

2005 A – 2006 B

090478745

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



“PAQUETE DIDÁCTICO PARA APOYO A LA MATERIA DE
INGENIERÍA GENÉTICA: ACTUALIZACIÓN DEL MANUAL
DE PRÁCTICAS Y MATERIAL DIDÁCTICO EN FORMA
DIGITAL”

PRODUCCIÓN DE MATERIAL EDUCATIVO

OPCIÓN PAQUETE DIDÁCTICO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

ENEIDA ARACELI LÓPEZ ARIAS

Las Agujas, Zapopan, Jal., Octubre 2007



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

1209/ C. C. BIOLOGÍA

C. Eneida Araceli López Arias

PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Producción de material educativo opción Paquete didáctico** con el título: **"Paquete Didáctico para Apoyo a la Materia de Ingeniería Genética: Actualización del Manual de Prácticas y Material Didáctico en Forma Digital"** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: **Dra. Anne Santerre Lucas** y como asesor a el/la **Dra. Luz Patricia Castro Félix** y la **Dra. Josefina Casas Solis**.

Sin más por el momento, le envío un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan., 3 de septiembre del 2007.

DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIATURA EN BIOLÓGICA

P. A.

M en C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

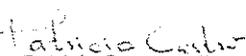
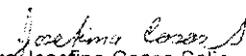
Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología
 CUCBA.
 Presente

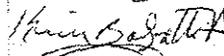
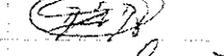
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Producción de material educativo ,opción paquete didáctico con el título: *"Paquete didáctico para apoyo a la materia de Ingeniería Genética: Actualización del manual de prácticas y material didáctico en forma digital (CD)"* que realizó el/la pasante ENEIDA ARACELI LÓPEZ ARIAS con número de código 090478745 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las Agujas, Zapopan, Jal., 28 septiembre de 2007

Firma 
 Nombre Dra. Anne Santerre
 Director/a del trabajo,

Firma 
 Nombre Patricia Castro Felix
 Firma 
 Nombre Josefina Casas Solis
 Asesor(es)

Nombre completo de los Síndicos asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Lucita Hernandez Mascón		28-09-07
María Belzarette Higuera		28-09-07
Ramón Raygoso Orozco		28/09/07
Supl. Dobson/raimond farragoel R.		28/09/07



El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Biomarcadores y Genética Molecular del departamento de Biología Celular y Molecular de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, Titulado: Actualización del manual de prácticas y material didáctico en forma digital.

Dirigido por:
Dra. Anne Santerre.

"Si supiera lo que estoy haciendo, no lo llamaría investigación"

Albert Einstein

Agradecimientos

Muy especialmente a la Dra Anne Santerre, gracias por brindarme en todo momento su apoyo y amistad, por compartir tan generosamente sus valiosos conocimientos conmigo y por este trabajo realizado.

Al Dr. Ramón Reynoso una gran persona y amigo que de igual manera me ayudo cuando lo necesite.

A las maestras Dra. Patricia Castro y Dra. Josefina Casas por asesorarme tan acertadamente.

Gracias a mis compañeros y amigos que hicieron de esto una gran experiencia y estuvieron presentes en mi vida.

Gracias

Dedicado a:

Mi familia que en todo momento estuvieron ahí para apoyarme, mis hijos Yosabeth e Ian que forman parte de este esfuerzo, mi mamá y mi hermano que siempre me alentaron para llegar al final y se emocionaron conmigo, mi papá presente en mi corazón y la familia de mi esposo que le toco estar siempre apoyándome; pero muy especialmente mi esposo, gracias Gerson porque sin tu paciencia y cariño este sueño no lo habría visto completo; eres parte esencial de el y de todo lo que venga adelante.

A ustedes que tanto los quiero...

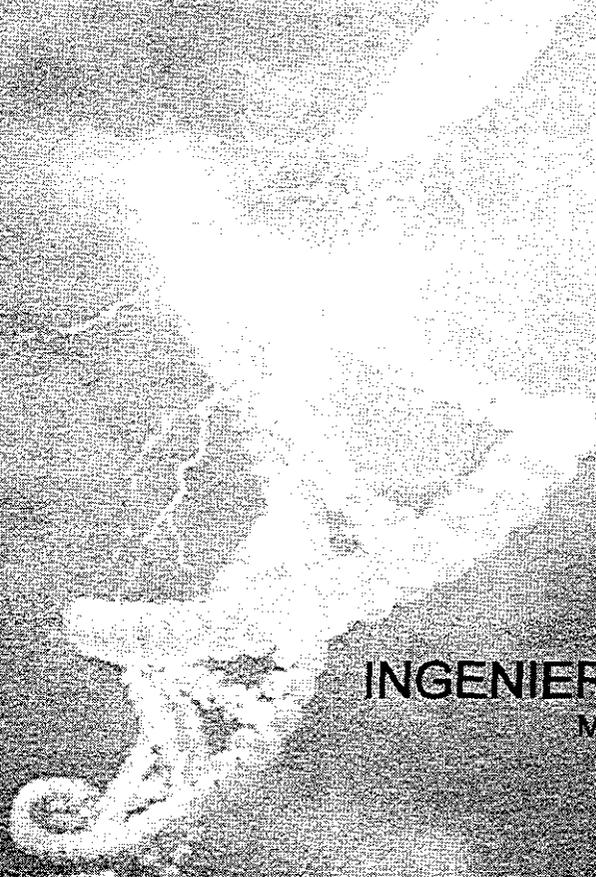
“ENE”



Universidad de Guadalajara

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR



INGENIERÍA GENÉTICA

MANUAL DE PRÁCTICAS

Septiembre 2007
Carr. Nogales Km. 15.5 Las Agujas Nexipac, Zapopan, Jalisco
Tel: 37 77 11 91 Fax: 36 82 00 75

Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

División de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Departamento de Biología Celular y Molecular

INGENIERÍA GENÉTICA

Clave:BC123

Créditos: 7

Manual de prácticas de laboratorio

Profesor:

Dra. Anne Santerre

Elaborado por:

Dra. Anne Santerre

Biol. Eneida Araceli López Arias

Asesores:

Dra. Luz Patricia Castro Felix

Dra. Josefina Casas Solís



ÍNDICE DEL MANUAL

1. Índice.....	3
2. Lista de Abreviaturas.....	4
3. Presentación.....	6
4. Reglamento del Laboratorio de Docencia.....	7
5. Introducción al Laboratorio.....	8
Medidas de seguridad.	
Lavado de cristalería de laboratorio.	
Conocimientos de reactivos, equipos y herramientas del Laboratorio.	
6. Análisis cualitativo y cuantitativo del ADN por electroforesis y espectrofotometría (Ejercicio de introducción).....	12
7. Práctica No. 1	
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su aplicación en el marcador molecular Espaciador intergénico transcrito (ITS).....	19
8. Práctica No 2	
Digestión y transferencia del ADN del bacteriófago lambda.....	27
9. Práctica No. 3	
Transformación Bacteriana.....	38
10. Práctica No. 4	
Obtención de plásmidos (Minipreparación).....	49
11. Práctica No.5	
Digestión de plásmidos y mapa de restricción.....	54
12. Programa de la materia de Ingeniería Genética.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNpol	Ácido ribonucleico polimerasa
BSA	Albúmina de suero de bovino
C	Citosina
CaCl ₂	Cloruro de calcio
C:I	Cloroformo: alcohol isoamílico
CTAB	Bromuro de cetil trimetil amonio
°C	Grados centígrados
cm ²	Centímetro cuadrado
cm ³	Centímetro cúbico
dNTPs	Desoxirribonucleotídos tri-fosfatos
dATP	2'desoxiadenosina 5'-tri-fosfato
dCTP	2'desoxicitocina 5'-tri-fosfato
dGTP	2'desoxiguanina 5'-tri-fosfato
dTTP	2'desoxitimidina 5'-tri-fosfato
EDTA	Ácido etilediamino tetra acético
G	Guanina
g	Gramo
GFP	Proteína verde fluorescente
Fig	Figura
F C I	Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico
H	Hidrógeno
H ₂ O	Agua
h	Horas
ITS	Espaciadores intergénicos transcritos
Kb	Kilobases
Kpb	Kilopares de bases
M	Molar
mg	Miligramos
Mg	Magnesio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitros
μL	Micro litro
mM	Mili molar
μM	Micro molar
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nano molar
ng	Nano gramo
nt	Nucleótido
OGM	Organismos genéticamente modificados

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Logaritmo negativo de la concentración de hidrogeniones
RAPDs	Amplificación al azar del ADN polimorfico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcriptasa inversa-PCR
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
ST	Cloruro de sodio; Tris; EDTA
STE	Cloruro de sodio; Tris. HCL; EDTA
<i>Taq</i> pol	ADN polimerasa
TBE	Tris; ácido bórico; EDTA
TE	Tris; EDTA
Trp	Triptófano
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Tris-HCL	Tris-ácido clorhídrico
U	Unidad
UV	Ultravioleta
V	Volts

PRESENTACIÓN

En los últimos 50 años hemos sido testigos del descubrimiento que es considerado el más revolucionario y fundamental de toda la Biología, "la estructura tridimensional del ADN". En 1953, con la descripción de la molécula del ADN, por Watson y Crick, nace la Biología Molecular y las técnicas de Ingeniería Genética que han permitido el avance en el conocimiento de la organización y la regulación de los genes en los cromosomas (Balbás, 2002).

Las técnicas del ADN recombinante y clonación de genes son, sin duda las herramientas más poderosas jamás creadas en el campo de la Biología; es por ello que los estudiantes en ciencias biológicas deben conocerlas y adentrarse en el manejo de las mismas.

El presente manual pretende abordar una serie de 6 prácticas, con el propósito de reforzar el conocimiento teórico generado en las aulas. Está basado en recopilaciones bibliográficas y diseñado de manera muy cuidadosa, acompañado de imágenes que le permitan al estudiante una mejor comprensión de las técnicas de la Ingeniería Genética. Los alumnos podrán además, despertar su interés por la investigación básica y aplicada desarrollando conceptos y hechos importantes e incrementar así su competencia en este campo en constante desarrollo. Para la realización de las prácticas de Ingeniería Genética el alumno deberá tener el conocimiento previo adquirido en las prácticas de Biología Molecular.

Como cualquier trabajo documental y de recopilación este manual no esta exento de errores y omisiones, por lo que estará en constante actualización y enriquecimiento, tal labor corresponde no sólo a los elaboradores de este manual, sino también a los profesores y a los estudiantes de la materia, (a través de la aportación de ideas nuevas e interesantes). Esperamos que este trabajo sea de interés y sobre todo de mucha utilidad a la comunidad universitaria del CUCBA.

BIBLIOGRAFÍA.

Balbás. 2002, De la Biología Molecular a la Biotecnología, Primera Edición, Editorial Trillas, D. F., México

REGLAMENTO DEL LABORATORIO.

ES IMPORTANTE RESPETAR LAS SIGUIENTES REGLAS DENTRO DEL LABORATORIO.

1. Leer su manual antes de ingresar al laboratorio. **"OBLIGATORIO"**.
2. Usar bata de manga larga.
3. No introducir alimentos ni consumirlos en el laboratorio.
4. Prohibido fumar en el laboratorio.
5. Prohibido arrojar materiales sólidos en las tarjas (papel, algodón, hojas de plantas o cubre objetos).
6. Leer y aplicar las precauciones de uso de cada reactivo que utilice (en especial el bromuro de etidio).
7. Leer y respetar las instrucciones de manejo de equipos y materiales.
8. Usar guantes, lentes, cubre bocas y en caso necesario campana de extracción.
9. Solo se permite el manual o cuaderno de notas sobre la mesa de trabajo, evitar colocar ropa, libros o bolsas.
10. Si es necesario abandonar el laboratorio solicitar permiso al profesor, de no hacerlo así, el alumno tendrá falta en la práctica.
11. Respetar el volumen especificado en las micropipetas.
12. Asegurarse de que llaves de gas, agua y aire queden perfectamente cerradas antes de salir de laboratorio.
13. Es responsabilidad de cada equipo de trabajo limpiar (con agua y jabón, si se requiere) y desinfectar (con alcohol) su área de trabajo antes de iniciar la práctica y al final de la misma. Es necesario lavarse las manos antes de dejar el laboratorio.
14. Todo el material de cristalería que se rompa, deberá ser reemplazado por el equipo de trabajo o el alumno responsable, así como cualquier tipo de material faltante al término de la práctica.

NOTA: El profesor tiene la atribución de suspender la práctica cuando así lo considere.

“INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO DE INGENIERÍA GENÉTICA”

Las técnicas moleculares involucran el uso rutinario de una variedad de equipos, herramientas y accesorios científicos, aunque son relativamente sencillos de manejar, su uso apropiado requiere de considerar algunas medidas de precaución.

Además, varios de los reactivos que se manipulan durante las prácticas son potencialmente peligrosos por lo que es necesario conocer la naturaleza de los productos utilizados y por supuesto es imprescindible respetar las medidas de seguridad, como el uso de bata, guantes, lentes, cubre boca y campana de extracción de humos.

I. MEDIDAS DE SEGURIDAD

Es importante prestar atención a las siguientes medidas de seguridad, ya que permiten el éxito del trabajo en el laboratorio.

- 1) Utilizar bata de algodón (uso personal, **OBLIGATORIO**), guantes desechables, lentes de protección ultra violeta (UV) y campana de extracción de vapores (cuando prepare reactivos volátiles y/o tóxicos).
- 2) Utilizar siempre un bulbo o pipetor para obtener los volúmenes precisos de las soluciones. **NO** pipetear con la boca: es peligroso.
- 3) Preparar y acomodar sobre la mesa de trabajo solo el material y reactivos necesarios para un experimento.
- 4) Debido al uso de reactivos y equipos peligrosos en las prácticas de Ingeniería Genética es necesario conocer las reglas de uso de los siguientes reactivos químicos y equipo:
 - a. **Bromuro de Etidio:** Es una sustancia mutagénica y posiblemente carcinogénica (se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN) por lo que se debe de manejar con mucha precaución, usar guantes y no contaminar el espacio y utensilios de trabajo. La tinción con bromuro de etidio es el método más rápido, sencillo y sensible para teñir el ADN, gracias a sus propiedades fluorescentes y de unión al ADN.
 - b. **Fenol:** El fenol es una sustancia muy corrosiva que puede causar quemaduras muy severas. Es necesario usar guantes, bata y lentes de protección para manipularlo además de una campana de extracción. En caso de contacto enjuagar con abundante agua y después lavar con jabón y agua.

- c. **Transiluminador:** El transiluminador emite radiaciones ultravioletas (302 nm) las cuales son peligrosas en particular para la retina de los ojos. **NUNCA** mire directamente hacia la fuente de luz UV sin protección. Para minimizar la exposición es indispensable utilizar lentes protectores (tipo UV), careta, bata y guantes para cubrir toda la piel. Además el transiluminador podría estar contaminado con bromuro de etidio así que es necesario manejarlo con precaución.

II. LAVADO DE MATERIAL DE LABORATORIO.

Para la limpieza del material utilizado en la práctica:

- a. Enjuagar con agua de la llave el material sucio (usar guantes de hule).
- b. Preparar un litro de una solución de Extran al 5% (detergente).
- c. Lavar cada una de las piezas con esponja y escobillón.
- d. Enjuagar con abundante agua corriente.
- e. Enjuagar con agua destilada 2 veces.
- f. Enjuagar con agua desionizada.
- g. Dejar el material en el escurridor.
- h. Secar el material de vidrio y de acero en un horno de secado (50°C).
- i. Reservar el material que necesita esterilización en autoclave.

