

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

EL LABORATORIO DE
BIOLOGÍA MOLECULAR

Edición ampliada

ARIEL ERNESTO CARIAGA MARTÍNEZ
PEDRO DARÍO ZAPATA

Editorial Universitaria de Misiones
2007



EDITORIAL UNIVERSITARIA DE MISIONES

San Luis 1870

Posadas - Misiones – Tel-Fax: (03752) 428601

Correos electrónicos:

edunam-admini@arnet.com.ar

edunam-direccion@arnet.com.ar

edunam-produccion@arnet.com.ar

edunam-ventas@arnet.com.ar

Colección: Cuadernos de Cátedra

Coordinación de la edición: Claudio Oscar Zalazar

Armado de interiores: Amelia E. Morgenstern

Corrección: Sebastián Franco

ISBN 978-950-579-073-9

Impreso en Argentina

©Editorial Universitaria

Cariaga Martinez, Ariel
El laboratorio de biología molecular: edición ampliada / Ariel Cariaga Martínez
y Darío Zapata. 1a ed. - Posadas: EdUNaM - Editorial Universitaria de la Univ.
Nacional de Misiones, 2007.
160 p.; 30x21 cm.
ISBN 978-950-579-073-9
1. Biología Molecular. I. Zapata, Dario II. Título
CDD 574.8

Fecha de catalogación: 06/07/2007.

LOS AUTORES

Ariel Ernesto Cariaga-Martínez, nació en la ciudad de L. N. Alem y es **Bioquímico** recibido en la Universidad Nacional de Misiones, año 2005, y premiado como mejor promedio de su carrera (Premio Fundación Wiener 2005).

Tempranamente durante su postgraduación ha sido merecedor de 2 becas de posgrado:

Beca de la **FUNDACIÓN CAROLINA** por el programa Formación Permanente 2005 en la **UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Unidad de Neuroendocrinología Molecular**, Madrid, España. (Concluida).

Beca de Doctorado de **FUNDACIÓN CAROLINA** (2006) en la **UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES** en el programa de **Biomedicina** del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Madrid, España. (En desarrollo).

Entre sus tareas se destaca su dedicación a la docencia, investigación y extensión a través de las funciones que desempeña:

- Auxiliar de Primera Ad-Honorem por concurso. Cátedra Biología Celular y Molecular. Desde 2005 y continúa. FCEQyN - UNaM.

- Investigador con categoría Jefe de Trabajos Prácticos del Proyecto: “*Relación entre la expresión del receptor 2 de somatostatina (sstr2), la fosfotirosina fosfatasa SHP1 y el grado de diferenciación tumoral en el cáncer de próstata*”. Proyecto subsidiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por Resolución ANCyP N° 266 **PICT 05-15058**. Desde septiembre de 2003 y continúa. Director: Dr. Pedro Darío Zapata.

- Investigador del Proyecto: “*Caracterización de marcadores microsatélites para estudios poblacionales de *Aracucaria angustifolia* y *Pinus taeda**”. **PFIP Mi09**. Proyecto subsidiado por la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Desde diciembre de 2005 y continúa. Director: Dr. Pedro Darío Zapata.

En sus años de desempeño como investigador ha participado de 7 publicaciones científicas en revistas indexadas y 8 trabajos enviados a congresos nacionales e internacionales. Además se encuentra dirigiendo 2 tesis de la Licenciatura en Genética.

Pedro Darío Zapata, nació en la ciudad de Posadas, es **Bioquímico** recibido en la Universidad Nacional de Misiones, año 1995, y **DOCTOR** por la Universidad de Alcalá de Henares (España, 2002).

Sus estudios de doctorado fueron realizados en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular mediante la obtención de una beca de la **Agencia Española e Cooperación Internacional** (1998 – 2002).

Actualmente desempeña tareas como docente Jefe de Cátedra y además es director de varios proyectos de investigación subsidiados por organismos nacionales, así como de proyectos de extensión:

- Profesor Adjunto Regular. Cátedra Biología Celular y Molecular. Desde 2006 y continúa. FCEQyN - UNaM.

- Profesor Adjunto Interino. Cátedra Biología Celular y Molecular. Desde 2002 a 2006. FCEQyN - UNaM.

- Profesor Adjunto Interino. Cátedra Genética Molecular. Desde 2003 y continúa. FCEQyN - UNaM.

- Director del Proyecto: “*Relación entre la expresión del receptor 2 de somatostatina (sstr2), la fosfotirosina fosfatasa SHP1 y el grado de diferenciación tumoral en el cáncer de próstata*”. Proyecto subsidiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por Resolución ANCyP N° 266 **PICT 05-15058**. Desde septiembre de 2003 y continúa. Director: Dr. Pedro Darío Zapata.

- Director del Proyecto: “*Caracterización de marcadores microsatélites para estudios poblacionales de *Aracucaria angustifolia* y *Pinus taeda**”. **PFIP Mi09**. Proyecto subsidiado por la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Desde diciembre de 2005 y continúa.

- Co-Director del Proyecto: “*Utilización de hongos de pudrición blanca nativos de la provincia de misiones para su aplicación en procesos de bioremediación*”. Proyecto subsidiado por la Fundación Banco Río al mejor proyecto innovador. Desde febrero de 2005 y continúa.

- Director del Programa de Formación en Biología Celular y Molecular. Resolución HCD 109/03. Cátedra de Biología Celular y Molecular. Departamento de Bioquímica Clínica. Fac. Cs. Ex. Qcas. y Nat. Universidad Nacional de Misiones. Función: Director. Objetivos: formación de recursos humanos – dictado de cursos de grado y postgrado.

En sus años de desempeño como investigador ha participado de la edición de 2 libros, 26 publicaciones científicas en revistas indexadas y 23 trabajos enviados a congresos nacionales e internacionales. Además dirige actualmente varios becarios, tesis de grado y postgrado en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| Agradecimientos | 7 |
| Guía de abreviaturas y palabras extranjeras utilizadas en esta obra | 8 |
| Introducción | 9 |
| Preparación de soluciones | 13 |
| Extracción y purificación de DNA | 19 |
| Protocolos de extracción de DNA | 23 |
| Extracción de RNA total | 41 |
| Protocolos de extracción de RNA | 45 |
| Evaluación de los ácidos nucleicos extraídos | 49 |
| Electroforesis de DNA en geles de agarosa | 49 |
| Cuantificación y verificación de ácidos nucleicos | 59 |
| Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 63 |
| Anexo | 81 |
| Cálculo teórico de las temperaturas de hibridación (T_m) | 81 |
| Ejemplo para el cálculo de la T_m usando la aproximación “ <i>nearest neighbor</i> ” | 82 |
| Manipulación de RNA:RT-PCR | 85 |
| Electroforesis en geles de poliacrilamida | 99 |
| Repaso | 113 |
| Técnicas en biología celular: <i>Western Blot</i> | 125 |
| Recursos informáticos en el estudio de la biología celular y molecular | 135 |
| Bibliografía | 157 |

AGRADECIMIENTOS

Los autores deseamos agradecer muy especialmente a:

La Bioquímica Esp. Marcela Guastavino, por tomarse el trabajo de leer la presente obra, entregándonos sugerencias muy útiles, y que además colabora con nosotros desde que se fundó nuestra joven Cátedra. También agradecemos a la Bioquímica Laura Milde por cedernos tiempo en su ajustada agenda y leer este texto. En realidad ambas nos enseñan día a día, desde hace mucho tiempo.

A nuestros tesisistas, becarios y becarias y todos aquellos jóvenes que colaboran en nuestro humilde laboratorio. Ellos saben que la razón de ser del científico es construir con ingenio verdadero, y día a día nos lo demuestran cuando se enfrentan a nuestras limitaciones. Más que la Ciencia interesa la Vida, y más que nosotros como científicos interesamos nosotros como personas.

A nuestro pequeño naciente, grupo de trabajo, por su dedicación y esfuerzo en aprender a ver nuevamente la Biología, pero esta vez a través del enfoque molecular. Son personas que vienen de todas las áreas y con todos los títulos, y de allí la riqueza y la amplia visión, primando siempre el respeto.

Nuestro grupo es la institución que hace que todas las metas se alcancen, trabajando cada día. No nos cansaremos de felicitar a todos los jóvenes que apuestan a esta nueva Cátedra. A los que se empeñan, y si hay alguno que no lo hace, también, porque nos enseña cómo **no** debemos ser.

A todos los científicos que desde las más diversas áreas colaboran en la generación de nuevo conocimiento, considerando a la Ciencia como un ente dinámico, en constante cambio, que son capaces de dudar de los aspectos más básicos de todo lo que nos rodea sin cerrar su visión y que atraviesan los horizontes individuales en pos de generar un conocimiento útil, democrático y solidario, ya que son nuestros ejemplos de científicos de razón y corazón.

GUÍA DE ABREVIATURAS Y PALABRAS EXTRANJERAS

UTILIZADAS EN ESTA OBRA

La Biología Molecular como parte de la Ciencia utiliza muchas palabras del idioma inglés. Si bien en la actualidad es el idioma que domina la ciencia y los científicos deben conocerlo, el propósito de esta obra es acercar esta área a todos aquellos que la deseen conocer, por lo que agregamos este apartado con la explicación de las abreviaturas y significados de palabras rutinariamente utilizadas en el desarrollo de protocolos investigaciones en Biología Molecular.

DNA: ácido desorribonucleico.

RNA: ácido ribonucleico.

SDS: detergente iónico dodecilsulfato de sodio.

PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida.

PCR: **R**eacción en **C**adena de la **P**olimerasa.

RT-PCR: variante de PCR que permite la amplificación de segmentos de RNA, previa retrotranscripción, ya que las polimerasas de DNA dependientes de DNA (como Taq) no reconocen al RNA como matriz.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético. Usualmente se adquiere en forma de sal disódica.

TBE/TAE: Tris-Borato-EDTA / Tris-Acetato-EDTA. Estas abreviaturas corresponden al nombre de los principales iones presentes en la soluciones tampón de electroforesis.

esp: cantidad suficiente para.

Pellet: es una palabra de origen inglés utilizada para referirse al precipitado obtenido en el fondo de un tubo luego de, por ejemplo, una centrifugación.

Tips: palabra de origen inglés que se refiere a las puntas intercambiables de las micropipetas. Las puntas usualmente se presentan en dos colores, aquellas que corresponden a pipetas de bajo volumen son de color amarillo (volúmenes hasta 200 µl) y aquellas que corresponden a pipetas de volúmenes mayores son de color azul (volúmenes mayores a 200 µl).

INTRODUCCIÓN

Cuando nos detenemos a observar la silenciosa belleza de una flor o el cuidadoso volar de una abeja, o nos maravillamos frente a la existencia de un delfín, no solemos recordar que las propiedades que observamos y de las que nos maravillamos, tienen sus orígenes en una intrincada red de estructuras vivientes: las células. La correcta fisiología celular radica en la perfección de sus componentes, y su capacidad de mantener intactas muchas de sus propiedades de generación en generación es un fenómeno biológico que encuentra su explicación en una molécula increíble: el DNA.

Intentando descifrar los misteriosos designios de nuestros orígenes y de todo lo que nos rodea, los científicos de las ramas biológicas siempre han buscado nuevos modos de acercarse a la verdad, intentando responder la antigua pregunta: ¿qué es la **vida**? Quizás esto sea difícil responder, pero sabemos cuales son las letras del “*Libro de la Vida*”: bases nitrogenadas organizadas finamente en un código que constituye el **genoma**

Por otro lado, desde sus inicios la Bioquímica se ha ocupado de los fundamentos químicos que sustentan la vida, en tanto que la Genética se ha encargado de explicar las bases de la herencia y otros fenómenos biológicos de importancia, como el desarrollo y la diversidad. Entonces, *la Biología Molecular surge como un nuevo enfoque de la Biología que reúne los aportes de la Bioquímica, la Biología Celular y la Genética, para explicar los acontecimientos biológicos*. Como decía François Jacob, en su libro “*La Lógica de la Vida*”, entre sus objetivos se destaca el alcanzar la meta de interpretar las propiedades de un organismo a través de la estructura de las moléculas que lo constituyen.

En los últimos cincuenta años, y especialmente en las últimas tres décadas, la acumulación de conocimiento e información ha sido un proceso exponencial, destacándose un hito en el año 2001: la publicación de la secuencia completa del Genoma Humano. A partir de entonces tenemos abierto a todo el mundo el Gran Libro de la Vida y con la información obtenida de él podremos conocernos mejor, apuntando a la generación de nuevas tecnologías que nos permitan desarrollarnos como científicos, profesionales y personas.

La gran responsabilidad de manejar información tan importante está solamente en nuestras manos, por lo cual hemos de ser personas con enfoque maduro para enfrentar este nuevo tiempo de cambios, vibrantes de conocimiento, pero que también conlleva sus desventajas. Hemos de ser usuarios responsables de un Libro que revela la perfección de la Naturaleza. Por ello, lo mejor que podemos hacer es informarnos, y aprender a **leer** nuevamente: porque este Libro no se lee sin más, una vez que lo abrimos ya no somos los mismos de antes. Una vez que lo leemos tenemos una nueva percepción de lo que nos rodea e incluso de nosotros mismos.

Es deseo de estos autores que los lectores conozcan el uso responsable de la información generada con los últimos avances de la ciencia y que sea utilizada con nobleza, para reconocer que somos importantes en la Creación, pero que no estamos tan separados entre nosotros, ni con otras especies, ni con los vegetales, ni con el resto de seres vivientes: estamos todos **unidos, todos compartimos el mismo código**.

¿Qué es la Biología Molecular?

La biología molecular es un nuevo enfoque de la biología que reúne los aportes de la bioquímica, la biología celular y la genética, para explicar los acontecimientos biológicos.

Entre sus objetivos se destaca el alcanzar la meta declarada en 1973 por François Jacob en su libro “*La Lógica de la Vida*”:

“Interpretar las propiedades del organismo a través de la estructura de las moléculas que lo constituyen”.

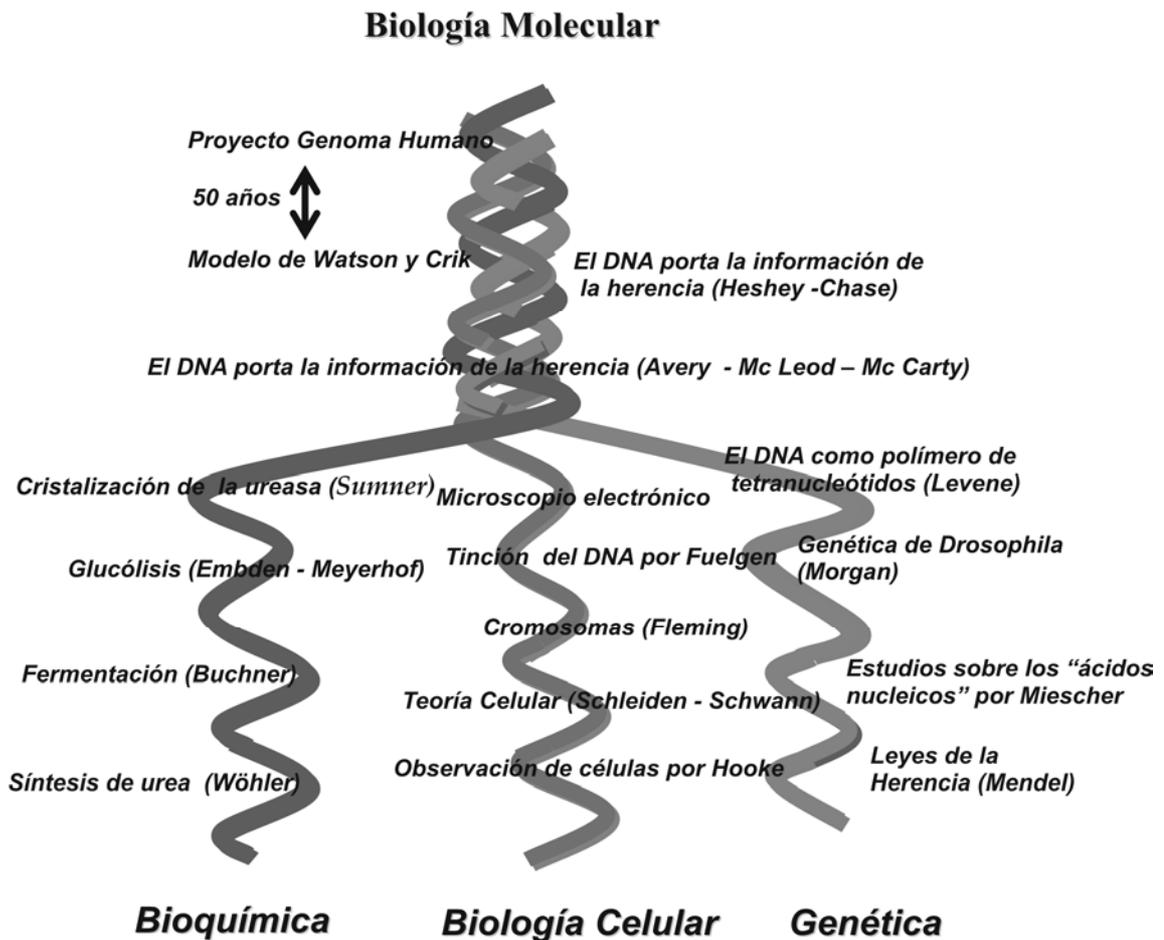


Figura 1: La Biología Molecular como un nuevo enfoque de la Biología. Principales contribuciones de diversas áreas al desarrollo del nuevo enfoque biológico-molecular.

Empezando a conocer la Biología Molecular

Como expresáramos antes, la Biología Molecular puede considerarse como un nuevo enfoque de la Biología, un nuevo aporte para conocer los fundamentos de la Vida. Interactúa de modo importante con esta ciencia tradicional, amparándose y alimentándose en sus fundamentos, teorías y experimentos. Recibe también el aporte esencial de la Bioquímica, que se constituye en su punto de apoyo fundamental, ya que le brinda todo el sustento para su contexto y no puede existir desprendida de la Genética, fortaleciéndola y extendiendo sus alcances dentro del área biológica, histórica, antropológica y social.

A pesar de contar con (relativamente) poco tiempo de existencia, el bagaje de datos es importante, y para no perdernos en esta maraña de información, será útil organizar nuestro estudio. Inicialmente veremos cómo podemos realizar la extracción de ácidos nucleicos, a partir de diversas muestras, tanto eucariotas como procariotas. Se agrega además el fundamento de extracción de DNA plasmídico, de vital importancia en la tecnología del DNA recombinante. La molécula de RNA, que permite el flujo de la información génica también puede ser aislada por diversas metodologías que luego se discutirán en la presente obra.

Una vez que hemos conseguido aislar los ácidos nucleicos, tendremos que conocer sus características cualitativas y cuantitativas. Para ello conoceremos los fundamentos de la absorbancia de ácidos nucleicos en el espectro ultravioleta, y utilizaremos la propiedad de los ácidos nucleicos, que al ser moléculas cargadas, podrán migrar en un soporte al aplicarle un campo eléctrico, o sea, se separarán mediante la técnica de electroforesis.

Ya verificada la pureza y cantidad, procederemos a amplificar regiones de DNA, haciendo uso de la poderosa Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual nos permitirá obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA, con las cuales podremos realizar numerosos estudios.

Actualmente la manipulación de la molécula de RNA es de vital importancia, tanto en investigación como en el diagnóstico clínico. De allí la discusión y generación de protocolos para comprender la retrotranscripción y la variante de la reacción en cadena de la polimerasa, denominada RT-PCR.

Luego agregamos un protocolo de electroforesis de alta utilidad en investigación, como lo es la electroforesis en geles de poliacrilamida. Ofrecemos además un protocolo para investigación proteica: electroforesis discontinua en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

El gran número de técnicas actualmente disponible para el estudio de la biología celular no nos permite generar un orden de jerarquía. Sin embargo a los fines de investigación y diagnóstico médico se incluye la discusión teórica y el protocolo general para el desarrollo de la tecnología del Western Blot.

Finalmente incluimos un capítulo destinado a los usos de la red de redes, Internet, para fines de investigación biológica. En él desarrollaremos las bases necesarias para buscar información en Internet, haciendo uso de bases de datos actualizadas, en donde encontraremos desde bibliografía y secuencias, hasta la posibilidad de diseñar y analizar *primers* para Reacciones en Cadena de la Polimerasa y observar estructuras tridimensionales, tanto de proteínas como de ácidos nucleicos.

El lector encontrará ejemplos, datos, fórmulas y preparación de soluciones, expresadas de un modo sencillo, en vistas de obtener el mayor provecho de este libro, que si bien no intenta ser exhaustivo, pretende ser un buen aliado a la hora de iniciarse en el campo fascinante de la *Biología Molecular*.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Fundamento teórico

En nuestra experiencia diaria con alumnos (y aún con graduados) llegamos a la conclusión de que no es desatinado iniciar un libro básico de laboratorio, recordando conceptos tan básicos como la preparación de soluciones. Aunque nos parezca muy común en el desarrollo diario del trabajo en ciencias, la preparación de soluciones merece un apartado especial en el cual nos pongamos de acuerdo con algunas unidades utilizadas y repasemos los fundamentos de su preparación.

A menudo nos encontramos con la necesidad de preparar soluciones de todo tipo, utilizando reactivos de diversas clases. La diferencia en el área de Biología Molecular radica, entre otros puntos, en la exquisitez de la especificidad observada aplicando sus técnicas, lo que nos impele a ser cautos y a hacer uso de todo nuestro criterio en la preparación de las soluciones a ser utilizadas. Por otra parte, hemos de ser responsables en el uso de reactivos de calidad Biología Molecular, ya que para alcanzar la pureza de los mismos son necesarios estrictos métodos de control de contaminantes, lo que encarece notablemente dichos reactivos. Por otra parte, a diferencia de los volúmenes que usualmente solemos preparar en un laboratorio común, en el área de Biología Molecular tendremos que acostumbrarnos a manejar volúmenes sumamente pequeños, incluso menores a microlitros, y valores de masa del orden de picomoles. Cualquier error que cometamos manipulando estos ínfimos valores, puede afectar la calidad del experimento o determinación a desarrollar. Aún así, a pesar de los cuidados y recomendaciones, veremos en el desarrollo de estas metodologías, que podremos hacer uso de la experiencia y el criterio, para variar concentraciones, volúmenes o masas utilizadas en técnicas de biología molecular.

Soluciones y unidades de concentración

Se llama **solución** (o **disolución**) al conjunto **homogéneo** que resulta de la dispersión de una sustancia en el seno de otra constituyendo una sola fase. El compuesto en el que se produce la dispersión es el **solvente** o **disolvente**, y el compuesto que se disuelve se denomina **soluto**. Los solutos pueden estar en cualquier estado de condensación (líquido, sólido o gas) y diremos en general que se encuentran siempre en menor cantidad.

La masa de un determinado soluto que puede disolverse en un determinado solvente a una dada temperatura es limitada. Cuando una solución tiene disuelta la máxima cantidad de soluto posible, nos encontramos frente a una solución saturada. El agregado de más soluto provocará la precipitación del mismo, encontrándonos entonces frente a una solución sobresaturada.

En general y a los fines técnicos, podemos hablar de soluciones **diluidas** (con baja cantidad de solutos), soluciones **concentradas** (de mayor contenido en solutos), soluciones **saturadas** y **sobresaturadas**, por lo que para caracterizar a una solución tendremos que conocer la **concentración**. *La concentración representa la cantidad de soluto presente en una determinada cantidad de solución o solvente.* La concentración puede expresarse en unidades físicas o bien en unidades químicas. Veamos a continuación la definición de cada una de ellas.

Unidades utilizadas en Biología Molecular

Unidades físicas

La primera unidad física se representa por % P/V (So/Sn), que expresa la cantidad en **gramos de soluto (So)** que hay en **100 mililitros de solución (Sn)**.

La segunda es % P/P (So/Sn), que expresa la cantidad en **gramos de soluto (So)** que hay en **100 gramos de solución (Sn)**.

La tercera unidad de utilidad en biología molecular es % P/P (So/Se), que indica la cantidad en **gramos de soluto** que hay en **100 gramos de solvente (Se)**.

Finalmente también tenemos % P/V (So/Se), unidad que indica la cantidad en **gramos de soluto** que hay en **100 mililitros de solvente (Se)**.

Unidades Químicas

No es intención de esta Guía Práctica describir los pormenores de la discusión acerca de las unidades de concentración, simplemente daremos algunas definiciones, remitiendo al lector a la bibliografía correspondiente para mayores detalles.

Normalidad: se define como el número de equivalentes químicos de soluto por litro de solución.

$$\text{NORMALIDAD} = N = \frac{\text{Número de equivalentes químicos}}{\text{Litro de solución}}$$

Molaridad: se define como el número de moles de soluto por litro de solución.

$$\text{MOLARIDAD} = M = \frac{\text{Moles de soluto}}{\text{Litro de solución}}$$

Molalidad: se define como el número de moles de soluto por 1000 gramos de solvente.

$$\text{MOLALIDAD} = m = \frac{\text{Moles de soluto}}{1000 \text{ g de solvente}}$$

A pesar de que existen otras unidades, de la que más uso haremos es la **molaridad**, debido a su practicidad y la facilidad de su utilización, ya que no requiere manejar el número de equivalentes químicos, ni tampoco la densidad del disolvente, y nos basta entonces con conocer el peso molecular del reactivo para calcular rápidamente la concentración de la solución requerida.

Preparación de soluciones a partir de Soluciones Madres o Stock

Como indicáramos anteriormente, los volúmenes y masas de trabajo en el área molecular, son sumamente pequeños, por lo que usualmente se preparan **soluciones madre (Stock)**, de alta concentración, que luego se pueden diluir. Es más conveniente esto ya que se pesan masas mayores de solutos, lo que disminuye el error, evita la contaminación de los reactivos de Calidad Biología Molecular por

la manipulación constante y por diversos operarios, y además facilita la preparación de las soluciones, ya que no debe estar pesando una y otra vez los reactivos, optimizando el uso del tiempo en el laboratorio.

Las soluciones madre se preparan a alta concentración, se ajustan a pH deseado, se alicuotan, se esterilizan en autoclave (de ser necesario) y se mantienen congeladas (en caso de que puedan ser congeladas) o en refrigerador durante un tiempo prudencial.

Para poder hacer uso de las mismas, simplemente tenemos que diluirlas a la concentración necesaria. Para ello haremos uso de una práctica ecuación, conocida como la ecuación de equivalencia, que es la siguiente:

$$\text{CONCENTRACIÓN INICIAL} \times \text{VOLUMEN INICIAL} = \text{CONCENTRACIÓN FINAL} \times \text{VOLUMEN FINAL}$$

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

El término C_i (**Concentración Inicial**) indica la concentración de la Solución Madre o Stock de partida.

El término V_i (**Volumen Inicial**) indica el volumen que hemos de tomar de dicha solución madre, para llegar a la concentración final deseada.

C_f (**Concentración final**) representa el valor de concentración final al cual debemos llegar, tras diluir la solución madre.

Finalmente V_f (**Volumen final**) representa el volumen de solución (diluida a partir de la solución madre) que necesitamos preparar.

Ejercicio Práctico

Para aclarar el uso de la ecuación propuesta podríamos exponer un ejemplo:

1) *Se debe preparar 10 mL de una solución para la extracción de DNA vegetal. La fórmula de la misma es la siguiente: Tris 100 mM, EDTA 50 mM y NaCl 500 mM.*

Parta de las siguientes Soluciones Madres:

- Tris 1 M
- EDTA 0,5 M
- ClNa 6 M.

Resolución

a) **Tris**: este es un compuesto básico (2-amino-2-(hidroximetil)-1, 3- propanodiol) cuyo uso está muy difundido en el área de Biología Molecular en la preparación de diversos tampones, y como agregado en reactivos de lisis, purificación, y re-suspensión de ácidos nucleicos. Su peso molecular es de 121,1 g/mol.

