cuando se calientan. La inhalación, ingestión o contacto con piel y ojos puede causar lesiones graves, quemaduras o la muerte. En contacto con el fuego puede producir gases irritantes, corrosivos y tóxicos.

Utilizar guantes apropiados y lentes de protección y manipular en la campana de extracción.

- Ácido clorhídrico. Tóxico y corrosivo. La inhalación, ingestión o contacto de la piel y ojos con el líquido o sus vapores puede causar lesiones graves, quemaduras o la muerte. La reacción con agua o aire húmedo liberará gases tóxicos, corrosivos e inflamables. No es combustible por sí mismo, pero puede descomponerse al calentarse y producir gases irritantes, corrosivos y tóxicos. El contacto con metales puede generar hidrógeno gaseoso inflamable. Los contenedores pueden explotar cuando se calientan o si se contaminan con agua. En caso de contacto con la sustancia, lave inmediatamente la piel o los ojos con agua corriente durante al menos 20 minutos. Los efectos de la exposición (inhalación, ingestión o contacto con la piel) pueden no presentarse inmediatamente. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección y manipular con extrema precaución en la campana de extracción.

- Acrilamida. Potente neurotóxico con efecto acumulativo. La inhalación, ingestión o contacto con la piel pueden causar lesiones graves o la muerte. Evite cualquier contacto con la piel. Es combustible: puede arder, pero no se enciende fácilmente. El fuego producirá gases irritantes, corrosivos y tóxicos. Cuando se calienta, los vapores pueden formar mezclas explosivas con el aire. El contacto con metales puede generar hidrógeno gaseoso inflamable. Los contenedores pueden explotar cuando se calientan. En caso de contacto con la sustancia, lave inmediatamente la piel o los ojos con agua corriente durante al menos 20 minutos. Si hay polvo seco sobre la piel, primero debe eliminarse con un cepillo suave antes de lavar. En casos de contacto mínimo con la piel, evite extender el material sobre la piel no afectada. Los efectos de la exposición (inhalación, ingestión o contacto con la piel) pueden no presentarse inmediatamente. Usar guantes y mascarilla de protección para su manipulación y preparar las soluciones en campana de extracción. En principio, la poliacrilamida no es tóxica, pero

debe manejarse con precaución ya que puede contener restos de acrilamida no polimerizada.

- Azul de Coomassie. Puede ser peligroso por inhalación, ingestión o absorción por la piel. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección y manipular en la campana de extracción.

- Beta-mercaptoetanol. Líquido inflamable y tóxico. Puede ser fatal si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. La inhalación o contacto irritará o quemará la piel y los ojos. El fuego producirá gases irritantes, corrosivos y tóxicos. Los vapores pueden causar mareos o asfixia. Es fácilmente inflamable: se encenderá fácilmente por calor, chispas o llamas. Los vapores pueden viajar a la fuente de ignición y arder. Los contenedores pueden explotar cuando se calientan. En caso de contacto con la sustancia, lave inmediatamente la piel o los ojos con agua corriente durante al menos 20 minutos. Lave la piel con agua y jabón. Los efectos de la exposición (inhalación, ingestión o contacto con la piel) pueden no presentarse inmediatamente.

- Bis-acrilamida. Ver acrilamida.

- Bromuro de etidio. Potente mutagénico y tóxico. Utilizar guantes apropiados para pesarlo o al trabajar con soluciones que lo contienen.

- Cloroformo. Altamente tóxico, puede ser fatal si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Evite cualquier contacto con la piel. No es combustible por sí mismo, pero puede descomponerse al calentarse y producir humos corrosivos o tóxicos. Los contenedores pueden explotar cuando se calientan o si se contaminan con agua. En caso de contacto, lave inmediatamente la piel o los ojos con agua corriente durante al menos 20 minutos. En contactos menores con la piel, evite extender el material sobre

la piel no afectada. Los efectos de la exposición (inhalación, ingestión o contacto con la piel) pueden no presentarse inmediatamente. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección y siempre manipular en la campana de extracción.

- Dimetilsulfóxido (DMSO). Puede ser peligroso por inhalación y absorción por la piel. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección y manipular en una campana de extracción. El DMSO es combustible. Almacenar en un contenedor bien cerrado. Apartar del calor, chispas y flamas.

- Etanol. Líquido inflamable, se encenderá fácilmente por calor, chispas o llamas. Sus vapores pueden viajar a una fuente de ignición y arder. Los contenedores pueden explotar cuando se calientan. La inhalación o contacto irritará o quemará la piel y los ojos. Los vapores pueden causar mareos o asfixia. En caso de contacto, lave inmediatamente la piel o los ojos con agua corriente durante al menos 20 minutos. Lave la piel con agua y jabón. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección y manipular en la campana de extracción.

- Fenol. Tóxico y corrosivo. La inhalación, ingestión o contacto con la piel pueden causar lesiones graves o la muerte. Es combustible, pero no se enciende fácilmente. El fuego producirá gases irritantes, corrosivos y tóxicos. Cuando se calienta, los vapores pueden formar mezclas explosivas con el aire. El contacto con metales puede generar hidrógeno gaseoso inflamable. Los contenedores pueden explotar cuando se calientan. En caso de contacto con la sustancia, lave inmediatamente la piel o los ojos con agua corriente durante al menos 20 minutos. Evite extender el material sobre la piel no afectada. Los efectos de la exposición (inhalación, ingestión o contacto con la piel) pueden no presentarse inmediatamente. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección y manipular en la campana de extracción.