III. CONOCIMIENTO DE EQUIPOS Y HERRAMIENTAS DEL LABORATORIO.

Balanza de precisión: La balanza de precisión permite pesar pequeñas cantidades definidas de reactivo (entre 1 mg y 1 g).

Baño María: El baño maría permite mantener los reactivos o tubos de reacción a una temperatura constante establecida, por ejemplo se trabaja típicamente a 37°C con endonucleasa de restricción y a 50°C y 65°C para la lisis celular durante la extracción de ADN plasmídico.

Cámara de electroforesis horizontal y fuente de poder: La cámara de electroforesis permite establecer una corriente eléctrica entre los dos extremos del gel de electroforesis, permitiendo así el desplazamiento de las moléculas de estudio. La fuente de poder permite alimentar a la cámara de electroforesis con una corriente constante.

Espectrofotómetro UV-visible y celdas de cuarzo: La luz ultravioleta se utiliza para determinar la cantidad del ADN extraído así como para evaluar su pureza (lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm respectivamente). Para medir longitudes de onda en el rango del ultravioleta se necesita de una luz especial emitida por una lámpara de deuterio ya que la lámpara visible (de tungsteno) no produce suficiente energía en esta región del espectro electromagnético para permitir mediciones correctas. Para determinar las concentraciones de ácidos

nucleicos en solución es necesario trabajar en el rango del UV. Las longitudes de onda cortas que se deben de utilizar para estudiar el ADN son absorbidas por el plástico o el vidrio. Como consecuencia se utilizaran celdas de cuarzo cuyo precio es elevado por lo que es importante manipularlas con mucho cuidado, al igual que el espectrofotómetro.

Microcentrifuga: La centrifuga es un equipo a través del cual se aprovecha la fuerza centrífuga para separar líquidos de distintas densidades, o las sustancias sólidas de un líquido en que están suspendidas. Por lo que constituye un método sistemático de separación de grandes partículas de una solución o suspensión. Como lo indica su nombre, las microcentrífugas fueron diseñadas para centrifugar cantidades pequeñas de muestras (menos de 2 mL) colocadas en tubos especiales (microtubos) resistentes a altas velocidades (hasta 14,000 rpm).

Micropipetas: Una micropipeta es esencialmente una bomba de alta precisión unida a una punta desechable. El volumen de aire disponible en el barril se ajusta girando el botón más adentro o afuera del pistón y el volumen disponible se visualiza en una graduación. Al apretar el botón (hasta el primer tope) se desplaza el volumen específico de aire del pistón y al liberar el botón se crea un vacío, el cual desplaza un volumen equivalente de solución. El volumen extraído se expulsa apretando otra vez el botón (hasta el segundo tope).

Las micropipetas permiten pipetear volúmenes pequeños con alta precisión. Existen varios tipos de micropipetas (volumen fijo o variable) con diferentes rangos de capacidades (de 0.2-5 μL , 0.5-10 μL , 2-20 μL , 5-40 μL , 10-100 μL , 20-200 μL , 40-200 μL , 100-1000 μL). Es muy importante conocer el uso y manejo adecuado ya sea para un pipeteo correcto o para evitar daños en el mecanismo de las mismas.

Platina con termostato y agitador magnético: Esta herramienta ayuda en la preparación de soluciones calentándolas con acción de una resistencia eléctrica y agitándolas con la fuerza de centrifugación con una barra magnética.

Transiluminador: El transiluminador emite radiaciones ultravioletas a 302 nm, que atraviesan el gel y permiten la visualización del ADN teñido con bromuro de etidio observando bandas fluorescentes debido a las propiedades del reactivo unido al ADN.

Termociclador: Este equipo permite la amplificación *in vitro* del ADN. Básicamente se trata de una placa en la cual se colocan los microtubos y que el equipo calienta o enfría repetidamente a las temperaturas deseadas durante un tiempo definido.

Vortex: Este aparato permite agitar soluciones contenidas en un tubo de ensayo o microtubo de forma variable.

NOTA

HACER UN REPORTE DE LA LECTURA REFERENTE AL BUEN USO DE LAS MICROPIPETAS Y LA CENTRIFUGA.

BIBLIOGRAFÍA

Bloom M.V., Freyer G.A., Micklos D.A.,1996. Laboratory DNA Science: An Introduction to Recombinant DNA Techniques and Methods of Genome Analysis. Editorial The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California, USA.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY, USA.

ANÁLISIS CUANTITATIVO Y CUALITATIVO DE ADN EJERCICIO DE INTRODUCCIÓN

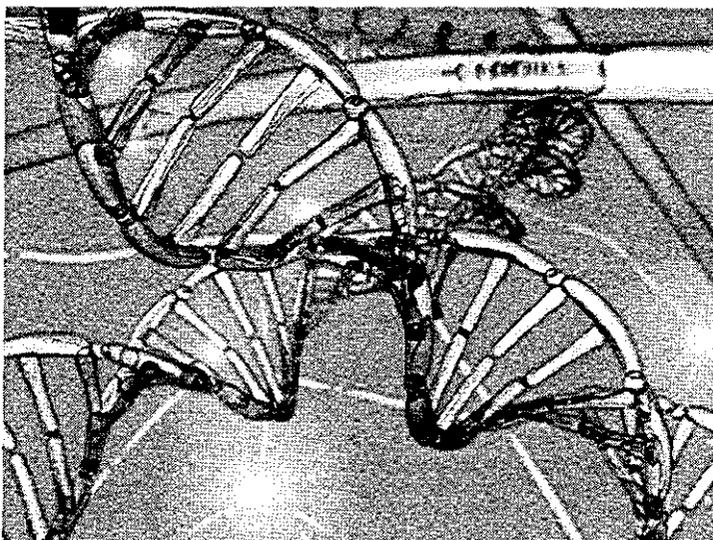


Fig. 1: ADN (Tomado de nanopedia.case.edu/NWPPage.php?page=dna).

INTRODUCCIÓN

La obtención de cantidades suficientes de ADN de calidad y pureza es imprescindible para el éxito de las subsecuentes técnicas moleculares que se apliquen a la muestra de interés; por lo tanto después de extraer el ADN se determina su concentración y calidad, así como la posible presencia de proteínas coextraídas y sales.

Son utilizados dos métodos para el análisis cuantitativo y cualitativo de ácido nucleico en solución: espectrofotometría y electroforesis.

Si la muestra de ADN es pura (NO contaminada por proteínas, fenol, u otros componentes) la determinación espectrofotométrica de la cantidad de radiación ultravioleta absorbida por las bases nitrogenadas a 260/280nm es un método simple y confiable para su cuantificación. La electroforesis en geles de agarosa permite visualizar indirectamente la muestra de ADN gracias al bromuro de etidio; determina además de la cantidad de ADN su calidad

Una vez realizado el análisis cualitativo y cuantitativo de la muestra se puede proceder a la dilución del ADN de interés a la concentración apropiada para la técnica que se pretende aplicar a la muestra (Ejemplo: 50 ng/ μ L en caso de PCR, ver práctica uno).

OBJETIVO GENERAL

Análisis cuantitativo y cualitativo de una preparación de ADN.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Recordar y ejercitar el análisis cuantitativo y cualitativo de una muestra de ADN.
2. Preparar una dilución de ADN a una concentración de 50 ng/ μ L.

METODOLOGÍA

I. DETERMINACIÓN ESPECTOFOTOMÉTRICA DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN EN SOLUCIÓN

(Adaptado de Sambrook *et al.*, 1989. Udowle *et al.*, 2000)

Para cuantificar una solución de ADN las lecturas deben de realizarse a las longitudes de onda de 260 y 280 nm. Las lecturas a 260 nm permiten calcular la concentración de ácido nucleico en la muestra, una Absorbancia (A) de 1 corresponde a 50 μ g/mL ó 50 ng/ μ L (A_{260}/A_{280}) de ADN de doble cadena. La razón entre A_{260} y A_{280} provee una estimación de la pureza de la preparación de ácido nucleico. Una preparación pura de ADN da una razón de 1.8 a 2.0, de manera que si existe contaminación con carbohidratos, proteínas, péptidos, fenoles o compuestos aromáticos, la razón será significativamente mas baja o alta por lo que el valor óptimo y la cuantificación de la preparación de ADN no será exacta.

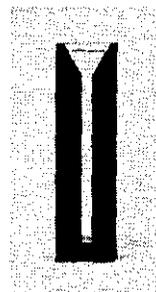


Fig. 2: Espectrofotómetro y celda de cuarzo (fotografía tomada del laboratorio de Biomarcadores y Genética Molecular DBCM).

EJERCICIO

Se elaboró una dilución de muestras de ADN: para cada muestra se utilizaron 990 μL de H_2O desionizada estéril y se agregaron 10 μL de ADN (factor de dilución: 1/100)

Se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm (ver tabla 1).

1. Calcular la concentración final del ADN de las muestras en $\text{ng}/\mu\text{L}$ a partir de las lecturas obtenidas (A_{260}). No olvide tomar en cuenta el factor de dilución. Ejemplo:

$$A_{260} = 0.075$$

$$\text{Concentración} = 0.075 \times 50 \times 100 = 375 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

2. Evaluar la pureza del ADN a partir de la relación A_{260}/A_{280} . Ejemplo:

$$A_{260} = 0.075$$

$$A_{280} = 0.045$$

$$\text{Pureza} = A_{260}/A_{280} = 0.075/0.045 = 1.66$$

3. Estimar la calidad de las preparaciones de ADN.

Tabla 1: Resultados de la A. a 260 y 280 nm de las muestras de ADN

MUESTRA	A_{260}	A_{280}	RELACIÓN A_{260} / A_{280}	CONCENTRACIÓN DE ADN EN LA MUESTRA	OBSERVACIÓN
1	0.250	0.125			Calidad Óptima
2	0.250	0.140			
3	0.250	0.160			
4	0.250	0.180			
5	0.250	0.200			

II. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL ADN POR ELECTROFORESIS

(Adaptado de Bloom et al., 1996)

La electroforesis permite la separación de moléculas cargadas en un campo eléctrico de acuerdo a su peso molecular y su longitud de tal manera que la movilidad electroforética de un fragmento de ADN es inversamente proporcional al logaritmo del número de pares de bases que contenga.

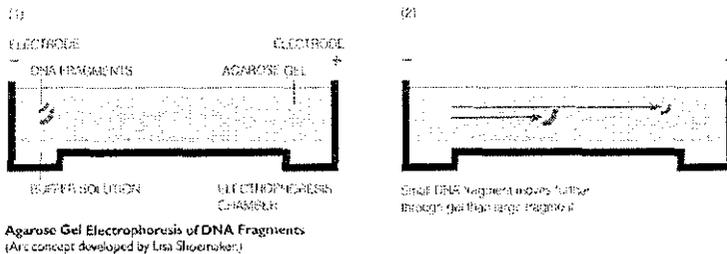


Fig. 3: Corrimiento en gel de agarosa (Tomado de Bloom et al., 1996)

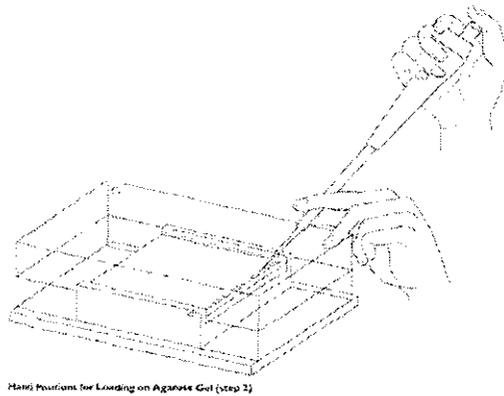
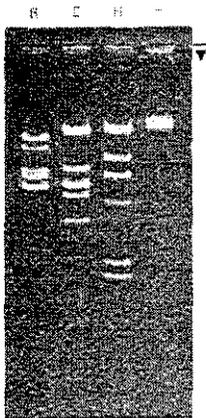


Fig. 4: Como cargar un gel (Tomado de Bloom *et al.*, 1996)

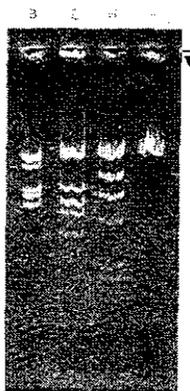
Ejercicio.

1. Se preparó un gel de agarosa al 1% en TBE 1X.
2. Se realizó el corrimiento electroforético a 90 V por 2 h. y la tinción con bromuro de etidio.
3. Se visualizó el gel bajo luz UV obteniéndose los diferentes resultados:



Ideal Gel

Fig. 5a



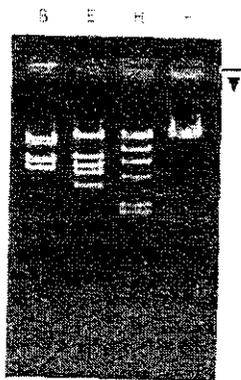
Poorly Formed Wells
Wavy bands in all lanes; bands narrowed before gel was completely set.

Fig. 5b



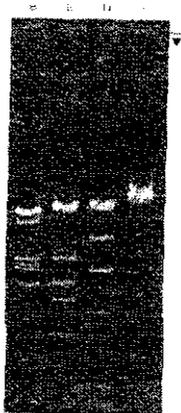
Punctured Wells
Bands faint in lanes B and H; DNA lost through hole punched in bottom of well with pipet tip.

Fig. 5c



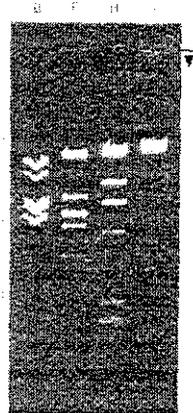
Short Run
Bands compressed; short time electrophoresing.

Fig. 5d



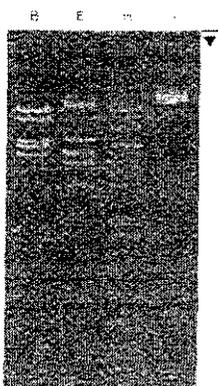
Long Run
Bands spread; long time elec-
trophoresing.

Fig. 5e



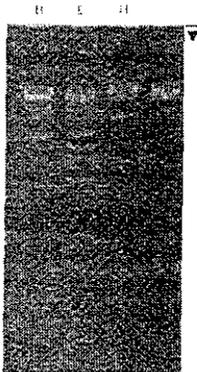
Bubble in Lane
Bump in band in lane B; bubble in lane.

Fig. 5f



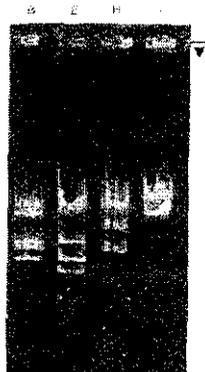
Enzymes Mixed
Extra bands in Lane H; BamHI and
HindIII mixed as digest.

Fig. 5g



Incomplete Digest
Bands faint in lane H; very late in
digest. Also, extra bands are present in
lanes B and E.

Fig. 5h



Gel Made with Water
Bands smeared in all lanes; gel made
with water or wrong concentration of
TBE buffer.