Para calcular lo solicitado, aplicaremos la fórmula:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Y entonces calcularemos V_i

$$V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i}$$

$$V_i = \frac{100 \times 10^{-3} \text{ M} \times 10 \text{ mL}}{1 \text{ M}} = 0,1 \text{ mL}$$

b) **EDTA**: es el ácido etilendiaminotetraacético, y generalmente se provee en forma de sal disódica. Es un quelante de iones y se hace uso extensivo del mismo en la preparación de diversas soluciones en Biología Molecular, así como en solución tampón de corridas electroforéticas. Su peso molecular es de 362 g/mol.

Para calcular lo solicitado, aplicaremos la fórmula:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Y entonces calcularemos V_i

$$V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i}$$

$$V_i = \frac{50 \times 10^{-3} \text{ M} \times 10 \text{ mL}}{0,5 \text{ M}} = 0,1 \text{ mL}$$

c) **Cloruro de Sodio**: las sales se agregan a los fines de estabilizar el medio salino y además para coadyuvar a la lisis de las paredes celulares vegetales o a las membranas biológicas en caso de las muestras de mamíferos.

Para calcular lo solicitado tendremos:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Y entonces calcularemos V_i

$$V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i}$$

$$V_i = \frac{500 \times 10^{-3} \text{ M} \times 10 \text{ mL}}{6 \text{ M}} = 0,83 \text{ mL}$$

Entonces la fórmula final indicaría lo siguiente:

| | |
|-----------------------|-------------------------------------|
| Tris 1 M | 0,1 mL |
| EDTA 0,5 M | 0,1 mL |
| CINa 6 M | 0,83 mL |
| Agua destilada | csp 10 mL (es decir 8,97 mL) |

Proponemos otro ejemplo:

2) Se desea preparar 50 mL una solución de Lisis para Glóbulos Rojos, obtenida a partir de la bibliografía. La fórmula de concentraciones finales indica: Tris 10 mM; Sacarosa 11%, Tritón X 100 1%.

Resolución:

a) **Tris:** partiremos nuevamente de la Solución Madre de Tris 1 M.

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Y entonces calcularemos V_i

$$V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i}$$

$$V_i = \frac{10 \times 10^{-3} \text{ M} \times 50 \text{ mL}}{1 \text{ M}} = 0,5 \text{ mL}$$

b) **Sacarosa:** en este caso, el aporte osmótico ejercido por la sacarosa permitirá la ruptura de las membranas del glóbulo rojo, eliminándolos de una muestra de sangre en la que, para extraer DNA, solo nos importan los elementos nucleados, o sea los glóbulos blancos. En este caso se presenta una variación, ya que se solicita una concentración final de 11 %. Esto significa 11 g de soluto por cada 100 mL de solución, por lo que para preparar 50 mL tendremos que pesar 5,5 g de sacarosa de Grado Biología Molecular.

100 mL 11 g
50 mL X= 5,5 g

c) **Tritón X100™:** esta es la marca comercial de un detergente muy utilizado en Biología Molecular, para desorganizar las membranas biológicas, permitiendo la ruptura de las mismas, lo cual constituye un paso sumamente importante en la extracción de ácidos nucleicos, como veremos en las próximas experiencias.

Para este caso sucede algo similar a lo del inciso anterior. Se nos solicita Tritón X100 a una concentración final de 1% por lo que en este caso se agregará 1 mL del detergente (que se comercializa líquido) por cada 100 mL de solución. Para preparar 50 mL hemos de medir 0,5 mL.

100 mL 1 mL
50 mL X= 0,5 mL

Entonces la fórmula final indicaría lo siguiente:

| | |
|-----------------------|-----------------------------------|
| Tris 1 M | 0,5 mL |
| Sacarosa | 5,5 g |
| Tritón X100™ | 0,5 mL |
| Agua destilada | csp 50 mL (es decir 49 mL) |

Recomendaciones finales y ejercicios propuestos

Finalmente recordamos que siempre es conveniente tomarse un tiempo prudencial para calcular, corregir y observar la preparación de soluciones. Muchos de los cálculos se realizan una sola vez, ya que se preparan grandes volúmenes o altas concentraciones. Aún así siempre es útil repetir los cálculos y asentarlos en el cuaderno de laboratorio. Cuando surjan dudas acerca de los procedimientos tendrá el respaldo del cuaderno, el cual debe ser su mejor aliado en el laboratorio de Biología Molecular.

Para que se entrene en el cálculo y preparación de soluciones, usted tiene al final de cada experiencia las soluciones que se utilizan. Puede recalcularlas y obtener sus propias conclusiones ya que dichos ejercicios le serán de gran utilidad en el desarrollo de las siguientes experiencias. Antes de la siguiente experiencia le proponemos los siguientes ejercicios:

El Jefe de su Laboratorio de Biología Molecular le pide que prepare los reactivos que han de utilizar para una corrida electroforética, entregándole los siguientes datos:

TBE 10 X (Buffer de Corrida Electroforética)

| | |
|----------------------------|-------------------------------------|
| Tris base | 0,89 M (Solución madre: Tris 1 M) |
| Ácido bórico | 0,89 M (PM=61 g/mol) |
| EDTA | 0,02 M (Solución madre: EDTA 0,5 M) |
| H ₂ O destilada | csp 1000 mL |

Buffer de carga para preparación de muestras de electroforesis en geles de agarosa

| | |
|-----------------------------------|--|
| Glicerol | 60% (Solución madre: Glicerol al 100%) |
| Azul de Bromofenol | 0,01 % (reactivo en polvo) |
| Solución de Tris 10 mM y EDTA 1mM | csp 1,5 mL |

Indique (a modo de “fórmula”) cuanto ha de agregar de soluciones madre, o cuanto pesará de solutos, y la cantidad de solvente que ha de agregar para preparar las soluciones requeridas.

Además le pide que prepare 50 mL de agarosa al 1,5 % p/v.

¿Qué significa “agarosa al 1,5% p/v”? ¿Cómo prepara el volumen de agarosa solicitado? Contestar esta pregunta en formato de fórmula, tal como hemos visto en los ejemplos anteriores.

(Como veremos en experiencias siguientes, el solvente utilizado para preparar agarosa, un gel que servirá como soporte para corridas electroforéticas, es el mismo buffer de corrida una vez concentrado (1X). Si lo desea consulte el apartado de Electroforesis en geles de agarosa para asesorarse mejor).

En el apartado “repaso” encontrará las respuestas a estas cuestiones, sin embargo, instamos al lector a agotar sus propios recursos en el intento de resolver estos ejemplos.

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA

Fundamento teórico

Actualmente es bien conocido el hecho de que la información genética en un organismo está almacenada (y es pasada de generación en generación) en forma de ácido desoxirribonucleico (DNA).

El DNA fue aislado por primera vez hace más de 100 años a partir de esperma de salmón, por el bioquímico suizo Miescher, el cual lo llamó *ácido nucleico*. Mucho más tarde se llegó a conocer que, de hecho, hay dos clases de ácidos nucleicos en todas las células. Luego de que Feulgen introdujera una coloración específica para el DNA (hace más de 7 décadas), se reconoció a esta molécula como localizada ampliamente en el núcleo de las células eucariotas. En contraste, el otro ácido nucleico, el ácido ribonucleico (RNA), se ubica en mayor proporción en el citoplasma. Las bacterias, que carecen de núcleo, poseen ambos ácidos nucleicos dentro del citosol.

Los ácidos nucleicos son componentes importantes de las células y juntos representan del 5 al 15% del peso seco de las mismas. Las bacterias como *Escherichia coli* contiene 0,1 picogramos ($0,1 \times 10^{-12}$ g) de DNA por célula y su DNA puede llegar a medir 1 mm. Sin embargo, una célula humana típica contiene alrededor de 6 picogramos de DNA, y la longitud total de una molécula del mismo puede llegar a los 174 cm e incluso más.

El DNA como molécula es extremadamente sensible a las fuerzas de estrés mecánico o cizallamiento debido a su gran longitud, por lo que las prácticas rutinarias del laboratorio podrían romper la molécula en fragmentos. Sin embargo, una vez aislado, el DNA es una macromolécula relativamente estable y puede mantenerse congelada seca, en etanol, o hidratada (en soluciones buffer o agua destilada estéril).

Pero las células contienen otras moléculas complejas distintas al DNA, por lo que existen diversos métodos que permiten el aislamiento de este ácido nucleico, en forma relativa o altamente pura. Los métodos de rutina incluyen una serie de pasos básicos:

- Disrupción celular.
- Lisis celular por tratamiento con detergentes.
- Remoción de las proteínas por digestión o tratamiento con proteasas, o bien por extracciones con solventes, como fenol y cloroformo. Eventualmente se pueden eliminar proteínas, precipitándolas al aumentar la tensión iónica del medio, por ejemplo agregando sales en alta concentración.
- Precipitación del DNA por mezclas de alcoholes y sales.
- Rehidratación y almacenamiento.

El DNA puede llegar a precipitar como un material fibroso que puede ser recogido y continuar siendo purificado de proteínas o bien RNA, que puede coprecipitar durante el proceso de aislamiento.

La presencia de detergentes, agentes quelantes de metales divalentes, y proteasas estables tales como la proteinasa K durante el proceso de aislamiento, previene cualquier hidrólisis del DNA por nucleasas celulares y asegura el aislamiento de DNA intacto.

La mayoría de las investigaciones en el área de la Biología Molecular parten en el aislamiento de ácidos nucleicos. La obtención de los mismos es un paso fundamental para utilizar las herramientas moleculares, al servicio del diagnóstico o del proceso de investigación científica.

Dado que el DNA se encuentra en todas las células eucariotas y procariotas, las muestras de las que podemos partir para aislarlo son diversas.

En el caso de los vegetales, el primer inconveniente que hallamos en el aislamiento de los ácidos nucleicos es la pared celular. Por ello se suele recurrir al congelamiento con nitrógeno líquido, con el objeto de disrumpir fácilmente dicha pared. Por otro lado, la rápida activación de enzimas (especialmente nucleasas), provoca la rápida destrucción de los ácidos nucleicos vegetales. El tiempo consumido en la destrucción de la pared celular es suficiente para que la activación de enzimas provoque la pérdida del material genético. Así, para sortear este inconveniente, debemos tener la precaución de trabajar a las más bajas temperaturas posibles y con la mayor velocidad. Por ello es importante tener congelados los morteros, los brazos de morteros, los microtubos donde depositaremos la muestra pulverizada y todo elemento que se pondrá en contacto con la muestra hasta que se le adicione la solución de extracción **en caliente**. En conclusión, el único aumento de temperatura que sufrirá la muestra se verificará cuando le adicionemos la solución de extracción que contiene detergentes y compuesto desnaturizantes de proteínas, lo que prevendrá la destrucción de los ácidos nucleicos.

El impedimento de la pared celular no se halla cuando partimos de células animales, por lo que directamente empleamos un detergente, el cual actuará formando micelas con los componentes lipídicos de las membranas biológicas. En ocasiones, el agregado de sales que aportan cationes divalentes puede coadyuvar a este proceso de disrupción. Sucede algo similar cuando se emplean células bacterianas. A pesar de que en las bacterias se halla presente una pared celular, no suele representar un impedimento para la acción de los detergentes, ya que no es tan rígida y estable como las paredes celulares vegetales. Eventualmente algunos protocolos incluyen el uso de enzimas para facilitar la disrupción del péptidoglicano, constituyente de las paredes celulares bacterianas.

Una vez que ha actuado el detergente las membranas celulares han sido disrumpidas y las organelas han sido precipitadas tras la desnaturización y centrifugación, por lo que se debe iniciar el proceso de purificación. Esta etapa es fundamental y se centra en la eliminación de las proteínas, que representan los principales contaminantes y que atentan contra la pureza de los ácidos nucleicos que buscamos aislar.

Para purificar el DNA de las proteínas que acompañan al extracto, tenemos varias opciones. La más comúnmente utilizada es la extracción utilizando solventes orgánicos, como fenol y cloroformo. Estos solventes apolares permiten la disolución de las porciones hidrofóbicas de las proteínas, siendo luego eliminadas las mismas junto a la eliminación del solvente. Además los solventes presentan propiedades como desnaturizantes proteicos.

Sin embargo, los solventes son inhibidores de muchas enzimas (como la Taq polimerasa utilizada en la PCR), y además conllevan un riesgo para la salud del operador (recordemos que ambos solventes son volátiles y además que el fenol puede causar quemaduras y que el cloroformo puede afectar a los hepatocitos). Por ello contamos con otras posibilidades: una muy útil y efectiva es aumentar la tensión iónica del medio, mediante el agregado de sales en alta concentración. Las sales al disociarse en sus iones, afectan la carga global de las proteínas. Inicialmente, el agregado de bajas concentraciones de sales puede llegar a aumentar la solubilidad de las proteínas (en un fenómeno conocido como "*salting in*", muy utilizado para la purificación proteica). Sin embargo, a medida que aumenta la concentración salina, la solubilidad de las proteínas disminuye y estas terminan precipitando, pudiendo ser luego concentradas por centrifugación y eliminadas fácilmente.

Otra posibilidad muy utilizada es contar con enzimas proteasas que al actuar digieren a las proteínas, liberando péptidos que pueden ser más fácilmente elimina-

dos del extracto. Una proteasa muy comúnmente utilizada es la Proteinasa K. Esta enzima cliva específicamente las uniones peptídicas que involucran a aminoácidos alifáticos, aromáticos o hidrofóbicos. Como todas las enzimas, esta proteasa tiene un valor de temperatura óptima que se encuentra en 65°C, por lo cual se requiere someter al extracto a esta temperatura, por lo general valiéndonos de un baño termostático. Además la actividad de esta enzima puede ser aumentada por la adición al medio del detergente SDS (dodecil sulfato de sodio).

Una vez que hemos eliminado la mayor parte de los contaminantes, se obtiene un extracto acuoso que contiene solubilizado y disperso al DNA, por lo que se requiere su concentración. Para ello se utilizan alcoholes, que disminuyen la solubilidad del DNA. Tras la precipitación y centrifugación, podemos obtener un *pellet* (que es una palabra inglesa para referirse al precipitado concentrado en el fondo del tubo o culote), que representa el DNA concentrado y en condiciones de pureza.

Luego debemos lavar este DNA recién obtenido, con el objeto de eliminar cualquier resto de solvente o alcohol, que puede llegar a interferir con el uso futuro de dicho aislamiento. Una vez lavado este *pellet*, es resuspendido nuevamente en agua estéril o bien en buffer, pudiendo ser almacenado a bajas temperaturas por un período considerable de tiempo.

Una diferencia respecto a lo anteriormente expuesto, se observa cuando el objeto de nuestro interés es el aislamiento de plásmidos.

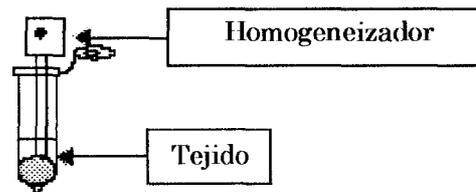
Los plásmidos bacterianos están constituidos por DNA bicatenario circular y se caracterizan por replicarse independientemente del genoma de la bacteria que los contiene. Muchos plásmidos contienen genes que pueden representar una ventaja para la bacteria que los alberga, y pueden ser “*compartidos*” por diversas cepas bacterianas. Los plásmidos adquieren importancia médica, ya que son portadores de genes de resistencia a muchos antibióticos, y son de importancia en investigación en Biología Molecular, ya que pueden ser utilizados como vectores en los procesos de clonación celular.

Cuando buscamos aislar un plásmido nos valemos del hecho de que al desnaturar el DNA (tanto del genoma bacteriano, como del propio plásmido) las hebras pueden volver a hibridar, si se revierten las condiciones que provocaron dicha desnaturalización. Sin embargo, los plásmidos al ser moléculas mucho más pequeñas y circulares, pueden volver a hibridar de un modo correcto y más rápidamente que el genoma bacteriano, el cual no hibrida correctamente, formando una masa que puede precipitar junto a los restos de la célula bacteriana destruida por el detergente. Las condiciones desnaturantes se alcanzan utilizando un álcali (NaOH) el cual luego es neutralizado con un ácido débil (acetato de potasio), para revertir la separación de las dos cadenas del DNA, permitiendo mantener al DNA plasmídico en solución, en tanto que el genoma bacteriano precipita. Es sumamente necesario tener en cuenta esta diferencia, ya que es crucial evitar el exceso de fuerzas mecánicas en la solución, cuando aislamos plásmidos.

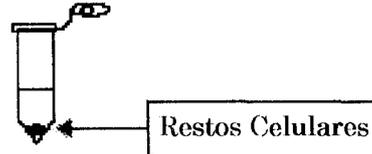
Como hemos visto contamos con una amplia gama de posibilidades de aislar y purificar efectivamente el DNA contando con relativamente pocos recursos. Sin embargo, tenemos que recordar que actualmente este paso suele ser automatizado, o bien basado en el uso de kits comerciales, que permiten la obtención de DNA tanto en solución, como en soportes sólidos tales como las tiras comerciales para aislar ácidos nucleicos.

A pesar de que este paso de extracción no sea muy complejo, constituye nuestro punto de partida para todo el desarrollo y la aplicación de las técnicas del área de Biología Molecular, por lo que siempre deberemos optimizarlo según las necesidades y uso futuro del DNA aislado.

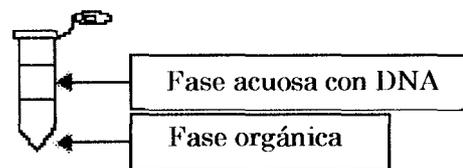
Disgregación del tejido



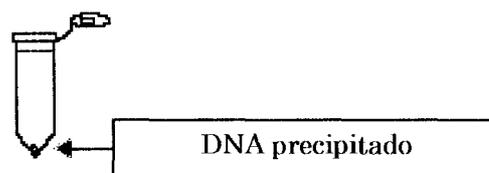
Lisis de células y eliminación de restos celulares



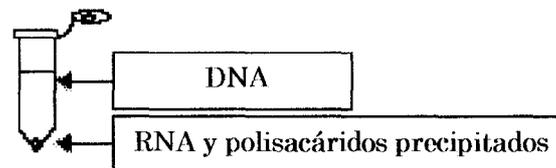
Purificación del DNA



Precipitación del DNA



Repurificación (Eliminación de RNA y polisacáridos)



Resuspensión del DNA

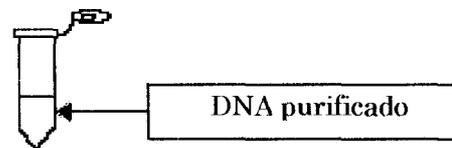


Figura 2: Protocolo general de extracción de ácidos nucleicos. Cada Laboratorio adapta su protocolo general de extracción de acuerdo con el tipo de muestras con las que trabaja.

PROTOSCOLOS DE EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE
MUESTRAS DIVERSAS

A) Protocolo de extracción de dna a partir de muestras embebidas en parafina (nacimiento y cols, 2003) modificado.

Muestra: tejidos embebidos en parafina presentados en microtubos cónicos de 1,5 mL libre de nucleasas.

REACTIVOS

Xilol

Etanol absoluto

Etanol 95%

Etanol 70%

Solución de Extracción de DNA

SDS 20%

CTAB 20%

β -mercaptoetanol

Solución Cloroformo: Alcohol Isoamílico 24:1

Acetato de Sodio 3 M

Solución TE 1 pH 8

PROCEDIMIENTO

- Adicionar al tejido 1,5 mL de xilol. Incubar en baño termostatzado a 55°C, durante 30 minutos. Centrifugar a 12000 rpm por 3 minutos y eliminar el solvente. Adicionar 1,5 mL de xilol y volver a incubar a 55°C durante 30 minutos más. Se verifica una mejor desparafinización cambiando cada 20 minutos el solvente. Luego del último cambio de solvente centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos y eliminar el sobrenadante.
- Agregar 1,5 mL de etanol absoluto. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Centrifugar a 12000 rpm durante 3 minutos y eliminar el sobrenadante.
- Agregar 1,5 mL de etanol 95%. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a 12000 rpm durante 3 minutos y eliminar el sobrenadante.
- Agregar 1,5 mL de etanol 70%. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a 12000 rpm durante 3 minutos y eliminar el sobrenadante. Repetir la adición de etanol 70 % y la centrifugación.
- Agregar 1,5 mL de agua destilada libre de nucleasas. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante.
- Adicionar 800 μ l de *Solución de Extracción (100 mM TRIS pH 8, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8)*. Adicionar *SDS 20%* (concentración final 2%), *CTAB 20%* (concentración final 2%), *Proteinasa K 20 mg/ml* (concentración final 0,1 mg/ml) y *β -mercaptoetanol* (concentración final de 10 mM; se debe adicionar el *β -mercaptoetanol* justo en el momento de utilizar). Mezclar por inversión. Incubar a 55 °C durante 16 hs. Verificar la total digestión de los tejidos.
- Adicionar 600 μ l de *Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1)*. Mezclar con vórtex durante 15 segundos.
- Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos. Trasvasar la fase acuosa (superior) a un microtubo cónico nuevo. **Registrar el volumen de fase acuosa que se trasvasa.** Repetir el paso de purificación con cloroformo: alcohol isoamílico

- Adicionar a la fase acuosa recuperada del paso anterior 200 µl de acetato de potasio 3 M. Mezclar por inversión. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos. Trasvasar el sobrenadante a un nuevo microtubo cónico de 1,5 mL.
- Precipitar el DNA con 1 volumen de *isopropanol*. Dejar precipitando durante 16 hs a 4°C o -20 °C.
- Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos.
- Eliminar el *isopropanol* y lavar el precipitado (*pellet*) con 1 mL de *etanol* 70%.
- Volver a centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos y extraer todo el alcohol. Dejar secar a temperatura ambiente.
- Resuspender en *TE 1 pH 8* (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) o bien en agua destilada libre de nucleasas.
- Conservar a -20°C.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

TRIS-HCl 1M pH 7.4 (SOLUCIÓN STOCK)

*Pesar 12,11 g de Tris y disolverlo en 100 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7,4 con HCl concentrado.
Autoclavar y mantener en heladera.*

EDTA 0,5M pH 8,0 (SOLUCIÓN STOCK)

*Pesar 93,05 g de EDTA y disolver en 500 mL de agua destilada. Ajustar a pH 8,0 con granallas de Na (OH).
Autoclavar y mantener en heladera.*

SOLUCIÓN DE EXTRACCIÓN DE DNA

| | |
|-----------------------|--|
| <i>Tris HCl 1M</i> | <i>10 mL (concentración final 100 mM o 0,1 M)</i> |
| <i>EDTA 0,5M</i> | <i>10 mL (concentración final 50 mM o 0,05 M)</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>71,6 mL</i> |
| <i>CINa 6 M</i> | <i>8,3 mL (concentración final 500 mM o 0,5 M)</i> |

Autoclavar y preservar en heladera.

SDS 20 %

*Disolver 20g de SDS en 100 mL de agua. Calentar en baño termostatzado para favorecer su disolución.
Mantener a temperatura ambiente.*

CTAB 20 % Bromuro de cetiltrimetilamonio

*Disolver 20g de CTAB en 100 mL de agua. Calentar en baño termostatzado para favorecer su disolución.
Mantener a temperatura ambiente.*

CLOROFORMO: ALCOHOL ISOAMÍLICO

Precaución: el fenol es un solvente volátil que pueden causar quemaduras de diversa consideración. El cloroformo también es volátil. Trabaje con precaución.

La proporción es de 24 partes de cloroformo y 1 parte de alcohol isoamílico. Mezclar 25 mL de fenol saturado en Tris con 24 mL de cloroformo y 1 mL de alcohol isoamílico. Se pueden preparar volúmenes mayores respetando dicha proporción. Mantener a temperatura ambiente, o bien, refrigerado.

ETANOL 95%

| | |
|-------------------------------|----------------------|
| <i>Etanol absoluto</i> | <i>95 mL</i> |
| <i>Agua destilada estéril</i> | <i>c.s.p. 100 mL</i> |

ETANOL 70%

| | |
|-------------------------------|----------------------|
| <i>Etanol absoluto</i> | <i>70 mL</i> |
| <i>Agua destilada estéril</i> | <i>c.s.p. 100 mL</i> |

TE 1 (TRIS-HCl/EDTA)

| | |
|-----------------------|--|
| <i>Tris 1 M</i> | <i>1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)</i> |
| <i>EDTA 0,5 M</i> | <i>0,2 mL (concentración final 1 mM o 0,001 M)</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>c.s.p 100 mL</i> |

Ajustar el pH a 8, autoclavar y preservar en heladera.

B) Protocolo de extracción de dna vegetal (Wining y Langridge; 1991)

Muestra: tejido vegetal fresco congelado y molido (por ejemplo ápices de hojas jóvenes).

EQUIPAMIENTOS

Baño termostatizado (45°C y 90°C)

Microcentrífuga

Micropipetas

Agitador vórtex

Morteros con sus correspondientes brazos

Espátulas

Gradillas correspondientes a los distintos volúmenes de tubos empleados

MATERIALES

Puntas (“tips”) amarillas y azules

Tubos de plástico de fondo cónico de 50 mL y 15 mL

Microtubos cónicos de 1,5mL resistentes a solventes orgánicos

Marcador indeleble

REACTIVOS

Nitrógeno líquido contenido en recipiente térmico apropiado para mantenerlo en estado líquido

Solución de Extracción de DNA vegetal

SDS 20%

Solución Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico 25:24:1

Solución Cloroformo: Alcohol Isoamílico 24:1

Acetato de Sodio 3 M

Isopropanol

Etanol 70%

Solución TE 1 pH 8

PROCEDIMIENTO

Antes de iniciar el procedimiento debemos tener congelados los morteros, así como los microtubos y todo elemento que se ponga en contacto con la muestra hasta el paso de adición de la Solución de Extracción. Es de vital importancia no someter a la muestra a un aumento de temperatura antes de este paso. Se recomienda trabajar en hielo y con todos los elementos congelados.

- Seleccionar las porciones más jóvenes de la muestra, evitando tomar hojas muy antiguas, o con nervaduras importantes. Congelar la muestra utilizando N_2 líquido y moler el tejido vegetal hasta obtener un polvo sumamente fino ejerciendo un movimiento rotatorio sobre la muestra congelada. Colocar el polvo en un microtubo cónico de 1,5 ml, utilizando una espátula congelada.
- Disolver el polvo con 800 μ l de *Solución de Extracción (100 mM TRIS pH 8, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8)*. Mezclar por inversión. De acuerdo con el mayor agregado de muestra se puede adicionar mayor volumen de *Solución de Extracción*.
- Adicionar 80 μ l de *SDS 20%*, mezclar con vórtex 5 segundos e incubar a 60 °C durante 1 hora (agitar cada 10’).
- Adicionar igual volumen de *Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1)*. Mezclar con vórtex durante 15 segundos.

- Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos. Trasvasar la fase acuosa (superior) a un microtubo cónico nuevo. **Registrar el volumen de fase acuosa que se trasvasa.**
- Adicionar **igual volumen** de *Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)*. Mezclar con vórtex durante 15 segundos hasta formación de emulsión.
- Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos. Trasvasar la fase acuosa (superior) a un microtubo cónico nuevo. **Registrar el volumen de fase acuosa que se trasvasa.**
- Precipitar el DNA con un volumen de *isopropanol* frío. Se puede utilizar 2 ½ volúmenes de *etanol absoluto* en este paso. Dejar precipitando toda la noche a -20 °C.
- Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos.
- Eliminar el *isopropanol* y lavar el precipitado (*pellet*) con 1 mL de *etanol 70%*.
- Volver a centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos y extraer todo el alcohol. Dejar secar a temperatura ambiente.
- Resuspender en *TE 1 pH 8 (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8)* o bien en agua destilada estéril.
- Conservar a - 20 °C.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

TAMPÓN DE EXTRACCIÓN DE DNA VEGETAL

| | |
|--|--|
| <i>Tris HCl 1M</i> | <i>10 mL (concentración final 100 mM o 0,1 M)</i> |
| <i>EDTA 0,5M</i> | <i>10 mL (concentración final 50 mM o 0,05 M)</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>71,6 mL</i> |
| <i>CINa 6 M</i> | <i>8,3 mL (concentración final 500 mM o 0,5 M)</i> |
| <i>Autoclavar y preservar en heladera.</i> | |

SDS 20 %

*Disolver 20g de SDS en 100 mL de agua. Calentar en baño termostatzado para favorecer su disolución.
Mantener a temperatura ambiente.*

FENOL SATURADO EN TRIS-HCl

Fundir el fenol en baño termostatzado (temperatura de fusión: 80°C). Una vez líquido, adicionar lentamente Tris-HCl pH 7,5 hasta saturar la solución. Permitir que se separen las dos fases y ajustar con Tris 0,1 M hasta que el pH del Tris en equilibrio sea de 7,6. Almacenar saturado en Tris en heladera en frasco color caramelo (se debe evitar la oxidación del fenol, y siempre constatar el pH del mismo, no utilizándose si está oxidado o ácido).

