



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Manual de prácticas de laboratorio Técnicas Básicas de Biología Molecular



Pablo G. **Damián Matzumura**

Leticia **González Núñez**

Alicia **López Yáñez**

Nancy Yuritzí **Espino Rivera**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

Dr. Salvador Vega y León
Rector General

Mtro. Norberto Manjarrez Álvarez
Secretario General

UNIDAD IZTAPALAPA

Dr. Javier Velázquez Moctezuma
Rector

Dr. Miguel Ángel Gómez Fonseca
Secretario

Dra. Edith Ponce Alquicira
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Dr. Pablo Damián Matzumura
Jefe del Departamento de Biología de la Reproducción

Dra. Milagros Huerta Coria
Coordinadora de Extensión Universitaria

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas
Jefe de la Sección de Producción Editorial

Primera Impresión 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Av. San Rafael Atlixco Núm. 186
Iztapalapa, 09340. México, D. F.

Impreso y hecho en México/*Printed in Mexico*

Índice

Justificación	5
Medidas generales de seguridad en el Laboratorio de Biología Molecular.....	9
Práctica 1. Aislamiento de ADN Plasmídico Bacteriano por Lisis Alcalina. Minipreparación (“Miniprep”)	11
Práctica 2. Separación del plásmido por electroforesis en Geles de Agarosa	17
Práctica 3. Corte del plásmido con enzimas de restricción	27
Práctica 4. Purificación del plásmido por centrifugación en columna.	33
Práctica 5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
Anexo 1 Uso de equipos especiales en el laboratorio de biología molecular: micropipetas y microcentrífuga	41
Anexo 2 Preparación de las soluciones para biología molecular	49
Bibliografía	55

Justificación

Uno de los objetivos de la humanidad ha sido el poder analizar y alterar la composición y expresión de los genes en todo tipo de organismos; sin embargo, no fue sino hasta el siglo pasado que se implementaron técnicas que pudieron aislar, analizar y manipular a los ácidos nucleicos, tanto el ácido desoxirribonucleico (ADN) como el ácido ribonucleico (ARN), así como a las proteínas que son codificadas por estos, dando lugar a la ciencia ahora denominada Biología Molecular. El desarrollo exponencial de esta área del conocimiento ha permitido el avance en todas las disciplinas de la investigación biológica e inclusive en aquellas donde solamente sea necesaria una pequeña muestra de ADN, pudiendo llegar al entendimiento más profundo de los procesos estudiados.

Es evidente que la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), una de las principales instituciones públicas de educación superior en México, debe propiciar el desarrollo de áreas prioritarias que le permitan aplicar los conocimientos científicos en beneficio de la sociedad. Entre las acciones preferenciales que ha emprendido en relación con la Biología Molecular se destacan, el fomento en el desarrollo de grupos de trabajo que implementen técnicas de Biología Molecular en sus investigaciones, en particular en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (DCBS) de la Unidad Iztapalapa de la UAM -(UAMI) y la creación del Laboratorio Divisional de Biología Molecular (LDBM) de esta misma División.

A pesar de estos esfuerzos, todavía no se ha podido involucrar adecuadamente a los estudiantes de las licenciaturas de la DCBS (Biología, Biología Experimental, Hidrobiología, Ingeniería Bioquímica Industrial, Ingeniería en Alimentos y Producción Animal) en el manejo de las técnicas de Biología Molecular, ya que en las unidades de enseñanza aprendizaje (UEA) que pueden hacerlo actualmente, como son la Bioquímica III y la Biología Molecular (esta última solamente para la Licenciatura en Biología Experimental), generalmente no se realizan prácticas de laboratorio. Esto es debido principalmente a que no existe un manual de prácticas actualizado y accesible para que los profesores del área puedan impartir las prácticas de técnicas básicas de la biología molecular y donde los alumnos tengan una guía que los acerque fácilmente a estos métodos. Este vacío ha propiciado que no se asignen recursos ni espacios a las prácticas de laboratorio de la UEA Bioquímica III.

Este “Manual de prácticas de laboratorio. Técnicas Básicas de Biología Molecular” tiene como objetivo llenar dicho vacío a través de la descripción de manera clara de los fundamentos teóricos de los principales métodos y explicar paso a paso a los profesores y alumnos el desarrollo de las técnicas básicas utilizadas en la Biología Molecular, mediante el uso de los materiales, reactivos y equipos con los que cuentan los laboratorios de docencia de la DCBS-UAMI, permitiendo la comprensión y realización de las técnicas propuestas que servirán de base para el desarrollo de métodos más avanzados.

Con el fin de guiar a los alumnos en la revisión de los conocimientos necesarios previos al desarrollo del trabajo de laboratorio y reforzar posteriormente los conocimientos adquiridos, se plantean cuestionarios pre y post-práctica.

Es importante señalar que este manual, además de apoyar los Programas de Estudio de Bioquímica III y Biología Molecular, también puede servir de texto de la UEA Técnicas Básicas de Biología Molecular (trimestre VII), que es parte de la propuesta de modificación al Plan de Estudio vigente de la Licenciatura en Biología Experimental, ya que cubre la mayor parte del contenido sintético del Programa de Estudio de esta UEA (Tema 1 Enzimas utilizadas en Biología Molecular; Tema 2 Digestión con endonucleasas de restricción; Tema 3 Vectores de clonación; Tema 4 Extracción de ADN total y electroforesis de ADN; Tema 7 PCR). También puede ser usado en la parte práctica de la UEA Biología Molecular, que pertenece a las propuestas de modificación de los Planes de Estudio de las Licenciaturas en Ingeniería en Alimentos e Ingeniería Bioquímica Industrial.

Al final se incluyen dos anexos que se pueden utilizar como prácticas, a juicio del profesor y tomando en cuenta la experiencia de los alumnos en el manejo de las micropipetas y la microcentrífuga, así como en la preparación de soluciones y medios de cultivo, así como la preparación de diluciones a partir de

soluciones concentradas. Con base en la experiencia adquirida en la impartición del laboratorio de las UEA Bioquímica III y Biología Molecular, para los alumnos de la primera UEA es necesario que ambos anexos se tomen como prácticas, mientras que para los alumnos de la segunda UEA sólo es necesario que el anexo 2 se imparta en forma de práctica.

Mejorar la calidad de la enseñanza y el aprendizaje es la principal motivación para la realización de este manual.

México D. F. diciembre de 2011.

Medidas generales de seguridad en el Laboratorio de Biología Molecular

(Tomado del Manual de Seguridad del LDBM, DCBS-UAMI, 2008)

Para permitir la seguridad de los alumnos que realizan las prácticas aquí descritas, se deben seguir las siguientes normas:

1. No comer, tomar bebidas, fumar, ni mascar chicle.
2. No correr ni empujarse dentro del laboratorio.
3. No cepillarse el cabello ni aplicarse maquillaje
4. Siempre usar bata cuando se permanezca en el laboratorio y guantes para las actividades que se indiquen.
5. Calzar zapatos cerrados y de suela antiderrapante.
6. Cuando se empleen los guantes, no tocar objetos de uso común (apagadores, manijas de puertas, instrumentos de escritura, teclados y "ratón" de la computadora, etc.) ni partes del cuerpo (cara o cabello).
7. No utilizar ningún equipo del laboratorio (refrigerador, congelador, horno de microondas, etc.) para almacenar o preparar alimentos.
8. No pipetear ninguna solución con la boca.
9. No oler directamente, ni probar ninguna sustancia utilizada en el laboratorio.
10. Informarse previamente de los riesgos de salud a los que se exponen por el uso de las sustancias químicas que se manejan en el laboratorio.
11. Limpiar el espacio de trabajo antes y después de utilizarlo.
12. No obstruir el paso entre las mesas, ni las salidas del laboratorio.
13. No utilizar material de vidrio dañado o astillado.
14. Utilizar la campana de extracción de humos cuando se trabaje con los ácidos líquidos.
15. Manejar sustancias tóxicas, irritantes, inflamables, cancerígenas o mutagénicas en las áreas destinadas para su uso y con la protección adecuada.
16. No dejar destapados los frascos que contengan sustancias químicas o algún material estéril.
17. Respetar la asignación de espacios y reactivos.
18. Al terminar de trabajar, guardar o entregar el material limpio y seco.

NOTA: Ante una situación de urgencia dar aviso inmediatamente a su profesor o profesora; en caso necesario se deberá mantener la calma y abandonar las instalaciones en orden.

Medidas especiales de seguridad en el Laboratorio de Biología Molecular

Debido al manejo de bacterias modificadas genéticamente, así como reactivos y equipos especiales que pueden ser peligrosos, se deben seguir las siguientes medidas de seguridad:

- **Manejo de bacterias (*Escherichia coli*)**

Las bacterias *Escherichia coli* no son patógenas, forman parte de la *fauna* bacteriana normal del intestino delgado, sin embargo pueden ser un peligro biológico si no son manejadas adecuadamente, ya que se puede generar una gastroenteritis (dolor abdominal, fiebre y diarrea).

1. Para evitar que el cultivo se contamine es necesario realizarlo en un área estéril (junto a un mechero) y se deben de usar guantes.
2. No acercar la boca o nariz a los tubos o puntas de pipeta que contengan o hayan estado en contacto con el cultivo bacteriano.
3. Tomar el cultivo bacteriano solamente con las pipetas serológicas estériles.
4. Desinfectar el material que haya estado en contacto con las bacterias. Los líquidos se vierten en un baño de agua con hipoclorito de sodio ("clarasol" limpiador). Los sólidos se depositan en una bolsa para autoclave. Esterilizar posteriormente a 121°C durante 15 minutos y tratar como residuo normal.
5. Lavarse las manos **siempre antes** de salir del laboratorio.

- **Uso del transiluminador**

El transiluminador (UVP Illuminator®) trabaja con luz ultravioleta de onda media (302 nm), por lo que debe evitarse al máximo mirarla directamente durante la visualización del ADN. La exposición a ella debe de ser mínima y **EMPLEANDO SIEMPRE PROTECCIÓN PARA CARA, OJOS** (careta y/o lentes) **Y MANOS** (guantes).

- **Manejo del Bromuro de Etidio (EtBr)**

El bromuro de etidio (EtBr; del idioma inglés Etidium Bromide; figura 1) es un agente mutagénico (induce mutaciones) de efecto acumulativo y se sospecha que es carcinógeno, ya que se intercala entre el ADN. Debe evitarse el contacto con las manos, piel y ojos, por lo que **SE DEBERÁN UTILIZAR GUANTES DURANTE EL TIEMPO QUE SE MANIPULE ESTE COMPUESTO**. Cuando se vayan a preparar las soluciones de EtBr, se recomienda utilizar guantes de nitrilo, en lugar de los de látex, ya que estos últimos brindan menor protección. Cuando se trabaje con las soluciones líquidas de EtBr se recomienda cambiarse los guantes constantemente y **NO TOCAR OBJETOS DE USO COMÚN AL TENER LOS GUANTES PUESTOS**.

Los geles teñidos con EtBr no deben eliminarse en la basura convencional, sino a través de los sistemas de eliminación de mutágenos inactivándolos e incinerándolos.

En caso de alguna contaminación con la solución líquida de EtBr en piel u ojos, avise a su profesor y enjuáguese con abundante agua por 15 minutos.

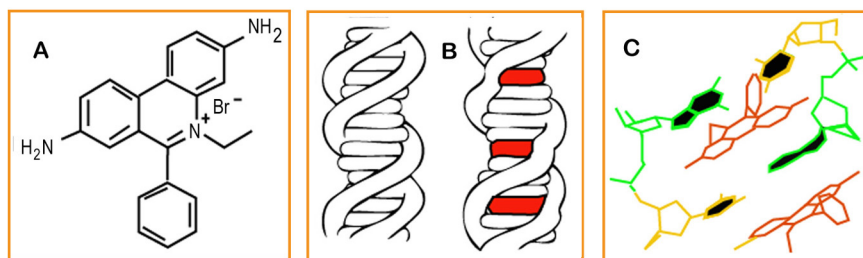


Figura 1. A) Estructura del bromuro de etidio (EtBr, Bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenil fenantridinio). B) El EtBr (naranja) se intercala entre las bases de la doble cadena de ADN, debido a su estructura plana. C) En la figura de la derecha, se representan las bases nitrogenadas en negro interaccionando con el EtBr (naranja), mientras que las desoxirribosas de cada nucleótido se representan en amarillo y verde. (Tomado de: www.steve.gb.com/science/genetics.html ; <http://www.protocol-online.org/biology-forums/posts/13350>; [http://en.wikipedia.org/wiki/Intercalation_\(chemistry\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Intercalation_(chemistry)))

Todos los desechos de EtBr deben ser considerados como "TÓXICOS", lo cual se aplica a los desechos líquidos y sólidos que entraron en contacto con la solución de EtBr, como por ejemplo: puntas desechables, guantes, tubos de microcentrífuga, papel absorbente, etc.

Cabe señalar que en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la DCBS, de la UAMI se recolectan los desechos contaminados con EtBr y, a través de la Secretaría de la Unidad, una empresa contratada para tal efecto los retira y se encarga de su incineración, la cual es la única forma de descontaminación.

Práctica 1

Aislamiento de ADN Plasmídico Bacteriano por Lisis Alcalina. Minipreparación (“Miniprep”)

Introducción

Los plásmidos son moléculas de ADN circular, extracromosómico, presente en bacterias, capaces de llevar a cabo su replicación en forma autónoma y portan uno o más genes que, por lo general, codifican para proteínas que le confieren resistencia a los antibióticos, por lo que han sido útiles vehículos en la clonación molecular. En esta práctica se aislará ADN plasmídico del resto de los componentes celulares bacterianos por el método de lisis alcalina, donde se rompen las células mediante un choque alcalino (NaOH) y un detergente (dodecil sulfato de sodio; SDS) y se precipita el plásmido con etanol.

El plásmido que con frecuencia se utiliza para realizar clonaciones y el que mejor se conoce es el pBR322. Éste fue el primer plásmido artificial en donde un investigador mexicano, el Dr. Francisco G. Bolívar Zapata participó en su construcción (Bolívar *et al.*, 1977) y se convirtió en una de las primeras herramientas para la introducción de genes específicos en una bacteria, según lo requiera el investigador.