Fig. 5i

Fig. 5: Diferentes corrimientos en geles de agarosa (Tomado de Bloom et al., 1996)

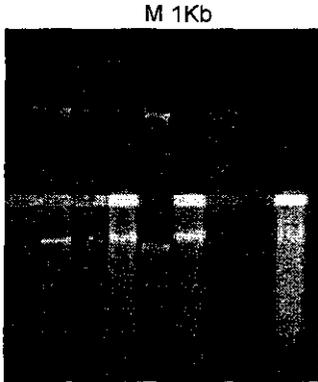


Fig. 6:

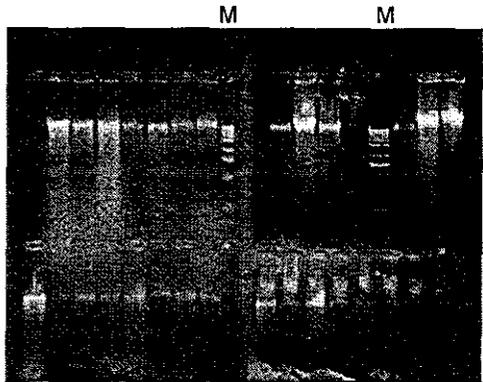


Fig. 7:

M

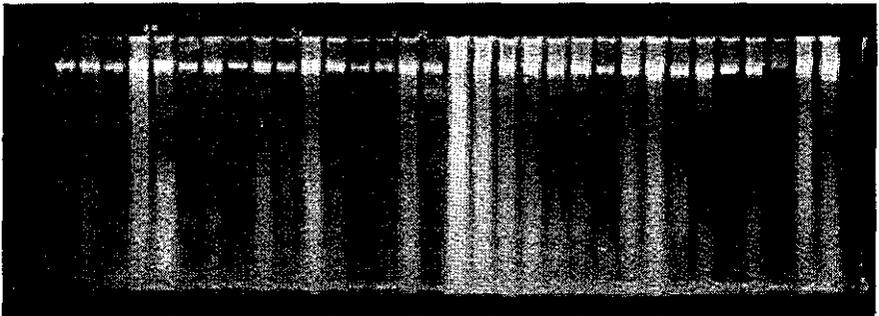


Fig. 8:

Fig. 6,7,8 Experimentos reales de extracción de ADN genómico (Fotografías tomadas de clases anteriores)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis cuantitativo y cualitativo

Discutir sobre la utilidad de ambas técnicas: espectrofotometría y electroforesis, para el análisis cualitativo y cuantitativo del ADN.

Dilución del ADN

Como haría para ajustar la concentración del material obtenido a $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ y para preparar $100 \mu\text{L}$ para una posible reacción de PCR (tabla 1)

Realizar también lo siguiente:

- Completar y comentar la tabla 1
- Comentar las fotografías anteriores (5ª a 5ª)
- Comentar las fotografías (6 a 8).

BIBLIOGRAFÍA

Bloom M.V., Freyer G.A., y Micklos D.A. 1996. Laboratory DNA Science: Introduction to Recombinant DNA Techniques and Methods of Genome Analysis, Editorial the Benjamin/Cumming Publishing Company, USA.

Budowle B., Smith J., Morety T., DiZinn J. 2000. DNA typing protocols: Molecular Biology and forensic analysis. Bio Techniques Books., USA.

Hillis D.M., Larson A., Davis S.K., Zimmer E.A. 1996. Nucleic Acids III: Sequencing, en Hillis D.M. y Moritz (Eds) Molecular Systematics. Sinauer Associates, Sunderland, Mass, USA.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY, USA.

Villalobos A. et al. 2003. Manual de Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

PRÁCTICA 1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

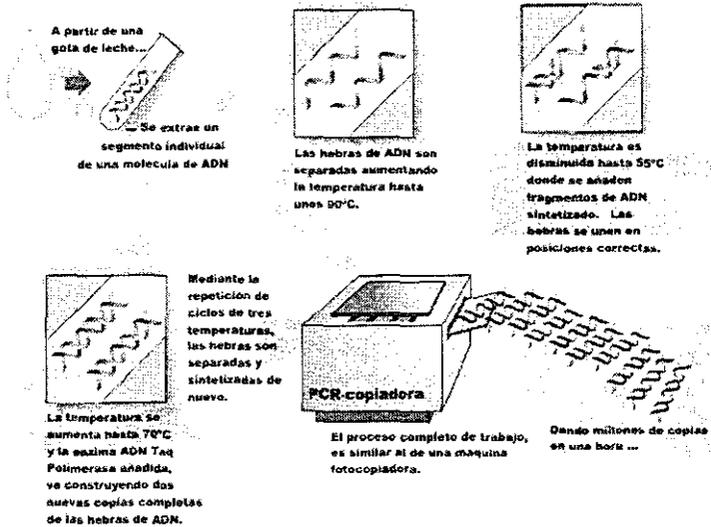


Fig. 1: La PCR permite replicar *in vitro* un segmento de ADN (Tomado de www.santafe.gov.ar/...laboratorio/pcr.htm).

INTRODUCCIÓN

Para el estudio de la función y la estructura génica es necesario contar con importantes cantidades del ADN de interés (ADN blanco). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction), permite la replicación *in vitro* de secuencias específicas de ácidos nucleicos, mediante ciclos repetidos de síntesis dirigida por cebadores (Fig. 1). Por lo tanto se le considera hoy en día una herramienta imprescindible en los laboratorios de Biología Molecular e Ingeniería Genética (Lunque y Herráez, 2001; Suzuki et al., 2000). La PCR, descrita en 1983 (Mullis), es una metodología resultante de la aplicación práctica de tres conceptos básicos de la Biología Molecular (Innis et al., 1990).

Teóricamente por PCR y con el uso de cebadores específicos es posible replicar segmentos de ácidos nucleicos, presentes en mezclas de ADN de muy diversas fuentes, sin la necesidad de purificación previa de la muestra íntegra y original de material genético, lo que se puede partir de homogenados, extractos crudos de tejidos, sangre completa, mezcla de fragmentos de ADN obtenidos con enzimas de restricción, muestra resultantes de procesos de extracción y

aislamiento de ADN. La amplificación de un gen o un fragmento de ADN puede ser directa a partir de la molécula de ADN (PCR clásica), ó indirecta a partir de ARN, mediante la técnica de retro transcripción acoplada a la PCR (RT-PCR, por sus siglas en Retrotranscriptase-Polymerase Chain reaction).

En la presente práctica amplificaremos un fragmento de ADN presente en la región del genoma nuclear que contiene los genes del ARN ribosomal (ARNr) llamada región espaciadora transcrita (ITS por sus siglas en inglés: Internal Transcribed Spacer), para los cuales existen varios cebadores.

Pasos de una PCR

- **Desnaturalización:** El ADN molde de doble hebra es desnaturalizado por calor para formar hebras sencillas, aplicando una temperatura por encima de su punto de fusión (típicamente 94°C por un min.). La etapa de desnaturalización de la PCR es similar a la etapa de iniciación de la replicación *in vivo*.
- **Hibridación o alineación:** Se reduce la temperatura lo suficiente (entre 30 y 65°C por un min.), aproximadamente; para que ocurra la hibridación específica por complementariedad de bases entre los cebadores y el ADN molde (Fig. 2) la temperatura óptima depende de la secuencia nucleotídica del cebador. La disminución de la temperatura permite la asociación de las cadenas sencillas de ADN, con el cebador de interés. El uso de altas concentraciones de cebadores favorece la unión cebador-ADN blanco transcurra con mayor eficiencia que el re-alineamiento de las hebras de ADN molde. La etapa de hibridación de la PCR *in vitro* corresponde *in vivo* al evento de síntesis de ARN cebador para la cadena retrasada y los fragmentos de Okasaki durante la replicación, proporcionando así los extremos 3'OH libre para la unión de la polimerasa.
- **Replicación o elongación:** La ADN polimerasa sintetiza nuevas cadenas de ADN a partir de cada cebador unido a su secuencia diana. En esta etapa la temperatura se eleva a 72°C (por 30 segundos a 1 min.) para favorecer la actividad catalítica de la *Taq-pol* (ADN polimerasa obtenida de la bacteria termo-resistente *Thermus aquaticus*). La síntesis comienza a partir de los extremos 3'OH de cada cebador hasta al extremo del molde o hasta que la reacción se detenga mediante un aumento de la temperatura (94°C) por segunda vez (nuevo ciclo). En su última etapa la PCR corresponde a la fase de elongación de la replicación *in vivo*.

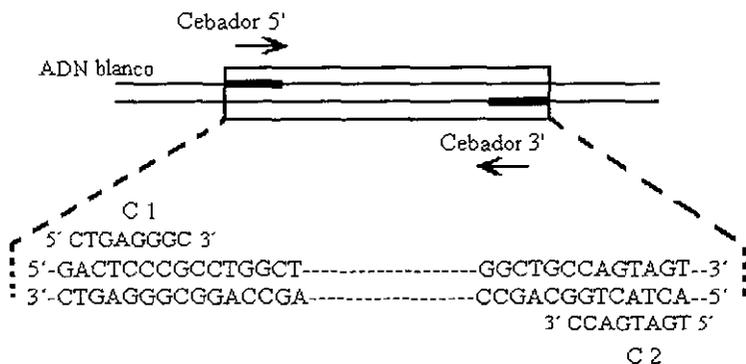


Fig. 2: ADN blanco amplificado por PCR y secuencias oligonucleotídicas de los cebadores. La secuencia de interés o diana se encuentra delimitada por los sitios de unión de los cebadores (C1= cebador 1 y C2 =cebador 2).

Mediante la aplicación en forma cíclica de las tres etapas de la PCR (Fig. 3), generalmente entre 20 y 50 ciclos, se obtienen múltiples copias del fragmento de ácidos nucleicos de interés en un corto espacio de tiempo (3-5 hrs, dependiendo del número de ciclos). El termociclador es el equipo que permite realizar de manera automática y programable las etapas del proceso de amplificación.

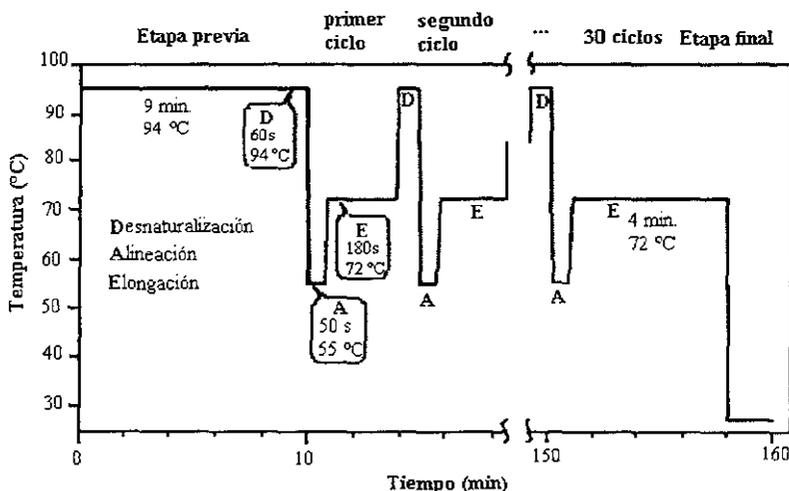


Fig. 3: Representación de la amplificación por PCR (Adaptado de Lunque y Herráez, 2001).

Tabla1 Rango de concentraciones de los reactivos utilizados en una reacción de PCR

Reactivo	Concentración
ADN molde	10-100 ng
Amortiguador de reacción 10X ¹	1/10 del volumen final (10x concentrado)
Mg ⁺⁺ cofactor de la <i>Taq</i> pol, en forma de MgCl ₂	0.5-5 µM
dNTPs	20-200 µM de cada uno de los dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Cebador 5'	0.1-0.5 µM
Cebador 3'	0.1-0.5 µM
<i>Taq</i> polimerasa	0.5-2.5 unidades
Agua grado B.M. (Milli Q)	Para ajustar el volumen final.
Volumen final	25- 50 µL

¹ optimizado por el fabricante según las características de la ADN polimerasa.

MARCADOR MOLECULAR ITS

El marcador ITS se basa en el análisis de una región de los genes que codifican (ARNr). Estos genes se encuentran presentes en copias múltiples a lo largo del genoma (cada uno de 8 a 12 kb de largo).

Tres de los genes que codifican para ARNr en eucariontes son organizados en "Clusters" que incluyen el gen de la sub-unidad ribosomal pequeña (16 a 18S), un gen de la sub-unidad ribosomal grande (26 a 28 S) y el gen 5.8 S. Además dos regiones espaciadoras transcritas (ITS-1 y ITS-2) se encuentran entre estos genes. Se encuentra también una región denominada espaciador externo transcrito (ETS por sus siglas en ingles: External Transcribed Spacer) al extremo 5' del transcrito de ARN.

La región ITS es probablemente una de las regiones más secuenciadas para estudios filogenéticos (por ejemplo para identificar variedades geográficas), es una herramienta muy útil en sistemática molecular a nivel de especie y también intra-específico gracias a su alto nivel de variabilidad en comparación con otras regiones del genoma.

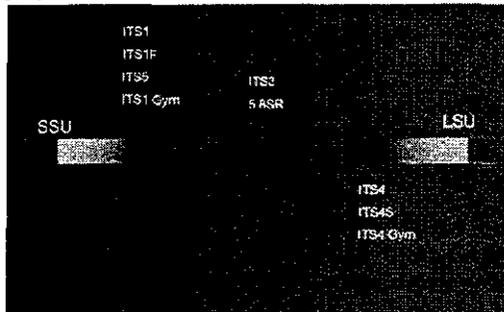


Fig. 4: Región ITS de los genes ribosomales (Tomado de Hillis, 1996)

Numerosos cebadores de secuencia conservada han sido diseñados para la amplificación y la secuenciación de esta región y que abarcan las diferentes secciones del cluster de los genes ribosomales (Fig. 4).

Estos seis componentes forman un cluster que se repite en tándem a lo largo del genoma (hasta 100 o 1000 veces). Cada cluster es separado del siguiente por una región espaciadora que no se transcribe (NTS por sus siglas en inglés Non-Transcribed Spacer). Los 6 componentes presentan diferentes ritmos de evolución, por lo que su análisis permite estudiar un amplio manejo evolutivo de las muestras de interés (Hillis et al., 1996; Valadez y Kahl., 2000).

En la presente práctica se proporcionará una muestra de ADN (50 ng/μL) y se proseguirá a su amplificación por PCR. Se utilizarán los cebadores ITS-1 (forward) e ITS-4 (reverse) (Fig. 4).

OBJETIVO GENERAL

Amplificar la región ITS completa de los genes ribosomales de una muestra de ADN.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar y conocer los componentes de reacción de PCR.
2. Ensayar una reacción de PCR-ITS.
3. Analizar los productos de la PCR por electroforesis en geles de agarosa.

METODOLOGÍA

REACTIVOS	MATERIAL, EQUIPO Y ACCESORIOS
Taq pol 5 unidades/μL	Microcentrífuga
Amortiguador (10x)	Tubos nuevos de 0.2 ml. para PCR
Cebador(es) (10 μM) (c/u) ITS-1(F), ITS-4 (R)	Gradilla
Aceite mineral	Micropipetas y puntas
dNTPs (10 mM)	Termociclador
MgCl ₂ (50 mM)	Equipo electroforético
Agua estéril (MilliQ)	Marcadores permanentes.
ADN molde (50 ng/μL)	

NOTA:

Es importante evitar cualquier contaminación por lo que es necesario utilizar una sola punta para cada muestra de ADN, otra punta para pipetear la "mezcla de reacción" y otra más para la "mezcla Taq-cebador", sin tocar la gota de ADN. Si se sospecha de contaminación de la punta se debe cambiar. Es indispensable además tener los tubos cerrados cuando no se pipetea y abstenerse de hablar para evitar contaminaciones.