FENOL: CLOROFORMO: ALCOHOL ISOAMÍLICO

Precaución: el fenol es un solvente volátil que pueden causar quemaduras de diversa consideración. El cloroformo también es volátil. Trabaje con precaución.

*La proporción es de 25 partes de fenol, 24 partes de cloroformo y 1 parte de alcohol isoamílico. Mezclar 25 mL de fenol saturado en Tris con 24 mL de cloroformo y 1 mL de alcohol isoamílico. Se pueden preparar volúmenes mayores respetando dicha proporción.
Mantener a temperatura ambiente, o bien, refrigerado.*

ETANOL 70%

| | |
|-------------------------------|----------------------|
| <i>Etanol absoluto</i> | <i>70 mL</i> |
| <i>Agua destilada estéril</i> | <i>c.s.p. 100 mL</i> |

TE 1 (TRIS-HCl/EDTA)

| | |
|---|--|
| <i>Tris 1 M</i> | <i>1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)</i> |
| <i>EDTA 0,5 M</i> | <i>0,2 mL (concentración final 1 mM o 0,001 M)</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>c.s.p 100 mL</i> |
| <i>Ajustar el pH a 8, autoclavar y preservar en heladera.</i> | |

C) Protocolo de extracción de dna procariota a partir de cultivo bacteriano

Muestra: suspensión bacteriana (aproximadamente 18 a 20 hs de cultivo) en caldo nutritivo, o bien colonias bacterianas en agar nutritivo u otro medio de cultivo sólido.

EQUIPAMIENTOS

Microcentrífuga

Baño termostatzado

Micropipetas

Agitador vórtex

Gradillas correspondientes a los distintos volúmenes de tubos empleados

Mecheros

MATERIALES

Cultivo bacteriano en medio sólido o líquido

Ansas ojales (de ser necesarias para realizar la suspensión)

Puntas (“tips”) amarillas y azules

Tubos de plástico de fondo cónico de 50 mL y 15 mL

Microtubos cónicos de 1,5mL

Marcador indeleble

SOLUCIONES

Solución TE 1

Proteinasa K 20 mg/ml

SDS 20%

Fenol saturado en Tris-HCl

Solución Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)

Isopropanol

Acetato de Sodio 3 M

Etanol 70%

TE 1 pH 8

PROCEDIMIENTO

- Partir de la suspensión de bacterias bajo estudio. La concentración mínima útil es usualmente muy baja, sin embargo se recomienda disponer de una suspensión concentrada en bacterias. Trasvasar la suspensión a un microtubo cónico de 1,5 mL. Eventualmente suspender el cultivo en caldo estéril en el volumen de un microtubo cónico de 1,5 mL.
- Centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos. Eliminar el sobrenadante y dejar el **pellet** lo más seco posible.
- Resuspender el **pellet** en un máximo de 600 µl de *Solución TE 1 (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA)*.
- Adicionar 5 µl de *Proteinasa K 20 mg/ml* y mezclar con vórtex por 10 segundos.
- Adicionar 15 µl de *SDS 20%*, mezclar con vórtex por 5 segundos e incubar durante 1 hora a 60 °C (agitar con vórtex cada 10 minutos).
- Adicionar un volumen de *Fenol saturado en Tris-HCl*. Mezclar con vórtex por 15 segundos.
- Centrifugar 3 minutos a 12.000 rpm. Transferir la fase superior (acuosa) a un microtubo cónico nuevo. **Registrar el volumen de fase acuosa que se trasvasa.**

- Adicionar ***igual volumen*** de *Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)*. Mezclar con vórtex durante 15 segundos.
- Centrifugar 3 minutos a 12.000 rpm. Transferir la fase superior (acuosa) a un tubo nuevo. ***NOTA: Puede repetirse una vez más esta última extracción con Cloroformo: Alcohol Isoamílico.***
- Precipitar el DNA con un volumen de *isopropanol* frío y 1/10 de volumen de *Acetato de sodio 3 M pH 7*. Puede permitirse la precipitación durante un tiempo, por ejemplo durante toda una noche a -20°C.
- Centrifugar durante 5 minutos a 12.000 rpm.
- Eliminar el *isopropanol* y lavar el ***pellet*** con 1 mL de *etanol 70%*.
- Volver a centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos y extraer todo el alcohol. Dejar secar a temperatura ambiente.
- Resuspender en *TE 1 pH 8 (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8)* o bien en agua destilada estéril.
- Conservar a -20 °C.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

SOLUCIÓN TE 1 (TRIS-HCl/EDTA)

| | |
|---|--|
| <i>Tris 1 M</i> | <i>1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)</i> |
| <i>EDTA 0,5 M</i> | <i>0,2 mL (concentración final 1 mM o 0,001 M)</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>c.s.p 100 ml</i> |
| <i>Ajustar el pH a 8, autoclavar y preservar en heladera.</i> | |

PROTEINASA K 20 mg/mL

Comercialmente se distribuye liofilizada o bien en solución conteniendo glicerol (que evita que se congele). Se debe preservar a -20 ° C.

SDS 20 %

Disolver 20g de SDS en 100 mL de agua destilada. Calentar en baño termostático para disolver el SDS. Mantener a temperatura ambiente.

FENOL SATURADO EN TRIS-HCl

Fundir el fenol en baño termostático (temperatura de fusión: 80°C). Una vez líquido, adicionar lentamente Tris-HCl pH 7,5 hasta saturar la solución. Permitir que se separen las dos fases y ajustar con Tris 0,1 M hasta que el pH del Tris en equilibrio sea de 7,6. Almacenar saturado en Tris en heladera en frasco color caramelo (se debe evitar la oxidación del fenol, y siempre constatar el pH del mismo, no utilizándose si está oxidado o ácido).

CLOROFORMO: ALCOHOL ISOAMÍLICO (24: 1)

Mezclar 24 mL de cloroformo con 1 mL de alcohol isoamílico. Se pueden preparar volúmenes mayores respetando dicha proporción. Mantener a temperatura ambiente en frasco ámbar oscuro.

ACETATO DE SODIO 3 M pH 7

Pesar 246 g de acetato de sodio y disolverlo en 100 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7. Autoclavar y mantener en heladera.

ETANOL 70%

| | |
|------------------------|----------------------|
| <i>Etanol absoluto</i> | <i>70 mL</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>c.s.p. 100 mL</i> |

D) Protocolo de extracción de DNA plasmídico a partir de cultivos bacterianos (lisis alcalina mini-prep)

Muestra: suspensión bacteriana en caldo nutritivo (aproximadamente 18 a 20 hs de cultivo) conteniendo el plásmido de interés. Eventualmente obtener la muestra a partir de cultivos en medio sólido.

EQUIPAMIENTOS

Microcentrífuga

Baño termostatzado (45°C y 90°C)

Micropipetas automáticas

Agitador vórtex

Gradillas correspondientes a los distintos volúmenes de tubos empleados

Mecheros

MATERIALES

Cultivo bacteriano en medio sólido o líquido

Ansas (de ser necesarias para realizar la suspensión)

Puntas (“tips”) amarillas y azules

Tubos de plástico de fondo cónico de 50 mL y 15 mL

Microtubos cónicos de 1,5mL

Hielo molido

Marcador indeleble

SOLUCIONES

Solución TE 1

Solución de Lisis

Acetato de Potasio 3 M pH 4,8

Solución cloroformo: alcohol isoamílico

Isopropanol

Acetato de Sodio 3 M pH 7

Etanol 70%

TE 1 pH 8

PROCEDIMIENTO

- Partir de una suspensión bacteriana conteniendo el plásmido de interés. Disponer de una suspensión concentrada de bacterias conteniendo el plásmido. Eventualmente preparar la suspensión en un microtubo cónico de 1,5 mL utilizando caldo nutritivo estéril.
- Centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante y dejar el **pellet** lo más seco posible.
- Resuspender el **pellet** en 100 µl de *Solución TE 1 (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA)*. **trabajar en frío** (por ejemplo utilizando trozos de hielo en una conservadora).
- Adicionar 200 µl de *Solución de Lisis (NaOH 0,2 N; SDS 1%)*. **Invertir suavemente** y dejar 5 minutos en hielo.
- Neutralizar con 150 µl de *Acetato de Potasio 3 M pH 4,8*. Invertir suavemente y dejar 5 minutos en hielo.
- Centrifugar 10 minutos a 12.000 rpm.

- Transferir la fase superior (acuosa) a un microtubo cónico nuevo. **Registrar el volumen de fase acuosa que se trasvasa.**
- Adicionar **igual volumen** de *Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)*. Mezclar con vórtex durante 15 segundos.
- Centrifugar 3 minutos a 12.000 rpm. Transferir la fase superior (acuosa) a un tubo nuevo. **NOTA: Puede repetirse una vez más este último paso de purificación con Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1).**
- Precipitar el DNA con un volumen de *isopropanol* frío y 1/10 de *Acetato de Sodio 3 M pH 7*. Puede permitirse la precipitación durante un tiempo, por ejemplo durante toda una noche a -20°C.
- Centrifugar durante 5 minutos a 12.000 rpm.
- Eliminar el *isopropanol* y lavar el **pellet** con 1 mL de *etanol 70%* sin levantar el precipitado.
- Volver a centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos y extraer todo el alcohol. Dejar secar a temperatura ambiente.
- Resuspender en *TE 1 pH 8 (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8)* o bien en agua destilada estéril.
- Conservar a -20 °C.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

SOLUCIÓN TE 1 (TRIS-HCl/EDTA)

| | |
|---|--|
| <i>Tris 1 M</i> | <i>1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)</i> |
| <i>EDTA 0,5 M</i> | <i>0,2 mL (concentración final 1 mM o 0,001 M)</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>c.s.p 100 ml</i> |
| <i>Ajustar el pH a 8, autoclavar y preservar en heladera.</i> | |

SOLUCIÓN DE LISIS

| | |
|--|--|
| <i>NaOH</i> | <i>0,8 g (Concentración final 0,2 N)</i> |
| <i>SDS 20%</i> | <i>5 mL (concentración final 1%)</i> |
| <i>Agua destilada estéril</i> | <i>c.s.p 100 ml</i> |
| <i>Preservar en heladera. No guardar en frascos de vidrio, ya que el álcali ataca al vidrio.</i> | |

Otro modo de preparación:

| | |
|-------------------------------|---|
| <i>NaOH 2N</i> | <i>0,1 mL (concentración final 0,2 N)</i> |
| <i>SDS 10%</i> | <i>0,1 mL (concentración final 1%)</i> |
| <i>Agua destilada estéril</i> | <i>0,8 ml</i> |

SDS 20 %

*Disolver 20g de SDS en 100 mL de agua destilada. Calentar en baño termostatzado para disolver el SDS.
Mantener a temperatura ambiente.*

ACETATO DE POTASIO 3 M pH 4,8 y pH 7

Pesar 294 g de acetato de potasio y disolverlo en 100 mL de agua destilada. Autoclavar y mantener en heladera. Ajustar la solución al pH adecuado. Autoclavar y preservar en heladera.

CLOROFORMO: ALCOHOL ISOAMÍLICO (24: 1)

*Mezclar 24 mL de cloroformo con 1 mL de alcohol isoamílico. Se pueden preparar volúmenes mayores respetando dicha proporción.
Mantener a temperatura ambiente.*

ETANOL 70%

| | |
|------------------------|----------------------|
| <i>Etanol absoluto</i> | <i>70 mL</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>c.s.p. 100 mL</i> |

E) Protocolo de extracción de DNA a partir de sangre entera por el método de “salting out” (Miller-Dykes) modificado (Nuc. Ac. Res. vol 16, num. 3, 1988)

Muestra: Sangre entera anticoagulada con EDTA.

EQUIPAMIENTOS

Microcentrífuga
Baño termostatzado
Micropipetas
Gradillas correspondientes a los distintos volúmenes de tubos empleados
Agitador vórtex

MATERIALES

Agujas y jeringas descartables
Ligas, alcohol y torundas de algodón
Frascos pequeños (tipo antibióticos/penicilina) con 20 µl EDTA por cada 2 a 2,5 mL de sangre obtenida.
Puntas (“tips”) amarillas y azules
Tubos de plástico de fondo cónico de 50 mL y 15 mL
Microtubos cónicos de 1,5mL
Marcador indeleble

SOLUCIONES

Solución de lisis de Glóbulos Rojos
Solución de lisis de Glóbulos Blancos
Acetato de Potasio 3 M
Isopropanol
Etanol 70%
TE 1 pH 8

PROCEDIMIENTO

- Partir de 500 µl de sangre entera anticoagulada con EDTA.
- Adicionar a la muestra de sangre 900 µl de *Solución de Lisis de Glóbulos Rojos (Tris-HCl 10 mM; TRITON X100™ 1%; Sacarosa 11%)*.
- Centrifugar a 12000 rpm durante 3 minutos.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo, repitiéndose la adición de *Solución de Lisis de Glóbulos Rojos* y la centrifugación 3 o 4 veces. La solución irá aclarándose a medida que se lleva adelante la lisis de glóbulos rojos y se eliminan los sobrenadantes.
- Descartar por completo el sobrenadante obtenido durante el último paso anterior y adicionar al **pellet** 300 µl de *Solución de Lisis de Glóbulos Blancos (Tris-HCl 10mM; ClNa 400 mM; EDTA 2 mM)*, 50 µl de *Solución de Proteinasa K (Proteinasa K 1 mg/ml; SDS 1%; EDTA 2 mM)* y 10 µl de *SDS 20%*.
- Incubar una hora a 65 °C agitando con vórtex cada 10 minutos hasta disolución completa del **pellet**.
- Adicionar 150 µl de *Acetato de potasio 3 M*.

- Centrifugar por 5 minutos a 12000 rpm. Transferir el sobrenadante a un microtubo cónico nuevo, y repetir el agregado de 150 µl de *Acetato de potasio 3 M*.
- Centrifugar a 12000 rpm y transferir **el sobrenadante** a un microtubo cónico nuevo.
- Adicionar al sobrenadante 1 mL de *isopropanol* (invertir 3 o 4 veces) y dejar precipitar el DNA, el cual se forma casi instantáneamente presentándose en su forma de ovillo característico.
- Centrifugar a 12000 rpm por 5 min. Descartar el sobrenadante y lavar con 1 mL de *etanol 70%*.
- Volver a centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos y extraer todo el alcohol. Dejar secar a temperatura ambiente.
- Resuspender en *TE 1 pH 8 (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8)* o bien en agua destilada estéril.
- Conservar a - 20 °C.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

SOLUCIÓN DE LISIS DE GLÓBULOS ROJOS

| | |
|-------------------------------|--|
| <i>Tris HCl 1M</i> | <i>0,3 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)</i> |
| <i>Sacarosa</i> | <i>3,3 g (concentración final 11%)</i> |
| <i>TRITON X-100™</i> | <i>0,3 mL (concentración final 1%)</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>c.s.p 30 ml</i> |
| <i>Preservar en heladera.</i> | |

SOLUCIÓN DE LISIS DE GLÓBULOS BLANCOS

| | |
|-------------------------------|---|
| <i>Tris 1 M</i> | <i>0,1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)</i> |
| <i>EDTA 0,5 M</i> | <i>0,04 mL (40 µl) (concentración final 2 mM o 0,002 M)</i> |
| <i>NaCl 6 M</i> | <i>0,66 mL (concentración final 400 mM)</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>c.s.p 10 ml</i> |
| <i>Preservar en heladera.</i> | |

SOLUCIÓN DE PROTEINASA K

| | |
|-------------------------------------|---------------|
| <i>Proteinasa K (20 mg/ml)</i> | <i>25 µl</i> |
| <i>SDS 20%</i> | <i>25 µl</i> |
| <i>EDTA 0,5 M</i> | <i>2 µl</i> |
| <i>Agua destilada estéril</i> | <i>448 µl</i> |
| <i>Preservar freezeada a -20°C.</i> | |

ACETATO DE POTASIO 3 M

Pesar 294 g de acetato de potasio y disolverlo en 100 mL de agua destilada. Autoclavar y mantener en heladera.

ETANOL 70%

| | |
|------------------------|----------------------|
| <i>Etanol absoluto</i> | <i>70 mL</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>c.s.p. 100 mL</i> |

TE 1 (Tris-HCl/EDTA)

| | |
|---|--|
| <i>Tris 1 M</i> | <i>1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)</i> |
| <i>EDTA 0,5 M</i> | <i>0,2 mL (concentración final 1 mM o 0,001 M)</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>c.s.p 100 ml</i> |
| <i>Ajustar el pH a 8, autoclavar y preservar en heladera.</i> | |

F) Protocolo de extracción de DNA a partir de sangre entera (CTAB)
(Doyle y Doyle con modificaciones de Figueira et al.; 1997)

Muestra: Sangre entera anticoagulada con EDTA.

EQUIPAMIENTOS

Microcentrífuga

Baño termostatzado (45°C y 90°C)

Micropipetas

Gradillas correspondientes a los distintos volúmenes de tubos empleados

Agitador vórtex

MATERIALES

Agujas y jeringas descartables

Ligas, alcohol y torundas de algodón

Frascos pequeños (tipo antibióticos/penicilina) con 20 µl EDTA por cada 2 a 2,5 mL de sangre obtenida.

Puntas (“tips”) amarillas y azules

Tubos de plástico de fondo cónico de 50 mL y 15 mL

Microtubos cónicos de 1,5mL

Marcador indeleble

SOLUCIONES

Solución de Lavado TE 10

Solución de Lisis CTAB

Solución Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico

Solución Cloroformo: Alcohol Isoamílico

Isopropanol

Etanol 70%

TE 1 pH 8

PROCEDIMIENTO

- Partir de 700 µl de sangre anticoagulada con EDTA.
- Adicionar a la muestra de sangre 700 µl de *Solución de Lavado TE 10* (*Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM, pH 8*). Homogeneizar.
- Centrifugar 3 minutos a 12.000 rpm.
- Descartar el sobrenadante (aproximadamente 700 µl) con cuidado. Mezclar con vórtex y volver a agregar *Solución de Lavado TE 10*. Centrifugar nuevamente.
- Repetir el agregado de *Solución de Lavado* y la centrifugación hasta aumentar la proporción de leucocitos. Se observará la formación de una “nube”, que corresponde al conglomerado de glóbulos blancos.
- Eliminar el sobrenadante **EVITANDO ARRASTRAR LA “NUBE”**.
- Lisar los leucocitos con 600 µl de *Solución de Lisis CTAB* (*Bromuro de cetiltrimetilamonio, 2%; NaCl, 1,4 M; EDTA pH 8, 20 mM; Tris-HCl pH 7,5, 10 mM; B-mercaptoetanol, 0,2%; Proteínasa K 1 mg/ml*). Mezclar con vórtex e incubar 1 hora a 65°C o bien hasta clarificar la solución (agitar con vórtex cada 10’).
- Adicionar 1 volumen (aproximadamente 600 µl) de *Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1)*. Mezclar con vórtex hasta formar emulsión y centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos.

- Transferir el sobrenadante (fase acuosa) a un microtubo cónico nuevo. **Registrar el volumen de fase acuosa que se trasvasa.**
- Adicionar **1 volumen** de *Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1)*. Agitar bien hasta formar emulsión y centrifugar nuevamente a 12.000 rpm durante 3 minutos.
- Extraer el sobrenadante y transferirlo a un tubo nuevo. Precipitar el DNA con el doble de volumen de *etanol absoluto*. Observar la formación del ovillo. Centrifugar 3 minutos a 12.000 rpm.
- Eliminar el *etanol absoluto* y lavar el **pellet** adicionando 1 mL de *etanol 70%* (evitar levantar el precipitado).
- Volver a centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos y extraer todo el alcohol. Dejar secar a temperatura ambiente.
- Resuspender en *TE 1 pH 8 (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8)* o bien, en agua destilada estéril.
- Conservar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

SOLUCIÓN DE LAVADO TE 10

| | |
|--|---|
| <i>Tris HCl 1M</i> | <i>10 mL (concentración final 100 mM o 0,1 M)</i> |
| <i>EDTA 0,5M</i> | <i>2 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>88 mL</i> |
| <i>Autoclavar y preservar en heladera.</i> | |

SOLUCIÓN DE LISIS CTAB

| | |
|--|--|
| <i>CTAB</i> | <i>0,2 ml</i> |
| <i>CiNa 6 M</i> | <i>2,33 mL (concentración final 1,4 M)</i> |
| <i>Tris-HCl 1 M</i> | <i>0,1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)</i> |
| <i>EDTA 0,5 M</i> | <i>0,4 mL (concentración final 20 mM o 0,02 M)</i> |
| <i>Proteinasa K (20 mg/ml)</i> | <i>0,5ml</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>6,45 ml</i> |
| <i>β-Mercaptoetanol</i> | <i>0,02 ml</i> |

Precaución: ajustar a volumen final y por último agregar el β -mercaptoetanol.

CLOROFORMO: ALCOHOL ISOAMÍLICO (24: 1)

Precaución: el cloroformo es un solvente volátil y su exposición crónica está relacionada con afección hepática. Trabaje con precaución.

La proporción es de 24 partes a 1 parte. Mezclar 24 mL de cloroformo con 1 mL de alcohol isoamílico. Se pueden preparar volúmenes mayores respetando dicha proporción.

Mantener a temperatura ambiente.

ETANOL 70%

| | |
|------------------------|----------------------|
| <i>Etanol absoluto</i> | <i>70 mL</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>c.s.p. 100 mL</i> |

TE 1 (TRIS-HCl/EDTA)

| | |
|---|--|
| <i>Tris 1 M</i> | <i>1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)</i> |
| <i>EDTA 0,5 M</i> | <i>0,2 mL (concentración final 1 mM o 0,001 M)</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>c.s.p 100 ml</i> |
| <i>Ajustar el pH a 8, autoclavar y preservar en heladera.</i> | |

G) Protocolo ① de extracción de DNA a partir de muestras de mucosas (TEC/SDS)

Muestra: células obtenidas a partir de exfoliación por raspaje de mucosa, utilizando un hisopo estéril o, eventualmente, una espátula estéril.

EQUIPAMIENTOS

Microcentrífuga

Baño termostatzado

Micropipetas automáticas

Gradillas correspondientes a los distintos volúmenes de tubos empleados

MATERIALES

Hisopos o espátula estéril,

Pipetas de vidrio o probetas capaces de medir los volúmenes requeridos

Tubos de plástico de fondo cónico de 50 mL y 15 mL

Microtubos cónicos de 1,5mL

Marcador indeleble

SOLUCIONES

Solución de Extracción TEC/SDS

Cloroformo: Alcohol isoamílico

Proteinasa K 20mg/mL

Etanol absoluto

Etanol 70%

Solución TE1

PROCEDIMIENTO

- Raspar el interior de la cavidad bucal (o de la mucosa de interés) utilizando un hisopo, de modo enérgico pero evitando laceraciones.
- Sumergir el raspado en un microtubo de ultracentrífuga de 1,5 mL . Cortar el extremo del hisopo y adicionar 800 µL de *Solución de Extracción TEC/SDS* (*Tris – HCL 10 mM; EDTA 10 mM; NaCl 100 mM, SDS 2%*). Adicionar 5 µL de *Proteinasa K 20 mg/mL*.
- Incubar toda la noche a 56°C.
- Luego de la incubación retirar el hisopo, cuidando de recuperar todo el líquido posible.
- Adicionar 600 µl de *Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1)*. Mezclar con vórtex hasta formar emulsión y centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos.
- Transferir el sobrenadante (fase acuosa) a un microtubo cónico nuevo. **Registrar el volumen de fase acuosa que se trasvasa.**
- Adicionar **1 volumen** de *Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1)*. Agitar bien hasta formar emulsión y centrifugar nuevamente a 12.000 rpm durante 3 minutos.
- Extraer el sobrenadante y transferirlo a un tubo nuevo. Precipitar el DNA con el doble de volumen de *etanol absoluto*. Observar la formación del ovillo. Centrifugar 3 minutos a 12.000 rpm.
- Eliminar el *etanol absoluto* y lavar el ***pellet*** adicionando 1 mL de *etanol 70%* (evitar levantar el precipitado).

- Volver a centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos y extraer todo el alcohol. Dejar secar a temperatura ambiente.
- Resuspender en *TE 1 pH 8 (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8)* o bien, en agua destilada estéril.
- Conservar a -20 °C.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

SOLUCIÓN DE EXTRACCIÓN TEC / SDS

| | |
|-------------------------------|---|
| <i>Tris HCl 1M</i> | <i>0,1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)</i> |
| <i>EDTA 0,5M</i> | <i>0,2 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)</i> |
| <i>NaCl 6 M</i> | <i>0,16 mL (concentración final 100 mM o 0,1 M)</i> |
| <i>SDS 20 %</i> | <i>1 mL</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>c.s.p 10 mL</i> |
| <i>Preservar en heladera.</i> | |

CLOROFORMO: ALCOHOL ISOAMÍLICO (24: 1)

La proporción es de 24 partes a 1 parte. Mezclar 24 mL de cloroformo con 1 mL de alcohol isoamílico. Se pueden preparar volúmenes mayores respetando dicha proporción.
Mantener a temperatura ambiente.

ETANOL 70%

| | |
|------------------------|----------------------|
| <i>Etanol absoluto</i> | <i>70 mL</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>c.s.p. 100 mL</i> |

TE 1 (TRIS-HCl/EDTA)

| | |
|---|--|
| <i>Tris 1 M</i> | <i>1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)</i> |
| <i>EDTA 0,5 M</i> | <i>0,2 mL (concentración final 1 mM o 0,001 M)</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>c.s.p 100 ml</i> |
| <i>Ajustar el pH a 8, autoclavar y preservar en heladera.</i> | |

H) Protocolo ② de extracción de DNA a partir de muestras de mucosas

Muestra: células obtenidas a partir de exfoliación por raspaje de mucosa, utilizando hisopos estériles.

EQUIPAMIENTOS

Centrífuga
Baño termostatzado
Micropipetas automáticas

MATERIALES

Espátula estéril, hisopos.
Tubos de centrífuga de 15mL
Pipetas de vidrio o probetas capaces de medir los volúmenes requeridos
Microtubos cónicos de 1,5mL
Marcador indeleble

SOLUCIONES

Solución Salina 9:1000 (Solución de ClNa al 0,9%)
Tampón de Extracción
Proteinasa K 20mg/mL

PROCEDIMIENTO

- Raspar el interior de la cavidad bucal (o de la mucosa de interés) utilizando el hisopo o la espátula estériles, de modo enérgico pero evitando laceraciones.
- Sumergir el raspado en un tubo de centrífuga de 15 mL conteniendo 8 mL de solución salina de ClNa al 0,9% (“*Solución fisiológica*”).
- Centrifugar el tubo a 2000 rpm por 5 min. Descartar el sobrenadante.
- Adicionar 200 μ L de *Tampón de Extracción* (*Tris-HCl 50 mM; EDTA 1mM; TWEEN 20 0,5%*) y 5 μ L de *Proteinasa K 20 mg/ml*.
- Incubar a 65° C *overnight* (16 a 20 h).
- Calentar en baño a 90 °C por 10 minutos para inactivar la proteinasa K
- Centrifugar a 12.000 rpm por 5 min.
- Transferir el sobrenadante (conteniendo el DNA) a microtubos cónicos de 1,5 mL.
- Almacenar en freezer a -20 °C.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

SOLUCIÓN SALINA

NaCl 9 g
Agua destilada c.s.p 1000 mL
Autoclavar y conservar en heladera.