El plásmido pBR322 (4,361 pares de bases; pb) contiene un origen de replicación, así como un gen de resistencia a la ampicilina y uno a tetraciclina, los cuales le confieren a las bacterias portadoras la capacidad de crecer en medios bacteriológicos en presencia de dichos antibióticos. El trabajo consistió en introducir el gen que se quería producir (en este caso, el de la insulina) en el interior del gen de resistencia a la ampicilina, reemplazándolo, de tal manera que si el gen nuevo estaba presente, la bacteria perdería la capacidad de crecer en el medio con el antibiótico y, por lo tanto, señalaría que es portadora del gen de interés. Esto es llamado “selección negativa”, porque se busca que la colonia de bacterias pierda una función; en este caso, la de resistir a la ampicilina. Esto permitió separar a las células que poseen el gen de insulina de las que no lo incorporaron.

El plásmido pBR322 (figura 2) además contiene sitios de restricción (corte) donde se pueden introducir fragmentos de ADN extraño sin afectar la autorreplicación del mismo, los fragmentos con longitud de entre 5 y 10 kilopares de bases (1 Kb = 1000 pb) son clonados en este vector de manera muy eficiente, fragmentos más largos tienden a ser inestables (Bolívar, *et al.*, 1977). Actualmente es distribuido por diferentes compañías que venden reactivos de Biología Molecular, incluyendo Invitrogene®, Promega®, Fermentas®, New England Biolabs®, etc.

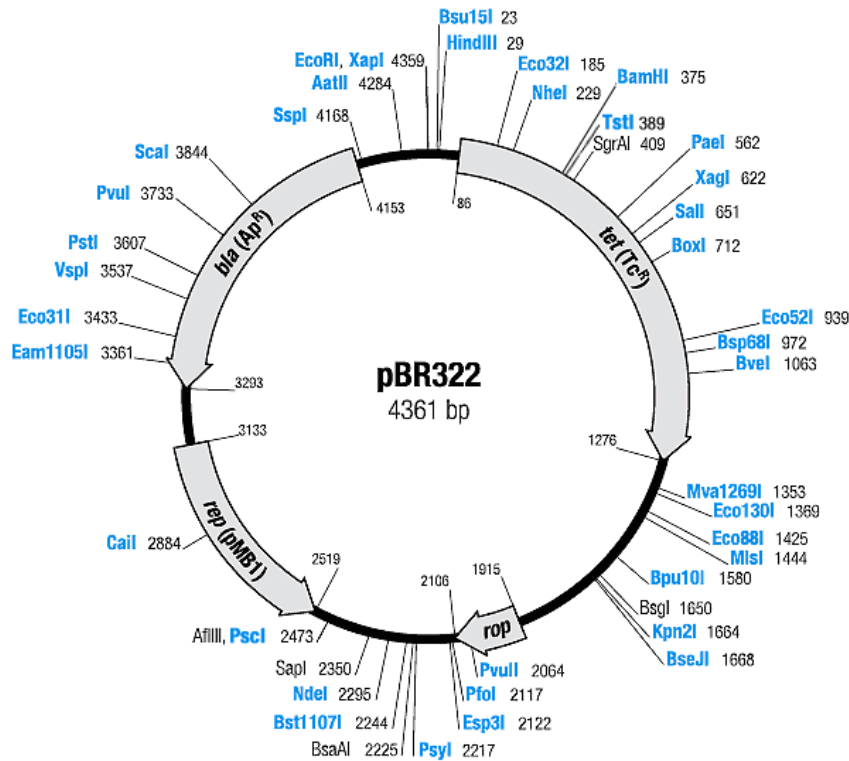


Figura 2. Mapa de restricción del plásmido pBR 322, uno de los primeros vectores de clonación utilizados en la ingeniería genética. Contiene: (1) la secuencia rep pMB1, responsable de su replicación; (2) el gen rop, que codifica una proteína que estabiliza los complejos RNA I – RNA II; (3) el gen bla (Ap^R) que codifica a la proteína beta-lactamasa, que confiere resistencia al antibiótico ampicilina; (4) el gen tet, (Tc^R) que confiere resistencia al antibiótico tetraciclina. La numeración de los 4361 pb sigue el sentido de las manecillas del reloj, donde el número 1 se ubica entre los genes de resistencia a antibióticos.

<http://www.fermentas.com/techinfo/nucleicacids/mappbr322.htm>; Bolivar et al., 1977)

Para realizar el crecimiento de las bacterias se utiliza el medio de cultivo denominado LB (Luria/Bertani), cuyo nombre se debe a sus creadores, Salvador Luria y Giuseppe Bertani, que contiene los nutrientes necesarios para promover el crecimiento de las bacterias, incluyendo péptidos, aminoácidos, vitaminas y minerales. Contiene tres ingredientes principales: triptona, extracto de levadura y cloruro de sodio. La primera provee la fuente de carbono y nitrógeno (en forma de péptidos de diferentes longitudes), el segundo componente es rico en vitaminas y elementos traza, mientras que el último aporta los iones de sodio necesarios para el balance osmótico. Para promover un crecimiento más rápido se puede suplementar el medio con glucosa, como fuente de carbono (Sambrook y Russell, 2001).

⦿ **Precaucion:** Las bacterias *Escherichia coli* no son patógenas, sin embargo pueden ser un peligro biológico si no son manejadas adecuadamente, provocando desde dolor abdominal y diarrea (gastroenteritis) hasta la muerte por deshidratación. **Se deberá evitar el contacto directo con las bacterias, por lo que no se debe pipetear ninguna solución con la boca, siempre usar guantes y lavarse las manos** después de manipular las bacterias y antes de comer o beber. Los desechos tienen que ser manejados por separado para su posterior incineración. Para evitar que el cultivo se contamine es necesario realizarlo en un área estéril. Ver “Medidas Especiales de Seguridad en el Laboratorio de Biología Molecular”.

Objetivo general

Extraer ADN plasmídico presente en bacterias por medio de la técnica de lisis alcalina y comparar este método con otros reportados en la literatura.

Material y equipo

Material por grupo

- 2 Pipetas serológicas de 10 mL (estériles)
- Incubador con agitación (que permita 37 °C)
- Microcentrífuga (Eppendorf, modelo 5415)
- Vortex
- Hielo frapé
- Hielo seco/acetona o ultracongelador (temperatura igual o menor a -70 °C)

Material por equipo

- 1 Tubo cónico de polipropileno de 15 mL (Marca Falcon, estéril)
- 4 Tubos estériles para microcentrífuga tipo Eppendorf, de 1.5 mL
- Micropipetas de volumen variable 10 a 100 µL
- Micropipetas de volumen variable 100 a 1000 µL
- Soporte para micropipetas
- Puntas para las respectivas micropipetas (estériles)

Material biológico

- Bacterias *Escherichia coli* transformadas con algún plásmido (pBR322)

Soluciones y reactivos

NOTA: La preparación de soluciones concentradas y sus diluciones se describe con detalle en el anexo 2

Por equipo

- 5 mL de medio de cultivo LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL)
- Acetato de Sodio 3 M
- Etanol absoluto y al 70% en agua estéril
- Solución GTE* (500µL de GTE que contiene: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM.)
- Solución TE (10 mL de TE que contiene: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM)
- NaOH/SDS* (500µL de NaOH/SDS con NaOH 0.2N y SDS 1%)

* Soluciones que deben ser preparadas al momento de ser utilizadas debido a que se precipitan o se contaminan a temperatura ambiente y posteriormente se deberá desechar el sobrante.

Método

Crecimiento de bacterias

NOTA: A juicio del profesor y con base en la experiencia de los alumnos, él puede hacer la inoculación del medio de cultivo LB con las bacterias transformadas o solicitar que los alumnos realicen este procedimiento un día antes de la práctica. En caso de que la sesión se lleve a cabo en lunes, la inoculación puede hacerse el viernes anterior, lo más tarde posible.

1. Un día antes de la práctica se colocará una alícuota de 20 µL de bacterias *E coli* transformadas con el plásmido pBR322 y se depositarán en 3 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) contenido en un tubo cónico de polipropileno de 15 mL con tapa y estéril.
2. Se prepara un control negativo en donde se colocan 3 mL de medio de cultivo sin bacterias.
3. El medio inoculado y el control se incuban a 37° C, con agitación constante, por 12-18 h para permitir el crecimiento exponencial de las bacterias.

Aislamiento de plásmidos por lisis alcalina

1. Al día siguiente, en condiciones estériles, transferir 1.5 mL del cultivo de bacterias en un tubo estéril de 1.5 mL y guardar el resto en el tubo cónico de 15 mL a 4° C, cuidando que no se contamine (éstas servirán si se requiere repetir la extracción o realizar un cultivo de mayor volumen).
2. Centrifugar a 14,000 g (o máxima velocidad) por 20 segundos.
3. Decantar el sobrenadante y el precipitado (botón o "pellet") se resuspende en 100 µL de la solución GTE.
4. Agregar 200 µL de una solución recién preparada de NaOH/SDS y agitar suavemente por inversión.
5. Pasar a hielo frapé durante 5 minutos y agregarle 150 µL de acetato de sodio 3 M y mantener en hielo durante 5 minutos.
6. Agitar en "vortex" por 2 segundos y regresar al hielo por 5 minutos.
7. Centrifugar a 14,000 g durante 3 minutos y recuperar el sobrenadante con una micropipeta (aproximadamente 100-200 µL), vaciarlo en un tubo nuevo.

8. Agregarle 0.8 mL de etanol absoluto, agitar por inversión y mantener a -70°C (ultracongelador o hielo seco/acetona) por al menos 30 minutos para permitir la precipitación del ADN.

NOTA: En caso necesario, se puede dejar precipitando el plásmido en etanol absoluto por mayor tiempo.

9. Centrifugar a 14,000 g (o máxima velocidad) por 10 minutos.
10. Decantar con cuidado el sobrenadante y lavar el "pellet" con 1 mL de etanol al 70%.
11. Centrifugar a 14,000 g por 5 minutos.
12. Decantar el sobrenadante y asegurarse de que no queden residuos de etanol.
13. Eliminar la mayor cantidad de etanol por aspiración con vacío o limpiado con un aplicador con algodón.

NOTA: no secar completamente para permitir una mejor resuspensión del "pellet".

14. Resuspender el "pellet", el cual contiene el plásmido, en 20-50 μL de TE pH 8.0.

NOTA: El buffer TE aumenta la estabilidad del ADN en muestras almacenadas a largo plazo o de uso frecuente, pues inhibe DNAsas presentes en la muestra.

15. Guardar a 4°C si se usará pronto o a -20°C si se desea preservar por más tiempo.

Resultados

Una vez que se ha decantado el sobrenadante (paso 12) debe observarse el precipitado o "pellet" de color blanco en el fondo del tubo, el cual contiene el ADN plasmídico extraído de las bacterias. Describir la formación del "pellet" de ADN y compararla con la que se obtuvo después de centrifugar las bacterias (paso 2).

Comparar el procedimiento realizado con otro método de extracción de ADN de plásmidos de bacterias reportado (p. ej. Calentamiento o "boiling method", filtración en membranas, etc.), señalando el tiempo de realización, el costo y el empleo de materiales tóxicos. Señale si el método reportado también puede ser implementado en los laboratorios de docencia de la UAM y las modificaciones que sugeriría para su realización.

Resolver el cuestionario post práctica correspondiente.

Cuestionario pre práctica 1

1. Señalar los 3 pasos fundamentales para aislar ácidos nucleicos y cuál es el fundamento de cada paso.
2. Mencionar tres ventajas de utilizar bacterias (*E. coli*) para donar ADN y 3 tres precauciones que se deben seguir al manejarlas.
3. Describir cuáles es el fundamento para aislar ácidos nucleicos por medio de la técnica denominada "lisis alcalina".
4. Explicar cuál es la razón de agregar ampicilina al medio de cultivo donde crecerán las bacterias transformadas. Fundamenta la respuesta con base en el tipo de plásmido utilizado.
5. Explicar las principales diferencias entre la transformación y la transfección, cuando se trata de introducir material genético en un organismo.

Cuestionario post práctica 1

1. Señalar la razón por la cual se recomienda utilizar un control negativo de cultivo, el cual contiene medio de cultivo, pero sin las bacterias transformadas.
2. Describir brevemente cuál es la función de las siguientes soluciones: a) GTE (glucosa, Tris-HCl, EDTA), b) SDS/NaOH, c) TE (Tris-HCl, EDTA), d) acetato de sodio 3 M
3. Explicar una razón por la cual se recomienda precipitar el ADN en temperaturas muy bajas (inferior a -70°C).
4. Decir por qué razón es necesario colocar los tubos que se van a centrifugar con la unión de la tapa hacia la parte externa de la centrífuga y qué relación tiene con el lugar donde se formará el "pellet".
5. Señalar una razón por la cual es mejor resuspender al ADN en TE que en agua y qué sucede si quedan restos de etanol en la muestra de ADN.

Práctica 2

Separación del plásmido por electroforesis en Geles de Agarosa

La electroforesis es el estudio del movimiento de moléculas cargadas en un campo eléctrico y se emplea particularmente para la caracterización y análisis de polímeros biológicos cargados, como las proteínas y los ácidos nucleicos. En la electroforesis que se empleará en esta práctica, el medio de soporte utilizado es la agarosa, producto extraído de algas marinas que forma una matriz gelatinosa al polimerizar sus monómeros de galactopiranososa que se utilizará TBE, que es una solución amortiguadora altamente iónica.

Los ácidos nucleicos se pueden separar en función de su peso molecular y de su conformación: circular, circular hendida, lineal, "super-enrollada", mono/bicatenario, así como de la concentración de la agarosa. Con una misma conformación, la velocidad de migración del ADN es inversamente proporcional al logaritmo de sus pesos moleculares, de tal manera que fragmentos de menor peso molecular presentan una mejor separación en concentraciones de agarosa mayor y viceversa.

La separación efectiva de los fragmentos de ADN depende, tanto de la masa molecular como de la carga de los distintos fragmentos (en el caso del ADN siempre es negativa a pH fisiológico), por lo que se tiene una relación carga-masa; de esta manera, fragmentos de ADN lineal migrarán a diferentes velocidades dentro de geles con diferentes concentraciones de agarosa (Tabla 1), por lo que es importante determinar la concentración óptima a la cual se obtiene la mejor separación (resolución).

Una forma fácil y económica de determinar el tamaño molecular aproximado de un fragmento de ADN es mediante la comparación con un marcador de tamaño molecular, el cual se separa en el mismo gel de agarosa mediante electroforesis y, por lo general, se coloca en el carril primero, último o ambos. La separación de los fragmentos de ADN, medidos en pares de bases (pb) o kilopares de bases (Kb) se realiza en escala logarítmica, con lo que se puede estimar el tamaño de otros fragmentos de ADN. Los fragmentos pueden resultar del corte con enzimas de restricción de un genoma viral (e.g. fago lambda/Hind III) o de fragmentos de oligonucleótidos de tamaño molecular definido con incrementos en múltiplos exactos entre las bandas, semejando a una escalera (ej. 1 Kb DNA "Ladder"; figura 3).