- Hidróxido de sodio y soluciones que lo contienen. Tóxico y corrosivo. La inhalación, ingestión o contacto con la piel pueden causar lesiones graves o la muerte. No es combustible por sí misma, pero puede descomponerse al calentarse y producir gases corrosivos o tóxicos. El contacto con metales puede generar hidrógeno gaseoso inflamable. Los contenedores pueden explotar cuando se calientan. En caso de contacto, lave inmediatamente la piel o los ojos con agua corriente durante al menos 20 minutos. Si hay polvo seco sobre la piel, primero debe eliminarse con un cepillo suave antes de lavar. Evite extender el material sobre la piel no afectada. Los efectos de la exposición (inhalación, ingestión o contacto con la piel) pueden no presentarse inmediatamente. Utilizar guantes apropiados, lentes de protección y mascarilla facial.

- Isopropanol. Líquido inflamable y nocivo. Fácilmente inflamable: se encenderá fácilmente por calor, chispas o llamas. Los vapores pueden formar una mezcla explosiva con el aire. Los vapores pueden viajar a las fuentes de ignición y prender. Los contenedores pueden explotar cuando se calientan. Puede causar efectos tóxicos si se inhala o se absorbe a través de la piel. La inhalación o contacto irritará o quemará la piel y los ojos. Los vapores pueden causar mareos o asfixia. En caso de contacto, lave inmediatamente la piel o los ojos con agua corriente durante al menos 20 minutos. Lave la piel con agua y jabón. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección.

- Luz UV. Puede dañar la retina de los ojos y la piel. Es mutagénica y carcinogénica. Es el principal factor de riesgo para cáncer en la piel. Utilizar pantalla protectora, mascarilla o lentes de protección.

- N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED). Extremadamente destructivo para tejidos, mucosas y tracto respiratorio superior, ojos y piel. Su inhalación puede ser fatal. El contacto prolongado puede causar severa irritación y quemaduras. Utilizar

guantes apropiados y lentes de protección y manipular en campana de extracción. Altamente inflamable, mantener lejos del calor, chispas y flamas.

- Persulfato de amonio. Oxidante. Acelerará la combustión cuando esté involucrado en un incendio. Los contenedores pueden explotar cuando se calientan. La inhalación, ingestión o contacto con piel u ojos puede causar lesiones graves, quemaduras o la muerte. Al contacto con el fuego puede producir gases irritantes, corrosivos y tóxicos. En caso de contacto con la sustancia, lave inmediatamente la piel o los ojos con agua corriente durante al menos 20 minutos. Si hay polvo seco sobre la piel, primero debe eliminarse con un cepillo suave antes de lavar. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección y manipular en campana de extracción.

- Poliacrilamida. Ver acrilamida.

- SYBR Green I. Se encuentra en solución concentrada 10,000X en dimetilsulfóxido (DMSO), el cual es una sustancia que transporta químicos a través de la piel y otros tejidos. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección.

- Tris. Puede ser peligroso por inhalación y absorción por la piel. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección.

- Xilen-cianol. Inflamable y narcótico a altas concentraciones. Puede ser peligroso por inhalación y absorción por la piel. Utilizar guantes apropiados y lentes de protección y manipular en una campana de extracción. Almacenar en un contenedor bien cerrado. Apartar del calor, chispas y flamas.



## Primeros auxilios en cortes en la piel

Para llevar a cabo los primeros auxilios para los cortes, es importante utilizar guantes de protección, a menos que la herida sea propia.

### En caso de corte superficial

1. Lavar con abundante agua y jabón y enjuagar bien. No usar alcohol o pomadas.
2. Secar la herida con gasas, dando pequeños toques de adentro hacia fuera, sin frotarla.
3. Aplicar una sustancia desinfectante una vez que está seca (opcional).
4. Cubrir con gasa o una curita adhesiva.

### En caso de corte profundo

1. Lavar cuidadosamente con agua.
2. Con la palma de la mano, presionar con gasas estériles durante 5-10 min, de manera directa y uniforme, para detener el sangrado. Si es posible, poner la herida en alto.
3. No despegar la gasa para ver si ha dejado de sangrar, ya que puede dañar o desplazar el coágulo que se está formando y hacer que vuelva a sangrar.
4. Cuando la sangre empapa la gasa, no hay que retirarla, sino utilizar otro trozo encima de la anterior y continuar ejerciendo presión sobre ella.
5. Si existen objetos incrustados, no se deben extraer.
6. Acudir al servicio médico.

## Primeros auxilios en quemaduras

Una quemadura de cualquier tipo en la mano, pie, cara, genitales o sobre una articulación, es una lesión grave y debe ser vista de inmediato por un médico o en una sala de urgencias.

1. Eliminar la causa de la quemadura (y de aquello que mantenga el calor en la zona).
2. Determine qué tan grave es. Si no está seguro, asuma que es grave y debe ser vista de inmediato por un médico o en una sala de urgencias:

No grave: enrojecimiento de la piel, dolor y ausencia de ampollas.

Grave: apariencia roja con hinchazón asociado y formación de ampollas. La superficie puede tener apariencia húmeda y llorosa y presentar muchísimo dolor incluso a las corrientes de aire. O bien, la piel es color oscuro o puede verse translúcida o blanca como cera, con apariencia de cuero o acartonada. En estos casos, la superficie no duele.

3. Ponga la parte afectada bajo un chorro de agua templada durante al menos 10 min.
4. Envolver la lesión con gasas o paños limpios, humedecidos en agua. El vendaje ha de ser flojo.
5. Sólo en quemaduras no graves, una vez que se enfríe la piel, una crema humectante puede ayudar a calmar el dolor.

### Qué **no hacer** ante una quemadura

Aplicar pomadas o cremas sobre quemaduras graves.

Romper ampollas o frotar la zona quemada.

Poner hielo sobre la quemadura.

Quitar la ropa quemada si ésta está adherida a la piel.

Apagar llamas con agua (haciendo que el afectado ruede o cubriendo las llamas)