TAMPÓN DE EXTRACCIÓN

Tris HCl 1M 5 mL (*concentración final 50 mM o 0,05 M*)
EDTA 0,5M 0,2 mL (*concentración final 1 mM o 0,001 M*)
Agua destilada 94,3 mL
Tween 20 0,5mL (*adicionar, luego autoclavar*)
Autoclavar y preservar en heladera.

EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Fundamento teórico

En el apartado anterior hemos visto cómo se procedía a la extracción de uno de los principales ácidos nucleicos. Sin embargo, nos resta analizar las posibilidades que existen para la extracción del otro ácido nucleico: el ácido ribonucleico o RNA.

El RNA es una molécula monocatenaria que no presenta conformación estructural de orden superior. Eventualmente algunos RNAs alcanzan algún tipo de estructura secundaria en regiones de la molécula, gracias al plegamiento de su única hebra sobre sí misma. En general, las estructuras tridimensionales que adoptan estas moléculas son del tipo horquillas, bucles, lazos, salientes y otras, siempre que puedan aparear los nucleótidos de su única cadena con los respectivos complementarios en otra región de la misma. Sin embargo, algunas conformaciones de orden superior pueden presentarse específicamente en el caso del RNA de transferencia (tRNA).

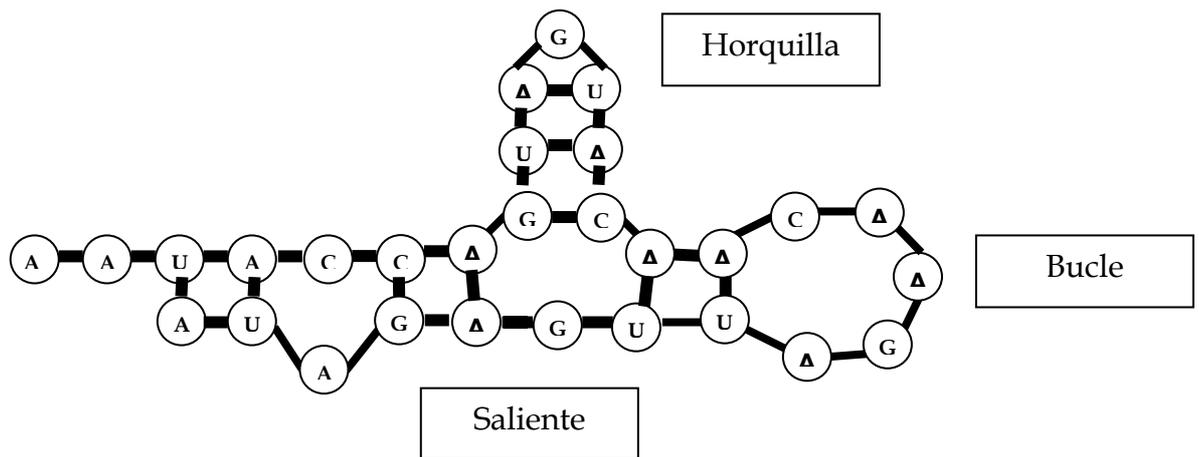


Figura 3: Estructura del RNA. Los principales modos de plegamiento del RNA sobre su única cadena generan horquillas, bucles y salientes.

Para intentar clarificar las amplias actividades que lleva a cabo el RNA en las células se pueden distinguir varios tipos de moléculas de RNA: RNA ribosómico (rRNA), RNA mensajero (mRNA), RNA de transferencia (tRNA), RNAs pequeños nucleares y pequeños citoplasmáticos (snRNA, scRNA).

Además en eucariotas una parte de las moléculas de RNA cumplen funciones como constituyentes de proteínas nucleares y otra parte se encuentra en las mitocondrias y cloroplastos. La flexibilidad de la molécula a los fines biológicos es tal que incluso toman parte en actividades catalíticas, como en el caso de las ribozimas.

Describiremos muy brevemente las características principales de los tres tipos de RNAs más relevantes presentes en las células:

A) **mRNA**: es la molécula que actuará como plantilla para la generación de proteínas en el ribosoma. Representa una baja proporción en relación a todo el RNA total y posee una vida media corta. Varias proteínas suelen unirse a las moléculas de mRNA por lo que su estructura usualmente es sencilla y formada por adenina, guanina, citosina y uracilo, siendo este último nucleótido propio del RNA (no se presenta en el DNA).

B) **tRNA**: actúan como moléculas intermediarias en la síntesis proteica y constituyen una porción importante del RNA total celular. Son las moléculas encargadas de unir específicamente los aminoácidos y transportarlos al ribosoma donde se sintetizan las nuevas proteínas. Son moléculas de estructura tridimensional compleja, ya que deben poseer dos regiones (ó “brazos”) bien definidos: una encargada de interactuar con el aminoácido y otra encargada de reconocer al triplete en el mRNA que codifica para dicho aminoácido.

Para cumplir con esta función la célula posee distintos tRNAs, al menos uno para cada aminoácido. Sin embargo, algunos aminoácidos son reconocidos por más de un tRNA por lo que eventualmente en una célula pueden llegar a presentarse 60 tRNAs distintos.

Por otro lado, la presencia de nucleótidos infrecuentes (como pseudouridina, metilguanosa y otros) provoca una gran influencia sobre la función de esta molécula. Hasta el 10% de los nucleótidos presentes en una molécula de tRNA pueden ser infrecuentes.

La estructura tridimensional final que adopta una molécula de tRNA es una especie de “L” invertida (Γ) donde se encuentra bien delimitada la región que deben interactuar con el aminoácido y aquella que debe interactuar con el mRNA.

C) **rRNA**: constituye el soporte y componente fundamental de los ribosomas. Constituyen aproximadamente el 75% del RNA total, con alto contenido de nucleótidos infrecuentes. Su conformación es compleja y se relaciona con su función estructural de los ribosomas.

Esta pequeña introducción pretende distinguir de modo general el tipo de molécula que se pretende aislar del interior celular, pero la profundización en los conceptos aquí expresados se deja en manos de la curiosidad del lector, remitiéndole al apartado de Bibliografía al final de este libro.

Desde el punto de vista químicos ambos ácidos nucleicos son muy similares, sin embargo la mínima diferencia provocada por la ausencia de un grupo $-OH$ en el C-2' de la desoxirribosa que constituye el DNA (y la presencia de dicho grupo en el C-2' de la ribosa que constituye el RNA) provoca una gran discrepancia a nivel de reactividad, funcionalidad y constitución de las moléculas.

A pesar de ello, la relativa similitud de ambos ácidos nucleicos, permitirá establecer cierto rango de analogía entre los protocolos de extracción de los mismos.

Así, a los fines de extracción de RNA, podemos distinguir etapas similares a las expuestas en el apartado anterior, respecto a la extracción de DNA.

En líneas generales deberemos romper la membrana plasmática, pared celular vegetal o bien pared celular bacteriana, haciendo uso de las mismas metodologías expuestas anteriormente. **Sin embargo, tendremos que tener en cuenta la labilidad de la molécula de RNA.**

A diferencia del DNA, el RNA es una molécula que usualmente se degrada muy rápido tras las primeras manipulaciones de la muestra. Una gran parte de esta de-

gradación es propiciada por la presencia de enzimas encargadas de la lisis de ácidos nucleicos: las nucleasas. De ellas las ribonucleasas atacan al RNA.

En general, podemos decir que prácticamente toda manipulación de la célula desencadenará la lisis del RNA, en especial por parte de la nucleasas celulares. Además, el medio ambiente (a través de las esporas fúngicas y bacterias), así como las manos del manipulador (debido a la flora bacteriana normal presente en la piel) pueden aportar ribonucleasas, por ello es vital inhibir su actividad.

Existen distintos inhibidores de ribonucleasas, como por ejemplo el fenol y el tiocianato de guanidinio, siendo este último uno de los más utilizados. En uno de los protocolos más sencillos y efectivos las células se rompen a pH bajo en presencia de altas concentraciones de tiocianato de guanidinio y, posteriormente, utilizando fenol y acetato de sodio o potasio en alta concentración, se purifica de proteínas el extracto. El hecho de la utilización de un pH bajo (alrededor de 4), provoca la protonación diferencial del DNA, afectando el coeficiente de partición del ácido nucleico entre las fases orgánica y acuosa. De este modo en la fase acuosa puede obtenerse RNA relativamente puro de DNA. Finalmente el RNA aislado es concentrado mediante deshidratación de la molécula utilizando alcoholes.

Otro inhibidor de RNAsas es el dietilpirocarbonato (DEPC), el cual es un agente que se adiciona al agua, autoclavándose posteriormente. A la temperatura de autoclavado el DEPC se degrada produciendo etanol y CO₂, aunque deja inhibidas de modo irreversible a todas las RNAsas. Por ello será de suma importancia preparar todos los reactivos con agua tratada con DEPC y autoclavada. Asimismo, se recomienda que todos los elementos que serán utilizados en el aislamiento y posterior manipulación de RNA, sean utilizados exclusivamente a este fin y que siempre sean tratados con esta agua DEPC autoclavada.

Una vez finalizada la extracción el RNA aislado puede ser almacenado a -20°C por períodos cortos, o a -70°C por períodos más prolongados. El tiempo de almacenaje puede abarcar hasta 1 año sin deterioro importante, sin embargo, el congelamiento y descongelamiento repetido del RNA aislado atenta contra su integridad.

Actualmente varias compañías ofrecen equipos de extracción de RNA (“kits”), usualmente basados en el protocolo anteriormente mencionado.

Es vital, por lo tanto, aumentar los recaudos en la extracción y purificación de esta macromolécula, para conseguir éxito en los pasos siguientes de la investigación o diagnóstico clínico.

PROTOSCOLOS DE EXTRACCIÓN DE RNA A PARTIR DE MUESTRAS DIVERSAS

A) Protocolo de extracción de RNA total (Chomczynski y Sacchi, Anal Biochem 162:156, 1987)

Muestra: sangre entera anticoagulada con EDTA (algunos anticoagulantes, como la heparina, inhiben las actividades de las retrotranscriptasas, que serán de vital importancia en los siguientes usos del RNA aislado).

EQUIPAMIENTOS

Microcentrífuga refrigerada
Micropipetas automáticas
Agitador vórtex
Baño de hielo
Gradillas

MATERIALES

Agujas y jeringas descartables
Ligas, alcohol y torundas de algodón
Frascos pequeños (tipo antibióticos/penicilina) tratados con agua DEPC y autoclavados, conteniendo 20 µl EDTA por cada 2 a 2,5 mL de sangre obtenida.
Puntas ("tips") amarillas y azules libres de RNAsas
Tubos plásticos de fondo cónico de 50 mL y 15 mL libres de RNAsas
Microtubos cónicos de 1,5mL libres de RNAsas
Marcador indeleble

SOLUCIONES

Solución de Extracción de RNA
Acetato de sodio o potasio 3 M, pH 4
Cloroformo
Fenol: Cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)
Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
Isopropanol
Etanol 70% preparado con agua DEPC
TE 1 pH 8 preparado con agua DEPC

PROCEDIMIENTO

- Partir de 100-150 µl de sangre entera anticoagulada con EDTA. El volumen puede reducirse hasta 50 µl. **Mantener todos los reactivos, y especialmente la muestra, a baja temperatura (en el baño de hielo preparado a tal fin) durante la mayor parte del tiempo.**
- Adicionar a la muestra 9 o 10 volúmenes (aprox. 1 mL) de *Solución de Extracción de RNA* (Isotiocianato de guanidinio 4M; citrato de sodio pH 7, 25 mM; sarcosil, 0,5%; β-mercaptoetanol 100 mM). Así, si se parte de 50 µl de sangre, adicionar 500 µl de *Solución de Extracción de RNA*. (**NOTA:** La *Solución de Extracción de RNA* puede ser preparada y preservada en heladera. En este caso adicionar β-mercaptoetanol, a una concentración final de 100 mM, justo antes de ser utilizada). Homogeneizar.
- Agregar 1 volumen de *acetato de sodio o potasio 3 M pH 4*, preparado con agua tratada con DEPC. Mezclar con vórtex.

- ⑥ Adicionar 2 volúmenes de *cloroformo*. Eventualmente utilizar la solución *fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)*. Mezclar con vórtex e incubar en baño de hielo durante 10 a 15 minutos.
- Centrifugar por 10 minutos a 12000 rpm en una microcentrífuga refrigerada a 4°C. Transferir el **sobrenadante** a un microtubo cónico nuevo libre de RNAsas.
- El sobrenadante puede tratarse nuevamente con 1 volumen de *cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)*. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos y transferir el sobrenadante a un microtubo cónico nuevo, libre de RNAsas.
- Precipitar el RNA aislado adicionando 1 mL de *isopropanol* (invertir 3 o 4 veces) y dejar precipitar entre 20 minutos y 1 hora a -20°C. Eventualmente dejar precipitando a -20°C durante toda la noche.
- Centrifugar a 14000 rpm por 10 min. Descartar el sobrenadante y lavar con 1 mL de *etanol 70%* preparado con agua tratada con DEPC y autoclavada.
- Volver a centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos y extraer todo el alcohol. Dejar secar a temperatura ambiente.
- Resuspender en *TE 1 pH 8 (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8 preparado con agua tratada con DEPC y autoclavada)* o bien en agua tratada con DEPC autoclavada.
- Conservar a -20°C.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

SOLUCIÓN DE EXTRACCIÓN DE RNA

| | |
|------------------------------------|---|
| <i>Isotiocianato de guanidinio</i> | <i>14,18 g (concentración final 4 M)</i> |
| <i>Citrato de sodio</i> | <i>0,16 g (concentración final 25 mM)</i> |
| <i>Sarcosil</i> | <i>0,15 mL (concentración final 0,5%)</i> |
| <i>Agua DEPC autoclavada</i> | <i>c.s.p 30 ml</i> |

La solución de Extracción de RNA puede ser preparada y preservada en heladera. En este caso adicionar β-mercaptoetanol, a una concentración final de 100 mM, justo antes de ser utilizada.

ACETATO DE POTASIO 3 M pH 4

Pesar 294 g de acetato de potasio y disolverlo en 100 mL de agua tratada con DEPC y autoclavada. Ajustar el pH a 4. Autoclavar y mantener en heladera.

CLOROFORMO: ALCOHOL ISOAMÍLICO (24: 1)

Precaución: el cloroformo es un solvente volátil y su exposición crónica está relacionada con afección hepática. Trabaje con precaución.

La proporción es de 24 partes a 1 parte. Mezclar 24 mL de cloroformo con 1 mL de alcohol isoamílico. Se pueden preparar volúmenes mayores respetando dicha proporción.

Mantener a temperatura ambiente.

ETANOL 70%

| | |
|------------------------------|----------------------|
| <i>Etanol absoluto</i> | <i>70 mL</i> |
| <i>Agua DEPC autoclavada</i> | <i>c.s.p. 100 mL</i> |

TE 1 (Tris-HCl/EDTA)

| | |
|------------------------------|--|
| <i>Tris 1 M</i> | <i>1 mL (concentración final 10 mM o 0,01 M)</i> |
| <i>EDTA 0,5 M</i> | <i>0,2 mL (concentración final 1 mM o 0,001 M)</i> |
| <i>Agua DEPC autoclavada</i> | <i>c.s.p 100 ml</i> |

Ajustar el pH a 8, autoclavar y preservar en heladera.

B) Protocolo abreviado de extracción de rna total utilizando el reactivo comercial trizol™ (invitrogen)

El reactivo *Trizol™* (Invitrogen) es un agente listo para usar, que consiste en una solución monofásica de isotiocianato de guanidinio y fenol, de utilidad en el aislamiento tanto de RNA total como de DNA o proteínas. Su fundamento se encuentra en el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi, reduciendo el proceso de extracción y purificación a un solo paso general (*single-step method*). Las muestras que pueden ser utilizadas son variadas, tanto procariotas como eucariotas. La proporción aproximada es de 1 mL de reactivo para el aislamiento de RNA total de hasta 100 mg de tejido o 1×10^7 células. Este reactivo también es útil para el aislamiento de RNA vírico presente en suero o plasma.

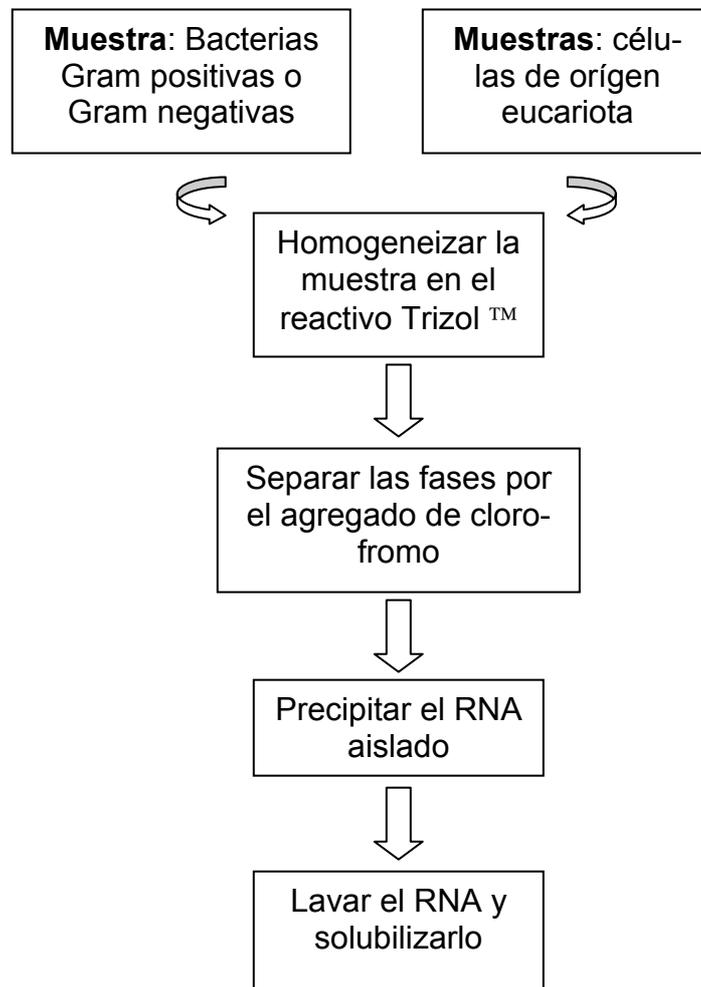


Figura 4: Método comercial de Extracción de RNA total. El reactivo *Trizol™* simplifica a un solo paso el protocolo de extracción de RNA total, de allí su gran utilidad.

B) Protocolo modificado de extracción de rna total en muestras de plasma utilizando el reactivo comercial trizol™ (invitrogen)

Muestra: Sangre entera anticoagulada con EDTA (algunos anticoagulantes, como la heparina inhiben las actividades de las retrotranscriptasas, que serán de vital importancia en los siguientes usos del RNA aislado).

EQUIPAMIENTOS

Microcentrifuga refrigerada
Micropipetas automáticas
Agitador vórtex
Baño de hielo
Gradillas

MATERIALES

Agujas y jeringas descartables
Ligas, alcohol y torundas de algodón
Frascos pequeños (tipo antibióticos/penicilina) tratados con agua DEPC y autoclavados, conteniendo 20 µl EDTA por cada 2 a 2,5 mL de sangre obtenida.
Puntas ("tips") amarillas y azules libres de RNAsas
Tubos plásticos de fondo cónico de 50 mL y 15 mL
Microtubos cónicos de 1,5mL libres de RNAsas
Marcador indeleble

REACTIVOS Y SOLUCIONES

TRIZOL™ (INVITROGEN)
Cloroformo
Isopropanol
Etanol 70% preparado con agua DEPC
TE 1 pH 8 preparado con agua DEPC

PROCEDIMIENTO

Mantener todos los reactivos, y especialmente la muestra, en el baño de hielo preparado a tal fin durante la mayor parte del tiempo.

- Partir de 300 µl de plasma obtenido con EDTA. Adicionar 1 µl de tRNA de levadura (*yeast tRNA*) que actuará como *carrier* arrastrando las cantidades mínimas de RNA que puedan ser recuperadas, aumentando de este modo el rendimiento de la técnica.
- Agregar 300 µl del reactivo comercial *Trizol™ (Invitrogen)*. Mezclar con vórtex por 5 segundos.
- Adicionar 100 µl de *cloroformo*. Mezclar con vórtex durante 5 segundos. Incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 5 minutos a 12000 rpm en una microcentrifuga refrigerada a 4°C.
- Transferir la fase acuosa superior a un nuevo microtubo cónico libre de RNAsas.
- Precipitar el RNA obtenido con 1 mL de *isopropanol*. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos.
- Lavar el ácido nucleico obtenido con 1 mL de *etanol 70%* preparado con agua DEPC.
- Eliminar todo el etanol y secar los microtubos boca abajo sobre papel absorbente.
- Resuspender en 100 µl de agua DEPC o en *TE 1* preparado con agua tratada con DEPC y autoclavada.
- Almacenar a -20°C.

EVALUACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS EXTRAÍDOS

Para evaluar la cantidad y calidad de los ácidos nucleicos extraídos, nos centraremos en dos enfoques:

- A) Electroforesis en geles de agarosa
- B) Cuantificación por el método espectrofotométrico

ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

Fundamento teórico

La electroforesis en gel de agarosa es un método simple y altamente efectivo para la separación, identificación y purificación de fragmentos de DNA en el rango de 0,5 a 25 kb. Usualmente, es posible detectar fragmentos mediante coloración con bromuro de etidio, si estos se encuentran en concentraciones cercanas a los 0,25 ng.

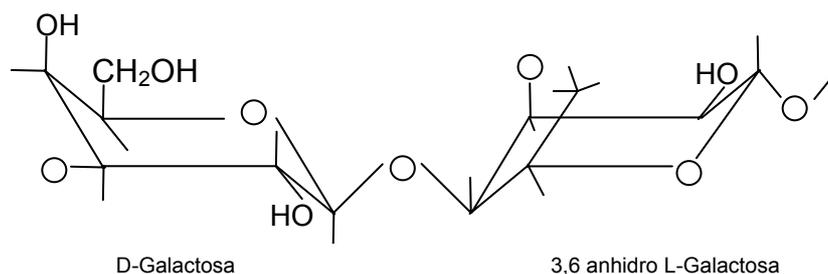


Figura 5: Modelo espacial de la molécula de agarosa. Este polímero se obtiene de ciertas algas y actualmente se encuentran preparados de alta pureza.

El protocolo de trabajo puede ser dividido en tres etapas:

A) *Se prepara un gel de agarosa de concentración apropiada al rango de los fragmentos a ser separados.*

Aunque hace varios años atrás no era sencillo conseguir agarosa de alta pureza, (por que esta se encontraba generalmente contaminada con otros polisacáridos, sales, proteínas, etc.) en la actualidad se obtienen preparados muy puros de agarosa y además se dispone comercialmente de agarosa químicamente modificadas que funden a baja temperatura (agarosas “*low melting*”). Este último tipo de agarosas se pueden utilizar para separar y analizar fragmentos de DNA muy pequeños (10-500 pb), presentando por lo tanto mayor poder resolutivo.

B) *Las muestras de DNA se cargan en las hendiduras del gel (“slots” o pocillos) correspondientes y se aplica al mismo una diferencia de potencial determinada por un período de tiempo específico.*

Luego de preparar las muestras utilizando un buffer de carga conteniendo glicerol y un colorante que servirá como frente de corrida, se siembran las muestras en los pocillos y se permite que la electroforesis se desarrolle.

C) *El gel es teñido con bromuro de etidio y analizado bajo luz UV.*

La tinción puede ser un paso posterior a la corrida en sí o bien, como veremos más adelante, el colorante puede agregarse directamente al gel, de modo que a medida que se produce la corrida se produce la tinción.

¿Qué factores afectan la migración del DNA en la matriz de agarosa?

Tamaño del DNA: Cuando el DNA es sometido al campo eléctrico aplicado en la electroforesis, la migración de los fragmentos es inversamente proporcional a sus pesos moleculares (la especie más pesada es la que menos migra).

Cuando nos referimos a la electroforesis también debemos recordar que el movimiento de una partícula cargada (con independencia del soporte utilizado), depende en cierta medida de su conformación estructural. Una metodología que hace uso de este carácter es el estudio de SSCP (“*Single Strand Conformational Polymorphism*” Polimorfismos Conformacionales de cadena simple): la doble cadena de DNA se desnaturaliza (utilizando por ejemplo formamida) y cada una de las cadenas simples adopta una estructura tridimensional particular. Si una base se encuentra mutada, la estructura tridimensional será distinta y esta cadena (“mutada”) migrará de un modo distinto a otra (“normal”). A través de esta técnica se pueden determinar mutaciones puntuales de una dada región amplificada por PCR. Sin embargo el soporte utilizado para esta metodología es poliacrilamida, como veremos en capítulos posteriores.

Concentración de la agarosa: la migración depende del tamaño de poro formado por la agarosa, dicho tamaño depende de la concentración de agarosa. Existe una relación lineal entre el logaritmo y la movilidad electroforética del DNA y la concentración del gel, descrita a través de fórmulas matemáticas.

Así a medida que aumentamos la concentración de agarosa permitimos la separación de fragmentos más pequeños de DNA.

Voltaje aplicado: El voltaje aplicado a las terminales de un gel de agarosa genera un campo eléctrico con una fuerza definida por la longitud entre los electrodos y la diferencia de potencial total aplicada (se sugiere que la intensidad no debe exceder los 5 o 6 V/cm).

Las moléculas de DNA expuestas a este campo eléctrico migran hacia el ánodo (polo positivo) debido a la carga negativa aportada por los grupos fosfato del esqueleto molecular. La velocidad de migración está limitada por la fuerza de fricción impuesta por la matriz del gel.

Composición de bases y temperatura: mientras que la carga y/o tamaño molecular pueden afectar la velocidad a la cual las macromoléculas se movilizan a través del gel, el cociente de carga a masa (Q/M) es el mismo para moléculas de DNA de diferente tamaño. Por ello, el tamaño del DNA es la característica que

determina la velocidad de migración, permitiendo la separación de mezclas complejas por electroforesis.

Además la movilidad electroforética del DNA no se ve afectada por variaciones de temperatura (rango 4 a 30°C) por lo que generalmente se llevan adelante corridas electroforéticas a temperatura ambiente.

Presencia de colorantes: El bromuro de etidio se intercala entre las bases a los ácidos nucleicos pudiendo ser así visualizados los mismos a la luz ultravioleta. El bromuro de etidio puede reducir la movilidad electroforética del DNA lineal en aproximadamente un 15%.

Composición de la solución tamón (buffer) de corrida electroforética: la movilidad electroforética del DNA es afectada por la composición y la fuerza iónica del buffer de electroforesis. Sin iones (por ejemplo si se omitiera el buffer de corrida por error) la conductividad eléctrica es mínima y el DNA migra, si lo hace, muy lentamente. Por otro lado, si se usa un buffer de corrida con alta fuerza iónica (por ejemplo si por error utilizáramos un buffer de corrida 10X) la conductividad eléctrica es demasiado alta generándose calor, lo que puede fundir el gel y/o desnaturalizar el DNA.

Existen diferentes composiciones para búferes de corrida. Los más utilizados son:

TAE (Tris Acetato EDTA): Tris Base 0,04 M; Ácido Acético Glacial 0,03 M; EDTA 0,002 M; pH= 7,8.

TBE (Tris Borato EDTA): Tris Base 0,89 M; Ácido Bórico 0,89 M; EDTA 0,002 M; pH= 8,3.

El primero de ellos tiene una capacidad de buffer baja y en electroforesis largas tiende a agotarse. El segundo (aunque es más costoso económicamente) posee una capacidad de buffer significativamente mayor.

Estos búferes se preparan en altas concentraciones (que se expresan en veces o "X") para luego ser diluidas, en general, a 1 X.

Electroforesis en gel de DNA plasmídico

Adaptaciones simples de los métodos electroforéticos son empleadas usualmente para la detección y caracterización física del DNA plasmídico presente en aislamientos bacterianos ambientales y clínicos.