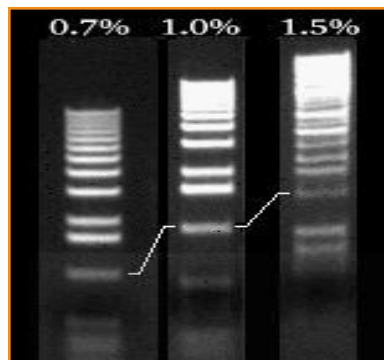


Figura 3. La imagen corresponde a la separación por electroforesis del marcador de peso molecular UltraRanger 1 Kb DNA Ladder (Número de Catálogo 12100, Normen Biotek Corporation, Canadá; <http://www.norgenbiotek.com/index.php?id=12100>) en tres geles de agarosa con diferentes concentraciones (0.7, 1.0 y 1.5 %). Con una línea se indica la presencia de la banda que corresponde a 1,000 pb y se observa que a mayor concentración de la agarosa el desplazamiento de esta banda es menor.

Concentración del gel de agarosa (% p/v)	Rango de peso molecular (pb)
0.3	50,000-5,000
0.5	25,000-2,000
0.7	10,000-800
1.0	8,000-500
1.2	5,000-400
1.5	3,000-200
2.0	2,000-100

Tabla 1. Relación entre las concentraciones de agarosa para preparar geles utilizados en la electroforesis y los rangos de los tamaños de los fragmentos de ADN que se desea separar. (Modificado de Boyer, 1993)

Para la visualización del ADN se emplea el EtBr, un colorante fluorescente que al intercalarse entre las bases de los ácidos nucleicos amplifica su fluorescencia 25 veces, y en presencia de luz ultravioleta (UV) se observa de color rojizo. Cuando la imagen se captura en un analizador de imágenes con filtro anaranjado, las bandas

se observan blancas y el fondo oscuro.

- **Precaución:** No tocar los cables de corriente ni la cámara de electroforesis cuando se encuentra en funcionamiento, ya que una **descarga de alto voltaje** puede ser fatal.

El **bromuro de etidio** es un mutágeno y potencial cancerígeno, por lo que se deberá **manejar con guantes** y bajo la estricta supervisión del profesor. **No permitir que su ropa se contamine** con la solución, en caso necesario lavar con abundante agua y jabón. Los desechos se deberán depositar en un envase especial (perfectamente etiquetado) e inactivarse para ser incinerados.

El transiluminador trabaja con **luz ultravioleta** de onda corta, por lo que debe evitarse al máximo mirarla directamente durante la visualización del ADN. La exposición a ella debe de ser mínima y empleando siempre protección para cara, ojos (mascara y/o lentes) y manos (guantes).

Objetivo General

Separar las diferentes formas del ADN plasmídico en función de sus pesos moleculares, mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa.

Material y equipo

Material por grupo

- 1 Matraz Erlenmeyer de 1 L
- 2 Cámaras horizontales para electroforesis de ácidos nucleicos (BioRad; Mini-Sub cell GT® o similares)
- 1 Fuente de poder
- 1 Transiluminador (UVP Illuminator®)
- 1 Horno de microondas

Material por equipo

- Muestras de ADN (obtenidas en la práctica 1)
- 1 Micropipeta de volumen variable 1 a 10 µL

- 1 Micropipeta de volumen variable 10 a 100 μL
- 1 Micropipeta de volumen variable 100 a 1000 μL
- Soporte para micropipetas
- Puntas para las respectivas micropipetas (estériles)
 - 1 Celda para espectrofotómetro (rango de ultravioleta)
 - 1 Espectrofotómetro para UV
 - 2-3 cuadrados de papel Parafilm®

Soluciones y reactivos

NOTA: La preparación de soluciones concentradas y sus diluciones se describe con detalle en el anexo 2, las cuales pueden ser preparadas por los alumnos, a juicio del profesor.

- Agarosa** (grado Biología Molecular)
- 200 mL de Solución TBE 0.5 X (diluido a partir de **5X TBE*** con agua estéril). Este volumen es suficiente para llenar la cámara de electroforesis BioRad Mini-Sub cell GT®.
- Solución TE (10 mL TE que contiene: ***Tris-HCl 10mM, *EDTA 1mM**)
- Solución de carga para ADN** o "Loading Buffer" 6X
- Solución de bromuro de etidio**, 1 mg/mL
- Marcador de alto peso molecular fago/Hind III**
- * Las soluciones concentradas serán preparadas por los alumnos, ver anexo 2
- ** Reactivos proporcionados por el profesor.

Método

A. Cuantificación de la concentración de ADN

1. Se emplea una celda de cuarzo para medir la concentración de ADN en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (uv). Se ajusta a cero con 500 μL de TE, pH 8.0, como "blanco" (0% absorbancia).
2. A los mismos 500 μL de TE, agregar 1 μL del ADN aislado en la práctica 1, homogenizando bien por inversión y leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm.
3. La concentración del ADN de doble cadena se calcula de la siguiente manera: $1.0\text{D } A_{260} \approx 50 \mu\text{g/mL}$, por lo que el valor obtenido se multiplica por el factor 50 y por la dilución realizada, en este caso por el factor de dilución 500.
4. La lectura a 260 nm indica la presencia de ácidos nucleicos (longitud de onda promedio a la cual absorben las bases nitrogenadas) y la lectura a 280 nm mide la presencia de proteínas contaminantes (longitud de onda promedio a la cual absorben los aminoácidos aromáticos), por lo que el cociente 260/280 debe ser igual o mayor de 1.6 para ADN y 1.8 para ARN para considerarlos aceptablemente puros.
5. Después de realizar la cuantificación y obtener la concentración del plásmido, se hacen los cálculos necesarios para cargar 1 μg de ADN en el gel de agarosa.

B. Preparación de la cámara de electroforesis

1. La cámara, el contenedor del gel y el peine tienen que estar **completamente limpios**.
2. El contenedor del gel se prepara poniendo los soportes laterales y se coloca el peine en posición donde se desea queden hechos los pozos para las muestras, posteriormente se depositará la agarosa derretida. NOTA: La cámara tiene que estar colocada de forma nivelada para un correcto corrimiento.
3. Por separado, preparar el gel de agarosa al 0.8% (p/v), pesando 0.4 g de agarosa (grado Biología Molecular, Gibco BRL o Sigma) y se adiciona 50 mL de TBE 0.5X. NOTA: Esta concentración de agarosa separa moléculas de ADN de 0.8 a 10 Kb.
4. Para que se disuelva la agarosa en el buffer TBE 0.5X calentar en horno de microondas hasta que la solución esté completamente transparente.
5. Dejar que la agarosa se enfríe hasta que la temperatura sea soportable al toque con la palma de la mano y verterla en el contenedor del gel.
6. Esperar a que el gel polimerice completamente y retirar el peine donde quedarán bien señalados los pozos.
7. Agregar la solución de TBE 0.5X a la cámara, en suficiente cantidad para cubrir perfectamente el gel.

C. Preparación de la muestra y electroforesis

Cada equipo preparará las muestras obtenidas en la práctica 1 y las pondrán en el gel.

1. Tomar con la micropipeta el volumen necesario para depositar 1 μg del ADN aislado en la práctica 1 en un volumen total no mayor a 8 μL , el cual se completa con solución TE. Agregar 2 μL de Buffer de carga para ADN 6X (del idioma inglés "DNA loading buffer") más 0.2 μL de bromuro de etidio y colocarlo sobre una tira de "Parafilm" y mezclar perfectamente. En el caso de que la concentración del ADN sea baja y se requiera más de 10 μL para tener 1 μg del ADN (o no se haya cuantificado la concentración del ADN), se pondrá como volumen máximo de 10 μL .
2. Con una micropipeta de 1-20 μL tomar toda la muestra ya preparada y depositarla en el pozo indicado. NOTA: Evitar tomar aire con la punta de la pipeta, ya que las burbujas producirán que la muestra se salga del pozo. No olvide hacer una relación de muestras y el orden de los pozos.
3. En el carril número 1 depositar el marcador de alto peso molecular para ADN (aproximadamente 1 μg) y de ser posible, dejar un carril vacío antes de las muestras. Este marcador puede ser el ADN del bacteriófago lambda (λ) cortado con la enzima de restricción *Hind* III.

Ubicar perfectamente los electrodos (positivo con positivo y negativo con negativo; es decir rojo con rojo y negro con negro) tanto de la cámara como de la fuente de poder. Cerrar la cámara y aplicar la corriente aproximadamente a 75 V, hasta que el colorante alcance las $\frac{3}{4}$ partes del gel.

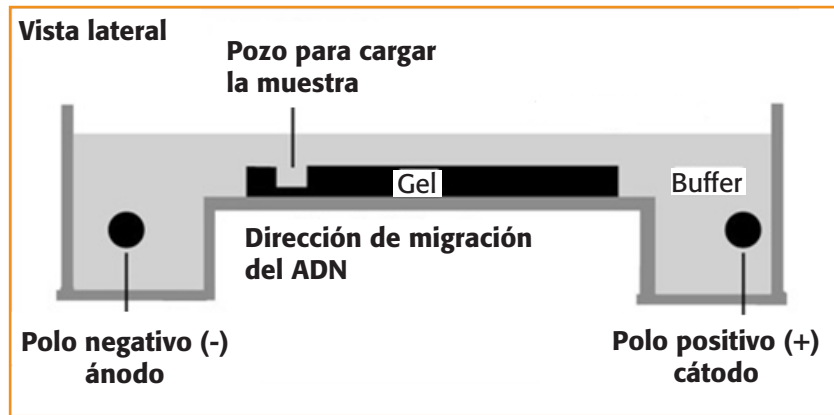


Figura 4. Electroforesis horizontal en agarosa para ADN. El ADN tiene carga eléctrica negativa, por lo que se desplaza hacia el cátodo cuando se somete a un campo eléctrico. La muestra de ADN se deposita en el pozo del gel de agarosa y el buffer de corrimiento electroforético cubre el gel para evitar que se seque por el calentamiento al paso de la corriente eléctrica.

D. Análisis en el transiluminador

1. Al finalizar el tiempo del corrimiento electroforético del gel, observarlo en el transiluminador.
2. Si es posible utilizar un analizador de imágenes para ácidos nucleicos (LDBM, DCBS-UAMI), capturar la imagen y guardarla en formato de imagen (jpg o tif preferentemente). Si se utiliza marcador de peso molecular se puede determinar su tamaño.
3. Desechar el gel en el contenedor especial para geles teñidos con bromuro de etidio para su posterior inactivación e incineración (Ver "Medidas especiales de seguridad en el Laboratorio de Biología Molecular").

Resultados

Realizar la descripción detallada de la imagen del gel, haciendo la comparación de las diferentes bandas de cada carril y entre las diferentes muestras. Determinar el peso molecular aparente de las bandas obtenidas, cuando sea posible.

Resolver el cuestionario post práctica correspondiente.

Análisis de resultados

Los puntos que se deben tomar en consideración para hacer la descripción de los resultados son:

- Para determinar el peso molecular aparente de cada banda se debe comparar con las bandas del marcador de peso molecular, de las cuales se conoce su valor.
- Comparar los valores reales con los esperados (teóricos).

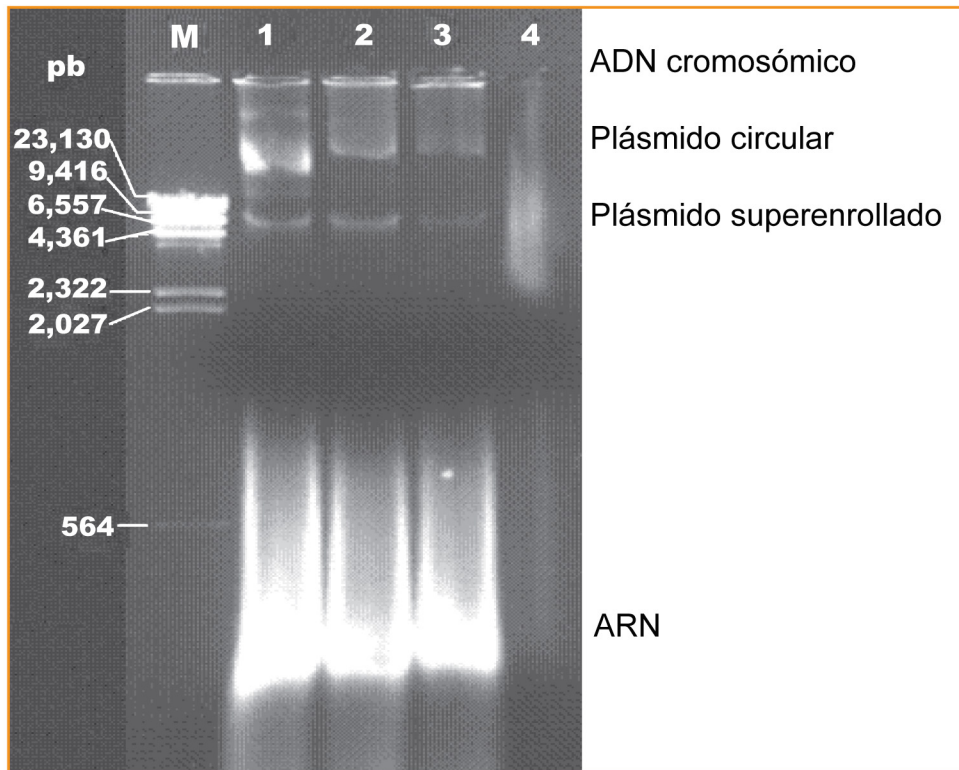


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para la separación del material genético extraído de las bacterias. M=marcador de alto peso molecular (ADN del fago λ cortado con *Hind* III), carriles 1 al 3, diferentes muestras de los productos de la extracción de ADN plasmídico (pBR322). Bandas de superior a inferior: el ADN genómico bacteriano, el plásmido en dos estados de compactación (enrollado y super-enrollado) y el ARN.