Reacción de PCR-ITS

1. Identificar, descongelar, mezclar y centrifugar (10,000 rpm por 1 minuto) los reactivos (Marca Invitrogen), incluyendo la muestra de ADN (diluida a una concentración de 50 ng/ μ L).
2. Rotular cuidadosamente los tubos para la PCR

3. Preparar la mezcla de Reacción:

Para una reacción de 20 μ L

Amortiguador 10X (minus $MgCl_2$)	2	μ L
$MgCl_2$, 50 mM	1	μ L
dNTPs, 10 mM	0.5	μ L
BSA, 2 μ g/ μ L (Albumina de suero bobino)	1	μ L
H_2O , MilliQ	11.5	μ L
	16	μ L

4. Cerrar el tubo, mezclar, dar un pulso de centrifugación.

5. Preparar la mezcla taq-cebadores:

Cebador ITS 1, 10 μ M	0.5	μ L
Cebador ITS 4, 10 μ M	0.5	μ L
Taq-polimerasa, 5 U/ μ L (a -20 °C)	0.1	μ L
H_2O , MilliQ	1.9	μ L
	3	μ L

NOTA: La Taq polimerasa se agrega hasta el último (sacarla y centrifugarla antes de usarla y volverla a guardar en el congelador de inmediato)

6. Cerrar el tubo, mezclar, dar un pulso de centrifugación.

7. Preparar la reacción de PCR:

Mezclar en cada tubo de PCR previamente rotulado:

ADN molde (depositar gota al fondo del tubo, sin tocar las paredes)	1	μ L
Mezcla de reacción (en la pared del tubo)	16	μ L
Mezcla Taq-cebador (en la pared del tubo, lado opuesto a gota anterior)	3	μ L
	Volumen total:	20 μ L

8. Cerrar el tubo, dar un pulso de centrifugación. Agregar una gota de aceite mineral (opcional). Colocar los tubos en la gradilla del termociclador programado con anterioridad (ver tabla 2)
9. Iniciar la reacción de PCR.

Tabla 2 Programación del termociclador (Marca M.J, Research, modelo PTC-100).
PROGRAMA "ITS" (Guzman Davalos *et al.*, 2003)

Paso del programa	Acción	Temperatura (°C)	Tiempo	Observación
1	Desnaturalización inicial	95	3 minutos	
2	Desnaturalización	95	1 minuto	
3	Alineación	52	45 segundos	
4	Elongación	72	2 minutos	
5	24 ciclos de los pasos 2,3,4			25 ciclos (etapas 2, 3 y 4)
6	Desnaturalización	95	1 minuto	
7	Alineación	52	45 segundos	Rampa de 5 segundos por ciclo
8	Elongación	72	2 minutos	
9	14 ciclos de los pasos 6,7,8			15 ciclos (etapas 6, 7 y 8)
10	Elongación prolongada	72	10 minutos	
11	Almacenamiento	15	Infinito	

Electroforesis

Al día siguiente correr las muestras amplificadas en gel de agarosa al 1.8 %, durante 2 horas a 80 V con marcador de 100 pb. Teñir con bromuro de etidio. Capturar los datos electroforéticos con un sistema de foto documentación (EDAS - Kodak).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Guía para reporte de práctica:

1. En base a la fotografía identificar el patrón de bandeo:
 - a). Identificar bandas.
 - b). Evaluar su tamaño (en pb) con ayuda del marcador de peso molecular de 100 pb, (Se miden las distancias de migración de la parte inferior del pozo de carga a la base de la banda de interés). (Ver fig. 4 de su práctica 2)
NOTA: no se reportara en gráfica.
2. Explicar porque se utilizó el corrimiento en un gel de agarosa al 1.8%
3. Completar la última columna de la tabla 3.
4. Describir dos ejemplos de la aplicabilidad de la presente práctica.

Tabla 3 Concentraciones finales de los componentes de la mezcla de reacción PCR

Componente	Concentración inicial	Cantidad aplicada en la reacción de PCR (20 μ L)	Concentración final en el tubo de PCR
DNA molde	50 ng/ μ L	1 μ L	completar
Amortiguador 10x	10 x	2 μ L	completar
MgCl ₂	50 mM	1 μ L	completar
dNTPs	10 mM	0.5 μ L	completar
TaqPol	5 unidades/ μ L	0.1 μ L	completar
Cebador (1 y2)	10 μ M	0.5 μ L	completar
BSA	2 μ g/ μ L	1 μ L	completar

BIBLIOGRAFÍA

Guzman Davalos L., Mueller G.M., Cifuentes J., Miller A.N., Santerre A. 2003. Traditional infrageneric classification of *Gymnopilus* is not supported by ribosomal DNA sequence data. *Mycologia* 95(6):1204-1214.

Hillis D.M., Larson A., Davis S.K., Zimmer E.A. 1996. Nucleic Acids III: Sequencing, en Hillis D.M. y Moritz (Eds) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass, USA.

Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. 1990. *PCR Protocols, a guide to methods and applications*, Academic Press.

Lunque J., Herráez A. 2001. *Biología Molecular e Ingeniería Genética*, Primera edición, Editorial Harcourt, Madrid, España.

Suzuki D.T., Griffiths A.J.F., Miller J.H., Lewontin, R.C. 2000. *Introducción al análisis genético*, cuarta Ed. Editorial Freeman, Nueva York, USA.

Valadez E., Kahl, G. 2000. *Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio)*. Mundi Prensa, Universidad Autónoma de Chapingo, D. F. México.

Villalobos A. et al. 2003. *Manual de Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular*, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

PRÁCTICA 2 DIGESTIÓN Y TRANSFERENCIA DEL ADN DEL BACTERIÓFAGO LAMBDA.

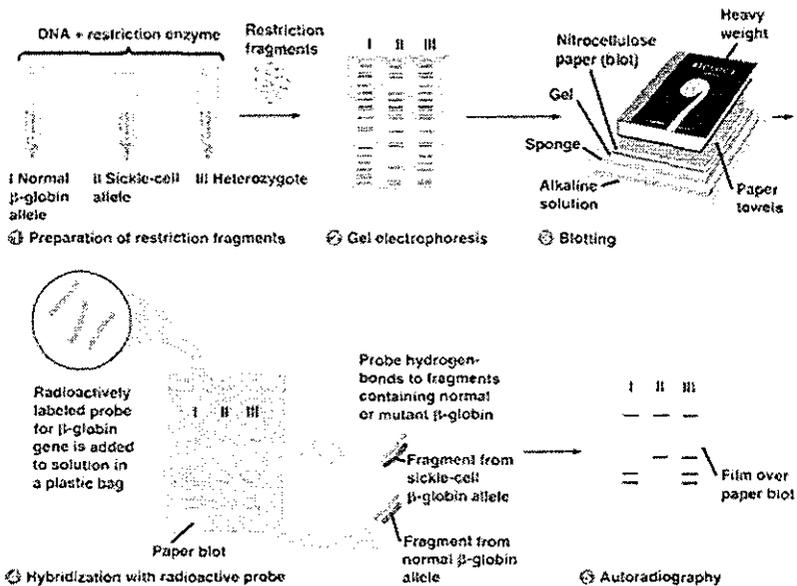


Fig. 1 Digestión y transferencia de ADN
(Tomado de fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/mol_gen.htm)

INTRODUCCIÓN

Las nucleasas celulares se clasifican en dos grupos: **exonucleasas** y **endonucleasas**. Entre las **endonucleasas** se reconocen tres familias, tipo I, tipo II y tipo III (de acuerdo a sus propiedades). Las tipo II son de particular interés para el área de la Ingeniería Genética, porque cortan específicamente el ADN de manera predecible y específica a modo de "tijeras moleculares" (Fig. 2).

Desde que las endonucleasas se descubrieron se hizo evidente que las bacterias pueden reconocer y eliminar el ADN foráneo sin destruir el ADN propio. El ADN propio a la cepa es protegido ("modificado") por metilación. Cada especie bacteriana posee una o varias endonucleasas que reconocen una secuencia nucleotídica específica (denominada sitio de restricción) a la que se unen para hidrolizar un enlace fosfodiéster del esqueleto azúcar-fosfato de la doble cadena del ADN. En general el sitio de restricción es una secuencia palindrómica, provocando la ruptura de la doble cadena del ADN entre dos nucleótidos específicos sobre cada una de las dos cadenas (Fig. 2). Cuando el sitio de corte esta cargado hacia una extremidad del sitio de restricción, los productos de un

evento de digestión son fragmentos que presentan extremos “cohesivos o pegajosos” los cuales son muy utilizados para la formación de ADN recombinante (el otro tipo de sitio es “romo”).

Varios cientos de endonucleasas de tipo II, llamadas también nucleasas de restricción, endonucleasas de restricción, enzimas restrictivas o restrictasas, han sido identificadas y están disponibles comercialmente con elevada especificidad, estabilidad y pureza. La importancia de estas enzimas radica en su gran especificidad de reconocimiento del sitio de restricción de 4, 6 o más nucleótidos, proporcionando fragmentos de ADN (denominados “fragmentos de restricción”) de diferentes tamaños. Entre mas corto es el sitio de restricción, más frecuentes serán los cortes y mas pequeños los fragmentos de restricción. Los fragmentos de ADN así obtenidos se pueden unir, utilizando ligasas de ADN. Por lo tanto, las enzimas de restricción y las ligasas permiten romper y reunir de nuevo los fragmentos de ADN de cualquier origen. Lo anterior es básico en las técnicas del ADN recombinante, en el análisis del ADN, en la elaboración de los mapas físicos de restricción, secuenciación del genoma y en el estudio de polimorfismos.

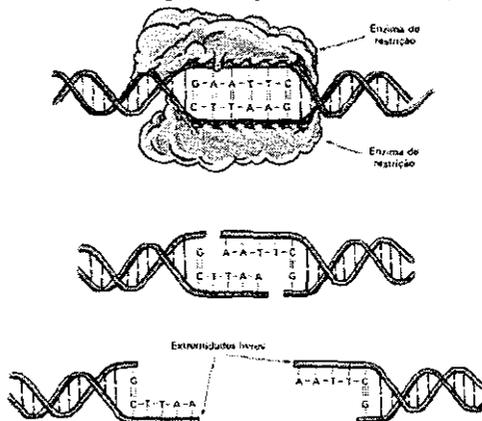


Fig. 2: Endonucleasa *EcoRI* cortando a manera de tijera molecular la molécula del ADN en el sitio de restricción 5'GAATTC3' (Tomado de www2.uah.es/.../cienciasvida/cv1.htm)

ADN del bacteriófago lambda λ .

El ADN obtenido del bacteriófago λ que se utilizará en esta práctica esta comercialmente disponible, al igual que las enzimas de restricción. Este virus es inocuo para el hombre por lo tanto es una excelente herramienta en el laboratorio de investigación como en el de docencia. El ADN λ esta constituido de aproximadamente 48,000 pb, en la Fig. 3 se muestra el mapa de restricción del ADN del fago λ que proporciona la endonucleasa de tipo II, *HindIII*.

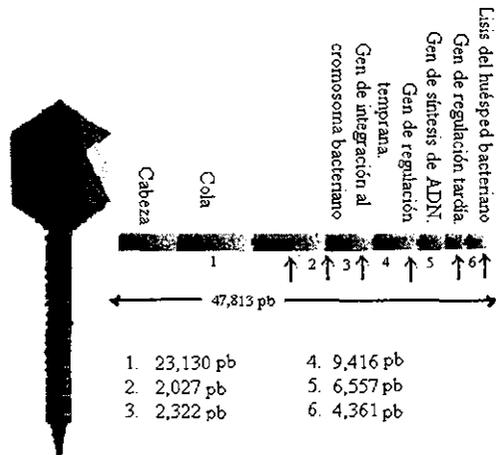


Fig. 3: Mapa de restricción para *Hind*III del fago λ . Las flechas indican los sitios de restricción de la enzima *Hind*III, entre las flechas se destacan los 6 fragmentos de ADN que proporciona *Hind*III. (Bio Rad laboratory, 2000)

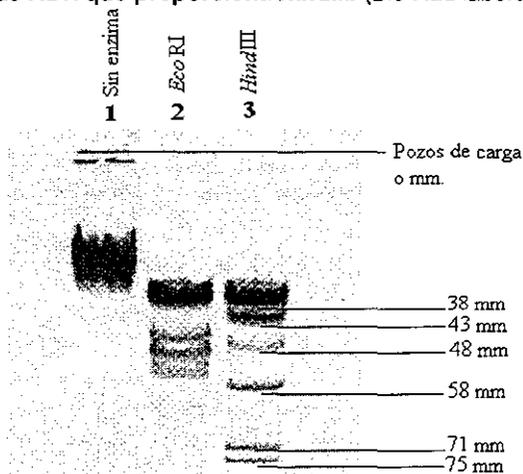


Fig. 4: Digestión del ADN del bacteriófago lambda con dos enzimas de restricción: (usar esta gráfica para la sección de resultados). Carril 1 control negativo (ADN λ sin cortar 48,000 pb), carril 2 ADN λ digerido con *Eco*RI (muestra problema) y carril 3 ADN λ digerido con *Hind*III (nuestra referencia y marcador de tamaño). Se miden las distancias de migración de la parte inferior del pozo de carga a la base de la banda de interés. (Bio Rad laboratory, 2000)

Tras la digestión del ADN por medio de las enzimas de restricción, los fragmentos resultantes se separan según su tamaño mediante electroforesis, sin embargo el gel de agarosa o poliacrilamida es muy frágil y poco durable, por lo que una vez terminada la electroforesis se prepara el gel para la transferencia de los fragmentos de restricción a una membrana donde conservaran su posición relativa. La técnica de transferencia permite pasar las macromoléculas (ADN, ARN o proteínas, separadas por electroforesis) a una membrana.

Existen dos tipos de transferencia: por capilaridad o aplicando corriente eléctrica la transferencia se lleva a cabo por capilaridad (Fig. 1 y 5) cuando el amortiguador (SSC 20 x) se desplaza del reservorio inferior hacia el gel y los papeles absorbentes. Los ácidos nucleicos son arrastrados del gel por el amortiguador y se quedan atrapados sobre la superficie inferior de la membrana. El peso sobre la pirámide asegura un buen contacto entre las capas de materiales utilizados, o con la ayuda de una corriente eléctrica constante (Fig. 6 y 7) el emparedado (papel filtro-gel-membrana-papel filtro) se mantiene firmemente en un cassette especial y se sumerge en una solución de transferencia. La aplicación de una corriente eléctrica constante (electrodo negativo al lado del gel, electrodo positivo al lado de la membrana), permite la transferencia de las macromoléculas en 1-3 horas. La técnica es muy eficaz con geles de agarosa y poliacrilamida (Sambrook et al., 1989) y conserva la posición relativa de las bandas donde se encuentran las moléculas de interés.

La detección del segmento de interés (ADN, ARN o proteína) se realiza por la técnica de autoradiografía con una sonda específica (Fig. 1)

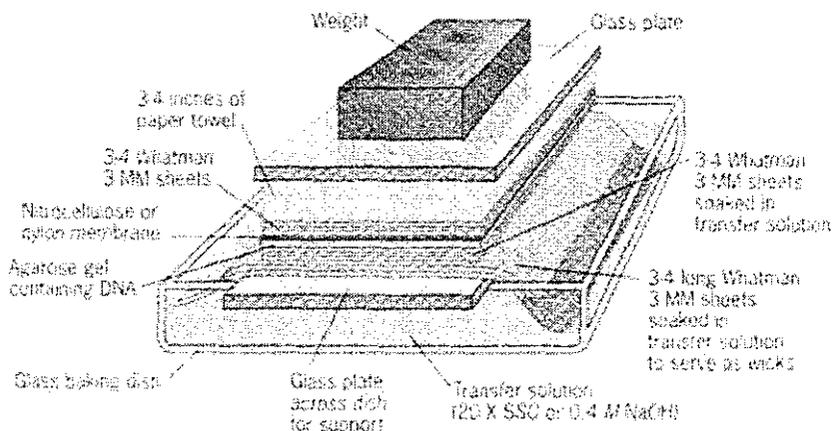


Fig. 5: Transferencia de ADN por capilaridad de un gel de agarosa a una membrana (Tomado de genetics.situ.edu.cn/genetics/9.05.htm)

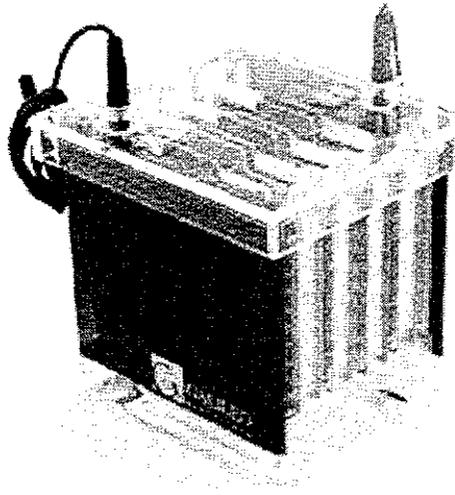


Fig. 6: Equipo para electrotransferencia de macromoléculas
(Tomado de www.galileobioscience.com/electroblotter_prod...)