Las concentraciones comúnmente empleadas para realizar corridas plasmídicas en geles de agarosa varían entre 0,6 y 1,5%, utilizando búferes estándares.

El DNA plasmídico generalmente se presenta en tres conformaciones: la forma circular cerrada (forma I), la circular abierta o "*nicked*" (forma II) y la lineal de doble cadena (forma III). Estas conformaciones del DNA conducen a que especies del mismo peso molecular migren a velocidades diferentes en geles de agarosa.

La forma I migra más rápidamente que la forma III. El superenrollamiento esencialmente retuerce las moléculas sobre sí mismas, confiriéndole un radio hidrodinámico menor, permitiéndole pasar más fácilmente por la matriz del gel.

La forma II o circular abierta, la cual ha perdido totalmente el superenrollamiento, migra de manera apreciablemente más lenta que cualquiera de las otras dos.

Electroforesis en gel de RNA total

Para el caso de las corridas electroforéticas de RNA la visualización es distinta. Como indicáramos en apartados anteriores la mayor contribución al RNA total de la célula es por parte del rRNA (RNA ribosómico) y en menor cuantía se encuentran los tRNA (RNA de transferencia) y los mRNA (RNA mensajeros). Atendiendo a esto la electroforesis es un buen método para analizar la integridad del RNA total: se espera encontrar dos bandas por carril. Para el caso de las muestras eucariotas una de dichas bandas pertenece al rRNA 28S y la otra al 18S, que constituyen las dos subunidades de los ribosomas. Usualmente la banda 28S suele presentar una intensidad de tinción dos veces mayor que la correspondiente a la banda 18S. También es posible visualizar un ligero “smear” entre ambas bandas que suele corresponder a los tRNA y mRNA.

Nuevamente remitimos al lector al apartado de extracción de RNA donde se proponen algunos cuidados a observar durante la manipulación de RNA para evitar su degradación.

Preparación, siembra, coloración y registro de geles de agarosa

La agarosa pesada (según el porcentaje a utilizar) se prepara utilizando como solvente buffer de corrida una vez concentrado (1X) y fundiéndola en baño o microondas hasta que se consigue una solución transparente y límpida. Luego se sellan los bordes libres del soporte de electroforesis y se vierte la solución. Es útil dejar enfriar la agarosa antes de volcarla en el soporte (a unos 45-50°C), para evitar que aparezcan ondulaciones debido al enfriamiento desparejo, afectando la corrida.

Una vez vertida la agarosa en el soporte, estando esta aún líquida, se debe observar que no queden burbujas en el mismo, colocando el peine (que se encargará con sus “dientes” de formar los pocillos cuando solidifique la agarosa). Observar además que no se formen burbujas entre los dientes del peine.

Ya solidificado el gel, se debe colocar el soporte en la cuba, llenar la cuba con buffer de corrida sumergiéndolo al gel, y proceder a retirar los peines.

Preparación de las muestras

La muestra debe ser mezclada con un buffer de carga (“loading buffer”), el cual cumple con 3 funciones:

- A) Aumenta la densidad de la muestra.
- B) Asegura que el DNA se deposite directamente en el pocillo preparado a tal fin.
- C) Otorga color a la muestra, que se utiliza como “frente de corrida”.

Para poder aumentar la densidad de la muestra se hace uso de glicerol, que es una sustancia densa que asegura que la muestra sea depositada en el fondo del pocillo y no se solubilice en el agua del buffer de corrida.

Para el frente de corrida se utilizan distintos colorantes, siendo el más común el azul de bromofenol. En general se conoce la tasa de migración de los colorantes, asegurando una distancia prudencial con la muestra. Otro colorante utilizado es el xileno-cianol. A veces también se adicionan detergente en bajas concentraciones con el objeto de evitar posibles contaminaciones bacterianas y fúngicas.

Una composición para el buffer de carga muy económica, sencilla y comúnmente utilizada es la siguiente:

Buffer de carga: Glicerol 60%; EDTA 0,01 M; SDS 1%; Azul de bromofenol 0,1%

Corrida electroforética

Luego de conectar la fuente de poder a la cuba, si esta conexión es correcta podremos observar la formación de burbujas en los electrodos y en unos minutos el azul de bromofenol (que constituye la mayoría de los búferes de carga) comenzará a migrar desde el pocillo.

La electroforesis se lleva a cabo hasta que el frente haya migrado una distancia apropiada a lo largo del gel, que dependerá del tipo de muestra aplicada y de la experiencia y criterio del operador. Se recomienda una corrida a un voltaje apropiado intentando no superar los 45 a 60 minutos.

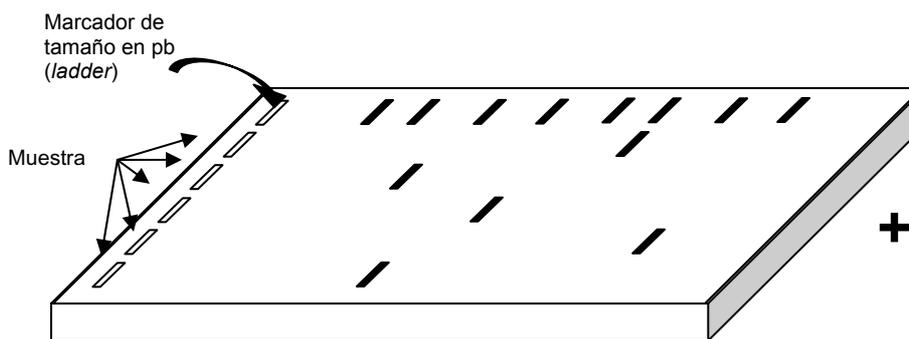


Figura 6: Corrida electroforética en gel de agarosa. Las muestras así como el maracador de peso molecular se depositan en carriles realizados en la agarosa. Las muestras migrarán hacia el ánodo (polo positivo). El bloque de agarosa se encuentra dentro de un recipiente con buffer de corrida de manera que el nivel del mismo supera la superficie del gel, por ello este tipo de electroforesis se denomina electroforesis submarina.

Tinción de los geles

Los geles de agarosa se tiñen fácilmente con bromuro de etidio. Este agente (**po-****deroso mutagénico**) se intercala entre las bases del DNA y absorbe la radiación ultravioleta, con posterior emisión, generando una coloración rosada-anaranjada de las muestras. En general la interacción con el DNA aumenta la absorción y emisión del bromuro de etidio.

La presencia del colorante puede retrasar la migración de las muestras hasta en un 15%. Por ello algunos optan por teñir al gel luego de la corrida, posibilidad también válida. En la mayoría de los casos no se procede a desteñir el gel, pero cuando las cantidades de ácidos nucleicos son muy pequeñas (<10 ng) se facilita su observación si se reduce el “background” coloreado, originado por el bromuro de etidio no asociado al DNA y entonces se sumerge el gel en agua o en 1 mM de MgSO₄ por 20 minutos.

Registro fotográfico de corridas electroforéticas

Tras la tinción con bromuro de etidio, es posible registrar fotográficamente la corrida, utilizando una cámara instantánea (Polaroid 667 ASA 300), cuya película es expuesta a la luz ultravioleta durante un tiempo determinado, a través de un filtro rojo/naranja (tipo Wratten 22 A de Kodak) el que sirve para eliminar la radiación de fondo que emulsiona la película. Las cámaras digitales con buena resolución también son útiles a los fines del registro fotográfico de corridas electroforéticas. De este modo, tras unos segundos, podemos tener guardada la fotografía de la corrida realizada, con objeto de usos posteriores.

En la siguiente figura podemos observar una típica corrida electroforética, registrada mediante el uso de la metodología propuesta:

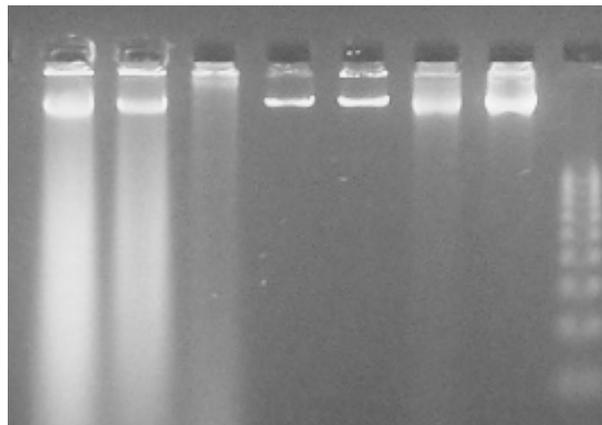


Figura 7: Corrida electroforética en gel de agarosa Carriles 1, 2 y 3: DNA vegetal; Carriles 4 al 7: DNA de sangre; último carril: marcador de peso molecular.

a) En los carriles 1, 2 y 3 con muestras de DNA vegetal. Podemos observar dos carriles iniciales con abundante cantidad de DNA de buena calidad. Pero además debe observarse el nivel de degradación, representado por el chorreado o “smear” que es el escurrido que brota de la banda manifiesta. Esto nos indica que se debe mejorar la metodología empleada en la extracción (suele ser un grave problema inicial en las técnicas de extracción de ácidos nucleicos vegetales). El carril 3 muestra una degradación importante, por lo que los ácidos nucleicos no se encontrarían en su calidad óptima. A pesar de ello, aún puede dársele varios usos (por ejemplo la amplificación por PCR, debido a su extrema sensibilidad y especificidad). En otros casos como el DNA cadavérico esto se debe al estado de degradación inicial del que se parte. En caso de contaminación con RNA también puede

observarse una zona de gran intensidad, algo difusa pero a cierta distancia de la banda de DNA.

b) En los siguientes carriles (4 al 7) observamos bandas correspondientes a ácidos nucleicos extraídos a partir de muestras de sangre (el volumen de partida de sangre fue de 500 μ L).

Una extracción ideal se podría ejemplificar por los carriles 4 y 5, cuyas bandas se presentan nítidas, sin “*smear*” y en cantidad importante, pero no en exceso. Estos ácidos nucleicos, evaluados por electroforesis, son óptimos para la mayoría de los usos posteriores. Con estas características pretenderíamos obtener todos los aislamientos que involucren DNA de alta calidad (para RNA se tienen en cuenta otras bandas características, como veremos más adelante).

c) Los carriles 7 y 8 también contienen ácidos nucleicos de alta viabilidad en alta concentración por lo que se ve cierto rastro fluorescente. Seremos cuidadosos en el momento de rehidratar los ácidos nucleicos aislados, prefiriendo siempre obtener extractos concentrados, antes que diluir en exceso los mismos. A pesar de ello, cuando utilizamos ciertas herramientas de la Biología Molecular también hemos de ser cuidadosos en las cantidades de ácidos nucleicos agregadas; por ejemplo, un exceso de matriz de copia puede afectar a reacciones de PCR.

PROTOCOLO

EQUIPAMIENTO

Fuente de poder
Cuba para electroforesis
Cables de conexión
Matraces capaces de contener las soluciones
Balanza analítica
Probetas capaces de medir los volúmenes requeridos
Micropipetas automáticas
Puntas (“tips”) azules y amarillas.
Transiluminador UV

REACTIVOS

Agarosa en polvo
Tampón de corrida TAE 1 X (o el tampón seleccionado)
Tampón de carga (“loading buffer”)
Solución de bromuro de etidio
Marcador de peso molecular (“ladder”)

A) Preparación del gel de agarosa

- 1- Sellar el soporte de corrida.
- 2- Preparar el tampón TAE (diluyendo la solución concentrada a 1 X)
- 3- Preparar agarosa (el volumen deseado, de acuerdo al soporte, por ejemplo 100 mL) al 1% en buffer TAE 1 X dentro de un matraz. Fundirla a baño María o en horno microondas (evitar que hierva), hasta obtener una solución límpida y homogénea.
- 4- Enfriarla con cuidado hasta unos 45°C aproximadamente.
- 5- Agregar el bromuro de etidio (aproximadamente unos 5 µl)
- 6- Verter la agarosa al soporte y colocar el peine procurando que su extremo inferior quede a 1 cm de la base. Esperar a que la solución gelifique.
- 7- Cuando la agarosa esté sólida retirar los selladores, insertar el soporte en la cuba, llenar la misma con el buffer de corrida y luego retirar con cuidado el peine.

B) Preparación de las muestras y electroforesis

- 1- Añadir a 10 µl de cada muestra a analizar, 1 µl de tampón de carga.
- 2- Aspirar la muestra con micropipeta de 20 µl (siempre seleccionamos un volumen mayor, para tener mayor dominio en la descarga al contar con mayor recorrido de émbolo) y colocando la pipeta en posición vertical sobre el pocillo, con la punta del tip amarillo en la entrada (no en el fondo) del pocillo, **depositar la muestra despacio**. Evitar pinchar el fondo del pocillo, ya que la muestra escurriría por debajo del gel de agarosa, perdiéndose.

- 3- Una vez cargadas todas las muestras, depositar 2 μ l de patrón de peso molecular. Algunos patrones de peso molecular (que se adquieren comercialmente) son provistos listos para usar, en tanto que otros deben prepararse como si fueran una muestra más (o sea agregándole 1 μ l de tampón de carga)
- 4- Calcular el voltaje que hay que fijar en la fuente de electroforesis para migrar el gel a 6 V/cm (**recordar que para este caso, la distancia a tener en cuenta es la que separa los dos electrodos y no meramente la longitud del gel**).
- 5- Conectar la fuente a la cuba de electroforesis. Iniciar la corrida electroforética.
- 6- Detener la corrida cuando el frente (indicado por el azul de bromofenol) haya llegado a los $\frac{3}{4}$ de la longitud del gel.
- 7- Ya que el bromuro de etidio estaba en el gel, el DNA se ha teñido mientras migraba y pueden analizarse las bandas al UV.
- 8- Colocar el gel con la corrida efectuado bajo luz ultravioleta. El colorante bromuro de etidio coloreará las bandas de un color anaranjado. Fotografíar la corrida y guardar dicho registro con los datos indicados (Nombre del individuo, fecha y muestras presentes en cada carril).

Preparación de soluciones

BROMURO DE ETIDIO (8 mg/mL)

| | |
|--------------------------|-----------------|
| <i>Bromuro de etidio</i> | <i>8 mg</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>vsp 1 mL</i> |

TAE 10X

| | |
|--|--------------------|
| <i>Tris base</i> | <i>48,4 g</i> |
| <i>Ácido acético glacial</i> | <i>11,42 mL</i> |
| <i>EDTA 0,5 M</i> | <i>20 mL</i> |
| <i>Agua</i> | <i>vsp 1000 mL</i> |
| <i>Ajustar el pH con ácido acético. Autoclavar y preservar a 4 °C.</i> | |

TAE 1X

| | |
|--|--------------|
| <i>TAE 10X</i> | <i>10 mL</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>90 mL</i> |
| <i>Para volúmenes mayores la relación es la misma.</i> | |

TBE 10X (pH 8,2- 8,4)

| | |
|---|--------------------|
| <i>Tris base</i> | <i>108 g</i> |
| <i>EDTA</i> | <i>9,25 g</i> |
| <i>Ácido bórico</i> | <i>55 g</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>vsp 1000 mL</i> |
| <i>Ajustar el pH con ácido bórico. Autoclavar y preservar a 4 °C.</i> | |

TBE 1X

| | |
|-----------------------|--------------|
| <i>TBE 10X</i> | <i>10 mL</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>90 mL</i> |

GEL DE AGAROSA 1%

| | |
|------------------------------------|----------------------------|
| <i>Agarosa</i> | <i>1 g</i> |
| <i>TAE 1X</i> | <i>1000 mL</i> |
| <i>Bromuro de etidio (10mg/mL)</i> | <i>5 μl</i> |

CUANTIFICACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LA PUREZA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Fundamento teórico

Los ácidos nucleicos presentan un máximo de absorción a 260 nm, mientras que las proteínas (contaminantes de la preparación), tienen un máximo de absorción a 280 nm. Por ello, la medida de la absorbancia, a ambas longitudes de onda, permite saber el grado de pureza de la preparación de DNA y la absorbancia a 260 nm, la cantidad de DNA obtenido.

El uso del espectrofotómetro se basa en la aplicación de la ley de Lambert-Beer:

$$I = I_0 \times 10^{-\epsilon d C}$$

Luego del tratamiento matemático de esta fórmula, obtenemos la expresión más conocida de esta ley:

$$A = \epsilon \cdot d \cdot C$$

Donde

A es la absorbancia

ϵ es el coeficiente de extinción molar (mL/ μ gr.cm)

d es la longitud de la cubeta, o camino óptico

C es la concentración

Una preparación pura de DNA tiene un coeficiente de extinción molar ϵ_{260} de 0,027 mL/ μ gr.cm y una relación Abs₂₆₀ / Abs₂₈₀ de 1,6 a 1,8.

- La presencia de proteínas disminuye este valor de relación, ya que las mismas presentan su pico de absorción a 280 nm.
- La presencia de RNA como contaminante hace aumentar el valor de la relación (una muestra pura de RNA presenta un valor de relación de 2,0).
- La presencia de nucleótidos (como cuando se produce degradación de ácidos nucleicos) eleva la relación por encima de 2,3.

En general el cálculo de concentración de ácidos nucleicos puede estimarse a través de fórmulas matemáticas como por ejemplo:

a) La concentración de ácidos nucleicos (en $\mu\text{g/mL}$) en una cubeta de cuarzo es:

$$C_{\mu\text{g/mL}} = A_{260\text{ nm}} \times k \quad \left\{ \begin{array}{l} k_{ssDNA} = 37 \\ k_{RNA} = 40 \\ k_{dsDNA} = 50 \end{array} \right.$$

b) Para calcular la concentración en pmol/mL (masa molecular media de un nucleótido = 309).

$$C_{\text{pmol/mL}} = \frac{1515 \times A_{260} \times k}{pb}$$

que para el DNA se puede convertir en:

$$C_{\text{pmol/mL}} = \frac{1515 \times [\text{DNA}]_{\mu\text{g/mL}}}{pb}$$

EJEMPLOS Y EJERCICIOS

Para observar prácticamente la utilidad de manejar estas herramientas veremos un ejemplo:

En cierto experimento se extrae DNA a partir de tejido hepático bovino. Como primer paso se preparó una solución disgregante del tejido, con 20 mL de solución salina concentrada y 5 gr de tejido, utilizando un mortero para disgregar la muestra. Posteriormente se toman 0,5 mL de dicha solución y se procede a aplicar un protocolo de extracción de ácidos nucleicos. El DNA obtenido se resuspende en 0,5 mL de agua destilada estéril.

Para verificar la pureza y cuantificar los ácidos nucleicos aislados se utiliza el método espectrofotométrico, midiéndose la absorbancia en una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Para ello, a los 0,5 mL de aislado se le agregan 2,5 mL de agua destilada estéril, obteniéndose los siguientes valores:

$$A_{260} = 0,264$$

$$A_{280} = 0,164$$

La relación A_{260} / A_{280} es igual a 1,61, lo que nos indica un grado importante de pureza.

Se desea ahora cuantificar:

$$A = \epsilon \cdot d \cdot C$$

Entonces:

$$C = \frac{A_{260}}{\epsilon \cdot d}$$

$$C = \frac{0,264}{0,027 \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mL} \times 1 \text{cm}}$$

$$C = 9,77 \mu\text{g/mL}$$

Sin embargo 0,5 mL de muestra se diluyen 6 veces. Entonces tenemos:

$$C = 9,77 \mu\text{g/mL} \times 6 = 58,62 \mu\text{g/mL}$$

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mL} \text{ ————— } 58,62 \mu\text{g} \\ 0,5 \text{ mL} \text{ ————— } x = 29,3 \mu\text{g} \text{ totales de DNA obtenidos} \end{array}$$

Por otro lado, esta masa se encuentra en 0,5 mL de la solución de tejido disgregado. Entonces:

$$\begin{array}{l} 20 \text{ mL} \text{ ————— } 5 \text{ g de tejido hepático} \\ 0,5 \text{ mL} \text{ ————— } x = 0,125 \text{ g tejido hepático} \end{array}$$

Entonces para conocer los miligramos de DNA por gramo de tejido, tenemos:

$$\begin{array}{l} 0,125 \text{ g de tejido} \text{ ————— } 29,3 \times 10^{-3} \text{ mg DNA} \\ 1 \text{ g de tejido} \text{ ————— } x = 0,23 \text{ mg DNA} \end{array}$$

Por lo tanto aplicando este ejemplo tenemos 0,23 mg de DNA por cada gramo de tejido hepático.

Proponemos otro ejemplo: Recomendamos que repase brevemente el apartado de extracción de ácidos nucleicos y que el lector intente realizar el ejercicio por sí mismo.

En el apartado titulado “Repaso” encontrará la resolución de este ejercicio.

Se realiza la extracción de ácidos nucleicos a partir de sangre entera. Para verificar la pureza de los mismos se utiliza el método espectrofotométrico.

Para la extracción se ha partido de 300 μl de sangre y según los datos entregados por el contador hematológico, la muestra de sangre presenta 5000 glóbulos blancos por mL de sangre.

Luego de extraer los ácidos nucleicos se diluyen los 30 μl obtenidos luego de la rehidratación en 270 μl de agua destilada y se lee la absorbancia a 260 nm y a 280 nm, utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico, obteniendo:

$$A_{260} = 0.265$$

$$A_{280} = 0.165$$

- 1) ¿Se encuentran puros los ácidos nucleicos aislados de acuerdo al método empleado? ¿Por qué? (Supongamos que se desea obtener especialmente DNA).
- 2) ¿Cuál es la concentración de ácidos nucleicos obtenida luego de la extracción?
- 3) ¿Puede calcular cuantos microgramos de DNA tiene en 1 glóbulo blanco?

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Fundamento teórico

La reacción en cadena de la Polimerasa (**PCR**) es una técnica que ha revolucionado el modo de manipular, clonar y detectar fragmentos de DNA, lo que le ha valido a su descubridor K.B. Mullis el Premio Nobel. Después de su descubrimiento en 1983, se ha convertido en una de las técnicas básicas de Biología Molecular, ampliamente utilizada debido a su rapidez, especificidad, flexibilidad y aplicabilidad, y sobre todo porque no es necesario contar con DNA extremadamente puro para amplificar. Entre sus aplicaciones generales encontramos la generación de sondas, clonación, secuenciación, diagnóstico clínico y tipificación de individuos y microorganismos, siendo entonces muy utilizada en medicina forense y en estudios filogenéticos.

La PCR parte de la premisa de que el DNA bicatenario puede desnaturalizarse, de manera que en cada una de sus hebras pueden alinearse unos oligonucleótidos diseñados para ser complementarios a porciones de cada una de las cadenas. Cuando estos oligonucleótidos se sitúan en extremos opuestos de una región particular, pueden servir como cebadores para una DNA polimerasa, lo que permite formar una porción de DNA bicatenario definida por estos dos cebadores, también denominados "*primers*". La repetición de los ciclos de desnaturalización, alineamiento (hibridación o "*annealing*" en inglés) y polimerización es capaz de producir cantidades crecientes del producto, resultando una amplificación de orden exponencial de la secuencia enmarcada por los cebadores. Por lo tanto, bastaría una cantidad muy pequeña de DNA molde para obtener una gran masa de copias de la región seleccionada luego de la PCR. El número de copias de dicha región seleccionada (**amplicones**) se puede estimar según:

$$N = N_0 \times (1-R)^c$$

donde N es el número de copias obtenidas

N_0 es el número de copias que se han depositado en la reacción inicialmente

R es el rendimiento de cada ciclo expresado en tanto por uno (normalmente debe oscilar entre 0,7 y 0,85)

c es el número de ciclos.

Un ciclo de PCR comienza con un calentamiento inicial que desnaturaliza el DNA objetivo o blanco ("*target*") a 94 - 95°C o más. Este primer paso del ciclo dura entre 15 segundos y 2 minutos. En el proceso de desnaturalización, las dos cadenas del DNA se separan una de la otra y permiten que la matriz ("*template*") se encuentre como cadena simple, necesario para las actividades llevadas a cabo por la polimerasa termoestable durante los pasos de amplificación.

En el siguiente paso del ciclo, la temperatura se reduce a un valor que oscila en el rango de los 40°C a los 60°C. A esta temperatura, cada uno de los oligonucleótidos ("*primers*") hibridan ("*anneal*") con la secuencia complementaria en cada

una de las cadenas simples de DNA, que se han separado en el paso anterior, y sirven como cebadores para la síntesis, por la polimerasa termoestable.

La síntesis de DNA se inicia cuando la temperatura de la reacción llega al valor óptimo para la actividad de la polimerasa. Para la mayoría de las polimerasas esta temperatura se encuentra en, aproximadamente, los 72°C. Luego se permite la síntesis durante 30 segundos a dos minutos. Este paso completa **un ciclo**, y el **siguiente ciclo** se inicia con el retorno a los 94-95°C para la desnaturalización.

La cantidad de amplificado resultante va a depender de la disponibilidad de sustrato para la reacción. Por eso, los oligonucleótidos (“*primers*”) y los desoxirribonucleótidos trifosforilados (*dNTP's*) se añaden en exceso respecto al DNA a amplificar. Como es fácil inferir, la concentración de DNA, oligonucleótidos, desoxirribonucleótidos y DNA polimerasa activa disminuyen después de cada ciclo debido a la síntesis que se está produciendo, por lo que la reacción llega a un máximo de amplificación, luego del cual el rendimiento y el número de copias obtenidas no aumentan. A esto se lo conoce como el efecto “Platteau”.

Inicialmente se utilizaron DNA polimerasas que no eran estables a altas temperaturas y se desnaturalizaban junto al DNA, haciendo necesario añadir nueva enzima tras cada ciclo. La aparición de DNA polimerasa termoestables ha facilitado en gran medida la metodología gracias a su estabilidad para resistir los repetidos ciclos a temperaturas altas y variables.

Una PCR ideal debería ser altamente específica, fiel y de gran rendimiento. Cada uno de estos parámetros está influido por varios componentes de la propia reacción por lo que en muchos casos, ajustando las condiciones para la máxima especificidad no se obtiene buen rendimiento, o bien optimizando para la fidelidad no se obtiene buena eficiencia. En consecuencia, cada vez que se optimiza una PCR hay que tener en cuenta distintos aspectos que hacen que dicha reacción sea exitosa.

¿Cuáles son los factores de los que depende una PCR exitosa?

Aunque el concepto de la PCR es simple, el desarrollo de una reacción exitosa depende de un número de factores. **Algunos** de ellos son:

a) Diseño de los oligonucleótidos iniciadores (“primers”): un prerrequisito esencial para una reacción exitosa es el diseño de pares óptimos de “*primers*”. En el diseño de los mismos algunas reglas se han demostrado como útiles, por ejemplo:

- I. Cada “*primer*” individual debe contar con 18 a 24 bases. *Primers* de mayor longitud se desempeñan de modo similar comparados con *primers* más cortos.
- II. Los dos “*primers*” del par deben tener temperaturas de fusión (**T_m**) cercanos, dentro de los 5°C.
- III. Se debe mantener un contenido de **G:C (guanina: citosina)** entre 40 y 60% (o sea 4 a 6 bases de cada 10 que forman cada uno de los oligonucleótidos del par deben ser guaninas o citosinas).
- IV. La secuencia de los “*primers*” individuales debe iniciarse y terminarse con 1 o 2 bases púricas.

b) Concentración de Magnesio: en ausencia de concentraciones adecuadas del ión Mg⁺⁺ libre, la DNA polimerasa es inactiva. Por lo tanto, la concentración de magnesio es un factor crucial que afecta el desarrollo de la PCR. Muchos de los

componentes de la reacción unen magnesio, incluyendo la matriz de DNA, agentes quelantes presentes en la muestra (EDTA o citrato), dNTP's y proteínas. Como resultado se puede ver afectada la cantidad de magnesio libre presente en la reacción. Por otro lado, el exceso de magnesio disminuye la fidelidad de la enzima y puede incrementar el nivel de amplificación no específica. Por lo tanto, para cada protocolo de amplificación por PCR se deben optimizar las concentraciones de Cl_2Mg (esto se logra de manera experimental comparando el nivel de amplificación logrado con diferentes concentraciones de Mg^{++} , proceso conocido como titulación de Mg^{++}).

c) Elección de la enzima: la elección de la enzima correcta para ser usada en PCR depende de varios factores, pero por razones de automatización es preferible usar las termoestables. Sin embargo, no todas ellas son igualmente eficaces a la hora de amplificar. *Taq* no posee la actividad correctora 3'-5' con lo que se tasa de error es del orden de 10^{-4} errores por par de bases incorporada, *Vent* del orden de 10^{-5} y *Pfu* del orden de 10^{-7} , siempre considerando que una polimerasa normal tiene una tasa de error de 10^{-6} errores por par de bases incorporada.

d) Molde de DNA: tendremos que cuantificar el DNA para conocer la masa de ácidos nucleicos disuelta, además de tener indicios acerca de su pureza. Varios autores indican la cantidad de matriz de DNA a agregar a la reacción, expresándola en micro, nano o picogramos.

e) Termocicladores: se hallan disponibles un gran número de modelos de termocicladores y también de tubos para PCR. Sin embargo, todos los termocicladores se caracterizan por poseer un bloque metálico, que se calienta o enfría, alcanzando temperaturas que son controladas por un programa de computación y determinadas por un sensor que las regula y mantiene de acuerdo al programa. Pero a pesar de todo, los diferentes termocicladores tienden a obtener y mantener temperaturas de un modo levemente diferente, por lo que los resultados de la reacción pueden llegar a variar levemente. Por ello es necesario apropiarse los programas de ciclo a nuestros propios "primers" y condiciones. Actualmente contamos con tubos de paredes delgadas de 0,2 mL (tubos "thin wall") cuya forma y estrechez de pared, permiten un contacto perfecto entre los tubos y el bloque metálico del termociclador. Recordemos que el intercambio no uniforme de calor entre el termociclador y el tubo de PCR puede provocar significativas variaciones en la amplificación. Con todo, las condiciones óptimas de la PCR siempre acaban por determinarse empíricamente.