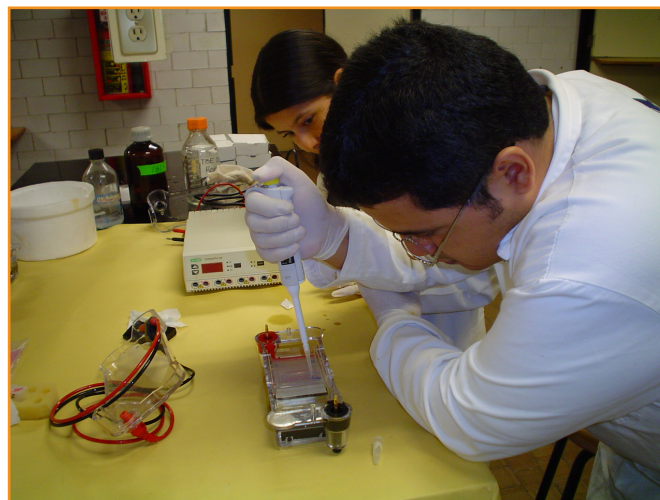


Figura 6. Alumno del curso de Laboratorio depositando la muestra de ADN en el gel de agarosa. El procedimiento es supervisado por una de las profesoras.

La interpretación de los resultados del ADN separado en los geles de agarosa obtenidos en el laboratorio de Biología Molecular no siempre es fácil, principalmente cuando no se tiene experiencia en ello. Con la finalidad de identificar las diferentes posibles conformaciones en que podemos encontrar el ADN del plásmido, se muestra la siguiente imagen tomada del libro DNA Science (Micklos, *et al.* 2003).

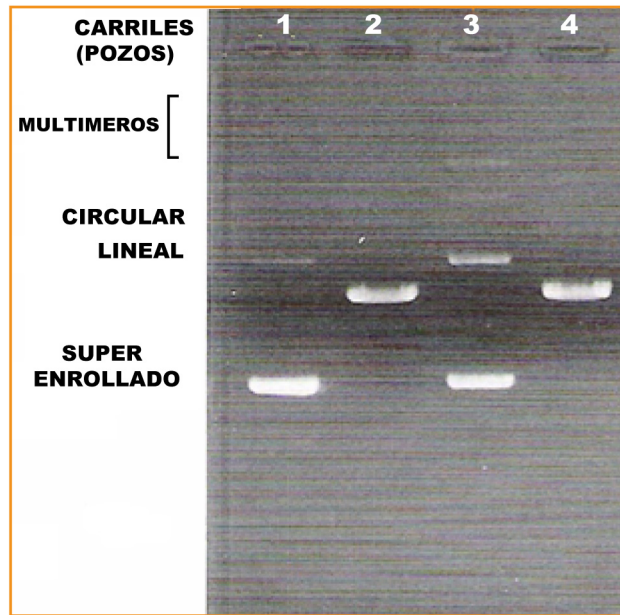


Figura 7. Imagen de un gel de agarosa donde se observan diferentes fragmentos de ADN revelados con EtBr. Se muestra el Plásmido intacto y el cortado con la enzima de restricción *Bam* H1 (carriles 1 y 3), respectivamente. En el carril 1 se observan la forma circular y la forma super-enrollada, siendo esta última de menor peso molecular, por lo que migra a mayor distancia desde el punto de aplicación (pozo). En el carril 3 se observa la formación de multímeros (concatámeros) del plásmido, además de las formas circular y enrollada. Cuando el plásmido es cortado en un sólo sitio de restricción, se observa una sola banda que corresponde al plásmido lineal con peso molecular aparente intermedio entre el circular y el enrollado (Modificado de Micklos *et al.* 2003, p 440).

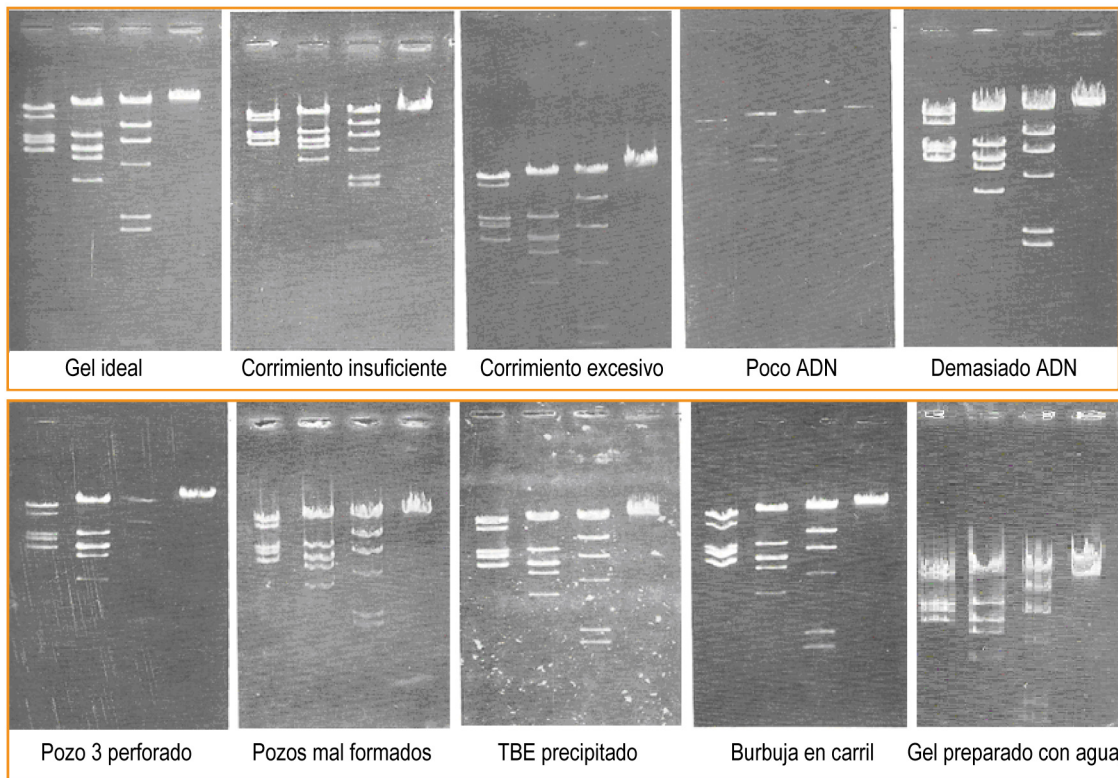


Figura 8. En las imágenes se muestran los problemas más frecuentes que pueden surgir en la separación del ADN por electroforesis en geles de agarosa teñidos con EtBr (Modificado de Micklos *et al.*, 2003).

Los problemas más comunes cuando se separa ADN por electroforesis en geles de agarosa son:

- 1) La degradación del ADN que se observa como “barrido” a lo largo de todo el carril. Este “barrido” es debido a la presencia de fragmentos de oligonucleótidos de diferentes pesos moleculares.
- 2) Material de alto peso molecular y ADN no disuelto que se precipita en los pozos y cuando éstos no están bien formados.
- 3) Separación insuficiente de las bandas de ADN debido a que el corrimiento fue insuficiente o que la muestra se “salga del gel” cuando el corrimiento electroforético es excesivo.
- 4) Que no se aprecien las bandas de ADN cuando se deposita una cantidad de ADN inferior al límite de detección (200 ng), cuando la muestra no ingresa completamente al pozo o cuando no se tiñe adecuadamente con EtBr.
- 5) Por el contrario, cuando se depositan grandes cantidades de ADN (>2000 ng) las bandas se observan poco definidas y “flameadas”.
- 6) Es común que se perforen los pozos con las puntas de las micropipetas, cuando al depositar se baja demasiado la punta, por lo que la banda se deformará o la muestra de un carril perforado se verá con menor intensidad que las demás.
- 7) Cuando el gel de agarosa no polimeriza adecuadamente (tiempo recomendado al menos 30 minutos) los pozos estarán mal formados y las bandas no se verán definidas.
- 8) Cuando el gel se prepara con agua en lugar de amortiguador (TBE o TAE) y cuando éste se precipite se reflejará en la nitidez de la muestra y en el fondo, respectivamente.

Cuestionario pre práctica 2

1. Señalar el fundamento de la separación de ácidos nucleicos por electroforesis en geles de agarosa. Indica cuál es la fase móvil y cuál es la estacionaria.
2. Analizar las principales diferencias entre el uso de geles de agarosa y los de poliacrilamida.
3. Discutir la importancia de utilizar soluciones amortiguadoras (fase móvil) adecuadas y sus funciones.
4. Describir una forma de determinar el peso molecular de un fragmento de ADN mediante la electroforesis en geles de agarosa.
5. Explicar por qué se mide la absorbancia de la muestra (plásmido) a las longitudes de onda de 260 y 280 nm y qué se determina en cada una.

Cuestionario post práctica 2

1. Indicar para qué se utilizaron los siguientes componentes en la presente práctica:
 - a) marcador de peso molecular,
 - b) bromuro de etidio
 - c) solución de carga de ADN ("DNA Loading Buffer")
2. Describir de qué manera los siguientes factores afectan el corrimiento electroforético:
 - a) la temperatura del buffer de corrimiento
 - b) sustituir el buffer de corrimiento por agua
 - c) el tiempo de corrimiento
 - d) la concentración del ADN a separar
 - e) preparar el gel con agua
3. Mencionar cuál es la relación entre la longitud de corrimiento del fragmento de ADN con:
 - a) la concentración del gel de agarosa,
 - b) el peso molecular del ADN
 - c) el voltaje empleado en la electroforesis
4. Señalar que significa que el cociente de los valores de absorbancia 260/280 nm sea mayor o menor a 1.8.
5. Explicar qué otras longitudes de onda son utilizadas para medir otro tipo de contaminantes del ADN.

Práctica 3

Corte del plásmido con enzimas de restricción

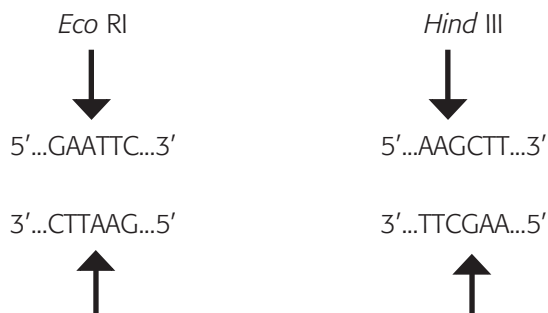
En 1975, Daniel Nathans y Hamilton O. Smith descubrieron las enzimas endonucleasas de ADN, también llamadas enzimas de restricción, y observaron que actúan como “tijeras moleculares” que cortan la doble cadena de ADN en secuencias específicas, sin dañar las bases. Gracias a este descubrimiento se les otorgó el premio Nóbel en 1978 y dio origen a la ingeniería genética.

El corte del ADN con enzimas de restricción es uno de los procedimientos más empleados en Biología Molecular. Estas endonucleasas bacterianas catalizan la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de secuencias de bases específicas del ADN de doble cadena. Cada enzima puede reconocer solamente una secuencia palíndromo, es decir que es la misma si se lee en una cadena en dirección 5' a 3' o en la cadena complementaria, también de 5' a 3'. Es decir, un corte fragmentará el segmento de ADN lineal en dos o generará una estructura lineal si es circular (p. ej. un plásmido).

La función biológica de estas enzimas de restricción es la protección de la bacteria contra el ataque viral por medio de la degradación del ADN invasor, mientras que su propio material genético está protegido de la hidrólisis debido a que sus bases en los sitios de corte se encuentran metiladas.

Hasta la fecha se han aislado y caracterizado más de 350 enzimas de restricción diferentes. La nomenclatura para denominar a cada una de ellas consiste de tres letras que representan el nombre genérico y específico del organismo del cual se aisló; por ejemplo, en esta práctica se emplearán dos enzimas que actuarán sobre el mismo fragmento de ADN plasmídico (*Eco* RI y *Hind* III), donde para la primera enzima toma su nombre de: *E=Escherichia* y *co=coli*, R es la cepa y el número romano I indica que fue la primera que se descubrió en esta bacteria. Por otro lado, la fuente de obtención de *Hind* III es *Haemophilus influenzae* Rd y fue la tercera aislada de dicho microorganismo.

Las secuencias de corte para las siguientes enzimas de restricción son:



Las enzimas de restricción pueden generar dos tipos de corte, cohesivos (adhesivos o pegajosos) y romos (rectos). Los primeros son generados cuando la enzima corta las dos hebras asimétricamente, dejando los extremos de cada hebra en forma de cadenas sencillas, desapareadas que son complementarias con las cadenas del otro extremo y, por ende, pueden unirse fácilmente a secuencias complementarias. Por otro lado, los extremos romos son generados cuando la enzima corta las dos hebras por el mismo lugar, generando dos extremos de doble cadena que no tienen nucleótidos desapareados.

Las enzimas de restricción permiten cortar el ADN de cualquier organismo en pequeños fragmentos llamados fragmentos de restricción. La colección de miles o millones de estos fragmentos se llama biblioteca génica o genoteca.

Objetivo general

Cortar el ADN plasmídico utilizando diferentes enzimas de restricción para generar fragmentos de distintos tamaños.

Material y equipo

Equipo por grupo

- 2 Termobloques (uno se deberá ajustar a 37° y el otro a 95 °C)
- 2 Cámaras para electroforesis de ácidos nucleicos (horizontales)
- 1 Fuente de poder
- 1 Transiluminador
- 1 Horno de microondas

Material por equipo

- Muestras de ADN plasmídico (obtenidas en la práctica 1)
- 1 Micropipeta de volumen variable 1 a 10 µL
- 1 Micropipeta de volumen variable 10 a 100 µL
- Soporte para micropipetas
- Puntas para micropipetas (estériles)
- Tubos de 0.5 mL para microcentrifuga tipo Eppendorf (estériles)
- Bisturí con navaja o navaja de un solo filo
- Hielo frapé

Soluciones y reactivos

Nota: La preparación de soluciones concentradas y sus diluciones se describe con detalle en el anexo 2

- Enzimas de restricción** *Eco* RI, *Hind* III o ambas
- Solución de RNasa A ** (10 µg/mL)
- Buffer de digestión de cada enzima** (10X)
- Agarosa
- Solución TBE* (0.5 X)
- Solución de carga para ADN** (6X)
- Solución de bromuro de etidio** (1 mg/mL)
- Solución TE *
- Marcador de alto peso molecular** (ADN del fago λ cortado con *Hind* III)

* Las soluciones concentradas serán preparadas por los alumnos, ver anexo 2

** Reactivos proporcionados por el profesor.

El transiluminador trabaja con **luz ultravioleta** de onda corta, por lo que debe evitarse al máximo mirarla directamente durante la visualización del ADN. La exposición a ella debe de ser mínima y empleando siempre protección para cara, ojos (mascara y/o lentes) y manos (guantes).

Resultados

Realizar la descripción detallada de la imagen del gel, haciendo la comparación de las diferentes bandas obtenidas en ausencia o presencia de la(s) enzima(s) de restricción empleada(s). Comparar entre las diferentes muestras separadas en cada carril. Determinar el peso molecular aparente de las bandas obtenidas, cuando sea posible.