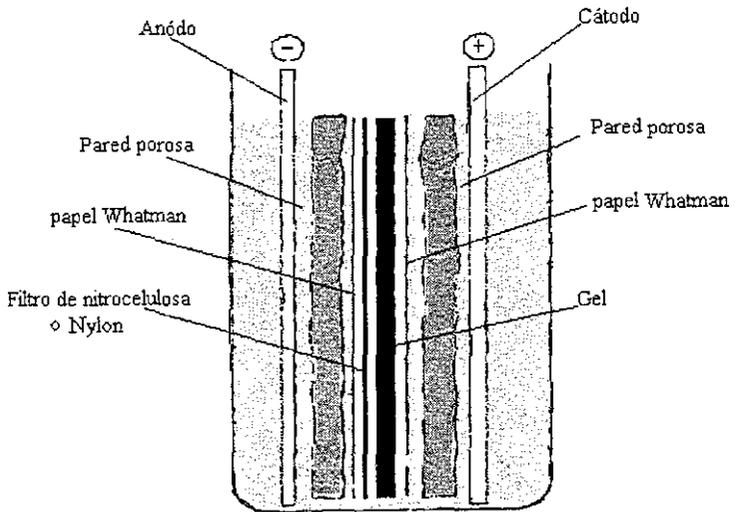


Fig. 7: Electrotransferencia de macromoléculas (Adaptado de Sambrook *et al.* 1989)

4. Tapar los tubos y mezclar los componentes suavemente al agitar los tubos con el dedo. Dar un pulso de centrifugación.
5. Colocar los tubos en la gradilla flotante e incubarlos durante 2 horas a 37 °C.
6. Mientras, preparar un gel de agarosa al 1% en TBE 1X.
7. Después de la incubación, retirar los tubos del baño maría, centrifugar rápidamente (pulso) con el propósito de recolectar el líquido en el fondo del tubo.
8. Añadir 2 µL del amortiguador de carga azul en cada tubo. Dar un pulso de centrifugación.
9. Llenar la cámara de electroforesis hasta cubrir el gel de agarosa con el amortiguador TBE 1X.
10. Asegurarse de que los pozos del gel de agarosa estén cerca del electrodo (-) de color negro y que la base del gel este cerca del electrodo (+) color rojo.
11. Cargar 10 µL de la muestra dentro de los pozos del gel, utilizando una punta diferente para cada muestra, siguiendo el orden indicado, de izquierda a derecha:
 - Carril 1: tubo L (control sin digestión).
 - Carril 2: tubo E, digestión con *EcoRI*.
 - Carril 3: tubo H, digestión con *HindIII*.
 - Carril 4: 3 µL de marcador de ADN (100 pb, Invitrogen proporcionado por el profesor).
12. Colocar la tapa de la cámara de electroforesis. Conectar los electrodos con la fuente de poder.
13. Encender la fuente de poder y someter las muestras a 80 V por 120 minutos.
14. Apagar la fuente de poder una vez terminado el proceso de electroforesis y retirar cuidadosamente el gel y el molde de la cámara.
15. Teñir el gel con bromuro de etidio (realizado por el profesor).
16. Visualizar el gel bajo luz UV (utilizando lentes de protección contra luz UV).
17. Tomar la fotografía del gel con sistema de fotodocumentación.

METODOLOGÍA PARA LA TRANSFERENCIA (Adaptado de Sambrook *et al.* 1989).

REACTIVOS	MATERIAL, EQUIPO Y ACCESORIOS.
Gel de agarosa	Membrana de nylon (recortada al tamaño del gel)
Restantes del ejercicio anterior (tubos L, E y H, 12 µL).	Microcentrifuga
Amortiguador TBE 1X	Equipo electroforético
Amortiguador de desnaturalización	Micropipetas y puntas
Amortiguador de neutralización	Papel filtro (Whatman)
Amortiguador SSC (20 X)	Sección de papel filtro largo
Amortiguador SSC (6 X)	Charola de vidrio y puente de plástico
Amortiguador SSC (2 X)	Peso (1 kg).
	Papel de plástico
	Marcadores permanentes.

Electroforesis de las muestras de ADN a transferir:

1. Cargar las muestras de ADN digerido y control (12 μ L restantes) en el gel de agarosa al 1%.
2. Llevar a cabo la electroforesis, 2 horas, 80 volts.

Transferencia del ADN a membrana de nylon

1. Sumergir el gel en una solución de desnaturalización por 45 minutos (Proporcionada por el profesor).
2. Enjuagar el gel en agua bidestilada 5 minutos.
3. Neutralizar en solución de neutralización por 15 minutos, dos veces.
4. Cortar una pequeña sección de la esquina derecha superior del gel.

Formación de la pirámide de transferencia por capilaridad:

5. Cortar la membrana de transferencia, 2 hojas de papel filtro grueso y una altura de 10 cm de papel filtro delgado al mismo tamaño que el gel
6. Para formar la pirámide colocar en orden todos los componentes (Fig. 5)
7. Dejar el proceso de transferencia de 8 a 24 hrs.
8. Al día siguiente, desmontar la pirámide en orden inverso al del montaje. Enjuagar brevemente (5 minutos) la membrana con SSC 6x.
9. Fijar el ADN de cadena sencilla covalentemente a la membrana:
 - a. Horneando (¡cuidado de no quemarse!) de 30 a 120 min. ($\geq 80^\circ$ C).
 - b. Irradiando con luz UV 5 min. (sobre la superficie limpia del transiluminador, ubicando la membrana con marca de lápiz por arriba). Usar lentes UVEX
10. La membrana se puede conservar por varias semanas a -20° C hasta su hibridación posterior con la sonda marcada

Verificación del éxito de la transferencia:

11. Para cerciorarse del éxito de la transferencia del ADN a la membrana se suele teñir el gel después de la transferencia y compararlo con el gel que se tiñó pero no se transfirió.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preguntas e investigaciones.

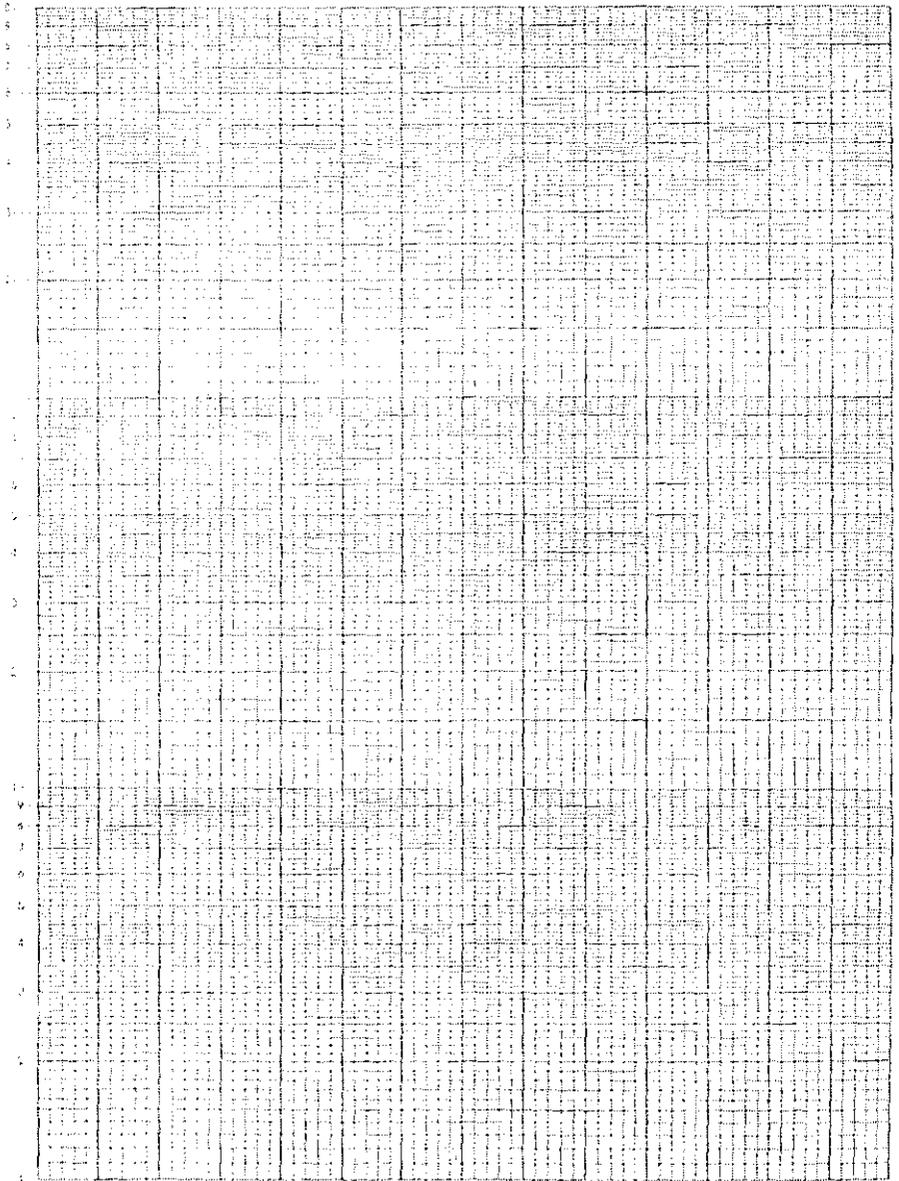
1. Al analizar el patrón de bandeo obtenido en fotografía. ¿Las digestiones fueron totales o parciales? ¿Por qué?
2. Utilizando el patrón de bandeo proporcionado (Fig. 4) o la fotografía proporcionada por el profesor, medir la distancia de migración de cada uno de los fragmentos de restricción producto de la digestión del ADN del bacteriófago lambda por *HindIII* y *EcoRI* respectivamente.

3. Reportar estos datos en gráficas (de papel semilogarítmico y milimétrico, anexo 1) junto con el tamaño de cada uno de los fragmentos de restricción para *HindIII* y *EcoRI* respectivamente. (guiarse con la tabla 1)
4. ¿Por qué el bandedo que proporciona lambda digerido por *HindIII* se usa como marcador?
5. Investigar sobre las técnicas de transferencia de southern, northern y western.
6. Investigar sobre membrana de nitrocelulosa y membrana de nylon.
7. Describir la fotografía del gel antes y después de su transferencia. ¿Fue exitosa la transferencia? ¿Porque?
8. Describir dos ejemplos de la aplicación de la presente práctica.

Tabla 1: Tabla de registro de datos electroforéticos (Bio Rad laboratory, 2000)

Fragmento de Restricción	ADN λ sin enzima		ADN λ digerido con <i>EcoRI</i>		ADN λ digerido con <i>HindIII</i>	
	Migración	Tamaño en pb	Migración	Longitud (pb)	Migración	Longitud (pb)
Banda 1	Completar	48,000	Completar	21,226	38	23,130
Banda 2			Completar	7,421	43	9,416
Banda 3			Completar	5,804 y 5,643	48	6,557
Banda 4			Completar	4,878	58	4,361
Banda 5			Completar	3,530	71	2,322
Banda 6					75	2,027

Hoja milimétrica y semilogarítmica (anexo 1)



BIBLIOGRAFÍA

Bio Rad laboratory. 2000. Life Science Research Products. Biotechnology Explorer, "Restricción Digestión and análisis of lambda DNA" (número de catalogo: 166-0002-EDU, www.bio-rad.com).

Lunque J., Herráez A. 2001. Biología Molecular e Ingeniería Genética, Primera edición, Editorial Harcourt, Madrid, España.

Sambrook J., Fritsch E.F. Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Segunda Edición, Nueva York, USA.

Suzuki D.T., Griffiths A.J.F., Miller J.H., Lewontin R.C. 1989. An Introduction to Genetic Analysis. Cuarta Ed. Editorial Freeman. USA.

Soberón M. F.X. 1999. La Ingeniería Genética y la Nueva Biotecnología, Segunda Edición, Editorial Fondo de la Cultura Económica, México, D. F.

PRÁCTICA 3 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA.

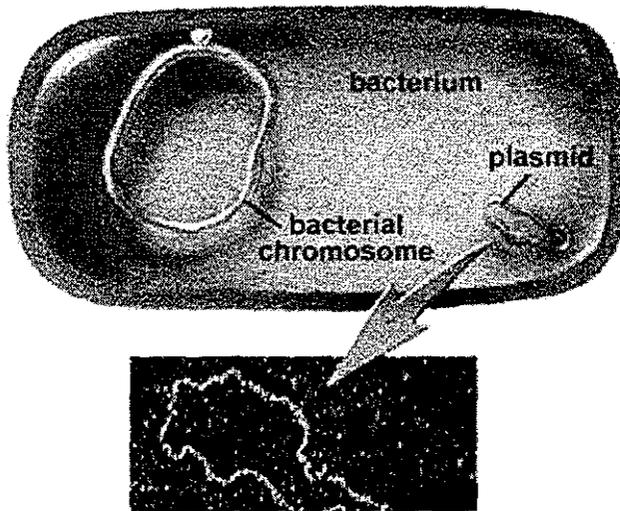


Fig. 1: Micrografía de un plásmido (Tomado de www.efn.uncor.edu/.../intrbiol/adntema3.htm).

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante representa el avance técnico que impulsó el campo de la ingeniería genética. Los tres aspectos científicos claves para obtener ADN recombinante son:

1. El descubrimiento, purificación y aprovechamiento de las endonucleasas (ver práctica anterior).
2. La habilidad de introducir ADN en la bacteria *E. coli* (Transformación bacteriana artificial) y la selección de las colonias transformadas.
3. La habilidad de obtener y purificar el ADN del plásmido con alto rendimiento.

Dominando estas tres técnicas, se puede trabajar en muchos campos de la ingeniería genética. La transformación genética tiene muchas aplicaciones en diversas áreas de la biotecnología, por ejemplo en agricultura, la introducción de genes que codifican para resistencia a las bajas temperaturas, enfermedades y pestes, en plantas de interés agronómico representa un reto técnico y comercial. Por ejemplo las bacterias se modifican genéticamente para ayudar a controlar derrames de petróleo. Recordemos además que desde 1982 la insulina humana recombinante es producida por bacterias *E. coli* genéticamente modificadas. En medicina tiene grandes expectativas "la terapia génica".