Problemas asociados a la PCR

Contaminación

Teniendo en cuenta la extrema sensibilidad de la reacción (comparada alguna vez con la caída de una gota de tinta de 50 μl en una pileta de natación olímpica de 4m x 25 m x 50 m) este problema puede conducir a erróneas interpretaciones de los resultados.

Para minimizar el problema se sugiere seguir estrictamente las Reglas de Kwok e Higuchi, donde se recomienda el uso de tips con filtro para los aerosoles, alicuotar los reactivos y trabajar en tres áreas físicamente separadas:

Área 1: Donde se trabaja con los materiales para extraer el material genético.

Área 2: Para prepara las soluciones de amplificación.

Área 3: Para manipular productos amplificados (ya sea provenientes de clones o de productos previos de PCR).

Es imprescindible destinar juegos de pipetas separados para cada una de estas áreas, así como es mandatorio el empleo de tips con filtro para cada una de las pipetas a emplear, con el objeto de que dicho filtro obre como barrera para impedir la contaminación de las mismas con aerosoles conteniendo templados artificiales.

Inhibición de la Reacción

Como contrapartida a los falsos resultados positivos, también es menester recordar que múltiples factores pueden vincularse a resultados falsos negativos. Los mismos pueden obedecer a:

- 1- defectos en la preparación/conservación de la muestra.
- 2- extracción defectuosa del material genético a amplificar.
- 3- presencia de inhibidores.

Resultados falsamente negativos pueden asociarse a la inhibición de la actividad enzimática de la DNA polimerasa termoestable utilizada. Han sido documentados resultados falsamente negativos, por ejemplo merced a la utilización de heparina para utilizar plasma. En ciertas ocasiones la presencia de quelantes como el EDTA en el espécimen a analizar, puede inhibir la reacción como resultado de la falta de magnesio libre necesario para la actividad enzimática.

Es también menester recordar que si luego de la etapa final de extracción de ácidos nucleicos quedar trazas de alcohol, este puede también inhibir la reacción de amplificación. En otros casos se ha documentado que el grupo hemo puede también inhibir la DNA polimerasa.

El problema de los falsos negativos en las reacciones de PCR puede ser evaluado mediante la coamplificación simultánea de un templado utilizado como control interno de la reacción.

¿Cómo evitar los problemas de amplificaciones espúreas en la PCR?

Se considera crítico el cumplimiento de las Reglas de Kwok e Higuchi antes mencionadas. Aún así es menester tener presente la posibilidad de transportar aerosoles de una muestra a otra, con el consiguiente riesgo de obtener falsos positivos. Entre los procedimientos habitualmente empleados, es de extrema utilidad recordar que la solución de NaOCl al 10% (lavandina diluida) es un método muy apropiado para evitar las contaminaciones. Dicha solución debería ser aplicada a las superficies inertes (mesadas, cabinas, etc.) donde se trabaja con dichos productos.

Así también se ha documentado que la luz UV de 254-300nm es suficiente para impedir la amplificación ulterior de amplicones anteriormente obtenidos. Dicha iluminación debería ser empleada una vez concluida la operación con ácidos nucleicos. Es suficiente la aplicación durante 5 min.

La luz UV no daña al DNA monocatenario de los oligonucleótidos.

Es importante destacar que la solución de dNTP's es capaz de absorber la luz UV y por ello no debe estar presente al momento de la irradiación. Tampoco debe irradiarse con luz UV al aceite mineral, pues podría afectar negativamente a la reacción.

Formación de dímeros de cebadores (“primers dimers”)

Este artificio ocurre frecuentemente como resultado del apareamiento de bases entre dos cebadores (o eventualmente, un extremo de un cebador sobre sí mismo). Dado que la DNA polimerasa elonga en sentido 5'-3', un oligonucleótido cebador puede permitir a la enzima que a partir de su extremo 3' continúe polimerizando según el templado constituido por el otro cebador.

Los dímeros ocurren cuando más frecuentemente cuando la PCR se realiza por más de 30 ciclos, así como cuando la matriz está en muy baja concentración. Aunque si existe una alta complementariedad entre los *primers* los primeros cambios de temperatura pueden provocar una predominancia de estos frente al amplicón deseado, perjudicando enormemente al resultado de la PCR. Esto puede evitarse colocando la enzima por último y cuando la reacción está ya a temperatura de desnaturalización (usualmente 94°C), estrategia denominada *Hot Start PCR*.

Por otra parte, actualmente existen enzimas que poseen un anticuerpo que bloquea su sitio catalítico impidiendo su acción hasta el momento en que la proteína se desnaturaliza.

¿Cómo observamos el producto de la amplificación por PCR?

Una vez que hemos realizado la Master Mix y desarrollado la reacción correspondiente utilizando el termociclador adecuado, obtenemos el producto de la reacción, o sea los millones de amplicones que representan la fracción de matriz enmarcada por los *primers* seleccionados.

Recordaremos entonces que uno de los modos de indicar el tamaño del producto es en pares de bases: así nuestro producto de amplificación tendrá tantos pares de bases como la región diana de amplificación, y hemos de incluir en dicha medición el número de bases correspondientes a los *primers*. Si por ejemplo se desea amplificar una región de 450 pb, utilizando dos *primers* de 18 pares de bases cada uno. El producto de amplificación tendrá **450 pares**, incluyendo a los *primers* (**no 414** pares de bases, lo que hubiera significado restar los 36 pares de bases de los dos cebadores).

Aunque esta aclaración puede resultar obvia, es importante recordarlo ya que el modo de evaluar la calidad del producto de amplificación es justamente a través de una corrida electroforética, ya sea en agarosa o en poliacrilamida. Así cuando evaluemos el tamaño del producto hemos de valerlos de un marcador de peso molecular, el cual nos indicará aproximadamente el tamaño.

Existen diversos programas informáticos que se encargan de realizar una evaluación mucho más refinada y exacta y puede ser conveniente su uso para ciertos estudios. A pesar de ello, cuando no requiramos parámetros de alto rigor, podríamos tener una aproximación al peso molecular, emulando cálculos matemáticos empleados para conocer el tamaño proteico (por ejemplo las “rectas de calibración”).

DESARROLLANDO UNA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Objetivo: Conocer una de las técnicas más poderosas actualmente de la Biología Molecular, comprendiendo sus ventajas y limitaciones.

EQUIPAMIENTO

Termociclador
Tubos para PCR de 0,2 mL
Micropipetas automáticas
Puntas (“tips”) azules y amarillas nuevas
Puntas “cristal”
Recipiente conteniendo hielo

REACTIVOS

Solución tampón para PCR conteniendo KCl 10 veces concentrada (“10 X”)
Solución de MgCl₂ 25 mM
Taq polimeras 5 U/μl
Par de oligonucleótidos o “primers” (preparados según indicaciones del fabricante)
Solución de dNTP's (desoxirribonucleótidos) concentración 10000 μM o 10 mM
Agua destilada esterilizada libre de DNAsas y RNAsas
Matriz de DNA aislada según protocolos manuales o comerciales de Laboratorio

PROTOCOLO

*Es sumamente importante recordar que es **ABSOLUTAMENTE** necesario... Colocarse guantes antes de iniciar la práctica. Recodemos la presencia de DNAsas y RNAsas, tanto en el ambiente, como en las manos del operador. Además se debe tratar imperiosamente de evitar la contaminación cruzada de ácidos nucleicos, por ello generalmente la extracción de DNA se realiza en un cuarto separado al lugar en el que se encuentra el termociclador, y donde se llevan adelante reacciones de PCR.*

CÁLCULO DE LA MASTER MIX

Cuando se realizan reacciones de PCR, se parte de una solución que contiene todos los elementos que requiere la polimerasa para sintetizar el DNA, **excepto el DNA matriz**, o sea el “blanco” o “*target*” de amplificación.

Se selecciona esta metodología debido a las mínimas cantidades que se requieren de cada uno de los reactantes, lo que acarrea graves errores de medición. Así por ejemplo, como veremos más adelante, para llevar adelante 1 sola reacción de PCR se debería pipetear 0,1 µl de la enzima Taq polimerasa. Esta medición tiene un alto porcentaje de error y por ello es mejor sumar varias reacciones y realizar una gran mezcla que contenga un mayor volumen. Entonces, si llevamos adelante 20 reacciones de PCR, lo que tendríamos que pipetear de Taq polimerasa sería 2 µl (0,1 µl x 20 reacciones = 2 µl) que es un volumen mucho más exacto para medir con una micropipeta automática.

Sucede algo similar con el resto de los componentes de la reacción de PCR, por lo que se parte de una solución que contiene una solución tampón (para mantener equilibrado el pH de la reacción), MgCl₂ (el Mg⁺⁺ es el cofactor de la enzima Taq), el par de “*primers*”, *dNTP*'s en exceso y la enzima Taq polimerasa; además se le adiciona agua libre de DNAsas y RNAsas ya que el medio en que se desarrolla la PCR es acuoso. A esta solución se la denomina **Master Mix (MEZCLA MAESTRA)** y contiene todos los reactantes necesarios para desarrollar el número de reacciones determinadas en un dado experimento.

Luego de tener lista esta “*Master Mix*” se reparten en los tubos correspondientes el DNA matriz y se le adiciona la Master Mix, para luego llevarlos al termociclador.

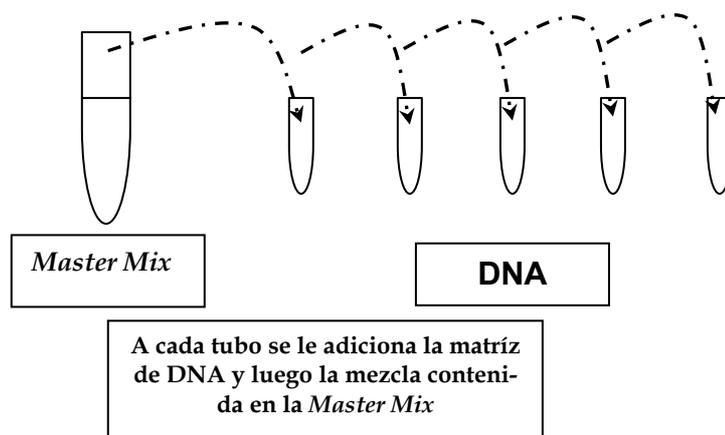


Figura 8: Preparación de Reacciones de PCR. La Master Mix se realiza en un tubo aparte y contiene todos los reactivos necesarios para la reacción, excepto el DNA matriz. Dicha matriz se agrega a cada tubo y luego se adiciona la *Master Mix*.

Antes de preparar la Master Mix...

Para preparar la “*Master Mix*” tenemos que conocer el **volumen final de reacción** que deseamos. Normalmente, las reacciones de PCR se llevan adelante en un volumen final de 50 a 25 μl , pero pueden elegirse volúmenes finales menores.

El ejemplo que vamos a brindar corresponde a una reacción de PCR de 25 μl de volumen final.

Componentes de la *Master Mix*

Solución tampón (Buffer) para PCR: es una solución que contiene KCl y también un detergente. Como imaginamos la solución tampón cumple la función de estabilizar el pH en el volumen de la reacción. Además, debido a la presencia del detergente también ayuda a disminuir la contaminación exógena.

Usualmente esta solución es provista por el fabricante de las enzimas recombinantes, y suele venir en un valor de concentración que se representa por **X** (*equis o por*; que en este caso significa “**VECES**”). Así, un buffer que es enviado con la Taq polimerasa, y en cuya etiqueta leemos “**10 X**”, es un buffer 10 veces concentrado respecto a la concentración final que requerimos en la reacción. **La concentración final de buffer en el volumen de la reacción es siempre “1 X”.**

Si la PCR tiene un volumen final de 25 μl , nuestra Master Mix contendrá 2,5 μl de buffer por cada reacción (o sea es diluir 10 veces el buffer en el volumen de reacción de PCR, para que su concentración sea de “1 X”).

MgCl₂: la solución de MgCl₂ también suele ser provista por el fabricante. Como se desprende de la discusión teórica, la concentración de Mg⁺⁺ es una variable importante, y debe determinarse empíricamente.

Por otro lado, la solución recibida se halla en una dada concentración, así que debemos calcular el volumen a utilizar (Por ejemplo: “*se llevará adelante una PCR donde se requiere un valor de 1 mM de concentración de Mg⁺⁺ por reacción, en tanto que el fabricante nos ha enviado un vial conteniendo 1 mL de una solución 25 mM de Cl₂Mg*”. Si nuestro volumen final de reacción es 25 μl , tenemos que agregar 1 μl de dicha solución a nuestra Master Mix por cada reacción).

Primers: para obtener la secuencia sintética deseada de los *primers*, debemos solicitarla a casas comerciales, las cuales nos proveerán dichos cebadores, también denominados oligonucleótidos. Junto a los cebadores se adjunta una cartilla donde constan las características de los mismos, como T_m, peso molecular, etc. Además, el fabricante indica cual es el volumen de **agua destilada estéril** o solución de *Tris-HCl/EDTA (TE)* que debemos agregar para alcanzar una determinada concentración.

Una vez que los *primers* son reconstituidos, deben ser almacenados a -20°C. Como luego de la reconstitución, la concentración alcanzada es elevada, suele guardarse como stock.

Recordemos que no es conveniente congelar y descongelar las soluciones de *primers* demasiadas veces. **Es mejor alícuotar la solución concentrada y luego elegir una alícuota y realizar las diluciones, para evitar el descongelado frecuente.**

Taq polimerasa: cuando adquirimos la Taq polimerasa, el fabricante indica el número de unidades de actividad. Al ser una enzima no hablamos de concentración sino de actividad, siendo esta indicada en UNIDADES DE ACTIVIDAD/LITRO (U/l). Para el caso de la Taq polimerasa, la definición de unidad es la siguiente: “**Una UNIDAD de enzima cataliza la incorporación de 10 nanomoles de desoxirribonucleótidos a una fracción polinucleotídica (adsorbida a una columna) en 30 minutos a 70°C**”.

Recordemos que para el caso de la medición de actividad enzimática es sumamente importante indicar la temperatura a la que se lleva a cabo dicha medición, ya que los valores varían de modo importante ante variaciones de temperatura.

La Taq polimerasa es provista en un vial conteniendo glicerol, que evita que se congele pero también vuelve más densa a la solución, por lo que tendremos que tener la precaución de observar que midamos el volumen requerido de solución al pipetear.

El número de unidades de Taq polimerasa a utilizar también termina siendo una variable que se debe ajustar. En general se recomienda utilizar 1 o 2 unidades por reacción de PCR. Sin embargo en volúmenes finales menores podemos utilizar menor número de unidades de polimerasa ya que el exceso de enzima no asegura un aumento de rendimiento y por otro lado un exceso importante puede llevar a un aumento en la frecuencia de presentación de artefactos.

Por ejemplo, *en una reacción de PCR de volumen final igual a 25 µl utilizaremos 0,5 Unidades*: si el vial comprado indica “**5U/µl**”, para alcanzar 0,5 Unidades en 25 µl, debemos agregar 0,1 µl por reacción de PCR.

dNTP's: usualmente se adiciona a la Master Mix un exceso de desoxirribonucleótidos trifosforilados. Aún así pueden ser una importante variable de ajuste de las reacciones de PCR. Para considerar más detenidamente el cálculo de los volúmenes y concentraciones de dNTP's a utilizar remitimos al lector al apartado que cuenta con el ejemplo práctico.

Matriz de DNA: la amplificación exitosa de la región de interés depende de la cantidad y calidad del DNA molde. El DNA aislado debe estar libre de inhibidores potenciales de polimerasas de DNA. Frecuentemente los inhibidores suelen estar representados por reactivos utilizados en la purificación de DNA como solventes orgánicos, proteasas, alcoholes, detergentes y otros.

Como indicamos anteriormente, la cantidad de matriz de DNA que tenemos que agregar a la reacción es una variable, que tendremos que optimizar. Sin embargo, los autores recomiendan una cantidad de matriz. Esta cantidad suele ser citada en masa (por ejemplo microgramos, picogramos o nanogramos), por ello es necesario saber la masa de DNA en el volumen de aislado.

Supongamos que luego de cuantificar el DNA obtenemos una concentración de 1 µg/µl. Por otra parte, un autor asegura que, utilizando los mismos *primers* y al mismo volumen final que nosotros, lleva adelante una reacción de PCR con excelente rendimiento utilizando 1 µg de DNA. Para basarnos en la idea de dicho autor, debemos agregar 1 µl de la solución cuantificada de DNA (ya que contiene 1 µg de DNA por cada µl de solución). Un cálculo tan sencillo como este puede ser utilizado en todas las ocasiones.

Eventualmente tendremos que tener en cuenta la cantidad de matriz de acuerdo al volumen final deseado, pero como indicamos antes, usualmente la cantidad de DNA que debe agregarse a una reacción de PCR suele determinarse empíricamente.

Agua: para conocer el volumen de agua que tendremos que agregar tenemos que tener presente la siguiente información:

- Tener cuantificado el DNA aislado.
- Conocer el volumen final de la reacción de PCR.

La cantidad de agua a agregar a la Master Mix surge según:

(volumen final de reacción X número de reacciones) - (vol de buffer + vol de Cl₂ Mg + vol de dNTP's + vol de “primers” + vol de Taq polimerasa + vol de DNA molde) = vol de agua destilada estéril a agregar a la Master Mix.

EJERCICIO PRÁCTICO

Pasaremos ahora a imaginar un caso **ABSOLUTAMENTE FICTICIO**, pero muy demostrativo.

En un publicitado film que se desarrolla en la ciudad de Los Ángeles, John Constantine es un hombre que tiene el (no muy envidiable) “don” de poder ver a los demonios que habitan en esta Tierra en donde, según el argumento de la película, Dios y Lucifer se juegan a la Humanidad como premio. Como ni Dios ni Lucifer pueden intervenir directamente, debido a su “Pacto de Equilibrio” sólo pueden influenciar a las personas a que tomen un camino, a través de mensajeros “híbridos” que son mitad ángel y mitad humanos, o bien mitad demonios y mitad humanos. Cuando alguno de estos “rompe el Pacto de Equilibrio”, John Constantine debe enviarlos de nuevo al Cielo o al Infierno. El problema es que él mismo, no es recibido ni el Estado Celestial, ni tampoco en el Reino de las Sombras Infernales, debido a que actúa como Mediador. Debido a esto, John Constantine lo contrata a usted ya que ha recibido muy buenas referencias y sabe que se ha formado en Biología Molecular. Él le comenta la situación y cree que el problema por el que no puede ir al Cielo (o al Infierno) se encuentra en su genoma.

Después de que usted cavila un rato (imaginando lo descabellado de lo que acaba de oír) decide ayudarlo. (Por supuesto que del tema dinero se ha hablado profuuuundamente). Como usted investiga para la “Equilibrium Pact Corporation” tiene disponible un lindo laboratorio de Biología Molecular...

Por otro lado una página de Internet (de investigadores pertenecientes a una religión muy devota) acaba de publicar el “PROYECTO GENOMA HÍBRIDO ANGELICAL”, donde consta la secuencia de un individuo “híbrido” mitad humano, mitad ángel.

-¿Qué puedo hacer?- se pregunta usted...

- a) enviarlo a la clínica psiquiátrica de su amigo (“porque este hombre esta re-loquito!!”).
- b) intentar secuenciar su genoma y compararlo con el publicado en la página anterior.
- c) buscar bibliografía por Internet.

Como no se decide por nada, va a una Iglesia a rezar un rato y mientras lo hace se percata de que a su lado se encuentran varias plumas de ala de ángel!!! Y con tanta suerte, que se hallan adheridas varias células de “híbrido” angelical!!!! Luego de felicitarse por su buena estrella, se decide a buscar información en Internet.

Allí consta que varios Mediadores anteriores, tenían una extraña mutación en el locus 5q21 (o sea un locus ubicado en el brazo largo del cromosoma 5, y en la subregión 21) que los inhabilita para salir de la Tierra e irse al Cielo (o al Infierno). Luego de entrar a bases de datos internacionales y de hallar bibliografía, usted encuentra que se trata de una secuencia cercana a un gen supresor de tumores.

¿Qué podría hacer con unas cuantas células de “híbrido” angelical para ayudar a Constantine?

- a) congelarlas en nitrógeno líquido para que no se pierdan y dedicarse a estudiar y recibirse de, por ejemplo, periodista de historias de ciencia ficción.
- b) Provocar mutaciones en las células para diseñar una línea de cultivo celular, a través de la immortalización de las células, aunque le puede llevar algunas décadas obtenerla.
- c) Aislar el DNA de “híbrido angelical”, amplificar el locus 5q21 y compararlo con el de John Constantine para conocer la posible mutación que lo afecta

Sin dudar, elige la última opción por lo que posteriormente, utilizando un programa de diseño informático de *primers*, disponible gratuito en Internet (por ejemplo el programa Primer 3, http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) obtiene un par de *primers* cuyas secuencias se consignan:

Primer izquierdo, sense o I: GTA GTT TGG CAT TAT TCC AGG G
Primer derecho, antisense o II: TGA TCT TGC CTC ACC CAT C

A través de Internet se pone en contacto con el representante de “*LA Hibrid Corporation*”, que le vende un vial liofilizado incluyendo una carta descriptiva de los mismos. Allí le indica que debe agregarle 655.5 µl al liofilizado de primer I (izquierdo o sense) y 539.6 µl al del primer II (derecho o antisense) de tampón TE 1 (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8), para obtener una concentración de 100 µM de *primers*.

También compra Taq polimerasa a “*Darkness Technologies*”, y le llega un vial de 500 Unidades (5 Unidades por µl). Además se incluye el buffer de PCR 10X conteniendo KCl y 1 mL de una solución de Cl₂Mg 25 mM.

Por otra parte, compra el set de desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y los prepara según su necesidad. El fabricante (“*HELL Molecules for Life Enterprises*”), le indica que se entregan 4 viales conteniendo cada uno de los dNTP's por separado en un volumen de 250 µl y en una concentración de 100 mM de cada uno de los mismos.

Si debe realizar 20 reacciones de PCR debe recordar que siempre se deben largar controles (positivos, negativos o ambos). Por eso decide trabajar con 18 muestras de DNA obtenidas de diversos humanos y la muestra de Constantine, o sea, 19 muestras en total más un control negativo.

De su bibliografía, el autor que Ud. habitualmente sigue le indica lo siguiente: "Para una amplificación exitosa de la región 5q21 se requiere **buffer de PCR 1 X, 1 µg de DNA, 1 mM de Cl₂Mg, 200 µM de solución de dNTP's, 10 picomoles de primers, 0,5 Unidades de Taq polimerasa, para un volumen final de reacción de 25 µl por PCR**".

Se realizará el cálculo para cada uno de los componentes de la Master Mix:

a) **Tampón de PCR 10X:**

Como está 10 veces concentrado, debemos diluirlo 10 veces. Así tendremos que agregar 2,5 µl del tampón 10 veces concentrado, a 25 µl de volumen final, para obtener tampón 1 vez concentrado (1X) en la Master Mix.

Así, para 20 reacciones de PCR utilizaremos (2,5 X 20=) 50 µl de Tampón de PCR 10X.

b) **Cl₂Mg:**

Su vial tiene una concentración de 25 mM y Ud desea que en cada reacción vayan iones Mg⁺⁺ en una concentración 1 mM.

Cuando nos encontramos frente a cálculos en los que deseamos saber cuanto tenemos que tomar de una Solución Madre (volumen inicial), más concentrada (concentración inicial), para diluirla (volumen final) a una determinada concentración (concentración final) nos valemos de lo siguiente:

$$\text{CONCENTRACIÓN INICIAL} \times \text{VOLUMEN INICIAL} = \text{CONCENTRACIÓN FINAL} \times \text{VOLUMEN FINAL}$$

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

En este ejemplo se procede según:

Concentración inicial= 25 mM

Volumen inicial = ¿? (es lo que tengo que tomar del vial provisto para luego diluirlo en la Master Mix).

Concentración final = 1 mM (que es el valor de concentración que indica el autor)

volumen final = 25 µl (que es el volumen final de la Master Mix) **(también podría colocar el volumen final de la reacción de PCR que es 500 µl, recuerde que en esencia esto es Matemática).**

$$C_i = \frac{1 \text{ mM} \times 25 \text{ µl}}{25 \text{ mM}} = 1 \text{ µl}$$

Del cálculo obtenemos que el volumen que debemos tomar de la solución provista por el fabricante es 1 µl que serán adicionados a la Master Mix. Para las 20 reacciones utilizaremos entonces 20 µl de solución de Cl₂Mg 25mM.

c) **dNTP's**:

Antes debemos ver la preparación de la **solución de dNTP'S**

Viales entregados = 4 (uno por cada dNTP)

Concentración de cada vial = 100 mM.

A los fines de este ejemplo prepararemos una solución stock de dNTP's del siguiente modo:

- ❖ 10 mM de concentración final (**conteniendo todos** los desorribonucleótidos trifosforilados) o bien, dicho de otro modo,
- ❖ 2,5 mM de **cada uno** de los desorribonucleótidos trifosforilados.

Nuevamente aplicamos la misma ecuación:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Entonces ahora sí podemos calcular cuál es el volumen que tenemos que tomar a partir del vial adquirido comercialmente:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f. \text{ (La variable a calcular es } V_i \text{)}$$

C_i = representa la concentración a la que se adquieren los viales (en este caso 100 mM)

V_i = representa cual es el volumen que tiene que tomar de los viales para obtener una concentración C_f (en este caso 2,5 mM, que fue determinada arbitrariamente por nosotros) en un volumen V_f

C_f = es la concentración dada a la que se encontrará la disolución. En este caso es de 2,5 mM y fue seleccionada por nosotros.

V_f = es el volumen final de solución que deseamos preparar. Este volumen también lo decidimos nosotros; en este caso será 250 µl.

Del cálculo surge:

$$V_i = \frac{2,5 \text{ mM} \times 250 \text{ µl}}{100 \text{ mM}} = 6,25 \text{ µl}$$

Esto significa que debemos agregar 6,25 µl (aproximadamente 7 µl) de cada uno de los dNTP's (6,25 µl), es decir, 7µl de dCTP, 7 µl de dATP, 7 µl de dGTP y 7 µl de dTTP y 222 µl de agua destilada estéril.