Resuelva el cuestionario post práctica correspondiente.

Análisis de resultados

Los puntos que se deben tomar en consideración para hacer la descripción de los resultados son:

- Para determinar el número de cortes que puede realizar la enzima es necesario contar el número de fragmentos resultantes y si el ADN es de tipo circular o lineal.
- La suma de los pesos moleculares aparentes de cada fragmento resultante debe ser aproximadamente igual al tamaño del ADN intacto.
- Es importante realizar la comparación entre los fragmentos cortados por cada enzima de restricción y posteriormente compararlos con los cortes realizados al utilizar las enzimas de restricción combinadas.
- Comparar los valores reales con los esperados (teóricos).

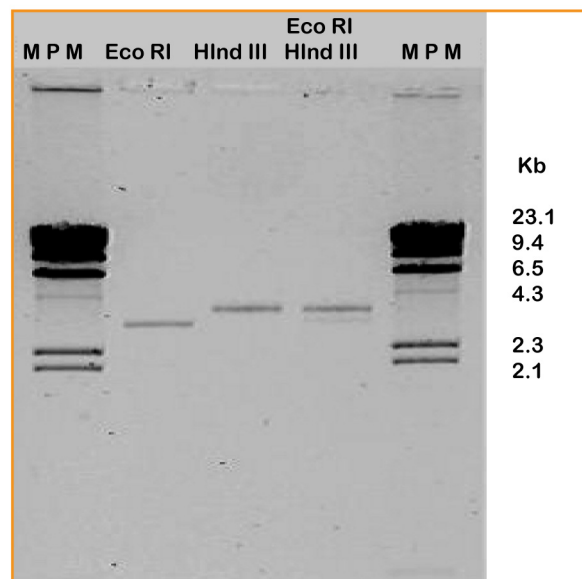


Figura 9. Imagen de un gel de agarosa al 0.8% donde se observan los fragmentos de un plásmido cortado con las enzimas de restricción *EcoRI*, *Hind III* y ambas. MPM=marcador de peso molecular (ADN λ)/*Hind III*)

Cuestionario pre práctica 3

1. Explicar cuáles son las semejanzas y diferencias entre los dos diferentes tipos de endonucleasas de ADN.
2. Señala las razones por las cuales son utilizadas las endonucleasas de restricción tipo II en la tecnología del ADN recombinante.
3. Esquematizar la forma en la cual se cortan los enlaces fosfodiéster de un fragmento de ADN generando extremos romos y uno donde se generen extremos adhesivos. Señalar la ventaja de utilizar enzimas de restricción que generan extremos "pegajosos" o adhesivos en la tecnología del ADN recombinante
4. Explicar dos aplicaciones de la tecnología del ADN recombinante.
5. Señalar al menos tres posibles aplicaciones de los mapas de restricción.

Cuestionario post práctica 3

1. Decir qué tipo de extremos generan las enzimas de restricción utilizadas en la presente práctica y señalar si existe alguna ventaja sobre los otros tipos de extremos.
2. Enlistar las precauciones que deben de seguirse al utilizar enzimas de restricción.
3. Explica si siempre se utilizan las mismas temperaturas para activar a todas las enzimas de restricción y, en caso de que la respuesta sea negativa, decir de qué depende dicha temperatura.
4. Explicar si siempre se utilizan los mismos buffers para activar a todas las enzimas de restricción y, en caso de que la respuesta sea negativa, decir de qué depende la composición de cada buffer.
5. Discutir la relación que existe entre el número de fragmentos de ADN obtenidos después de la digestión con enzimas de restricción y el número de sitios de corte. Señalar si esta relación se mantiene si el ADN es circular o lineal.

Práctica 4

Purificación del ADN plasmídico por centrifugación en columna

Introducción

La obtención de ADN libre de contaminantes (proteínas) es fundamental para aplicaciones posteriores, como lo es la secuenciación o amplificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Por tal motivo es necesario utilizar técnicas de purificación que permitan alto rendimiento en la recuperación del ADN, rápidas y en el caso de la docencia, de preferencia, económicas.

En esta práctica se utilizará una técnica de purificación del ADN mediante columnas de separación por exclusión molecular, utilizando la centrifugación para separar el ADN del gel de agarosa donde se encuentra. Se utiliza algodón que forma una malla en la cual las moléculas más pequeñas (ácidos nucleicos y proteínas) pueden penetrar libremente, al mismo tiempo que obstaculiza el paso de las moléculas más grandes (polímero de agarosa) que quedan atrapadas en el algodón después de la centrifugación.

La agarosa es un polímero que en disolución posee la propiedad de permanecer líquido por encima de 50 °C y formar un gel semisólido al enfriarse. Este gel forma una trama tridimensional de fibras poliméricas dentro del buffer (usualmente TBE) que, en la técnica de electroforesis, permite el paso de los ácidos nucleicos de forma inversamente proporcional entre la concentración del gel de agarosa y el tamaño de los ácidos nucleicos, aunque también influye su conformación (grado de compactación). Cuando la electroforesis se detiene, las moléculas de ácidos nucleicos quedan atrapadas en esta red, aquellas bandas que contengan las formas del ADN que sean de nuestro interés se pueden cortar y purificar por este método.

La técnica de purificación por centrifugación en columna es ampliamente utilizada debido a que es muy económica, rápida y de alto rendimiento para purificar moléculas de ADN, en este caso del plásmido o un fragmento de ADN.

Objetivo general

Purificar el ADN plasmídico obtenido en la práctica 3 por medio de la técnica de centrifugación en columna para su posterior amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Material y equipo

Material por grupo

- 1 Microcentrífuga (Eppendorf, modelo 5415)
- 2 Cámaras para electroforesis de ácidos nucleicos (horizontales)
- 1 Fuente de poder
- 1 Transiluminador (UVP Illuminator®)
- Ultracongelador del Laboratorio Divisional de Biología Molecular (S-032)

NOTA: En caso de no contar con ultracongelador, se puede utilizar hielo seco con etanol o acetona, lo que genera temperaturas de hasta -78 °C.

Material por equipo

- 1 tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL por muestra a separar
- 1 tubo tipo Eppendorf de 0.5 mL por muestra a separar
- 1 Micropipeta de volumen variable 1 a 10 μ L
- 1 Micropipeta de volumen variable 10 a 100 μ L
- Soporte para micropipetas
- Puntas para micropipetas (estériles)
- Algodón y palillos
- 1 aguja hipodérmica calibre 20 G \times 38 mm

Soluciones y reactivos

NOTA: La preparación de soluciones concentradas y sus diluciones se describe con detalle en el anexo 2

- Acetato de sodio 3M*
- Etanol absoluto
- Solución TE*
- Agarosa
- Solución TBE* 0.5 X
- Solución de carga para ADN**
- Solución de bromuro de etidio**
- Marcador de alto peso molecular fago λ /Hind III**

* Las soluciones concentradas serán preparadas por los alumnos, ver anexo 2

** Reactivos proporcionados por el profesor.

Método

A) Preparación y ensamblaje de los dispositivos de la columna (modificado de Pham *et al.*, 1996)

NOTA: Deben emplearse materiales nuevos y estériles.

1. Desprender la tapa del tubo para microcentrífuga de 1.5 mL al ras. La tapa deberá guardarse.
2. Desprender la tapa del tubo para microcentrífuga de 0.5 mL y con una aguja hacer un orificio en el fondo del mismo. La tapa puede desecharse.
3. La punta amarilla (para micropipeta) deberá tener empaquetado al fondo un pedazo de algodón. Con la punta conteniendo el algodón se coloca firmemente en el tubo de 0.5 mL, el cual a su vez es colocado en el tubo mayor (1.5 mL), de esta forma la columna queda preparada para ser usada.

NOTA: El orificio debe ser lo suficientemente grande para que la parte más delgada de una punta amarilla lo atraviese de 2-5 mm. Si el orificio es muy grande la punta perforará también el tubo de 1.5 mL al centrifugarlo (ver figura 10)

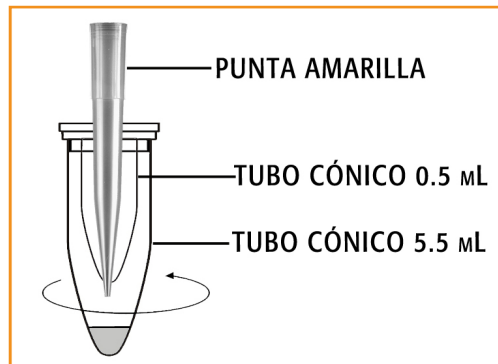


Figura 10. Columna para purificar una muestra de ADN.

B. Purificación por centrifugación

1. Introducir el fragmento de gel (obtenido en la práctica 3) en el orificio más amplio de la punta amarilla, en caso necesario ayudarse de un palillo estéril.
2. Congelar el dispositivo con la muestra a -70°C (en ultracongelador) por un periodo de 15 minutos.
3. Centrifugar a $12,000 \times g$ por 10 minutos y recuperar el líquido obtenido en el tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL
4. Para precipitar el ADN, medir el volumen del líquido con una micropipeta. Agregar un volumen de acetato de sodio 3M igual a la décima parte del volumen medido y 1 mL de etanol absoluto.
5. Agitar por inversión y congelar el tubo a -70°C por 10-30 minutos. A esta temperatura se puede quedar indefinidamente sin que la muestra se dañe.
6. Centrifugar el tubo a $14,000 \times g$ por 10 minutos.
7. Descartar el sobrenadante por aspiración con vacío o limpiado con un aplicador con algodón y dejar evaporar el alcohol a temperatura ambiente por al menos 10 minutos. NOTA: no secar exhaustivamente (Speedvac® o similar) para permitir una mejor resuspensión del pellet.
8. Resuspender el precipitado (casi transparente) en 10-50 μL de TE.

C. Electroforesis

Separar una alícuota del ADN purificado por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). Se pueden utilizar 2-10 μL del ADN purificado con 2 μL del Buffer de carga para ADN (6X), 0.2 μL de la solución de EtBr y ajustar a un volumen final de 12 μL con TE para cargar en el gel de agarosa.

Resultados

Realizar la descripción detallada de la imagen del gel, haciendo la comparación con la imagen del gel de la práctica 3 "Corte del plásmido con enzimas de restricción".

Resolver el cuestionario post práctica correspondiente.

Análisis de resultados

Para determinar que el fragmento de ADN se encuentra puro, se debe observar en cada carril una sola banda bien definida (recuadros), como se muestra en los carriles 5, 6 y 7 de la figura 11. En los carriles 1-3 y 5-7 se observa una zona intensa cercana a los pozos, el cual puede ser ADN de muy alto peso molecular (ADN genómico) que migra a poca distancia.

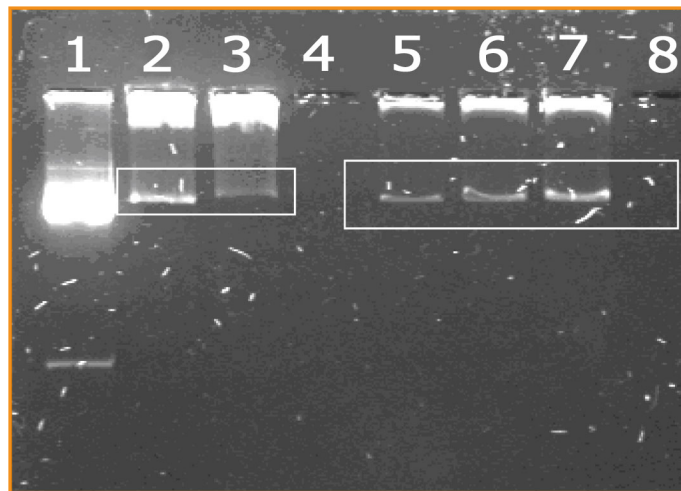


Figura 11. Imagen de un gel de agarosa al 0.8% donde se observan los fragmentos del plásmido lineal y purificado.

Carril 1= Marcador de Peso Molecular;

Carriles 2 y 3 = Plásmido sin purificar.

Carriles 5, 6, 7 = Plásmido purificado.

Carriles 4 y 8 = Sin muestra.

Gel obtenido durante una práctica de laboratorio.

Cuestionario pre práctica 4

1. Explicar el fundamento de otro método para purificar el ADN que se encuentren disponibles comercialmente.
2. ¿Cuál es la importancia de purificar el ADN antes de someterlo a técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la secuenciación de ADN?
3. ¿Por qué se dificulta la resuspensión del ADN en soluciones acuosas cuando éste se seca completamente?
4. Describir el principio de la precipitación etanólica del ADN y el papel que tiene el acetato de sodio 3M.
5. Señalar qué características tiene la agarosa de bajo punto de fusión y para qué se utiliza.

Cuestionario post práctica 4

1. ¿Qué función tiene el algodón y cada uno de los tubos de microcentrífuga en el dispositivo de purificación de ADN?
2. ¿Qué sucede si el orificio que se hace en el fondo del tubo de 0.5 mL es más grande o más pequeño de lo recomendado?
3. ¿Por qué razón la agarosa no atraviesa el algodón, mientras que sí lo hace el ADN?
4. ¿Cuál es el motivo por el cual debe congelarse la muestra para poder hacer la purificación?
5. ¿Cómo se puede determinar el rendimiento de recuperación del ADN?

Practica 5

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método simple pero poderoso, inventado por K. B. Mullis y patentado inicialmente por la compañía Cetus (California, USA), para amplificar fragmentos de ADN mediante la incubación sucesiva a diferentes temperaturas. Por lo general, se emplea una doble cadena de ADN que es desnaturizada por calentamiento (94-95 °C), se permite el alineamiento de dos cebadores (iniciadores u oligonucleótidos) complementarios en los extremos 3' de cada cadena (a una temperatura que depende de los cebadores) y finalmente se permite la elongación de las cadenas a una temperatura de 72-74 °C. Todo este proceso se conoce como un ciclo y estos pasos se repiten hasta obtener una amplificación de los segmentos de ADN de al menos 1×10^5 veces y potencialmente hasta 1×10^9 veces.

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta, pero presenta algunos inconvenientes como son el hecho de que exista la probabilidad relativamente alta de obtener falsos positivos por contaminación y que no es una técnica cuantitativa, sino semi-cuantitativa. Para resolver el primer problema se debe de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN correctamente y realizar una adecuada manipulación de los reactivos. Por otra parte, se han desarrollado modificaciones de esta técnica, una de ellas es la PCR en tiempo real o cuantitativo (Q-PCR), que es una variación de la original en la que podemos conocer la cantidad exacta de ADN original y el que se está produciendo durante cada ciclo.