La transformación genética (TG): es un proceso por el cual una célula acepta y expresa un nuevo fragmento de ADN, este fragmento provee a la célula nuevas características que permite su identificación. La TG es un fenómeno que ocurre de forma natural en muchas bacterias, que pueden aceptar ADN: 1. De manera natural y 2. Después de su preparación en el laboratorio, que son denominadas "COMPETENTES". En este estado la bacteria presenta alteraciones en su membrana celular que permiten la entrada de ácidos nucleicos en la célula. En *E. coli* la competencia no ocurre de forma natural pero se puede inducir con diversos tratamientos, químicos (Ejemplo CaCl_2 , Fig. 2) y eléctricos (choque eléctrico) que producen poros en la membrana celular, permitiendo una transformación eficiente. Además se ha desarrollado la electroporación que es un proceso que involucra la aplicación de un impulso eléctrico muy breve e intenso, que permite TG muy eficaces (10^9 Bacterias transformadas/ μg de ADN plásmidico.)

* Los cationes Ca^{2+} neutralizan la carga negativa del ADN plásmidico así como de los fosfolípidos de la membrana celular, facilitando así la entrada del ADN plásmidico en la célula huésped.

** Un choque térmico corto aumenta la permeabilidad de la membrana después de la transformación con CaCl_2 .

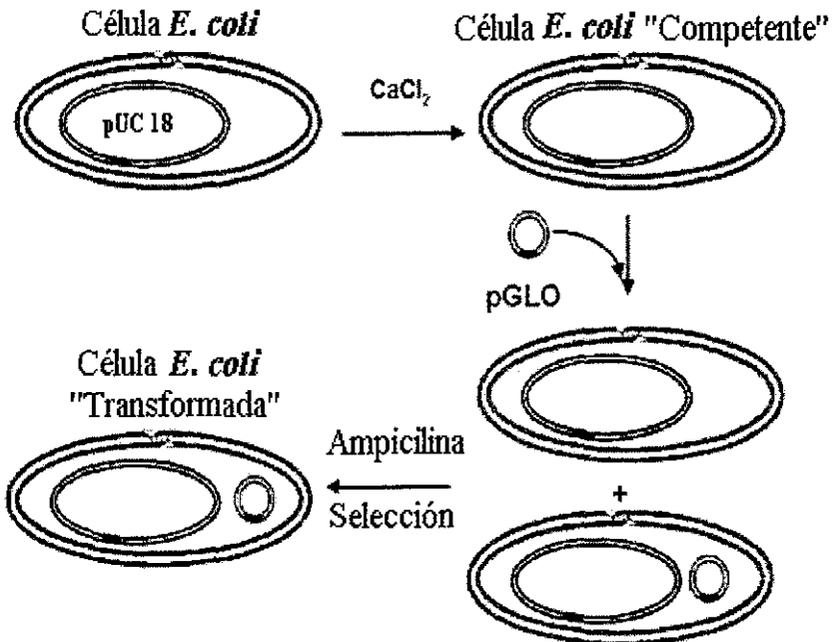


Fig. 2: El tratamiento de *E. coli* con CaCl_2 , provoca un estado competente y de esta manera la bacteria puede ser transformada (Adaptado de Blaber M. 2004).

Los **plásmidos** son pequeñas moléculas de ADN extracromosómicas, circulares, y autoreplicables presentes en muchos procariontes y algunos eucariontes sencillos (levadura). No son esenciales para el organismo que los lleva pero generalmente le confieren ventajas (como puede ser la resistencia transmisible a antibióticos) o características particulares (por ejemplo la capacidad de degradación de algunos hidrocarburos como el tolueno). Los plásmidos utilizados en los laboratorios a menudo están basados en el ADN circular de plásmidos bacterianos como por ejemplo Col E1, uno de los primeros plásmidos aislados. Contienen secuencias de ADN (origen de replicación) que permiten un alto grado de replicación en la bacteria, independientemente del ciclo celular hasta alcanzar altas concentraciones. Los plásmidos utilizados en biología molecular (por ejemplo de la familia de vectores de clonación pUC) también poseen un gen marcador, como el que provee la resistencia a un antibiótico (generalmente a ampicilina), de tal manera que cualquier bacteria portadora de un plásmido recombinante se volverá resistente a dicho antibiótico lo que permite su fácil selección y su cultivo en condiciones antibiótico-selectivas para la producción de clones bacterianos en placas de agar o en medio líquido. Una bacteria transformada por un plásmido recombinante se llama "bacteria recombinante".

Después del aislamiento de un clon bacteriano recombinante se puede fácilmente separar los plásmidos del contenido celular tras lisis celular y ultracentrifugación (140,000 g) en un gradiente de densidad con cloruro de cesio en presencia de bromuro de etidio. Este proceso permite separar el ADN plásmídico del ADN cromosomal, proteínas y residuos celulares.

En la siguiente práctica se utilizará un gen que codifica para una proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés Green Fluorescent Protein), obtenido de la Medusa *Aequorea victoria*, naturalmente bioluminiscente.

El plásmido con el cual se trabajará contiene un gen que codifica para la GFP además de un gen que provee resistencia al antibiótico ampicilina y un sistema que regula la expresión del gen GFP, se activa en presencia de arabinosa (Fig. 3 y 4). La introducción de este gen a la bacteria hace que esta produzca la GFP y brille cuando se observa con luz ultravioleta.

La selección de las bacterias se realizará sobre la caja de petri en presencia de ampicilina y arabinosa. Las colonias que se desarrollen en este medio y con fluorescencia son bacterias transformadas.

*** El gen GFP se encuentra insertado dentro del operon arabinosa. Su expresión (síntesis de la proteína fluorescente) necesita de la activación del operon arabinosa lo cual se logra agregando su sustrato (arabinosa). En ausencia de arabinosa el gen GFP se queda inactivo y las colonias no fluorescen.

Expresión del gen que codifica para la GFP en E coli.

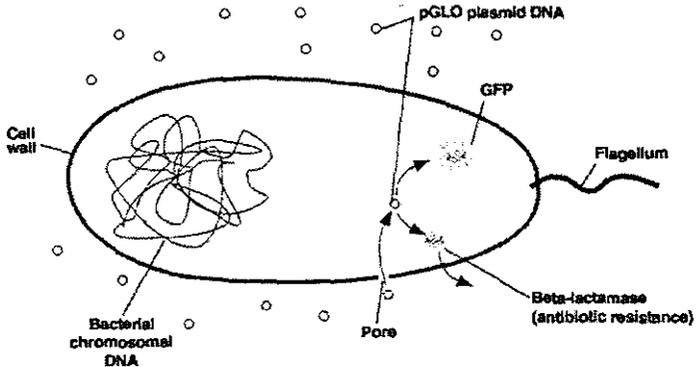


Fig. 3: Esquema de la bacteria con el plásmido pGLO que contiene el gen para la proteína verde fluorescente (Tomado de Bio-Rad, Laboratory, 2000)

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE

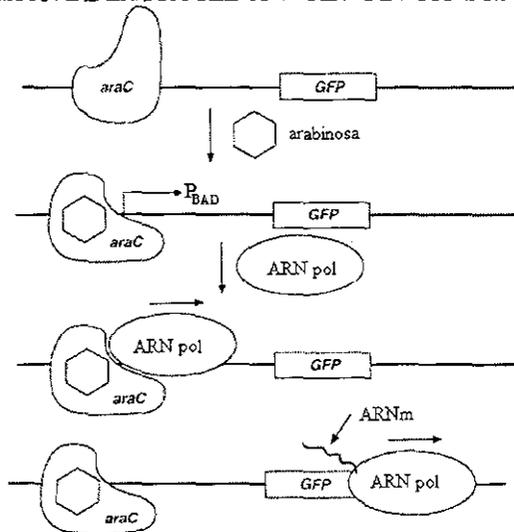


Fig. 4. La expresión de la proteína verde fluorescente, mediante un sistema que regula la presencia del gen GFP, se activa en presencia de arabinosa (araC: gen arabinosa C, PBAD: promotor, GFP: proteína verde fluorescente, ARNpol: ácido ribonucleico polimerasa, ARNm: ácido ribonucleico mensajero) (Adaptado de Bio-Rad Laboratory, 2000).

OBJETIVO GENERAL

Ensayar la transformación bacteriana.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar un protocolo de transformación bacteriana.
2. Observar la fluorescencia de las bacterias transformadas.
3. Determinar la tasa de transformación.

METODOLOGÍA

MATERIAL BIOLÓGICO	
Cepa bacteriana <i>E. coli</i> K-12: huésped (NO PATOGENA)	
Vector con proteína GFP recombinante	
REACTIVOS	MATERIAL
Medio LB (Luria Bertani) líquido o sólido (agar)	Micropipetas y puntas estériles
Ampicilina	Fuente de luz U V
Arabinosa ***	Incubadora a 37 °C
Caja de petri con siembra de la cepa K12	Baño Maria a 42 °C (para el choque térmico**)
Plásmido en solución pGLO	Recipiente con hielo
	Caja de petri con agar LB.
	Marcadores permanentes.

Se hace énfasis en que la presente práctica se tiene que realizar en condiciones de esterilidad, por lo cual se pretende que el alumno revise sus prácticas de microbiología. Además se precisa la necesidad de limpieza (antes, durante y después de la práctica), organización, orden y silencio en el aula. La transferencia (siembra) de las bacterias transformadas a la caja de Petri se tiene que hacer con mucho cuidado.

La presente práctica se desarrollara en dos sesiones:

- Día uno: transformación bacteriana
- Día dos: observación y conteo de colonias transformadas, realización de cálculos.

Preparación de bacterias competentes (realizado un día antes por el profesor) Método de CaCl_2

La bacteria DH 5 α se creció en un medio de cultivo LB a 250 rpm, de 12 a 16 h. Se inocularon 50 mL de LB con 0.5 mL del cultivo anterior en un matraz Erlenmeyer y nuevamente se dejaron crecer a 37 °C a 250 rpm (3h fase logarítmica). Se mantuvieron en el hielo por 10 min, e inmediatamente se centrifugaron 5 min. a 2,000 rpm a 4 °C en un tubo falcon de 50 mL. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 20 mL de CaCl_2 5 mM y se incubaron en el hielo por 20 min., lo cual capacita a la célula para incorporar ADN.

Se continuó con la centrifugación a 3,000 rpm por 10 min. a 4 °C, se deshecho el sobrenadante y se resuspendió en 2.5 mL de CaCl_2 0.1 M frío y se dejaron por 24 h. Finalmente, se prepararon alicuotas de 0.2 mL en tubos eppendorf con 7% del volumen de DMSO o 2.5mL de glicerol para preservar las células (colocadas en etanol con nieve carbónica) y fueron almacenadas a -80°C (Torres, 2007).

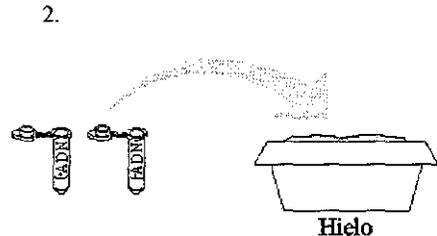
En condiciones estériles o campana de flujo laminar.

Día uno: Transformación bacteriana

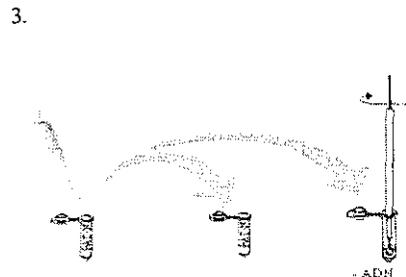
1. Tome, cierre y rotule dos microtubos de 2 mL, uno "+ADN" y otro "-ADN". Además rotule ambos tubos con las iniciales de su equipo. Colocar los dos microtubos en una gradilla.



2. Colocar los tubos sobre hielo.

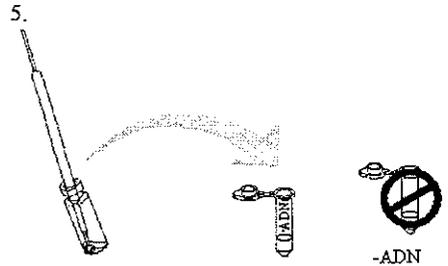


3. Con una micropipeta (Rango 100-1000 μL) transferir a cada uno de los dos microtubos "+ADN" y "-ADN" 100 μL de bacterias competentes (proporcionadas por el profesor). Con otra micropipeta (Rango 1-10 μL) agregar 1 μL de plásmido solamente al tubo "+ADN".

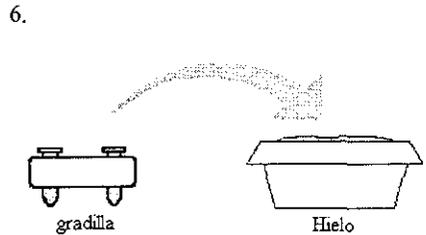


4. Observarla bajo luz UV (con lentes de protección UVEX) el vial que contiene el plásmido y anotar lo que observó.

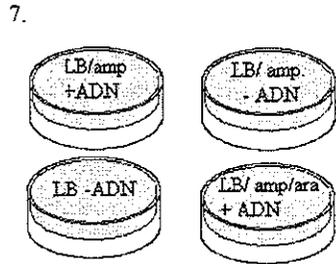
5. Cerrar el tubo, colocarlo de nuevo sobre hielo.



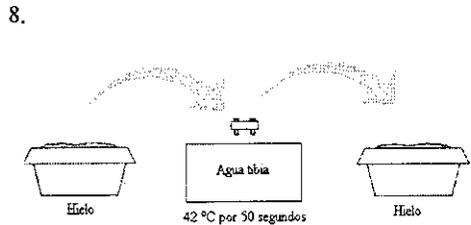
6. Incubar los dos tubos sobre hielo por 10 minutos (asegurarse que estén inmersos dentro del hielo).



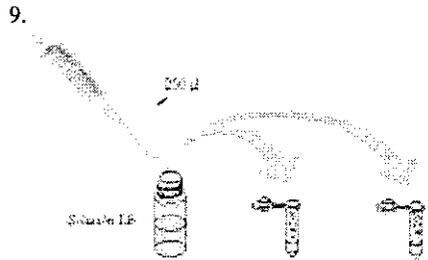
7. Mientras tanto, ubicar y rotular (en la parte de abajo no en la tapa) con el número de su grupo a las 4 cajas de petri que necesitará enseguida:
- Marcar una caja de petri con LB/amp. "+ADN" y otra con LB/amp. "-ADN".
 - Marcar una caja de petri con LB/amp/ara. "+DNA"
 - Marcar una caja de petri con LB "- DNA"



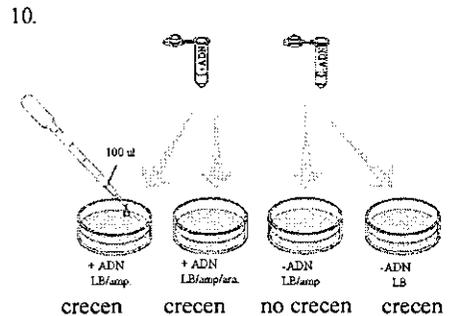
8. Realizar el choque térmico transfiriendo la gradilla con sus dos tubos a un baño María a 42 °C por exactamente 50 segundos, asegurándose de que los tubos estén en contacto con el agua tibia. Rápidamente regresar los tubos sobre hielo e incubar durante dos minutos.



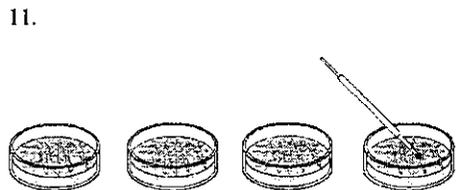
9. Sacar los tubos del hielo y agregar a cada uno 250 μL de medio LB con, una micropipeta con punta nueva y estéril, cerrar los tubos y dejar los 10 minutos a temperatura ambiente.