La concentración final de esta solución será 10 mM considerando todos los solutos adicionados (considerese que se aporta a la solución 2,5 mM de cada dNTP, por lo que la suma de los 4 hace una concentración final de 10 mM). Esta es nuestra **SOLUCIÓN DE dNTP's**.

Como indica nuestro autor, necesitamos 200 μM de **SOLUCIÓN DE dNTP's**, y la que hemos preparado según el apartado anterior está a una concentración de 10 mM. Por lo tanto utilizando nuevamente la misma ecuación tenemos:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f. \text{ (La variable a calcular es } V_i)$$

C_i = representa la concentración inicial a la cual hemos preparado la solución de dNTP's, que en este caso ha sido de 10 mM (recordemos que la concentración incluye a todo el soluto adicionado y no solamente al aporte de un solo dNTP, es decir, la concentración inicial de la solución de dNTP's **NO ES** 2,5 mM, sino 2,5 X = 10 mM).

V_i = representa cual es el volumen que tiene que agregar de la solución preparada de dNTP's a la Master Mix para alcanzar una concentración final de acuerdo a nuestro autor, es decir 0,2 mM (o 200 μl , recordando hacer las conversiones de unidades pertinentes).

C_f = es la concentración dada por el autor al que sigue. En este caso es 0,2 mM (200 μM).

V_f = es el volumen final de cada reacción de PCR (en este caso 25 μl).

Del cálculo surge:

$$V_i = \frac{0,2 \text{ mM} \times 25 \mu\text{l}}{10 \text{ mM}} = 0,5 \mu\text{l}$$

Este resultado indica que debemos pipetear 0,5 μl de la solución de dNTP's preparada a una concentración de 10 mM. Considerando que se llevará a cabo 20 reacciones de PCR se deberá adicionar 10 μl de solución a la Master Mix.

d) **Taq polimerasa:**

Contenido del vial = 500 Unidades (5 Unidades por μl).

Va a utilizar = 0,5 Unidades

$$\begin{array}{l} 5\text{U} \text{ ————— } 1 \mu\text{l} \\ 0,5 \text{U} \text{ ————— } X = 0,1 \mu\text{l} \end{array}$$

Si tiene 5 Unidades en 1 μl , entonces tiene 0,5 unidades en 0,1 μl . Como llevará adelante 20 reacciones de PCR, deberá multiplicar 0,1 por 20, o sea agregará 2 μl a la Master Mix.

e) **Primers:**

Este es el cálculo para la situación de uno de los *primers*. Es análogo para el otro:

Según el fabricante, si agrega 655,5 μl de agua destilada estéril al liofilizado de *primer* I (izquierdo o *sense*) se obtiene una concentración de 100 μM .

Entonces tendrá 100 micromoles de *primer* por cada litro de solución.

Una concentración de 100 μM significa 100 micromoles por litro de solución.

En un litro (1000 mililitros) hay 1×10^6 microlitros.

En 1×10^6 microlitros (1 lt) hay 100 micromoles
 En 655.5 microlitros (agregados según el fabricante) $X = 0,0655$ micromoles

Entonces tiene $0,0655$ micromoles $X \frac{1 \times 10^6 \text{ picomoles}}{1 \text{ micromol}} = \mathbf{65.550 \text{ picomoles (masa)}}$

Supongamos que desea pipetear $1 \mu\text{l}$ y que en ese volumen tenga 10 picomoles de *primers*.

Eso significa una concentración de 10 picomoles por microlitro de solución.

Diez picomoles por microlitro es equivalente a una concentración de $10 \mu\text{M}$.

Demostramos la equivalencia a continuación:

$$\frac{65.550 \text{ picomoles}}{655.5 \mu\text{l}} \times \frac{(1 \times 10^6) \mu\text{l}}{1 \text{ lt}} \times \frac{1 \mu\text{moles}}{1 \times 10^6 \text{ picomoles}} = \mathbf{100 \mu\text{M (concentración)}}$$

$$\frac{10 \text{ picomoles}}{1 \mu\text{l}} \times \frac{(1 \times 10^6) \mu\text{l}}{1 \text{ lt}} \times \frac{1 \mu\text{moles}}{1 \times 10^6 \text{ picomoles}} = \mathbf{10 \mu\text{M}}$$

Conociendo todo esto puede aplicar la fórmula:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \text{ (La variable a calcular ahora es } V_i \text{)}$$

$$V_i = \frac{10 \mu\text{M} \times 200 \mu\text{l}}{100 \mu\text{M}} = \mathbf{20 \mu\text{l}}$$

C_i = es la concentración inicial alcanzada tras reconstituir los *primers* según indicaciones del fabricante, es decir $100 \mu\text{M}$ (obtenida luego de agregar $655.5 \mu\text{l}$ de agua destilada estéril).

V_i = es el volumen que tenemos que agregar de la solución reconstituida de *primers*, para alcanzar una concentración C_f en un volumen final, V_f . Es la variable que calculamos y en este caso resultó $20 \mu\text{l}$

C_f = es la concentración final que deseamos alcanzar. Según nuestros autores necesitábamos una concentración de $10 \mu\text{M}$ (que es equivalente, según vimos anteriormente, a tener 10 picomoles en $1 \mu\text{l}$ de solución reconstituida y diluida a V_f).

V_f = es el volumen final de solución que decidimos deliberadamente preparar. En este caso se preparó $200 \mu\text{l}$, pero se pueden preparar otros volúmenes.

En conclusión, luego de reconstituir los primers tenemos una “Solución Madre” (de concentración $100 \mu\text{M}$ y volumen de $655.5 \mu\text{l}$, preparada según el fabricante), a la que diluimos convenientemente (por ejemplo para que contenga 10 picomoles en $1 \mu\text{l}$), para que pipeteando un volumen que nosotros queremos ($1 \mu\text{l}$) entreguemos a la Master Mix, la cantidad adecuada de primers, según las indicaciones del autor que seguimos.

Entonces vamos a pipetear $1 \mu\text{l}$ de solución diluida por cada reacción; como realizamos 20 reacciones, debemos agregar $20 \mu\text{l}$ de dicha solución a la Master Mix.

f) **DNA molde:**

Como cuantificó su DNA, Ud tiene un concentración de 1 µg/µl. Según su autor, debe utilizar 1 µg de DNA, así que agregará 1 µl a cada uno de sus tubos, lo que le resta 20 µl al volumen total de Master Mix.

En suma... luego de tantos cálculos (y sin ayuda divina) finalmente obtiene su Master Mix:

Master Mix (para 20 reacciones; 19 muestras y un control negativo)
(Volumen final de cada reacción de PCR = 25 µl)

25 µl de volumen final de reacción X 20 reacciones = 500 µl de Master Mix.

| Master Mix | 1 Reacción | 20 Reacciones | Conc. final |
|------------------------|--|--|------------------------------|
| Tampón de PCR | | | |
| 10 X | 2,5 µl | 50 µl | 1X |
| MgCl ₂ | 1 µl | 20 µl | 1mM |
| dNTP's | 0,5 µl | 10 µl | 200 µM |
| Primers | sense 1µl antisense 1µl | sense 20 µl antisense 20 µl | 10 picomoles 10 picomoles |
| Taq polimerasa | 0,1 µl | 2 µl | 0,5 Unidades |
| Agua destilada estéril | 17,9 µl (recuerde restar 1 µl que corresponden al volumen de DNA molde cuantificado) | 358 µl (recuerde restar 20 µl que corresponden al volumen de DNA molde cuantificado) | |
| DNA matriz | 1µl (por cada reacción) | 19 µl (adicione 1 µl de agua destilada estéril al control negativo) | 1 µg |

Luego de programar su termociclador según el programa de ciclado conveniente (2 min a 94 °C, y 35 ciclos de tres segmentos cada uno: 30'' a 94°C, 40'' a 55°C y 60'' a 72 °C, más un ciclo final de cierre de amplificación de 3' a 72°C) recibe un telegrama muy extraño!!! Con cierto miedo y emoción (imaginando que luego de tanto trabajo se merece una buena suma de dólares!!) lo abre lentamente y lo lee: "Arrepentirse y serais perdonados. John Constantine fue perdonado de todos sus faltas y ahora está en el Cielo".

- Con que solo se tenía que arrenpentir de sus faltas y no hay ninguna mutación!!!- se enoja usted pero para no perder su investigación (y dudando de que le vaya a poder cobrar al nuevo habitante celestial) se dedica a obtener la línea continua inmortalizada de *angeloblastos* en la que tanto se había ilusionado!!!

La verdad tras el ejemplo

En 1998, Bugert y cols describieron una región minisatélite ubicada en la región 5q21. Dicho minisatélite consta, de acuerdo con lo publicado, con 9 a 11 unidades de repetición de 33 pares de bases cada una. Los autores encontraron una variación en tal región cuando investigaron casos de tumores de riñón, sugiriendo su uso posible como marcador diagnóstico, o bien pronóstico.

Para finalizar este ejemplo (con todo el misterio que se merece) reproducimos a continuación una figura de los productos de amplificación de la región 5q21, obtenida en nuestro Laboratorio cuando investigábamos su posible conexión con el carcinoma de cérvix uterino (con el cual, por cierto, también hemos hallado variaciones en la zona minisatélite descrita).

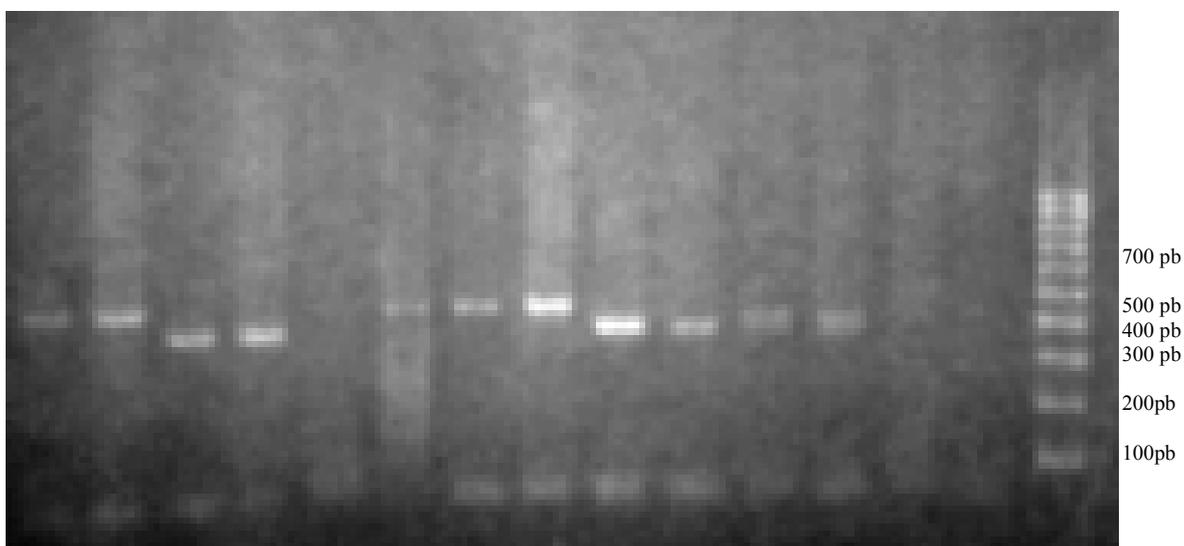


Figura 9: Amplificación de DNA genómico mediante reacción de PCR. Se trata de muestras apareadas: los carriles 1, 3, 5, 7, 9 y 11 son amplificaciones de muestras de sangre, en tanto que los carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12 son amplificaciones de muestras de mucosa cervical. Se depositaron 7 μ l de producto de PCR por pocillo. La EF se llevó a cabo a 120v durante 30 minutos. Los geles de agarosa al 2% se observaron con bromuro de etidio y posteriormente se fotografiaron con un equipo Polaroid.

ANEXO

Cálculo teórico de las temperaturas de hibridación (T_m)

La temperatura de hibridación de los *primers* es un parámetro que afectará de modo importante la consecución de una reacción en cadena de la polimerasa exitosa. Recordando un programa típico de una reacción de PCR, esta consta de los siguientes pasos:

1) Ciclo inicial de desnaturalización (94°C durante 30 segundos hasta 2 a 5 minutos).

2) Primer segmento de un ciclo: desnaturalización a 94°C (el tiempo es variable, pero usualmente oscila entre 30 segundos a 1 minuto 30 segundos).

3) Segundo segmento de un ciclo: hibridación (dependiendo de la temperatura de hibridación, el programa del termociclador disminuirá la temperatura hasta alcanzar el valor apropiado, manteniendo dicha temperatura durante un intervalo dado de tiempo).

4) Tercer segmento de un ciclo: polimerización (la temperatura será aumentada hasta los 72 °C que es la temperatura óptima para que la Taq polimerasa lleve adelante la polimerización).

Los tres últimos segmentos constituyen 1 ciclo de PCR y usualmente una reacción tiene entre 30 y 40 ciclos.

5) Último ciclo de polimerización: muchas veces se adiciona un ciclo a 72°C con el objetivo de finalizar la polimerización de los productos generados en los múltiples ciclos anteriores. Este ciclo suele durar entre 3 y 5 minutos.

Según vemos en esta distribución, el valor de temperatura de hibridación influirá notable y decisivamente en el éxito de la reacción. Por ello contamos con diversos modos de realizar una aproximación teórica al valor de dicha temperatura:

A) **Método de Wallace:** se basa en la ecuación de Wallace y es útil para calcular la T_m de oligos cortos. Es un método simple pero solo aplicable a *primers* menores a 18 pb

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

B) **Método del contenido de GC:** este se basa en la cantidad de bases G y C y en la longitud del cebador:

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10} [Na^+]) + 0,41 (\%GC) - (500 / N)$$

donde N es la longitud del *primer*.

C) **Método termodinámico:** este cálculo tiene en cuenta la entropía, la entalpía, la energía libre y la temperatura. El análisis incluye la determinación del efecto termodinámico, considerando cada dúplex de bases, provocado por la base vecina más cercana (“*nearest neighbor*”).

Recordando:

$$\Delta H = \Sigma \Delta h_i$$

$$\Delta S = \Sigma \Delta s_i$$

$$T_m = \Delta H / (\Delta S + R \times \ln 1/[primer])$$

R es la constante molar de los gases (1,987 cal/mol °K)

[primer] = concentración del primer

Tenemos que tener en cuenta algunas correcciones a la ecuación anterior: un factor (3,4 kcal) que representa el cambio de energía libre durante la transición del DNA de cadena simple a la forma B, la concentración salina, así como la conversión de °K a °C.

Por lo tanto la ecuación se formula del siguiente modo:

$$T_m = \{[(\Delta H - 3,4 \text{ kcal/mol } ^\circ\text{K}) / (\Delta S + R \times \ln 1/\text{conc. primer})] + 16,6 \times \log Na^+ - 273,2\}$$

A continuación reproducimos las tablas para el cálculo de la T_m según esta aproximación:

ΔH (kcal/ mol°K)

| Segunda base | A | C | G | T |
|--------------|-----|------|------|-----|
| Primera base | | | | |
| A | 8 | 9,4 | 6,6 | 5,6 |
| C | 8,2 | 10,9 | 11,8 | 6,6 |
| G | 8,8 | 10,5 | 10,9 | 9,4 |
| T | 6,6 | 8,8 | 8,2 | 8 |

ΔS (kcal/ mol°K)

| Segunda base | A | C | G | T |
|--------------|------|------|------|------|
| Primera base | | | | |
| A | 21,9 | 25,5 | 16,4 | 15,2 |
| C | 21 | 28,4 | 29 | 16,4 |
| G | 23,5 | 26,4 | 28,4 | 25,5 |
| T | 18,4 | 23,5 | 21 | 21,9 |

Ejemplo para el cálculo de la T_m usando la aproximación “nearest neighbor”

Considerando la siguiente secuencia, calcularemos su T_m haciendo uso de la aproximación termodinámica.

Secuencia: ACG ATG TGC CAT

| | | ACG ATG TGC CAT |
|-----------|-----------|-----------------|
| ΔH | ΔS | |
| 9,4 | 25,5 | AC |
| 11,8 | 29 | CG |
| 8,8 | 23,5 | GA |
| 5,6 | 15,2 | AT |
| 8,2 | 21 | TG |
| 9,4 | 25,5 | GT |
| 8,2 | 21 | TG |
| 10,5 | 26,4 | GC |
| 10,9 | 28,4 | CC |
| 8,2 | 21 | CA |
| 5,6 | 15,2 | AT |
| Suma | 96,6 | 251,7 |

Así la T_m para 50 μM de un oligo con la secuencia: ACG ATG TGC CAT en 50 mM de KCl es:

$$T_m = \{[(96,6-3,4) \times 1000] / [251,7 + 1,98 \ln (1/5 \cdot 10^{-5})]\} + 16,6 \log (5 \cdot 10^{-2}) - 273,2 =$$

| |
|--|
| $T_m = 48,7 \text{ } ^\circ\text{C}$ |
|--|

MANIPULACIÓN DE RNA:

RETROTRANSCRIPCIÓN, GENERACIÓN DE cDNA O RT-PCR

Fundamento teórico

Hemos establecido en los apartados anteriores las bases para el aislamiento de ácidos nucleicos. Luego hemos visto el uso de DNA en las reacciones en cadena de la polimerasa por lo que nos resta ver alguna aplicación tecnológica del RNA aislado.

Esta macromolécula, aunque más lábil, también puede ser ampliamente manipulada. Entre las diversas posibilidades con que contamos actualmente, la retrotranscripción es una de las metodologías que mayores aplicaciones brinda, especialmente en el campo de la investigación y el diagnóstico médico. Con respecto a esto debemos decir que el diagnóstico virológico (muchos virus contienen como ácido nucleico al RNA, uno de ellos es el HIV) se ha visto favorecido y facilitado por el desarrollo de estos estudios.

En este apartado analizaremos algunas generalidades de la manipulación de RNA, la generación de DNA complementario (cDNA) a partir de RNA y la posibilidad de amplificación de este DNA mediante la técnica de RT-PCR.

¿Por qué sería importante conocer las posibilidades de manipulación de RNA?

Muchas veces es importante analizar, por ejemplo, la tasa de expresión de una proteína. Para ello sería de poca utilidad analizar el gen en sí (quizás, por ejemplo, podríamos buscar mutaciones en regiones promotoras que aumenten la expresión, o bien mutaciones en los distintos exones que de algún modo generen alguna proteína defectuosa, disminuyendo así su expresión), por lo que una estrategia sería analizar el RNA mensajero de dicha proteína. Esta es una metodología corrientemente utilizada en investigación.

Otras veces, en el diagnóstico clínico, nos enfrentamos a enfermedades de origen viral. En líneas generales un virus está constituido por proteínas y por un único tipo de ácido nucleico (DNA o RNA). Así la existencia de virus en una muestra puede ser diagnosticada si se demuestra la presencia de ciertas regiones génicas conservadas en los distintos tipos virales.

Podríamos continuar dando ejemplos como los anteriores, tanto para investigación como para diagnóstico. Ahora bien, tal como hemos expuesto anteriormente, para demostrar cantidades ínfimas de algún ácido nucleico podríamos hacer uso de la reacción de PCR. El problema se encuentra en que las enzimas recombinantes que hemos analizado SOLAMENTE PUEDEN UTILIZAR COMO PLANTILLA EL DNA, NO EL RNA. Dicho de otro modo, la Taq polimerasa es una polimerasa de DNA dependiente de DNA.

Sin embargo, existen otras enzimas que son capaces de generar una hebra de DNA a partir de RNA. Estas enzimas se denominan polimerasas de DNA dependiente de RNA o retrotranscriptasas (o transcriptasas reversas). Quizás una de las más

conocidas, tanto por los científicos como por los estudiantes con niveles de conocimientos básicos de biología, es la retrotranscriptasa presente en el virus HIV. Dicha enzima, en conjunción con un gran grupo enzimático, es capaz de retrotranscribir la hebra de RNA del virus a una hebra de DNA, permitiendo el desarrollo de las actividades víricas. Eventualmente la hebra de DNA así generada puede servir como plantilla para la generación de su complementaria, dando lugar a una doble hebra de DNA que eventualmente puede insertarse en el genoma del paciente, estableciendo una latencia vírica. Remitimos al lector a cursos avanzados de virología para profundizar en el tema, considerando que solo presentamos un aspecto muy general de la complejidad vírica del HIV, a los fines de ejemplo. El proceso por el cual a partir de una hebra de RNA se genera una hebra de DNA se denomina **RETROTRANSCRIPCIÓN** y la hebra de DNA generada se denomina “*hebra de DNA complementario*” (a la hebra de RNA) o **cDNA**. Una vez generada una hebra simple de DNA, esta sirve como molde para la síntesis de su complementaria, generando una doble cadena de DNA.

Considerando este fundamento teórico podríamos adaptar la reacción de PCR del siguiente modo:

- Inicialmente una hebra de RNA se retrotranscribe a DNA (RETROTRANSCRIPCIÓN - RT) utilizando una retrotranscriptasa.
- La hebra de DNA generada (**cDNA**) puede servir como molde para la polimerasa y por lo tanto a partir de este momento puede desarrollarse la PCR.

Esta práctica adaptación recibe el nombre de **RT-PCR** y engloba en su nombre la modificación indicada.

Veremos a continuación que necesitamos para llevar adelante una reacción de RT-PCR.

DISEÑANDO UNA REACCIÓN DE

RT-PCR

Una vez extraído el RNA podemos desarrollar las reacciones de RT-PCR. Recordemos que el RNA extraído es el total, es decir, incluye a todos los tipos presentes en la célula. Esto debemos tenerlo en cuenta de acuerdo a los usos posteriores del ácido nucleico aislado y a la estrategia de elección para la retrotranscripción.

A los fines de comprender mejor el desarrollo de esta reacción vamos a dividirla en dos partes, aunque (a veces) en la práctica se llevan adelante en un solo paso:

A) Retrotranscripción

Para poder llevar adelante esta primera parte tenemos que conocer (y contar con) lo siguiente:

1) **Retrotranscriptasa**: Actualmente en el mercado contamos con la posibilidad de adquirir distintas retrotranscriptasas. Las siguientes son dos de las más utilizadas:

- **MMLV**: es una retrotranscriptasa recombinante perteneciente al virus de la leucemia murina Moloney.
- **AMV**: es la retrotranscriptasa perteneciente al virus de la mioblastosis aviaria.

En general ambas retrotranscriptasas tienen tasas de rendimiento comparables, aunque la MMLV suele ser levemente más barata.

2) **Cebadores**: para poder iniciar la retrotranscripción es necesario contar con cebadores, a partir de los cuales la enzima actúa para generar cDNA. Contamos con distintas estrategias para iniciar la retrotranscripción, en función de lo que deseamos estudiar. Veamos algunas de ellas:

a) cebadores específicos: la estrategia consiste en el diseño de cebadores específicos para un gen dado, cuyo RNA se pretende retrotranscribir. Según esta estrategia el primer hibridará específicamente con la hebra de RNA blanco y la cadena de cDNA será generada por la transcriptasa reversa. En este caso tendremos que tener en cuenta diversos parámetros experimentales, como la concentración del primer o la temperatura de hibridación.

b) cebadores “oligo dT”: es una estrategia muy aplicada cuando deseamos retrotranscribir mRNA. Recordemos que los mRNAs cuentan con una “cola de poli A”, que es una larga secuencia de adeninas al final de la molécula. El cebador *oligo dT* hibrida en la “cola de poli A” del mRNA y el resultado es que la retrotranscriptasa utilizará como plantilla solamente las moléculas de mRNA en la generación del cDNA.

c) random primers (cebadores al azar): los *random primers* están constituidos por hexanucleótidos (6 bases) con secuencias aleatorias. De esta manera diversos *primers* hibridarán en distintas zonas de todas las moléculas del RNA aislado (recordemos que se aísla RNA total), sirviendo como iniciadores de la cadena de cDNA.

En la siguiente figura se intentan clarificar las distintas estrategias en el uso de cebadores:

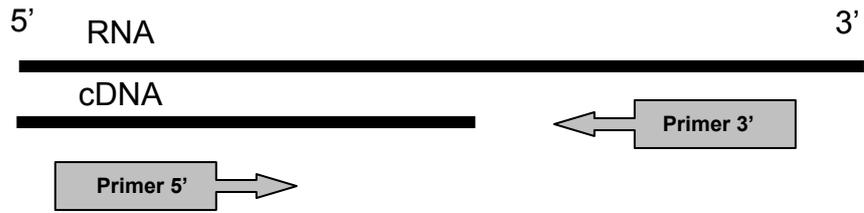


FIGURA 10: ESTRATEGIA DE CEBADORES ESPECÍFICOS. Se desarrollan cebadores específicos para una porción del gen de interés capaces de hibridar con la molécula de RNA. Como resultado sólo se retrotranscribirán las moléculas con la hibridación específica.

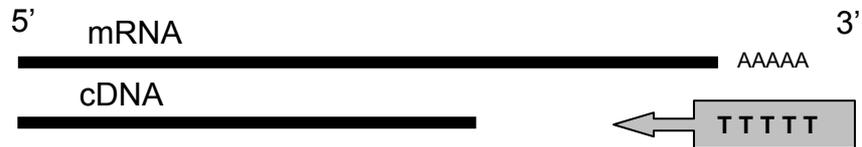


FIGURA 11: ESTRATEGIA DE CEBADOR oligo-dT. El primer oligo dT hibrida en la cola de poli A del mRNA permitiendo la retrotranscripción únicamente de estas moléculas.



FIGURA 12: ESTRATEGIA DE CEBADOR AL AZAR. Los “random primers” hibridan en distintas zonas de la molécula de RNA, sirviendo para la retrotranscripción de la práctica totalidad de moléculas de RNA.

3) **Inhibidores de RNAsas:** se debe agregar al tubo de retrotranscripción inhibidores de RNAsas debido a la labilidad del RNA, el cual puede ser fácilmente degradado por dichas enzimas, presentes tanto en el ambiente como en el operador. Los inhibidores de RNAsas son conseguidos en forma comercial. Así uno de ellos es el inhibidor recombinante de ribonucleasas **RNasin**™ (Promega).

- ❖ **RNasin**TM (Promega): es un inhibidor de ribonucleasas recombinante, de 50 kDa de peso molecular, que ejerce su acción por unión no covalente a RNAsas. Según el protocolo comercial la definición de Unidad es la siguiente: una unidad se define como la cantidad de **RNasin**TM (Promega) requerida para inhibir la actividad de 5 nanogramos de ribonucleasa A en un 50%.

Existen otros disponibles en el mercado, y remitimos al lector al apartado final de bibliografía para conocer otras posibilidades.

4) **Agentes reductores**: se suele adicionar un agente reductor que actuará sobre los puentes disulfuro. Estas uniones son importantes para mantener la estabilidad de las RNAsas y de allí se desprende su utilidad como coadyuvantes en evitar la contaminación de la retrotranscripción. El más utilizado es el DTT (ditiotreitól).

5) **Solución de dNTP's**: debemos adicionar a la mezcla de retrotranscripción el conjunto de desorribonucleótidos trifosforilados, que constituirán los “ladrillos” de construcción del cDNA. Para recordar al respecto, remitimos al lector al apartado donde se trata PCR ya que las consideraciones son similares para ambos casos.

B) PCR

Una vez que la retrotranscripción se ha completado exitosamente, el siguiente paso es la reacción de PCR.

Esta segunda parte es una reacción igual a la tratada en el apartado específico, por lo que no entraremos en mayores detalles.

DESARROLLANDO UNA REACCIÓN DE

RT-PCR

Una vez que hemos establecido las bases de ambas partes de la reacción de RT-PCR, veremos la metodología práctica para su desarrollo, detallando el protocolo. Posteriormente resumiremos dicho protocolo a los fines de observarlo en su totalidad. Seleccionaremos la opción en la que ambas partes se llevan adelante por separado, aunque debemos recordar que muchas veces la retrotranscripción y la reacción de PCR pueden llevarse en un solo paso (“*single tube reaction*” o reacción en “un solo tubo”). La retrotranscriptasa de elección será MMLV.