En la presente práctica se puede utilizar el plásmido pBR322 de molde (obtenido en la práctica 1 o proporcionado por el profesor) y los cebadores para amplificar el gen que codifica a la beta lactamasa CTXM-15 de *Escherichia coli*, (HQ157357), obteniéndose un producto (amplicón) de aproximadamente 875 pb.

Objetivo

Amplificar un fragmento de ADN mediante el uso de la técnica de PCR.

Material y equipo

Material por grupo

- 1 Termociclador (MJResearch, Eppendorf, Corvete Research, etc.)
- 2 Cámaras para electroforesis de ácidos nucleicos (horizontales)
- 1 Fuente de poder
- 1 Transiluminador
- 1 Horno de microondas
- Hielo frapé

Material por equipo

- Muestra de ADN (molde) obtenido de la práctica 1 u otro proporcionado por el profesor.
- 2 tubos estériles tipo Eppendorf de 0.2 mL, de pared delgada para PCR
- 1 Micropipeta de volumen variable 1 a 10 μ L

- 1 Micropipeta de volumen variable 10 a 100 μL
- Soporte para micropipetas
- Puntas para micropipetas (estériles)

SOLUCIONES Y REACTIVOS

NOTA: La preparación de soluciones concentradas y sus diluciones se describe con detalle en el anexo 2

- Buffer de reacción
- ** Mezcla de nucleótidos trifosfatados o dNTP's (10 mM de cada uno: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- ** Oligonucleótidos 5' (sentido, superior, "forward", "upper")
- ** Oligonucleótidos 3' (antisentido, inferior, "reverse", "lower")
- ** Ampli Taq DNA polimerasa
- Agarosa
- Solución TBE* 0.5 X
- ** Solución de carga para ADN 6X
- ** Solución de EtBr, 1 mg/mL
- ** Marcador de bajo peso molecular (escalera de 100 pb o similar).
- * Las soluciones concentradas serán preparadas por los alumnos, ver anexo 2
- ** Reactivos proporcionados por el profesor.

Método

A.- Reacción de PCR

En un tubo Eppendorf de 0.2 mL, nuevo y estéril, agregar los siguientes reactivos en el orden indicado:

- 2.5 μL de Buffer de reacción (10X)
- 1.5 μL de MgCl_2 (25 mM)
- 0.5 μL Mezcla de dNTP's (1 mM c/u)
- 1 μL oligonucleótido 5' (20 μM)
- 1 μL oligonucleótido 3' (20 μM)
- 1 μL ADN molde (10-50 ng/ μL)
- 0.2 μL de Ampli Taq DNA polimerasa (5 U/ μL)
- Agua bidestilada estéril (la necesaria para completar a 25 μL)

En otro tubo Eppendorf de 0.2 mL, nuevo y estéril, agregar los reactivos anteriores pero sin el ADN molde. Este control de reactivos se utiliza para descartar posibles contaminaciones, ya que no debe de haber amplificación por PCR.

B.- Condiciones de reacción

# ciclos	Temperatura / tiempo	
1	94°C / 3 min	(Desnaturalización)
	94°C / 30 seg	
25	* XX / 30 seg	(Alineamiento)
	72°C / 30 seg	(Elongación)
1	72°C / 7 min	
	4°C puede permanecer indefinidamente a esta temperatura.	

* XX Temperatura variable en función de la secuencia de los oligonucleótidos

C.- Gel de Agarosa

Separar los fragmentos de PCR por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 % (p/v) en 50 mL de TBE 0.5X a 100 V por 45 minutos.

Resultados

Realizar la descripción detallada de la imagen del gel, determinando el peso molecular aparente de los productos de PCR (amplicones) obtenidos

Resolver el cuestionario post práctica correspondiente.

Análisis de resultados

Los puntos que se deben tomar en consideración para hacer la descripción de los resultados son:

- Determinar el número de bandas obtenidas en la reacción de PCR. Solamente debe aparecer una del peso molecular esperado, ya que las demás bandas corresponden a productos de amplificación inespecíficos.
- En el caso de la formación de productos inespecíficos en la muestra (bandas no esperadas) se deberá realizar nuevamente la PCR, subiendo la temperatura de alineamiento de los cebadores o modificando la concentración del $MgCl_2$. Si los productos no específicos se forman en el control de reactivos (sin ADN molde) se deberán hacer nuevamente las reacciones, procurando evitar las contaminaciones con ADN no deseado (p. ej. el que tenemos en las manos o se encuentra en puntas usadas).
- En el caso de no obtener productos de amplificación se deberá realizar nuevamente la PCR, bajando la temperatura de alineamiento de los cebadores.
- Comparar los valores observados del peso molecular con los esperados (teóricos).

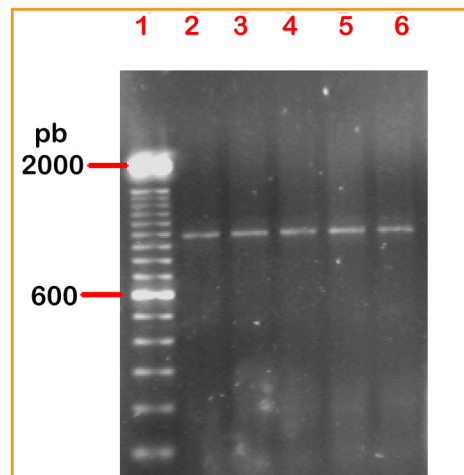


Figura 12. Gel de agarosa con los fragmentos de ADN amplificados mediante la técnica de PCR (carriles 2 al 6). El peso molecular aparente del ADN es de aproximadamente 1000 pb. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular de 100 pb. Gel obtenido durante una práctica de laboratorio.

Cuestionario pre práctica 5

1. Señalar brevemente los fundamentos de la técnica de PCR.
2. Esquematizar y describir lo que sucede en cada uno de los tres pasos básicos de la técnica de PCR.
3. Señalar las ventajas de utilizar DNA polimerasas termoestables y diga de qué tipo de enzimas se utilizaban antes.
4. Describir un mecanismo por el cual un termociclador (hay de muchos tipos) puede realizar los cambios de temperatura en forma rápida.
5. Mencionar una variación a la técnica de PCR (Q-PCR, RT-PCR, RAPD, etc.) y describa las semejanzas y diferencias con la técnica de PCR convencional.

Cuestionario post práctica 5

1. Mencionar la función de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción de PCR:
 - a) buffer de reacción, b) $MgCl_2$, c) mezcla de dNTP's, d) oligonucleótidos e) DNA polimerasa, f) ADN molde.
2. Explicar por qué razón la temperatura de alineamiento es variable y ésta depende de la secuencia de los cebadores.
3. ¿Cuáles son las características óptimas que deben tener los cebadores (oligonucleótidos) para que la técnica de PCR amplifique solamente el producto deseado?
4. Señalar qué problemas se pueden suscitar si la concentración del ión magnesio (Mg^{2+}) es más alta o más baja de la concentración óptima en reacciones de PCR.
5. Señalar qué modificaciones a la técnica de PCR se realizarían si:
 - a) no se obtiene ningún producto de PCR;
 - b) además del producto de PCR esperado, se obtienen productos inespecíficos

Anexo 1

Uso de equipos especiales en el laboratorio de biología molecular: micropipetas y microcentrífuga

⦿ **NOTA:** A juicio del profesor y en el caso de que los alumnos no hayan utilizado previamente las micropipetas y la microcentrífuga, se recomienda que el anexo 1 sea formalmente la primera práctica, cuyo objetivo es aprender el manejo correcto de las micropipetas, lo que permitirá que los volúmenes utilizados sean lo más exactos posibles.

Si los alumnos ya conocen el uso de las micropipetas, se recomienda hacer un recordatorio de su funcionamiento.

Es importante mencionar constantemente que las micropipetas deben mantenerse en posición vertical para evitar el escurrimiento de líquidos hacia el interior.

Mediciones

A nivel molecular, cualquier laboratorio y en particular en el Biología Molecular, se trabajan con concentraciones muy pequeñas y volúmenes de reactivos en el orden de mililitros (mL) y microlitros (μL); por lo tanto, para obtener resultados satisfactorios, es fundamental conocer las unidades de medición utilizadas, la conversión de unidades y el correcto uso de las micropipetas para tomar y depositar pequeños volúmenes con exactitud y reproducibilidad.

Si se requieren convertir:

- a) mililitros (mL) a microlitros (μL) se debe multiplicar por 1000
- b) microlitros (μL) a mililitros (mL) se debe dividir entre 1000

ya que:

Volumen	Conversión	Volumen	Conversión
1 mL =	1,000 μL (1×10^3)	1 μL =	0.001 mL (1×10^{-3})

Nota: Entre paréntesis se señala la notación científica.

Uso de las micropipetas

Las micropipetas son instrumentos del laboratorio de Biología Molecular que permiten medir pequeños volúmenes de líquidos, por lo que es indispensable que los alumnos conozcan el principio de operación de estos instrumentos de alta precisión y que los usen correctamente.

Los volúmenes que pueden ser tomados por las micropipetas dependen de la marca, pudiendo ser de **volumen fijo** o de **volumen variable**, donde las primeras solamente pueden medir un solo volumen (generalmente 10, 20, 50, 100, 200, 500 o 1000 μL), mientras que en el segundo tipo, la misma micropipeta puede tomar múltiples volúmenes en el rango establecido. Debido a su versatilidad, las que se emplean comúnmente en el Laboratorio de Biología Molecular son las últimas y los volúmenes pueden variar entre 0.1 y 5,000 μL , siendo los rangos más frecuentes los siguientes: 0.5 a 10, 2 a 20, 10 a 100 y 100 a 1000 μL . En ambos los casos el principio es a través de pistones que generan vacío, lo que permite que el volumen de líquido deseado ingrese a la punta desechable.

El uso correcto de las micropipetas permite medir con exactitud, en forma repetida y tomar de distintas soluciones simplemente cambiando las puntas desechables de plástico, las cuales habitualmente se utilizan en forma estéril. El tipo de puntas empleadas depende del tipo de micropipeta y por lo general se sigue un código de colores entre el instrumento y la punta, siendo de color azul para el rango de 100-1000 μL , de color amarillo para el de 2 a 100 μL y blancas para el de 0.1 a 10 μL .



Figura 13. Micropipetas con las que se pueden medir diferentes volúmenes, desde 1 μL , 100 μL hasta 1000 μL . <http://www.biosciencetechnology.com>

Las micropipetas con las que se cuenta en la DCBS-UAMI son de la marca **SOCOREX** y **BIOHIT**, como se muestran a continuación:



Color de las puntas	Rango de volumen (μL)
Azul	100 a 1000
Amarillo	2 a 20 10 a 100
Blanca	0.1 a 10

Figura 14. Micropipetas de la marca **SOCOREX** y **BIOHIT**. Se indica el tipo de puntas que se pueden utilizar para las diferentes micropipetas. <http://www.biosciencetechnology.com>
www.accuteklab.com/accupetpro.html

Las recomendaciones para el uso de las micropipetas son:

- Nunca mover el ajustador de volumen por arriba o por abajo del rango de la micropipeta. Además de que no será exacta la medición del volumen, éstas pueden descomponerse.
- Nunca usar la micropipeta sin la punta desechable.
- Nunca invertir la posición de la micropipeta cuando haya líquido en la punta desechable (ésta hacia arriba), ya que el líquido puede entrar al sistema de la micropipeta y descomponerse.
- No acercar la micropipeta con la punta desechable a la flama.
- Para evitar contaminar las soluciones es importante utilizar puntas nuevas y diferentes para cada solución. No es recomendable reutilizarlas.

Instrucciones para el uso correcto de las micropipetas



Figura 15. Fotografía de las micropipetas marca SOCOREX (izquierda;) y BIOHIT (derecha) con las que se cuentan en los laboratorios de Docencia de la DCBS. <http://www.biosciencetechnology.com>; www.accuteklab.com/accupetpro.html

Lo primero que se debe de tomar en cuenta es que en la parte que se encuentra debajo de la pantalla de la micropipeta (ver partes de la micropipeta) está indicado el rango de volumen que se puede tomar con cada micropipeta, es importante respetar estos límites.

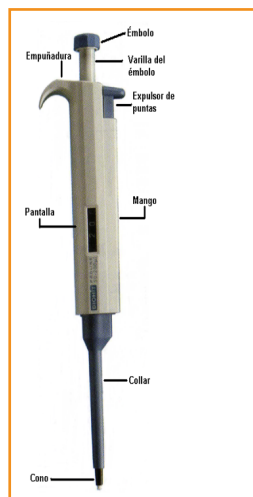


Figura 16. El rango de volumen de las micropipetas varía de acuerdo al fabricante. En el laboratorio de Biología Molecular, las micropipetas más comúnmente utilizadas son las que tienen un rango de volumen de: 0.5-10 μL , 10-100 μL y 100-1000 μL . www.accuteklab.com/accupetpro.html

Para usar correctamente las micropipetas se deben seguir los siguientes pasos:

En el caso de las micropipetas **SOCOREX**, antes de usarlas se debe de quitar el seguro de la micropipeta (si está puesto) de la siguiente manera:

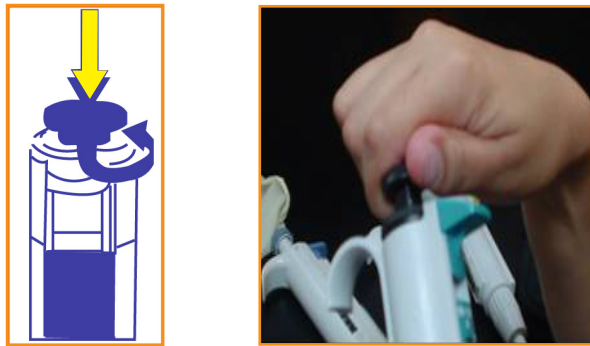
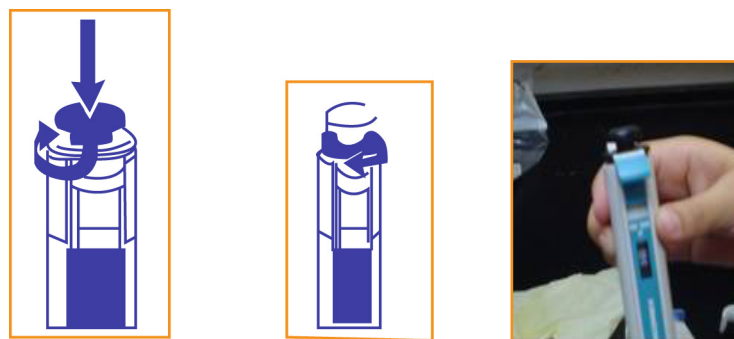


Figura 17. A. Presionar el émbolo y girarlo en dirección opuesta de las manecillas del reloj hasta que se libere. Para poner el seguro se deberá hacer el proceso inverso. <http://www.biosciencetechnology.com>

Para ajustar el volumen en las micropipetas **SOCOREX** se deben seguir los siguientes pasos:



<http://www.biosciencetechnology.com>

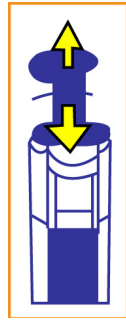
Figura 17-B. Presionar el émbolo hacia abajo con el dedo pulgar para permitir que gire la rosca de ajuste y con el índice girarla para establecer el volumen deseado, el cual aparecerá en la pantalla.