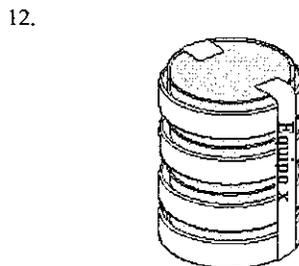
10. Agitar el contenido de los tubos (asegurarse de que estén bien cerrados) (CON LA MAYOR ATENCIÓN POSIBLE, para no cometer errores al momento de la siembra) y utilizando puntas nuevas para cada tubo (una para el "+ADN", otra para el "-ADN"), transferir 100 μL de solución a cada caja



11. Con un asa estéril diferente para cada caja de petri "extienda" cada suspensión, con el asa estéril sobre la superficie de la caja de petri



12. Agrupar las cajas, poner y rotular la cinta con iniciales de cada equipo, incubarlas, volteadas, hasta el día siguiente (18-20 h), a 37 $^{\circ}\text{C}$.



Tasa de transformación:

Calcular la TASA de TRANSFORMACIÓN:

Tasa de transformación = número total de bacterias transformadas / cantidad de ADN pipeteado.

REPORTAR SUS RESULTADOS:	
TASA de TRANSFORMACIÓN =	Bacterias / µg ADN

Análisis de resultados

En una tabla anotar y comparar los resultados de los diferentes equipos:

EQUIPOS	TASA DE TRANSFORMACIÓN	COMENTARIO
1		
2		
3		

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Investigaciones y Preguntas:

1. Investigar sobre el funcionamiento del operon arabinosa de *E. coli*.
2. ¿Qué organismo es mas adecuado para la transformación genética: procarionte o eucarionte? ¿Por que?
3. ¿Cuál es la principal limitante al utilizar a las bacterias?
4. Investigar cómo la ampicilina afecta al crecimiento bacteriano.
5. Investigar sobre la función del gen *mob* y su papel en la transferencia natural de los plásmidos de una bacteria a otra, durante un evento de conjugación bacteriana.
6. Si una bacteria modificada adquirió resistencia a ampicilina, ¿qué puede usted inferir sobre los genes presentes sobre el plasmido pGLO?
7. Comparar las tasas de transformación de la práctica con los reportados en la literatura científica y comercial.
8. Describir ejemplos de aplicaciones en: bacterias, plantas, mamíferos.

BIBLIOGRAFÍA

Balbás. 2002, De la Biología Molecular a la Biotecnología, Primera Edición, Editorial Trillas, D. F., México.

Bio Rad laboratory. 2000. Life Science Research Products. Biotechnology Explorer, "Bacterial Transformation The pGLO™ System" (número de catalogo 166-0003-EDU, www.bio-rad.com)

Blaber M. 2004, BCH 4053L Biochemistry Lab.
<http://wine1.sb.edu/BCH40531/Lecture07/Lecture07.html>

Lunque J., Herráez A. 2001. Biología Molecular e Ingeniería Genética, Primera edición, Editorial Harcourt, Madrid, España.

Smith C., Wood E. 1998. Molecular Biology and Biotechnology, Editorial Chapman Hall, Hong Kong, Japan.

Timothy M., Sinclair J. 1998, Biología Molecular en Medicina, Primera Edición, Editorial Medica Panamericana, España, Barcelona.

Torres N. 2007. Análisis comparativo de la expresión génica diferencial entre la glía envolvente y los precursores neurales multipotenciales en su proceso de diferenciación. Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencias Biomédicas. Universidad de Guadalajara, México.

PRÁCTICA 4 OBTENCIÓN DE PLÁSMIDO (MINIPREPARACIÓN).

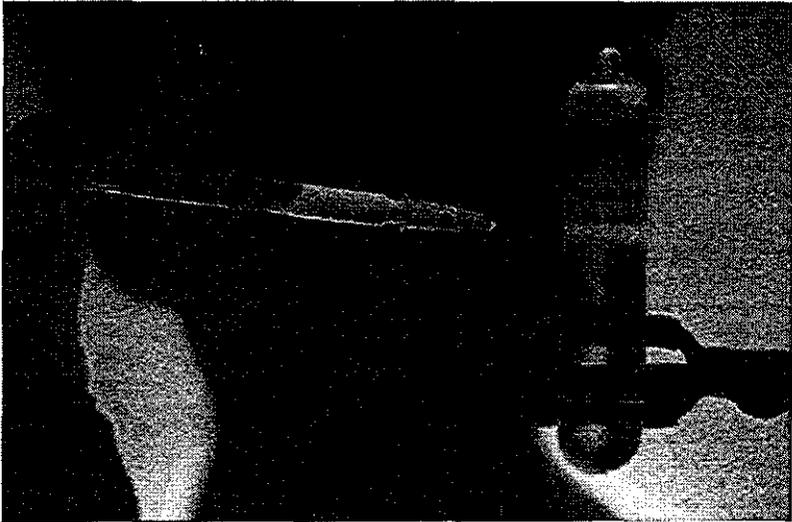


Fig. 1: Obtención de ADN de un plásmido por centrifugación en un gradiente de cloruro de Cesio (CsCl)

INTRODUCCIÓN

Los plásmidos son pequeñas moléculas de ADN de doble cadena, covalentemente cerrados y circulares, localizados extracromosomalmente en el citosol de muchas bacterias (de 1 a 3,000 plásmidos por célula), que se encuentran en la naturaleza y que pueden ser aislados como entidades individuales. Su tamaño variaría de 1 hasta más de 200 kilopares de bases (Kpb) y están presentes en una gran variedad de organismos procariotes y algunos eucariontes. Desde la década de 1970, los plásmidos han sido un componente clave para la Ingeniería Genética y se han utilizado como modelos de estudio de funciones así como replicación y transcripción y también como vectores para la clonación de ADN (Balbás, 2002).

Existen muchos métodos para purificar el ADN plásmidico de bacterias. Estos métodos involucran invariablemente tres etapas:

1. Crecimiento de cultivo bacteriano.
2. Cosecha y lisis bacteriana
3. Purificación del ADN plásmidico.

BIBLIOTECA CUCBA

Crecimiento

Los plásmidos (molécula circular, auto-replicable) se purifican casi siempre de cultivos en medio líquido, inoculados con una sola colonia bacteriana, tomada de una caja de petri con agar. La mayoría de los plásmidos utilizados hoy en día se replican de manera autónoma en un alto número de copias, por lo que se pueden purificar con un alto rendimiento a partir de un cultivo crecido hasta su fase logarítmica tardía, en medio LB estándar.

Cosecha y lisis bacteriana

Las bacterias se cosechan por centrifugación y se lisan. Existen diferentes métodos para la lisis los cuales dependen del tamaño del plásmido, la cepa bacteriana y de las técnicas subsecuentes de purificación.

Purificación del ADN plásmidico

Todos los métodos de purificación del ADN plásmidico explotan sus características especiales (ADN circular, relativamente pequeño). Por ejemplo la separación del ADN plásmidico del ADN del cromosoma bacteriano por centrifugación en un gradiente de Cloruro de Cesio (CsCl) y de bromuro de etidio (BrEt) es posible gracias a la cantidad diferencial de BrEt que se une a cada una de las moléculas de ADN.

En la mayoría de los procedimientos de rutina se obtiene gran cantidad de ADN, por lo que es suficiente hacer preparaciones de ADN plásmidico a pequeña escala, las cuales se llaman minipreparaciones.

Las minipreparaciones de ADN plásmidico se obtienen por lisis alcalina o por método de ebullición; en nuestro caso practicaremos con la lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989).

OBJETIVO GENERAL

Extraer y purificar ADN plásmidico por lisis alcalina.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar un cultivo bacteriano.
2. Cosechar y lisar a las bacterias.
3. Extraer y purificar el ADN plásmidico.
4. Comprobar el éxito de la práctica anterior.

METODOLOGÍA

MATERIAL BIOLÓGICO		
Cepa bacteriana <i>E. coli</i> K-12 transformada (obtenida de la practica anterior) sembrada en caja de Petri con LB en presencia de ampicilina y arabinosa (colonia fluorescente).		
REACTIVOS	SOLVENTES	MATERIAL
Medio LB (Luria Bertani) líquido con antibiótico		
Solución I: Tris HCL 25 mM, pH 8.0 EDTA 10 mM Glucosa 50 mM	F:C:I mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1)	Asa Micropipetas y puntas estériles
Solución II NaOH 0.2 M SDS 1% (p/v)	C:I mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1)	Fuente de luz UV Vortex
Solución III Acetato de potasio 3 M Ácido acético glacial 11.5% (v/v)		Incubadora a 37 °C Baño Maria a 42 °C
TE		Recipiente con hielo
		Marcadores permanentes.

Minipreparaciones por lisis alcalina

NOTA: Todo el procedimiento se realiza en hielo, excepto donde se indica. Todas las centrifugaciones se realizan a 10,000 rpm en una microcentrífuga (Sambrook *et al.*, 1989; Rojas Mallorquín, 2006).

Crecimiento bacteriano

- Inocular una colonia bacteriana transformada en 5 mL de medio LB líquido (con antibiótico) e incubar toda la noche.
- Colocar las bacterias en un tubo de polipropileno estéril de 1.5 mL y mantener en hielo.
- Centrifugar 3 min y desechar el sobrenadante en cloro.
- Agregar TE (400 µL) y resuspender con vortex.

Cosecha y lisis bacteriana

- Centrifugar 3 min y desechar el sobrenadante en cloro.
- Resuspender en solución I (100 µL) con vortex.
- Agregar solución II (200 µL) y agitar manualmente por inversión para no hacer espuma, y dejar fuera del hielo.
- Agregar solución III (100 µL), agitar manualmente y dejar precipitar en hielo durante 10 min.
- Centrifugar 3 min.

- Recuperar el sobrenadante sin restos sólidos y pasarlo a un microtubo nuevo y agregar 2-isopropanol frío (60% v/v), mezclar suavemente por inversión.
- Dejar precipitar en hielo durante 5 min.
- Centrifugar 15 min y desechar el sobrenadante (Dejar destapado el tubo para que se evapore el 2-isopropanol. Se observa el pellet de ADN (plásmidos).
- Resuspender el pellet en TE (100 μ L).

Purificación del plásmido con fenol, cloroformo y etanol:

- Agregar un volumen de fenol equilibrado pH 7.5 (100 μ L), y agitar en el vortex.
- Centrifugar 5 min y recuperar la fase superior en un microtubo nuevo.
- Agregar 100 μ L de una mezcla F:C:I , agitar en el vortex.
- Centrifugar 5 min y recuperar la fase superior en un microtubo nuevo.
- Agregar 100 μ L de una mezcla C:I , agitar en el vortex.
- Centrifugar 1min y recuperar la fase superior en un microtubo nuevo.
- Agregar 1/10 volumen de acetato de sodio 3M, pH 5.2, mezclar y agregar 2.5 volumen de etanol al 100%.
- Dejar a -20 °C toda la noche.
- Centrifugar 20 min y eliminar el sobrenadante. (dejar destapado el tubo para que se evapore el etanol), se observa el pellet de ADN.
- Resuspender en agua milli-Q estéril.

Opcional: Realizar análisis cuantitativo y cualitativo del ADN obtenido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Investigaciones y Preguntas:

1. Comentar sobre el aspecto de su material genético (color y apariencia)
2. Investigar sobre los diferentes métodos de extracción de ADN plásmidico, incluyendo Kits comerciales.
3. Investigar sobre las funciones de los plásmidos en la naturaleza.
4. Investigar sobre las características que debe de tener un vector de clonación eficiente.
5. Describir 2 ejemplos de aplicaciones de la presente práctica.

BIBLIOGRAFÍA

Balbás. 2002, De la Biología Molecular a la Biotecnología, Primera Edición, Editorial Trillas, D. F., México.

Lunque J., Herráez A. 2001. Biología Molecular e Ingeniería Genética, Primera edición, Editorial Harcourt, Madrid, España.

Rojas Mallorquín A.E. 2006. Diferenciación *in Vitro* de aldainoglia a partir de precursores neurales multipotenciales. Análisis de la expresión génica diferencial. Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencias Biomédicas. Universidad de Guadalajara, México.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Segunda Edición, USA.

Torres-Ruiz N.M. 2007. Análisis comparativo de la expresión génica diferencial entre la glía envolvente y los precursores neurales multipotenciales en su proceso de diferenciación. Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencias Biomédicas. Universidad de Guadalajara, México.

PRÁCTICA 5 DIGESTIÓN DE PLÁSMIDOS Y MAPA DE RESTRICCIÓN.

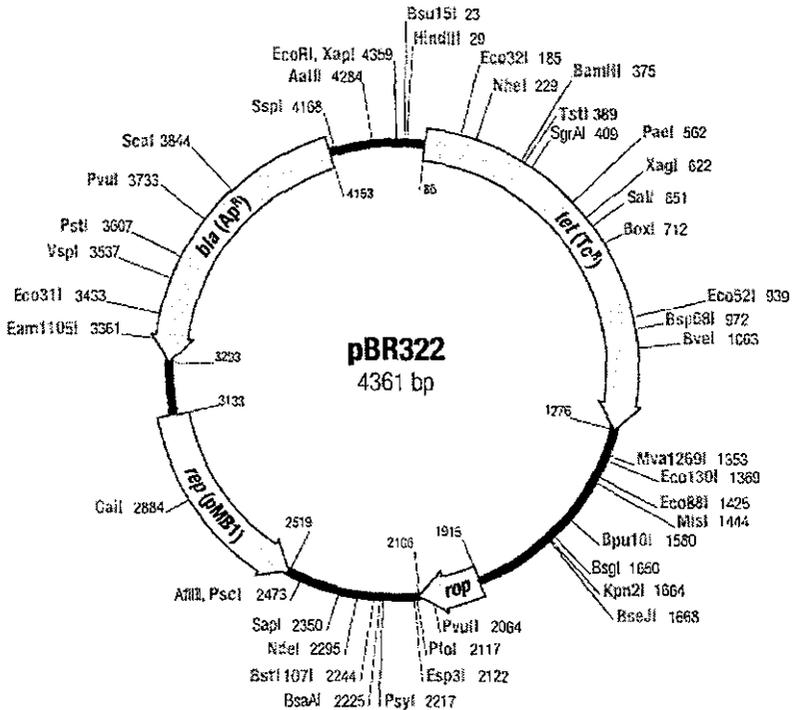


Fig. 1: Imagen del plásmido pBR322 (Tomado de www.fermentas.com/.../nucleicacids/mappbr322.htm)

INTRODUCCIÓN

En la Fig 1 se muestra un mapa de restricción del plásmido pBR322, que se construyó a partir de dos plásmidos naturales aislados y que ha sido la base de casi todos los vectores de clonación molecular para la bacteria *E. coli*. Se conoce totalmente su secuencia nucleotídica y la codificación de sus funciones transcripcionales, traduccionales y replicativas. Es un gran ejemplo de cómo los plásmidos naturales se han modificado y usado extensamente en la construcción de herramientas moleculares (Sambrook et. al. 1989, Balbás 2002.)

En las dos prácticas anteriores se trabajó con el plásmido pGLO:

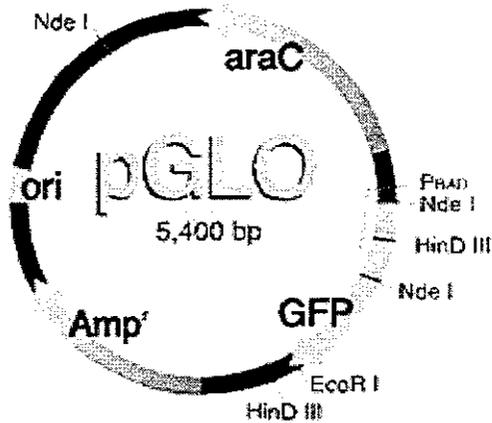


Fig. 2: Mapa de restricción del plásmido pGLO (Tomado de srv2.lycoming.edu/~mqgwetlab.html)

1. La práctica de transformación bacteriana permitió insertar el plásmido en el huésped donde se llevó a cabo su replicación, para así obtener un gran número de copias del mismo.
2. La práctica de Minipreparación permitió extraer y purificar gran cantidad de dicho plásmido.