<http://www.biosciencetechnology.com>

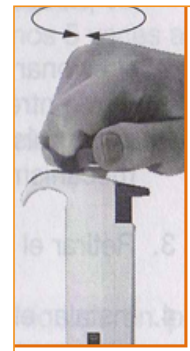
Figura 17-C. Si el volumen incluye fracciones que no pueden ser ajustadas en el paso anterior, se deberá jalar el seguro de la base hasta escuchar un “clic” y girarlo en dirección de las manecillas del reloj hasta establecer el volumen final deseado.

NOTA: En la mayoría de las micropipetas no se pueden ajustar las unidades.



<http://www.biosciencetechnology.com>

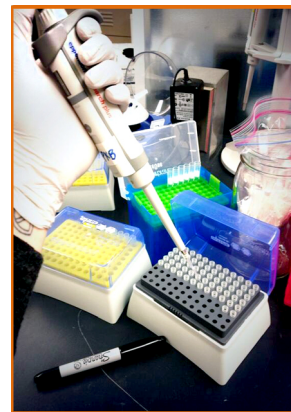
Figura 17-D. Finalmente, presionar la rosca de ajuste a la posición inicial para evitar cambios en el volumen deseado.



www.accuteklab.com/accupetpro.html

Figura 17-E. En el caso de las micropipetas BIOHIT solamente se deberá girar el émbolo hasta que el volumen deseado aparezca en la pantalla.

NOTA: Esta micropipeta puede girar el émbolo en ambos sentidos para aumentar o disminuir el volumen a tomar.



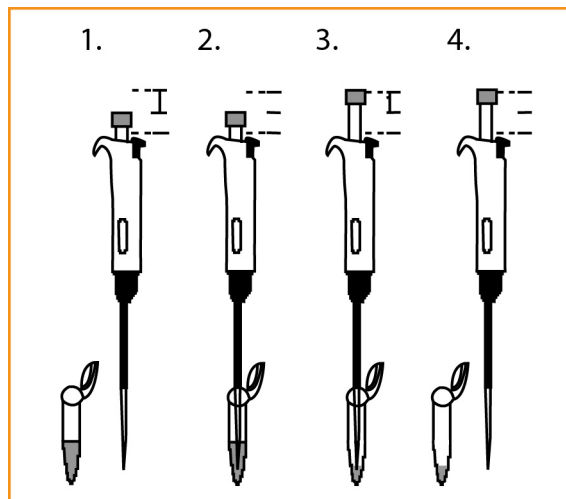
<http://www.biosciencetechnology.com>

www.accuteklab.com/accupetpro.html

Figura 17-F. Colocar una punta desechable en el cono (portapuntas) de la micropipeta y presionar ligeramente en forma circular.

NOTA: Jamás golpear la micropipeta para meter la punta ya que el cono de las micropipetas de menor volumen se puede romper.

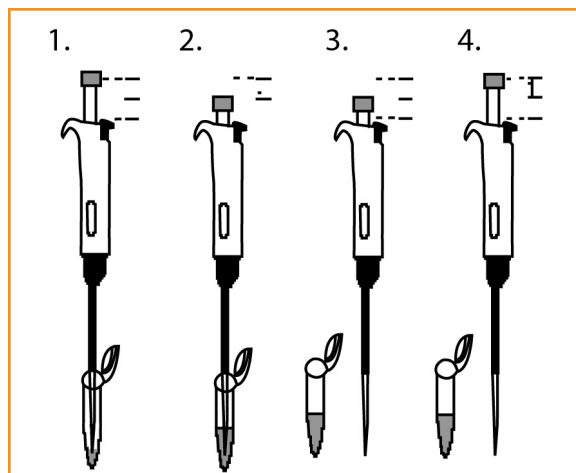
Es necesario que se tomen en cuenta las siguientes indicaciones para tomar la muestra y verter el líquido en el tubo respectivo:



<http://www.biosciencetechnology.com>

Figura 18-A. Toma de muestra:

- 1.- Para tomar la muestra se deberá oprimir el émbolo hasta el primer tope.
- 2.- Sumergir la punta de la micropipeta en el líquido que se desea tomar.
- 3.- Soltar lentamente el émbolo para que regrese a su posición inicial.
- 4.- Sacar la punta del líquido.



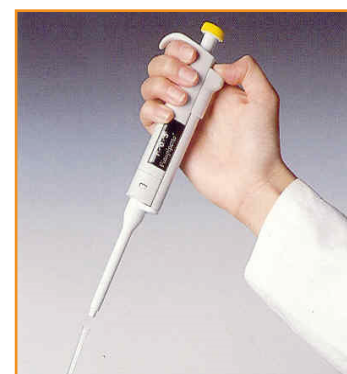
<http://www.biosciencetechnology.com>

Figura 18-B. Verter el líquido:

- 1.- Colocar la punta contra la pared del tubo donde se colocará la muestra.
- 2.- Presionar suavemente el émbolo hasta el segundo tope.
- 3.- Dejar presionado el émbolo en el segundo tope hasta sacar la punta del tubo.
- 4.- Regresar el émbolo a su posición normal.

Figura 18-C. Para quitar la punta utilizada se deberá presionar el eyector de puntas con firmeza para asegurar la expulsión. Las puntas se depositan en los sitios indicados por el profesor para evitar que el alumno se contamine con la solución.

<http://www.biosciencetechnology.com>



Es importante mencionar constantemente que las micropipetas deben mantenerse en posición vertical para evitar el escurrimiento de líquidos hacia el interior.

Microcentrifuga

La microcentrifuga es un aparato frecuentemente utilizado en el laboratorio de Biología Molecular para separar las sustancias de diferente densidad o tamaño de partículas, las cuales se encuentran suspendidas en un fluido. Estas mezclas se someten a fuerzas de aceleración que obligan a las moléculas a migrar al fondo del envase utilizado, separándolas del medio en que se encuentran. En este caso, la microcentrifuga se utilizará para separar el ADN del resto de los componentes celulares y para concentrar muestras de volumen pequeño.



Figura 19. Rotor de microcentrifuga marca Eppendorf.
www.eppendorfna.com

Uso correcto de la microcentrifuga

Los principales cuidados que debemos tener en el manejo de las microcentrifugas están relacionados con el sistema de rotación de los tubos, que incluye el balancear correctamente los tubos, lo cual evita que el eje del motor se dañe. En caso de que se requieran centrifugar números no pares de tubos se podrán balancear utilizando un tubo vacío adicional o acomodarlos en los rotores de 12 o 16 posiciones de la siguiente manera.

Rotor de 12 posiciones

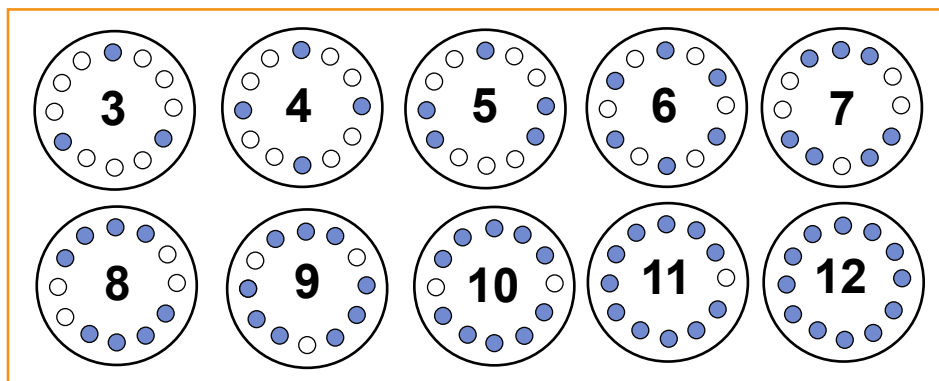


Figura 20. Los números al centro representan el número de tubos a centrifugar y los espacios llenos los lugares donde se deben colocar en el rotor. En el caso de tener 11 tubos se deberá usar un tubo extra.

Rotor de 16 posiciones

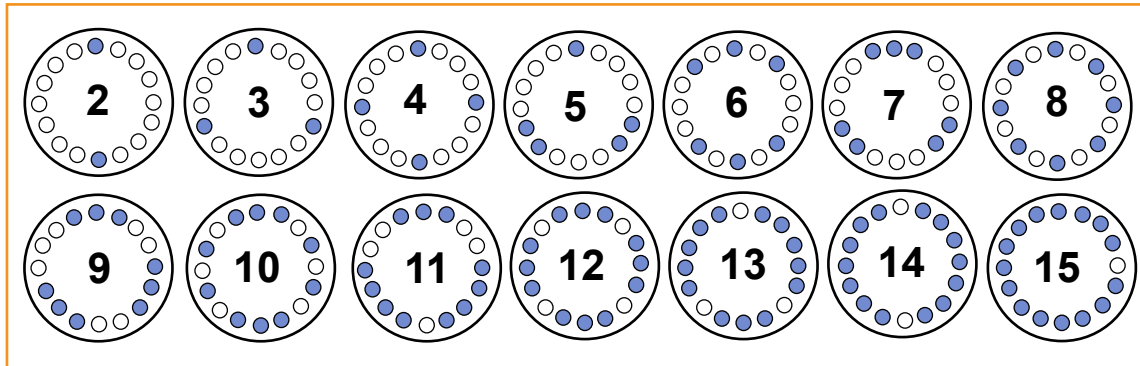


Figura 21. Los números al centro representan el número de tubos a centrifugar y los espacios llenos los lugares donde se deben colocar en el rotor. A pesar de que se sugieren posibilidades, en el caso de tener número de tubos no se recomienda usar un tubo extra, como está representado en el 15.

NOTA: En ningún caso se podrá centrifugar un solo tubo.

Anexo 2

Preparación de las soluciones para biología molecular

⦿ **NOTA:** A juicio del profesor y en el caso de que los alumnos no tengan conocimientos de la preparación de soluciones y medios de cultivo, se recomienda que el anexo 2 sea formalmente la primera práctica (segunda si el anexo 1 es considerado como la primera práctica), cuyo objetivo es aprender la preparación de soluciones y diluciones.

En caso de que no sea posible, el profesor deberá proporcionar el medio de cultivo LB y las soluciones concentradas, que deberán estar estériles. De igual manera, el profesor determinará la conveniencia de que los alumnos preparen el material estéril que se utilizará en las prácticas o que él lo proporcione.

El concepto de concentración se refiere a la composición de una solución o, secundariamente, de una mezcla homogénea (por ejemplo, una aleación de metales). Una solución (o disolución) es una mezcla cuyos componentes forman una sola fase. Se reconocen dos tipos de componentes: el solvente es el componente predominante en una solución y un soluto es un componente que se encuentra en menor cantidad. Por concentración se entiende la cantidad de soluto contenida en una cantidad del solvente o de la disolución. Para diluir una solución es preciso agregar más cantidad de disolvente a dicha solución y éste procedimiento nos da por resultado la dilución de la solución, y por lo tanto el volumen y concentración cambian, aunque el soluto no. Una solución stock es una de mayor concentración, a partir de ella se puede hacer una disolución.

Los criterios para expresar cuantitativamente una concentración son, principalmente, masa, volumen y cantidad de materia (moles). En el análisis químico son de particular importancia las “unidades” de concentración, y en particular dos de ellas: la molaridad y la normalidad.

La molaridad expresa la concentración como los moles de soluto en un litro de solución. Se expresa como M:

$$M = (\text{moles de soluto})/(\text{Litro de solución})$$

Un concepto parecido a la molaridad y que no debe confundirse con ella es la molalidad (m), que expresa la concentración como los moles de soluto por kilogramo de solvente:

$$m = (\text{moles de soluto})/(\text{kilogramo de solvente})$$

La molalidad tiene la ventaja de no variar con la temperatura, contrariamente a lo que pasa con la molaridad o cualquier otra expresión que incluya un volumen de líquido o gas; en estos casos, con la variación de temperatura el volumen puede aumentar o disminuir, lo que lleva a cambiar la concentración de la solución.

La normalidad está fundada en un concepto especial de la química analítica, el número de pesos equivalentes. Éstos indican la cantidad exacta de un reactivo que reacciona completamente con una cantidad de otro. Se dice, pues, que el primer reactivo es equivalente al segundo cuando sus respectivos números de pesos equivalentes son iguales. Enseguida la definición de número de pesos equivalentes:

$$\text{Número de pesos equivalentes} = (\text{masa de reactivo en gramos}) / (\text{peso equivalente del reactivo})$$

La definición de peso equivalente:

$$\text{Peso equivalente} = (\text{masa molecular del reactivo}) / (\text{número de equivalencia})$$

El número de equivalencia es la proporción del reactivo con que se hará reaccionar el reactivo en cuestión. La normalidad (N), entonces, es el número de pesos equivalentes de soluto contenidos en un litro de solución:

$$N = (\text{número de pesos equivalentes}) / (\text{Litro de solución})$$

Al darse la concentración en Normalidad debe especificarse la reacción, ya que el número de equivalencia depende de ésta. Por lo tanto, la normalidad de una solución depende de la reacción para la cual está indicada y puede variar de una reacción a otra.

Existen otras formas de especificar la concentración de una solución: El porcentaje peso en peso (p/p o m/m) que indica la masa de soluto por masa de solución. Así, una solución 15 % m/m tendrá 15 gramos (o kilos, etc.) de soluto en cada 100 gramos (o kilos, etc) de solución. Si se desea convertir los gramos de solución a mL, se deberá conocer la densidad de la solución. El porcentaje peso en volumen (p/v o m/v) indica la masa de soluto por unidad de volumen; así una solución 15 % m/v tendrá 15 gramos de soluto en cada 100 mL de solución. El porcentaje volumen en volumen (v/v) da cuenta del volumen de soluto por volumen de solución; así en una solución 15 % v/v se tendrán 15 mL de soluto en cada 100 mL de solución.

Material y equipo

Reactivos

1.8 g glucosa (PM 180)
15 g EDTA (ácido etilén diamino tetra acético; PM 292.2)
4 g NaOH (hidróxido de sodio; PM 40)
5 g SDS (dodecil sulfato de sodio o lauril sulfato de sodio; PM 288.38)
34 g acetato de sodio (PM 68)
15.8 g Tris-HCl (Trizma HCl; PM 157.6)
3.1 g ácido bórico (PM 61.8)
6.1 g Tris base (Trizma base; PM 121.1)
50 mL Alcohol etílico absoluto
0.5 g bacto-triptona (peptona)
0.5 g NaCl (PM 58.5)
0.25 g extracto de levadura
5 ml de glicerol
Agua bidestilada/desionizada
Hielo frapé

Equipo

4 Potenciómetros
4 Parrilla con agitación y agitadores magnéticos
Autoclave
1 Microcentrífuga para tubos cónicos
8 Micropipetas de volumen variable 1-10 μL
8 Micropipetas de volumen variable 10-100 μL
8 Micropipetas de volumen variable 100-1000 μL

Material de vidrio

10 Vasos de precipitado 250 mL
 6 Matraces aforados 50 mL
 4 Matraces Erlenmayer 250 mL
 8 Pipetas serológicas de 10 mL
 2 Matraces Erlenmayer 500 mL
 6 Frascos de vidrio de 100 mL
 2 Frascos de vidrio de 1000 mL

Material desechable

100 Puntas para micropipetas (100-1000 μ L)
 100 Puntas para micropipetas (10-100 μ L)
 100 Puntas para micropipetas (0.5-20 μ L)
 100 Tubos cónicos para microcentrífuga de 1.5 mL
 100 Tubos cónicos para microcentrífuga de 0.6 mL
 20 Tubos cónicos para microcentrífuga de 0.2 mL
 10 Tubos cónicos de 15 mL
 Papel Parafilm®

I. Hacer los cálculos para preparar las siguientes soluciones:

A. Soluciones stock

- a) 10 mL de **glucosa 1 M** (PM 180 g/mol). Después de esterilizar, se guardar en tubo cónico, de plástico, de 15 mL y estéril. Se almacena en refrigeración hasta por un trimestre, si no se contamina (cambia de transparente a turbio).
- b) 50 mL de **EDTA 0.5 M**, pH 8.0 (PM 292.2 g/mol). Se esteriliza en matraz Erlenmeyer de 250 mL y se guardar en frasco de vidrio, estéril, en refrigeración hasta por un trimestre. Verificar que no se precipite.
- c) 50 mL de **NaOH 2 N** (PM 40 g/mol). Se esteriliza en matraz Erlenmeyer de 250 mL y se guardar en frasco de vidrio, estéril, en refrigeración hasta por un trimestre. Verificar que no se precipite.
- d) 10 mL de **SDS 20 %** (PM 288.38 g/mol). Se prepara con agua estéril y se guardar en frasco de vidrio, estéril, a temperatura ambiente hasta por un trimestre. Si se precipita, se puede calentar en baño de agua.
- e) 100 mL de **acetato de sodio 5 M** (PM 68 g/mol). Se esteriliza en matraz Erlenmeyer de 250 mL y se guardar en frasco de vidrio, estéril, a temperatura ambiente hasta por un trimestre. Verificar que no se precipite.
- f) 100 mL de **1 M Tris-HCl**, pH 8.0 (PM 157.6 g/mol). Se esteriliza en matraz Erlenmeyer de 250 mL y se guardar en frasco de vidrio, estéril, en refrigeración hasta por un trimestre. Verificar que no se precipite.
- g) 1 mL de **bromuro de etidio 1 mg/ml** en ddH₂O (☠ PRECAUCIÓN). Se almacena en tubos cónicos de 1.5 mL.
- h) 200 mL de **5X TBE**: ácido bórico 0.5 M (PM 61.8 g/mol), Tris base 0.5 M (PM 121.1 g/mol) y EDTA 10 mM en ddH₂O. Se esteriliza en matraz Erlenmeyer de 500 mL y se guardar en frasco de vidrio, estéril, en refrigeración hasta por un trimestre. Verificar que no se precipite.
- i) 1 mL de **Solución de carga para ADN** [en inglés "DNA LOADING BUFFER"]: 0.05 % azul de bromofenol (PM 691.9 g/mol); 0.05 % xilen cianol FF (PM 538.6 g/mol); 30 % glicerol (PM 92.09 g/mol, $\rho=1.25$ g/mL), en ddH₂O. Se almacena en tubos cónicos de 1.5 mL.

B. Diluciones

Preparar las siguientes soluciones a partir de las soluciones stock

- 500 μ L de **GTE** que contiene: **glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM**. Se prepara al momento en tubos cónicos de 1.5 mL y el remanente se desecha.
- 10 mL **TE** que contiene: **Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM**. Se prepara tubos cónicos de 15 mL, estériles, a partir de las soluciones concentradas y se adiciona agua estéril para completar el volumen.
- 500 μ L de **NaOH/SDS** con **NaOH 0.2 N y SDS 1 %**. Se prepara al momento en tubos cónicos de 1.5 mL y el remanente se desecha.
- Ampicilina** a una concentración final de 100 μ g/mL (prepararla a partir de la stock de 100 mg/mL). Se almacena en tubos cónicos de 1.5 mL.
- 10 mL de **Etanol al 75 %**, utilizando etanol absoluto (99.5%) y ddH₂O. Se prepara tubos cónicos de 15 mL, estériles, a partir de etanol absoluto y se adiciona agua estéril para completar el volumen.
- 500 mL de la dilución **0.5X TBE** en ddH₂O estéril. Se prepara en frasco de 1 L estéril a partir de la solución 5XTBE y se adiciona agua estéril para completar el volumen. Esta dilución se debe preparar cada vez que se necesite y se puede reusar hasta 3 veces.

C. Medio Luria-Bertrani. 50mL con 1 % de bacto-triptona, 0.5 % de extracto de levadura y 1 % NaCl. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH. Se esteriliza en matraz Erlenmeyer de 500 mL y se guardar en frasco de vidrio, estéril, en refrigeración hasta por un trimestre. Verificar que no se contamine.

D. 50 mL de agarosa al 1.2 %, con TBE 0.5X ddH₂O. Se prepara en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se funde en el horno de microondas. Se recomienda poner tapón de vidrio para evitar evaporación.

II. Conversión de unidades de centrifugación.

Realiza las siguientes conversiones, utilizando un rotor de 10 cm de diámetro.

- Convertir revoluciones por minuto (r.p.m.) a fuerza centrífuga relativa (g)
 $g = 1.12 (r) (r.p.m./1000)^2$; donde r=radio del rotor en milímetros (mm)
- Determinar a cuántas r.p.m. equivalen: 12,000; 7,500 y 1100 g
- Determinar a cuántas g equivalen: 10,000; 7,000 y 100 r.p.m.

Preparación de material estéril

- Preparar 50 mL de medio LB para todo el grupo en un matraz de 125 mL:

Medio LB (Luria-Bertrani)

10 g de Bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura

10 g de NaCl para 1000 mL de ddH₂O. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH

Esterilizar por autoclave y guardar a 4° C

Adicionar ampicilina a una concentración final de 100 μ g/mL

2. Preparar 10 mL de ampicilina 100 mg/mL

Ampicilina: (Sal sódica o anhidra; Sigma)

Disolver 1.0 g en 10 mL dH₂O

Esterilizar con filtro de 0.22 µm

Guardar en alícuotas de 1.0 mL a -20 °C

3. Esterilizar:

Pipetas serológicas de 5 mL y 10 mL tubos para microcentrífuga tipo Eppendorf de 1.5, 0.5, 0.2 mL

Puntas para micropipetas de 10, 200 y de 1000 µL

Matraz Erlenmeyer de 200 mL

4. Preparar las siguientes soluciones "stock" (concentradas):

1 M Glucosa, esterilizada por filtración (0.22 µm). Guardar a 4 °C

1 M Tris-HCl pH 8.0

0.5 M EDTA pH 8.0

5 M Acetato de Sodio, pH 4.8

} Esterilizar en autoclave

EDTA=ácido etilén diamino tetraacético, sal sódica

SDS=dodecil sulfato de sodio

2 N NaOH, Guardar a temperatura ambiente

20% (p/v) SDS, Guardar a temperatura ambiente

Cuestionario

1. ¿Cuánto se debe de pesar de Tris HCl para preparar 50 mL de una solución 1 M (PM = 157.6 g/mol)?
2. ¿Qué volumen se necesita para preparar 100 mL de una solución de TBE 0.5X a partir del "stock" de TBE 10X y cuánto agregaría de ddH₂O?
3. ¿Qué volumen se necesita para preparar 500 µL de la solución NaOH/SDS, con una concentración de 0.5 N y 0.5% respectivamente? Realizar los cálculos a partir de las soluciones stock de NaOH 5 N y SDS 50%
4. ¿Qué volumen se necesita de las siguientes soluciones stock (1 M glucosa, 1 M Tris-HCl, 0.8 M EDTA) para preparar 250 µL de GTE? Si se requieren a las siguientes concentraciones: Glucosa 25 mM, Tris HCl 50 mM, EDTA 5 mM.
5. ¿Cuál es la molaridad de una solución de acetato de sodio (PM=68 g/mol), si se pesaron 16.25 g para preparar 0.1 L?

Bibliografía

Libros y artículos

1. Ausbel FM (Editor). (2002). *Short Protocols in Molecular Biology. A compendium of methods from Current Protocols in Molecular Biology*. 2nd Edition. John Wiley & Sons, NY, U SA.
2. Birnboim HC. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* 100:243-255.
3. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL. y Boyer HW. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system, *Gene* 2, 95-113.
4. Borst P. (1977). Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: how it started. *IUBMB Life.* 57:745-7.
5. Boyer RF. (1993). *Modern Experimental Biochemistry*. 2nd Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Co., CA, USA.
6. Brown TA. (2007). *MOLECULAR BIOLOGY, LABFAX*. Bios Scientific Publishers-Academic Press. Londres, RU.
7. Coyne VE, James MD, Reid SJ, Rybicki EP. (2007) *Molecular Biology Techniques Manual 3rd Edition*. Benjamin/Cummings Publishing Co., CA, USA.
8. Guzmán-Verri, C. (2006). *Manual de prácticas de laboratorio de Bioquímica*. Cátedra de Bioquímica Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela de Medicina Veterinaria Universidad Nacional de Costa Rica. www.medvet.una.ac.cr/carrera/mva505_Practica1.pdf
9. Howe C. (2007) *Gene Cloning and Manipulation*. 2a Edición. Cambridge University Press. Londres, RU.
10. Jain, SM; Brar, DS; Ahloowalia, BS. (2002). *Molecular Techniques in Crop Improvement*. Kluwer Academic Publishers, Elsevier, Holanda.
11. Jones, P, Jones, PG, Sutton, JM. (2005). *Plant Molecular Biology: Essential Techniques*. Ed. John Wiley & Sons. NY, USA.
12. Mas-Oliva, J. (2004) *Diagnóstico molecular en medicina*. Ed. Manual Moderno, México.
13. Micklos DA, Freyer GA, Crotty DA. (2009). *DNA Science*. 4a. Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
14. Pham TT, Chillapagari S, Suarez AR. (1996). Preparation of Pure Plasmid or Cosmid DNA Using Single-Strand Affinity Matrix and Gel-Filtration Spin Columns. *BioTechniques* 20(3):492-497.
15. Rodríguez Vico F, Clemente Jiménez JM, Las Heras Vázquez FJ. (2000). *Prácticas de biología molecular: (2º curso de Ciencias químicas)*. Universidad de Almería, España.
16. Sambrook J y Russell DW. (2008). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. (www.MolecularCloning.com)
17. Segal C y Ortega GJ (2007). *Manual de prácticas de biología molecular de la célula*. Facultad de Ciencias, UNAM. www.fciencias.unam.mx/docs/libros.pdf.
18. Widmer F y Beffa R. (2000). *Diccionario de Bioquímica y Biología Molecular*. 1ª. Edición. Editorial Aula Magna, Editorial Acibia, España.

Páginas web

1. A Manual of Online Molecular Biology Techniques. Rybicki E. Department of Molecular & Cell Biology, Department of Molecular and Cell Biology. University of Cape Town. South Africa. <http://www.mcb.uct.ac.za/manual/MolBiolManual.htm>
2. Beginning Molecular Biology Laboratory Manual. (UMBC Department of Biological Sciences. University of Maryland, Baltimore County • 1000 Hilltop Circle, Baltimore, MD 21250, EUA) <http://umbc7.umbc.edu/~jwolf/method1.html>
3. Bromuro de Etidio. http://en.wikipedia.org/wiki/Ethidium_bromide
www.steve.gb.com/science/genetics.html
4. DNA Ladders and Markers
<http://www.norgenbiotek.com/index.php?id=mdnamain>
5. Cell and Molecular Biology Online – Protocols-<http://www.cellbio.com/protocols.html>
6. Agarose Gel Electrophoresis of DNA
<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/agardna.html>
7. How Ethidium Bromide intercalates between RNA?
<http://www.protocol-online.org/biology-forums/posts/13350.html> y [http://en.wikipedia.org/wiki/Intercalation_\(chemistry\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Intercalation_(chemistry))
8. Métodos y técnicas de Biología Molecular I
http://mendel.ugr.es/seg/Docencia/programas/genmol/genetica_molecular_alcala2.html
9. Microcentrifuge: Principles of Centrifugation, MCDB Tutorial, Life Sciences Computing Facility, University of California, Santa Barbara. <http://tutor.lscf.ucsb.edu/instdev/sears/biochemistry/tw-exp/cent-forces.htm>
10. Molecular Biology Procedures. Chisholm Lab, Northwestern University Medical School, EUA
http://dicty.northwestern.edu/Chis_lab/Lab%20Manual/molecular_biology.htm
11. Plasmid Quick-Preps. In: Frank, MB. ed. Molecular Biology Protocols. 1997. Oklahoma City.
<http://omrf.ouhsc.edu/~frank/quikprep.html>
12. Protocols for Recombinant DNA isolation, cloning, and sequencing. Roe BA, Crabtree JS y Khan AS. Department of Chemistry and Biochemistry. The University of Oklahoma, Norman, Oklahoma 73019
http://www.genome.ou.edu/protocol_book/protocol_index.html

Manual de prácticas de laboratorio. Técnicas Básicas de Biología Molecular
Se terminó de imprimir en diciembre de 2013,
con un tiraje de 200 ejemplares, más sobrantes para reposición.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Av. San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina
C.P. 09340, Del. Iztapalapa, México D.F.
Tel.: (01) 58044600