En la presente práctica se digerirá el ADN de tres muestras de ADN desconocidas para su equipo (pGLO o pBR322 o una incógnita) con tres enzimas de restricción (*EcoRI*, *HindIII* y *BamHI*), se realizará la electroforesis de los productos de la digestión y se analizará el patrón de bandeo obtenido el cual se comparará con los mapas de restricción de pBR322 y de pGLO, proporcionados arriba (Fig. 1 y Fig. 2) con la finalidad de identificar la muestra de ADN que se les asignó si fue pGLO o pBR322 o la incógnita (investigar). Así se pretenderá poner a prueba los conceptos prácticos de uso de las endonucleasas y conocer unas de las aplicaciones de los mapas de restricción.

OBJETIVO GENERAL

Practicar con el uso de endonucleasas y mapas de restricción, para identificar un segmento de ADN de acuerdo al patrón de bandeo de sus fragmentos y mapa de restricción.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Digerir muestras de ADN con tres enzimas de restricción.
2. Realizar la electroforesis, visualizar y registrar los fragmentos de restricción obtenidos.
3. Diferenciar los patrones de bandeos propios a un plasmido linealizado (cortado en un solo sitio) y fragmentado (cortado en varios sitios).
4. Identificar el segmento de ADN (que le toco) de acuerdo al patrón de bandeos y a los mapas de restricción proporcionados, y su investigación.

METODOLOGÍA

REACTIVOS	MATERIALES
ADN (3 muestras)	Baño María a 37°C
Amortiguador de reacción (10X) uno propio de cada enzima	Micropipetas 0.5-10 µL
Enzima <i>EcoRI</i>	Equipo electroforético
Enzima <i>HindIII</i>	Microcentrifuga
Enzima <i>BamHI</i>	Sistema de fotodocumentación
Amortiguador de carga (jugo azul)	
H ₂ O milliQ	
TBE 1X	

Digestión del ADN

1. Ubicar los microtubos proporcionados por el profesor que contienen las tres muestras de ADN, los tres amortiguadores de reacción (10X) y el amortiguador de carga. Dar un pulso de centrifugación y mantener TODAS las soluciones en hielo.
2. Rotular nueve microtubos nuevos de la siguiente manera

Tabla 1: Rotulación de los microtubos

Tubo uno	ADN # uno, Digestión con <i>EcoRI</i>
Tubo dos	ADN # uno, Digestión con <i>HindIII</i>
Tubo tres	ADN # uno, Digestión con <i>BamHI</i>
Tubo cuatro	ADN # dos, Digestión con <i>EcoRI</i>
Tubo cinco	ADN # dos, Digestión con <i>HindIII</i>
Tubo seis	ADN # dos, Digestión con <i>BamHI</i>
Tubo siete	ADN # tres, Digestión con <i>EcoRI</i>
Tubo ocho	ADN # tres, Digestión con <i>HindIII</i>
Tubo nueve	ADN # tres, Digestión con <i>BamHI</i>

Agregar además una marca que distinga su grupo de los de sus compañeros.

- Pipetear con extrema precisión (micropipeta de 0.5-10 μL) los reactivos en los microtubos rotulados: LA ENZIMA SE AGREGARÁ AL FINAL Y BAJO SUPERVISIÓN DEL PROFESOR.

Tabla 2: Cantidades de las soluciones

Equipo	Tubo	Muestra de ADN	Amortiguador. 10X Am E, H, B	<i>EcoRI</i>	<i>Hind III</i>	<i>BamHI</i>	H ₂ O milliQ
No. 1	1	#1, 2 μL	2 μL (Am E)	0.5 μL	-	-	15.5 μL
No. 1	2	#1, 2 μL	2 μL (Am H)	-	0.5 μL	-	15.5 μL
No. 1	3	#1, 2 μL	2 μL (Am B)	-	-	0.5 μL	15.5 μL
No. 2	4	#2, 2 μL	2 μL (Am E)	0.5 μL	-	-	15.5 μL
No. 2	5	#2, 2 μL	2 μL (Am H)	-	0.5 μL	-	15.5 μL
No. 2	6	#2, 2 μL	2 μL (Am B)	-	-	0.5 μL	15.5 μL
No. 3	7	#3, 2 μL	2 μL (Am E)	0.5 μL	-	-	15.5 μL
No. 3	8	#3, 2 μL	2 μL (Am H)	-	0.5 μL	-	15.5 μL
No. 3	9	#3, 2 μL	2 μL (Am B)	-	-	0.5 μL	15.5 μL

- Tapar los tubos y mezclar los componentes suavemente al agitar los tubos con el dedo. Dar un pulso de centrifugación
- Colocar los tubos en la gradilla flotante e incubarlos en baño maría durante 2 horas a 37 °C.
- Mientras, preparar un gel de agarosa al 1% en TBE 1X.
- Después de la incubación, retirar los tubos del baño maría, centrifugar rápidamente (pulso) con el propósito de recolectar el líquido en el fondo del tubo.
- Añadir 2 μL del amortiguador de carga en cada tubo. Dar un nuevo pulso de centrifugación.
- Llenar la cámara de electroforesis hasta cubrir el gel de agarosa con el amortiguador TBE 1X.
- Asegurarse de que los pozos del gel de agarosa estén cerca del electrodo (-) de color negro y que la base del gel este cerca del electrodo (+) color rojo.
- Cargar 10 μL de la muestra dentro de los pozos del gel, utilizando una punta diferente para cada muestra, siguiendo el orden de los tubos (marcador de 100 bp, tubos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) de izquierda a derecha.
- Correr la electroforesis (80 V por 120 minutos).
- Teñir el gel con bromuro de etidio (realizado por el profesor).
- Visualizar el gel bajo luz UV (utilizando lentes de protección UVEX).
- Tomar la fotografía del gel con sistema de fotodocumentación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. En base a la fotografía de su gel, identificar el patrón de bandeo:
 - a. del plásmido linearizado.
 - b. del plásmido fragmentado
2. Estimar el tamaño de cada uno de los fragmentos, utilizando como referencia el marcador de 100 pb.
3. Comparar los resultados experimentales con los esperados de los mapas de restricción (Fig. 1 y 2). Identificar las muestras de ADN con la cual trabajo.
4. Describir dos ejemplos de aplicabilidad de la presente práctica.

BIBLIOGRAFÍA

Balbás P. 2002. De la Biología Molecular a la Biotecnología, Primera Edición, Editorial Trillas, D. F., México.

Concept: Martin, Ek, Svenska Dagbladet. 1993.
<http://www.nobel.se/chemistry/laureates/1993/illpress/pcr.html>?

Guzman Davalos L., Mueller G.M., Cifuentes J., Miller A. N., Santerre A. 2003. traditional infrageneric clasification of gymnopilus is not supported by ribosomal DNA sequence data. Mycologia 95(6) 1204-1214

Hillis D.M., Larson A., Davis S.K., y Zimmer E.A. 1996. Nucleic Acids III: Sequencing, en Hillis D.M. y Moritz (Eds) Molecular Systematics. Sinauer Associates, Sunderland, Mass, USA.

Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. 1990. PCR Protocols, a guide to methods and applications, Academic Press.

Lunque J.; Herráez A. 2001. Biología Molecular e Ingeniería Genética, Primera edición, Editorial Harcourt, Madrid, España.

Sambrook J., Fritsch E.F. Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Segunda Edición, USA.

Suzuki D.T., Griffiths A.J.F., Miller J.H., Lewontin R.C. 2000. Introducción al análisis genético, cuarta Ed. Editorial Freeman, Nueva York, USA.

Valadez E., Kahl G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Mundi Prensa, Universidad Autónoma de Chapingo, D. F. México.

Villalobos A. et al., 2003. Manual de Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FORMATO GENERAL

PROGRAMA DE ASIGNATURA

NOMBRE DE MATERIA

INGENIERÍA GENÉTICA

CODIGO DE MATERIA

BC 123

DEPARTAMENTO

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

CODIGO DE DEPARTAMENTO

BC

CENTRO UNIVERSITARIO

CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

CARGA HORARIA TEORIA

50

PRACTICA

18

TOTAL

68

CREDITOS

7

TIPO DE CURSO

ESPECIALIZANTE, TEÓRICO-PRACTICO

NIVEL DE FORMACION
PROFESIONAL

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las aplicaciones de las principales técnicas de biología molecular en los diferentes campos de la ingeniería genética

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Enfatizar en la importancia de las nociones básicas de biología molecular para el desarrollo de la ingeniería genética.
- Analizar las técnicas moleculares que permiten estudiar los polímeros celulares importantes en transferencia de la información genética así como su modificación.

CONTENIDO TEMATICO SINTETICO

UNIDAD I: Introducción: Aplicación de la biología molecular al campo de la Ingeniería genética

- 1) Recorrido histórico, origen y aplicación del campo de la biología molecular
- 2) Objetivos y alcances de la Ingeniería Genética.

UNIDAD II: Técnicas básicas de biología Molecular importantes en la transferencia de la información génica (Prácticas de laboratorio).

- 1) Reactivos, herramientas, equipos de laboratorio de Ingeniería Genética. Precauciones para su buen uso.
- 2) Evaluación cuantitativa y cualitativa de una preparación de ADN.
- 3) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 4) Digestión y transferencia del ADN.
- 5) Transformación bacteriana artificial.
- 6) Extracción de ADN plásmidico.
- 7) Secuenciación del ADN (demostrativo).

UNIDAD III: Clonación génica

- 1) Vectores de clonación
- 2) Bibliotecas genómicas
- 3) Bibliotecas de ADNc
- 4) Rastreo del clon de interés

UNIDAD IV: Marcadores Genéticos

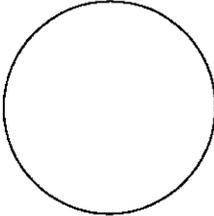
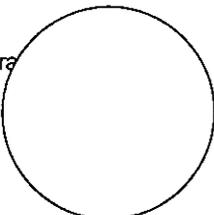
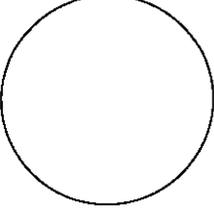
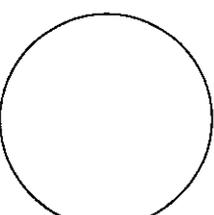
UNIDAD V: Organismos Genéticamente Modificados

UNIDAD VI: Temas actualizados

DÍA DOS: Recolección de datos, cálculos y análisis de resultados

Recolección de datos:

1. Retirar las cajas de petri de la incubadora. Observar cada una de las cajas bajo luz normal y luz UV (usar lentes protectores tipo UVEX).
2. Anotar sus observaciones usando el siguiente esquema:
3. contar el numero de colonia en cada caja

Transformación de cajas	Observaciones
+ADN LB/amp 	
+ADN LB/amp/ara 	
Cajas control	Observaciones
-ADN LB/amp 	
-ADN LB 	

BIBLIOGRAFIA BASICA

Libros

- Balbás P. 2002. De la Biología Molecular a la Biotecnología, Primera Edición, Editorial Trillas, D. F., México.
- Bloom M.V., Freyer G.A., y Micklos D.A. 1996. Laboratory DNA Science: Introduction to Recombinant DNA Techniques and Methods of Genome Analysis, Editorial the Benjamin/Cumming Publishing Company, USA.
- Budowle B., Smith J., Morety T., DiZinnc J. 2000. DNA typing protocols: Molecular Biology and forensic analysis. Bio Techniques Books., USA.
- Hillis D.M., Larson A., Davis S.K., y Zimmer E.A. 1996. Nucleic Acids III: Sequencing, en Hillis D.M. y Moritz (Eds) Molecular Systematics. Sinauer Associates, Sunderland, Mass, USA.
- Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. 1990. PCR Protocols, a guide to methods and applications, Academic Press.
- Lewin B. 2008. Genes IX. Jones and Bartlett Publishers, Boston, USA.
- Lunque J.; Herráez A. 2001. Biología Molecular e Ingeniería Genética, Primera edición, Editorial Harcourt, Madrid, España.
- Sambrook J., Fritsch E.F. Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Segunda Edición, USA.
- Suzuki D.T., Griffiths A.J.F., Miller J.H., Lewontin R.C. 2000. Introducción al análisis genético, cuarta Ed. Editorial Freeman, Nueva York, USA.
- Smith C., Wood E. 1998. Molecular Biology and Biotechnology, Editorial Chapman Hall, Hong Kong, Japan.
- Timothy M., Sinclair J. 1998, Biología Molecular en Medicina, Primera Edición, Editorial Medica Panamericana, España, Barcelona.
- Valadez E., Kahl G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Mundi Prensa, Universidad Autónoma de Chapingo, D. F. México.

ENSEÑANZA-APRENDIZAJE

El alumno revisará y/o aprenderá los fundamentos teórico- prácticos de la ingeniería genética lo que le permitirá entender e interpretar artículos científicos de investigación básica y aplicada.

CRONOGRAMA DEL CURSO

PROGRAMA ANALÍTICO DE: INGENIERÍA GENÉTICA				
CONTENIDO				
SEMANA N°	CONTENIDO	FORMA DE DOCENCIA	TRABAJO FUERA DE HORARIO	LUGAR
1	<i>Entrega de Programa.</i>	TEÓRICA	SI	AULA
2	1) Recorrido histórico, origen y aplicación del campo de la biología molecular. Objetivos y alcances de la Ingeniería Genética. 2) Ejercicio de evaluación cuantitativa y cualitativa de una preparación de ADN receso 3) PCR, secuenciación y sus aplicaciones	TEÓRICA	SI	Aula de clase
3	<i>Practica # 1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su aplicación en el marcador molecular ITS</i> Teoría: endonucleasas y sus aplicaciones	PRACTICA Y TEORICA	SI	Laboratorio Y Aula de clase
4	<i>Practica # 2 Digestión y transferencia del ADN del bacteriófago lambda</i> Teoría: Transferencia de macromoléculas y sus aplicaciones.	PRACTICA Y TEÓRICA	SI	Laboratorio y Aula de clase
5	Parcial uno Teoría: Vectores de clonación	TEÓRICA	SI	Aula de clase

6	Practica # 3 Transformación Bacteriana Teoría: bibliotecas			Laboratorio Y Aula de clase
7	Practica # 4 Obtención de plásmidos (Minipreparación)	TEÓRICA Y PRACTICA		Laboratorio
8	Practica # 5 Digestión de plásmidos y mapa de restricción	PRACTICA	SI	Laboratorio
9	Micro-organismos genéticamente modificados	TEÓRICA	SI	Aula de clase
10	Plantas genéticamente modificados	TEÓRICA		Aula de clase
11	Animales genéticamente modificados	TEÓRICA	SI	Aula de clase
12	Clonación y terapia génica	TEÓRICA	SI	Aula de clase
13	Parcial dos Tema selectivo	TEÓRICA		Aula de clase
14	<i>Marcadores moleculares</i>	TEÓRICA	SI	Aula de clase
15	<i>Marcadores moleculares</i>	TEÓRICA	SI	Aula de clase
16	Parcial tres Temas selectivos	TEÓRICA	SI	Aula de clase
17	Temas selectivos <i>Registro y publicación de evaluación</i>	TEÓRICA		Aula de clase