A) Retrotranscripción

El RNA aislado, al ser monocatenario, tiende a formar estructuras que pueden afectar el progreso y rendimiento de la reacción, por ello el paso inicial es una desnaturalización, que se lleva a cabo en presencia de “*random primers*”. Tras obtener todas las estructuras desnaturalizadas (incluidos los *random primers*, que

pueden hibridar entre ellos por complementariedad de secuencia), se puede llevar adelante la retrotranscripción.

El RNA aislado es mezclado con aproximadamente 4,5 picomoles de *random primers* y la mezcla es desnaturalizada a 72°C durante 10 minutos, y se adiciona un paso de disminución brusca de la temperatura (en el mismo termociclador o en un baño de hielo) a 4°C.

Esta solución será la matriz que será mezclada con los constituyentes de la *Master Mix* de retrotranscripción.

Mientras se lleva a cabo la desnaturalización de la matriz, procederemos a preparar una “*Master Mix*” o **MEZCLA MAESTRA** para retrotranscripción, cuyos cálculos de volúmenes y concentraciones son muy similares a los establecidos para PCR. Contará con lo siguiente:

1) **Solución tampón (buffer) para retrotranscripción**: cumple similares funciones a las que lleva adelante el buffer de PCR, es decir, mantener el pH de la solución para el desarrollo de la reacción. También es provista comercialmente, y usualmente viene junto a la retrotranscriptasa cuando esta es adquirida. La concentración final a la que se debe trabajar es 1X.

2) **Agentes reductores**: se utilizará DTT (ditiotreitól) como agente reductor. Su presencia actuará en la reducción de puentes de disulfuro que estabilizan a las RNAsas, coadyuvando a su inactivación. Las concentraciones a utilizar son variables y diversos autores brindan distintos valores. De acuerdo a nuestra experiencia una concentración final de 10 mM es útil y suficiente a los fines de la mayoría de las reacciones de retrotranscripción. Para calcular los volúmenes debemos utilizar la ecuación de la equivalencia, considerando cuales son las concentraciones iniciales del producto (por ejemplo el DTT adquirido comercialmente puede presentarse como una solución líquida de concentración 40 µg/mL).

3) **Inhibidores de RNAsas**: en este caso se hará uso del inhibidor recombinante **RNasin**[™] (Promega). Este se adquiere comercialmente y se utiliza según indicaciones del fabricante. En este caso la recomendación indica el uso de 1 unidad de **RNasin**[™] (Promega) por microlitro de solución. Por otro lado, la cartilla del producto indica su concentración (por ejemplo 40 U/µl).

4) **Solución de dNTP's**: nuevamente distintos autores proponen diferentes concentraciones de solución de dNTP's a los fines de asegurar el éxito de la retrotranscripción. Según nuestra experiencia concentraciones finales de 200 µM son suficientes. Remitimos al lector al apartado de PCR para encontrar mayor información, que no se repetirá aquí.

5) **Retrotranscriptasa MMLV**: cada vez que utilicemos enzimas tendremos que tener especial atención al número de unidades a aplicar.

En este caso, según indicaciones del fabricante definimos la unidad del siguiente modo: una unidad se define con la cantidad de enzima requerida para catalizar la transferencia de 1 nanomol de desoxirribonucleótidos a un material ácido-precipitable, en 10 minutos a 37°C.

Según las indicaciones del fabricante, se requieren 200 unidades para llevar adelante un protocolo general de retrotranscripción, con reacciones de 25 μ l de volumen final.

Una vez que la master Mix esté completa se adicionará la matriz desnaturalizada y se llevará a cabo la reacción de retrotranscripción en el termociclador a una temperatura de 37 grados durante 60 minutos. Finalmente se desnaturalizará la enzima (deteniéndose así la reacción) con un paso de 5 minutos a 95 °C y posterior enfriamiento a 4°C. El cDNA así obtenido puede ser reservado a -20°C o bien ser utilizado en el acto para la reacción de PCR.

Así el cDNA cumplirá, en la PCR, el papel que cumplía la matriz de DNA total, sirviendo de templado para las actividades de la *Taq* polimerasa, una vez que se han adicionado los *primers* correspondientes.

Vayamos entonces a un ejemplo práctico....

EJERCICIO PRÁCTICO

Pasaremos ahora a imaginar un caso **ABSOLUTAMENTE FICTICIO**, pero muy demostrativo a nuestros fines.

En un futuro no muy lejano, siguiendo con el argumento de la conocida serie de películas “X-Men” (“Hombres X”), la Tierra tendrá dividida a su población en dos grandes grupos: aquellos sujetos “normales” y los “mutantes”, cuyas mutaciones les brindan poderes extraordinarios, ¡aunque algunos de estos superpoderes no sean tan útiles en ciertas ocasiones! Un caso es el de una de las protagonistas: Titania (Rogue) ya que su extraño poder! absorbe las energías vitales de todos los chicos a los que besa! ¡Y eso sí que es un problema!

Sin embargo, en la tercera parte de esta película, asistimos a la consecución de un gran adelanto: la cura para las mutaciones. Un extraño mutante tiene la capacidad de generar un anticuerpo que es capaz de inhibir las actividades de las proteínas mutantes que causan los superpoderes. ¿Podríamos ayudar un poco a Titania con nuestros conocimientos, no?

Para ello usted se encuentra trabajando en un super laboratorio (¡visto y considerando que en esta película toda palabra debe tener incorporada la partícula “super”!), y tendrá como función intentar tener un acercamiento a este extraño anticuerpo y su producción. Existen distintas metodologías para alcanzar este objetivo, pero supongamos que se decide por una RT-PCR para conocer esta proteína (después de todo este ejemplo es para explicar esta metodología, ¿no?). Su idea es investigar la presencia de este anticuerpo en otras especies, o bien su presencia en humanos “normales”.

Para ello debe extraer RNA total de muestra de “mutantes” y de muestras de humanos “normales”. Aunque le hubiera gustado más sentir la tersa piel de Jean Grey (una mutante), en esta película hace de mala, así que no podemos obtener una muestra de ella y no le queda otra que conformarse con el peludo brazo de Guepardo (Wolverine) ¡un mutante de los buenos! Las muestras humanas “normales” no son un mayor problema, así que le pide a un par de sus colaboradores “no mutantes” que le presten un rato el brazito.

Luego de extraer la muestra de sangre, usted aísla RNA total siguiendo un protocolo general. El RNA aislado es mantenido a -20°C hasta que sea llevada adelante la reacción de retrotranscripción.

*Para esta reacción utilizarán **random primers**, como cebadores universales y MMLV como retrotranscriptasa.*

Según las indicaciones del fabricante debe utilizar 5 picomoles de random primers. La concentración expresada en el inserto de random primers (adquiridos de la firma comercial “Mutanamics”) indica: 2µg/µl.

Además indica: 1µg = 558 pmoles

De allí calculamos:

558 pmoles 1µg
5 pmoles x = (aprox) 9.10⁻³ µg

Entonces:

$$\begin{array}{l} 2 \mu\text{g} \dots\dots\dots 1\mu\text{l} \\ 9 \cdot 10^{-3} \mu\text{g} \dots\dots\dots x = 0,0045 \mu\text{l}, \end{array}$$

que es un volumen que no puede medirse con exactitud con ninguna de las micropipetas con las que cuenta. Lo que indica este cálculo es que la solución de *random primers* está muy concentrada.

La estrategia de usted adopta es de diluirla, de modo que pueda pipetear los 5 pmoles que desea con un volumen más exacto.

Así supongamos que usted desea que estos 5 pmoles se encuentren en 2 μl de solución diluida; dicho de otro modo: una concentración de 2,5 pmoles/ μl . Entonces tenemos lo siguiente:

2 $\mu\text{g}/\mu\text{l} = 1116 \text{ pmoles}/\mu\text{l}$ (recuerde que en la cartilla del producto se expresa que 1 $\mu\text{g} = 558 \text{ pmoles}$). A partir de esta conversión el cálculo siguiente es sencillo:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \text{ (La variable a calcular es } V_i)$$

C_i = representa la concentración inicial a la cual hemos adquirido la solución de *random primers*, que en este caso ha sido de 1116 pmoles/ μl
 V_i = representa cual es el volumen de solución madre (stock) que se debe agregar a un volumen V_f para alcanzar una concentración final deseada.
 C_f = es la concentración final deseada (o sea 2,5 pmoles/ μl).
 V_f = representa el volumen final de solución de *random primer* que deseamos preparar. Usualmente preparamos un volumen que luego se alícuota para evitar el descongelamiento reiterado de dichos cebadores. En este caso seleccionamos arbitrariamente un volumen de 250 μl .

Del cálculo surge:

$$V_i = \frac{2,5 \text{ pmoles}/\mu\text{l} \times 250 \mu\text{l}}{1116 \text{ pmoles}/\mu\text{l}} = 0,56 \mu\text{l}$$

Este resultado indica que debemos pipetear 0,5 μl de la solución de *random primers* y llevar a un volumen final de 250 μl con agua DEPC autoclavada. Ya tenemos lista la solución y tendremos que agregar 2 μl de la misma para entregar los 5 pmoles de *random primers* a la reacción de retrotranscripción.

*Usted resuspende el RNA extraído de las distintas muestras en 33 μl de agua DEPC autoclavada. Podría cuantificar y verificar la pureza del ácido nucleico, pero sus tiempos están acotados así que prefiere utilizar todo el extracto. Entonces a los 33 μl del extracto de RNA de cada muestra le adiciona 2 μl de la solución de **random primers** (es decir 5 pmoles, tal como hemos calculado anteriormente).*

Realiza este procedimiento con cada una de las 4 muestras que obtuvo: una procedente de un mutante, y 3 "normales".
 La desnaturalización de esta mezcla la lleva a cabo en un termociclador a una temperatura de 72°C durante 10 minutos, y posterior cambio brusco a 4°C.
 Mientras transcurre el tiempo usted puede dedicarse a preparar la "Master Mix" de retrotranscripción.

MASTER MIX DE RETROTRANSCRIPCIÓN

La retrotranscriptasa que utilizará es la MMLV que adquiere comercialmente de "Xavier Corporation", y le trae una solución buffer de retrotranscripción a una concentración de 5X.

Considerando que el volumen final de la reacción de retrotranscripción sea de 50 µl podemos calcular:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$V_i = \frac{1 \times 50 \mu\text{l}}{5X} = 10 \mu\text{l}$$

Es decir 10 µl de buffer de retrotranscripción por cada reacción. Nuevamente multiplicará el volumen por el número de muestras, ya que cada muestra debe retrotranscribirse. Si tenemos 1 muestra mutante y 3 muestras normales entonces necesitaremos 40 µl de buffer de retrotranscripción.

Como agente reductor usted se inclina por el uso de ditioneitol (DTT). La solución adquirida a "Magnetos Chem" viene a una concentración de 40 mg/mL. La concentración final deseada es de 10 mM. El peso molecular del DTT es de 154,2 g/mol.

Con estos datos podemos fácilmente calcular lo siguiente:

$$10 \text{ mM} = 10 \frac{\text{mmoles}}{\text{L}}$$

$$1 \text{ M} \dots\dots\dots 154,2 \text{ g/L}$$

$$10 \cdot 10^{-3} \text{ M} \dots\dots\dots x = 1.542 \text{ g/L}$$

Y

$$40 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 40 \text{ g/L}$$

$$154.2 \text{ g/L} \dots\dots\dots 1 \text{ M}$$

$$40 \text{ g/L} \dots\dots\dots x = 0,25 \text{ M}$$

Considerando que el volumen final de la reacción de retrotranscripción sea de 50 µl podemos calcular:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$V_i = \frac{10 \text{ mM} \times 50 \text{ }\mu\text{l}}{250 \text{ mM}} = 2 \text{ }\mu\text{l}$$

Es decir que le adicionaremos 2 μl del agente reductor DTT a la Master Mix de retrotranscripción. Para las 4 reacciones serán entonces 8 μl .

La solución de dNTP's que utilizará se encuentra a una concentración de 10 mM, y como bien aprendió a prepararla en apartados posteriores, este paso no es un problema. La concentración final que utilizará en la Master Mix de 50 μl será de 200 μM (0,2 mM).

Así podemos calcular lo siguiente:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$V_i = \frac{0,2 \text{ mM} \times 50 \text{ }\mu\text{l}}{10 \text{ mM}} = 1 \text{ }\mu\text{l}$$

Este resultado significa que debe adicionar 1 μl de la solución de dNTP's por cada reacción de retrotranscripción, a su Master Mix. Nuevamente, si llevará adelante 4 reacciones, deberá adicionar 4 μl de solución de dNTP's.

Como agente inhibidor de ribonucleasas utilizará uno adquirido comercialmente (de la Hank Independent Mutant Corporation). Según las indicaciones del fabricante, debe adicionar 1 unidad del inhibidor por microlitro de solución. La concentración del producto se indica en la etiqueta: 40 U/ μl .

Considerando que el volumen final de la Master Mix individual es 50 μl , necesitamos 50 U de dicho inhibidor. Así calculamos lo siguiente:

$$\begin{array}{l} 40 \text{ U} \dots\dots\dots 1 \text{ }\mu\text{l} \\ 50 \text{ U} \dots\dots\dots x = 1,25 \text{ }\mu\text{l} \end{array}$$

Por lo tanto para llevar adelante 4 reacciones deberá adicionar a la Master Mix de retrotranscripción 5 μl del inhibidor de ribonucleasas.

Ya le queda adicionar el último (y quizás el más importante) de los reactantes de la Master Mix: la retrotranscriptasa.

A diferencia de lo que recordaba cuando trabajaba con la polimera Taq debe utilizar mayor número de unidades de MMLV para llevar adelante la retrotranscripción. ¡El fabricante le sugiere utilizar 200 unidades! El inserto del producto indica 200 U/ μl .

A diferencia de otros solutos, en los que expresamos su concentración, en el caso de las enzimas lo que interesa es su actividad. Debido a esae se cuantifica dicha actividad enzimática y se la expresa en (por ejemplo) unidades de actividad por microlitro de solución de enzima. La unidad de actividad enzimática se define para cada enzima en particular, bajo ciertas condiciones y temperatura. Entonces la unidad definida para Taq no puede ser equiparada a la unidad definida para MMLV.

Como vimos en la introducción, la definición de unidad para MMLV es diferente a la definición de unidad para Taq, por lo que recomendamos comparar dichas deficiones.

Con respecto a los cálculos no tenemos demasiado que decir, ya que la concentración indica 200 U/ μ l, es decir que tendremos que agregar 1 μ l de la solución de enzima para tener las 200 U recomendadas por el fabricante. Si llevaremos adelante 4 reacciones, entonces adicionaremos a la Master Mix de retrotranscripción 4 μ l.

Ha finalizado el tiempo de desnaturalización de las muestras y Ud ya cuenta con la master Mix de retrotranscripción.

Veamos como ha quedado:

Master Mix de Retrotranscripción

(Volumen final de cada reacción de retrotranscripción= 50 μ l)

| Master Mix | 1 Reacción | 4 Reacciones | Conc. final |
|--|---|-----------------------------|------------------------------|
| Tampón de retrotranscripción 5 X | 10 μl | 40 μl | 1X |
| DTT | 2 μl | 8 μl | 10mM |
| dNTP's | 1 μl | 4 μl | 200 μM |
| Inhibidor de RNAsas | 1,25 μl | 5 μl | 50 U |
| MMLV | 1 μl | 4 μl | 200 Unidades |
| Mezcla (RNA total más random primers) | 35 μl (por cada reacción) | | |

Se adicionaron 15 μ l de la Master Mix de retrotranscripción a los 35 μ l de la mezcla RNA-random primers y la reacción se llevo a cabo durante 60 minutos a 37°C. Finalmente se detuvo la retrotranscripción con un calentamiento de las muestras a 95°C por 5 minutos y una posterior disminución brusca de la temperatura, a 4°C. Las muestras se reservaron a esta temperatura hasta que se desarrollaron las reacciones de PCR.

Hasta aquí ha sido de ayuda el ejemplo cinematográfico para intentar clarificar la reacción de retrotranscripción. Baste con decir que la reacción de PCR se llevará del modo usual, con primers específicos para amplificar la región deseada, en tanto que la matriz será el cDNA obtenido mediante la retrotranscripción.

Como dato final.... Rogue todavía no puede besar a su novio, pero los super-heroes siempre tienen poco tiempo para besarse, ya que tienen que defender al Mundo de vaya a saber cuántas amenazas. Por suerte las historietas y las películas siempre nos dan esperanza, porque en esta también los buenos ganaron!!!

RT-PCR

PROTOCOLO

EQUIPAMIENTO

Termociclador
Tubos para PCR de 0,2 mL
Micropipetas automáticas
Puntas (“tips”) azules y amarillas libres de DNAsas y RNAsas
Puntas “cristal” libres de RNAsas
Recipiente conteniendo hielo

REACTIVOS

Solución tampón para retrotranscripción conteniendo KCl 5 veces concentrada (“5X”)
Solución de random primers (2,5 pmoles/ μ l)
Ditiotreitol (40 μ g/mL)
Retrotranscriptasa MMLV (200 U/ μ l)
Inhibidor de RNAsas (RNasin™ Promega)
Agua DEPC autoclavada

Solución tampón para PCR conteniendo KCl 10 veces concentrado (“10 X”)
Solución de MgCl₂ 25 mM
Taq polimeras 5U/ μ l
Par de oligonucleótidos o “primers” (preparados según indicaciones del fabricante según la región a amplificar luego de la retrotranscripción)
Solución de dNTP's (desoxirribonucleótidos) concentración 10000 μ M o 10 mM
Agua destilada esterilizada libre de DNAsas y RNAsas

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Fundamento teórico

La técnica electroforética fue desarrollada en la década de los 40. Inicialmente se puso a punto una técnica que empleaba una solución acuosa como soporte. Esta técnica se modificó y simplificó desde entonces, así que cualquier laboratorio puede contar con esta poderosa herramienta de análisis.

En un campo eléctrico las moléculas cargadas se mueven con una velocidad que depende de su carga, forma y tamaño, por ello la electroforesis es una técnica muy útil en la separación de las mismas.

Las proteínas son polímeros de aminoácidos cuya carga eléctrica está determinada por los grupos ionizables presentes en su estructura: los grupos amino y carboxilo terminales y los grupos ionizables de las cadenas laterales de los aminoácidos de la secuencia proteica. Así, al disminuir el valor del pH, los grupos amino, guanidinio e imidazol se ionizan y las proteínas aumentan su carga positiva. Por el contrario, al aumentar el valor del pH los grupos carboxilo son los que se ionizan proporcionando a las proteínas carga negativa. El pH al cual la carga neta de una proteína es nula corresponde a su punto isoeléctrico (pI).

Los ácidos nucleicos por su parte también son estructuras cargadas. Las cargas derivan del esqueleto fosforado de los mismos. Sin embargo, una diferencia que presentan los ácidos nucleicos, respecto a las proteínas, es que siempre poseen 2 cargas negativas (a pH fisiológico) por nucleótido, correspondientes a la ionización de los grupos fosfatos. Por este motivo presentan una relación carga/masa constante.

La velocidad de migración (v) de una molécula depende de la fuerza del campo eléctrico aplicado (E), de la carga neta de la proteína (q) y del coeficiente de fricción (f) que expresa la resistencia al movimiento de la partícula y depende de la viscosidad del medio (η) y del tamaño de la partícula (r : radio medio de Stokes para una molécula esférica).

$$v = \frac{E \times q}{f} \qquad f = 6\eta r$$

v : velocidad a la que se mueve la molécula

E : intensidad del campo eléctrico en V/cm

q : carga de la molécula

f : coeficiente de fricción

η : viscosidad del medio

r : radio de Stokes (molécula esférica).

Asumiendo que los valores de intensidad del campo y viscosidad del medio son constantes, la velocidad de movimiento viene determinada por la relación carga/masa de la molécula.

Así, las técnicas electroforéticas se basan en la separación de moléculas en función de sus diferentes relaciones carga/masa. En el caso de la separación de ácidos nucleicos (cuya relación carga/masa es constante), las fracciones se separan únicamente en función de su tamaño.

Para emular la situación anterior en el caso de las proteínas se agrega el detergente iónico SDS, que es capaz de (además de desnaturalizar a las proteínas) aportar carga a la molécula proteica, confiriéndole entonces una relación carga/masa constante.

La electroforesis puede realizarse sobre distintos tipos de soportes como ser un soporte sólido tal como papel o acetato de celulosa, o bien un soporte de gel, ya sea de almidón (poco utilizado actualmente), agarosa o poliacrilamida.

El tipo de soporte depende del tipo de moléculas que se vayan a separar, así como del grado de resolución que se desee obtener.

Uno de los soportes más utilizados en investigación son los geles de poliacrilamida. Estos son químicamente inertes y se forman con facilidad mediante la polimerización de la acrilamida y la metilbisacrilamida (reactivo que establece enlaces cruzados entre distintas moléculas de acrilamida). Con diferentes concentraciones de acrilamida y se pueden conseguir geles con distinto tamaño de poro.

Como estos geles pueden fabricarse de manera muy reproducible, las variaciones de unos a otros, en cuanto a tamaño de poro son mínimas si las comparamos con lo que ocurre con los geles de agarosa. Además la resolución de los geles de poliacrilamida para ácidos nucleicos es sumamente alta, de modo que pueden separarse fragmentos de DNA que difieren solamente en un par de bases.

En la siguiente figura se consigna la reacción de polimerización de la acrilamida, para formar el soporte de la corrida electroforética.

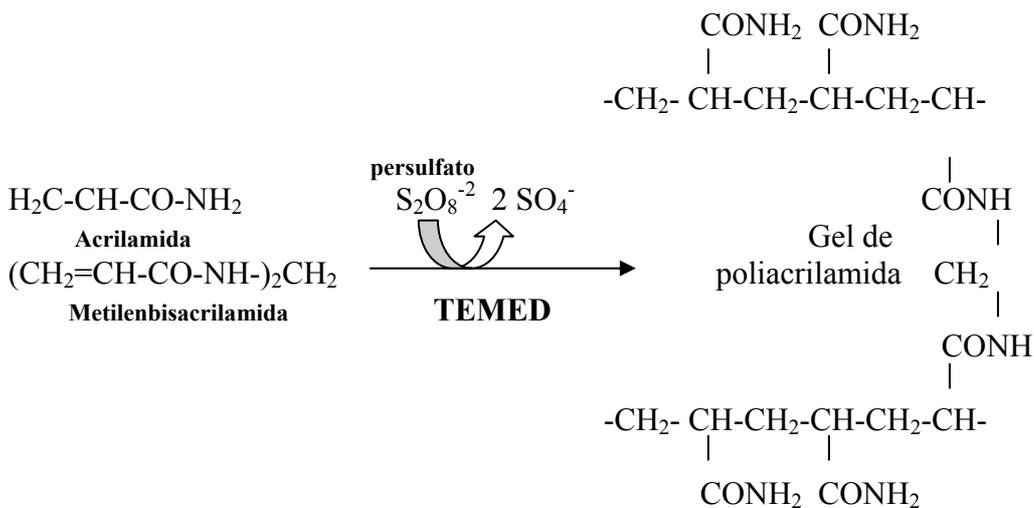


Figura 13: Polimerización de la acrilamida. La presencia de catalizadores permite esta reacción de polimerización y la presencia de bis-acrilamida permite la generación de enlaces cruzados para la generación de los poros del gel.

Para controlar el pH y la fuerza iónica, durante la electroforesis el gel debe estar saturado con un buffer. **La corriente del campo eléctrico será conducida por las moléculas de la muestra y por los iones del tampón que satura el soporte.**

El pH de los tampones escogidos debe permitir que los compuestos que se deseen separar presenten una carga global positiva o negativa de tal forma que se dirijan hacia el cátodo o ánodo mientras transcurre la electroforesis.

Como indicamos anteriormente, cuando a las muestras se les añade dodecil sulfato de sodio (SDS), las proteínas se desnaturalizan y además, el SDS tiene la capacidad de unirse a los aminoácidos: una molécula de SDS cada 2 residuos aminoácidos, por lo que las proteínas adquieren carga neta negativa y una relación carga/masa constante (esto no se requiere para la separación de ácidos nucleicos por las razones anteriormente expuestas).

En estas condiciones desnaturalizantes, la movilidad electroforética es inversamente proporcional al tamaño de la proteína, de forma que se puede establecer una correlación negativa entre el logaritmo de la masa molecular de la proteína o péptido y su **Rf** (coeficiente de movilidad relativa). La movilidad de cualquier especie molecular puede determinarse por su **Rf**, que es el resultado de dividir el recorrido de la especie molecular por el recorrido del frente electroforético. De esta forma, se puede calcular la masa molecular de diferentes proteínas cuando se dispone de patrones de tamaño conocido que son separados en la misma electroforesis.

Electroforesis discontinua

La resolución de la electroforesis se mejora en gran medida por el uso de una técnica conocida como electroforesis a pH discontinuo o electroforesis discontinua, que utiliza un sistema de dos geles y tres tampones.

Para poder comprender las bases de la separación mediante este último enfoque tendremos que recordar algunos conceptos: la representación común y corriente de un aminoácido rara vez hace referencia a su aspecto de molécula ionizada. Si bien la representación es una forma simple de “mostrar” un aminoácido, esta especie se encuentra en un equilibrio con su forma ionizada. Este equilibrio puede demostrarse por curvas de titulación (recomendamos al lector recurrir a bibliografía específica) o incluso por el simple hecho de que la mayoría de los aminoácidos son solubles en agua (polares). Para el caso de la glicina podríamos representar las dos formas del siguiente modo:

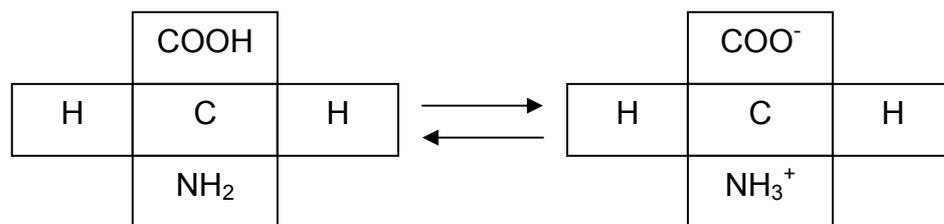


Figura 14: Equilibrio de las formas ionizada y no ionizada del aminoácido glicina.

Comprender este concepto nos ayudará a entender la separación en el sistema electroforético discontinuo.

En la electroforesis discontinua uno de los geles, el **gel separador**, es en el que se va a efectuar la separación de las moléculas. El otro gel es el **gel concentrador** que tiene un grado de polimerización inferior. El pH del gel separador se encuentra alrededor de 9, y el pH del gel concentrador se encuentra alrededor de 6. El pH del tampón de corrida es de alrededor de 8 y presenta al aminoácido glicina como uno de sus componentes. Las muestras proteicas se desnaturalizan en presencia de SDS, por lo que adquieren una carga neta negativa (aniones).

El sistema tiene como principal catión a la forma protonada del compuesto Tris-HCl (2-amino-2hidroximetil-propano-1,3-diol) formando parte de las soluciones tampón utilizadas, tanto en la generación de los geles, como en el buffer de corrida.

Los dos aniones del tampón de corrida son el anión cloruro y el anión glicinato. Ambos aniones están presentes en dicho tampón, donde a pH 8 el equilibrio que indicáramos antes tiende hacia la formación de aniones glicinato. Los iones cloruro presentan una gran movilidad, mucho mayor que los aniones glicinato por lo que estos le siguen hacia el ánodo.

Sin embargo al penetrar el gel concentrador, cuyo pH se encuentra alrededor de 6, el equilibrio se desplaza hacia la pérdida de protones, generándose glicina no ionizada. Esto retrasa aún más la movilidad de esta especie (que no tiene carga) por lo que las proteínas sembradas en el gel se ven obligadas a tomar el lugar del anión glicinato, con motivo de mantener constante la corriente iónica en todo el gel. Esto produce el movimiento de las proteínas hacia el ánodo, concentrándose.

Pero al llegar al gel separador, cuyo pH se encuentra alrededor de 8, los papeles se invierten. Ahora el equilibrio se desplaza hacia la protonación de la glicina, generándose aniones glicinato, los cuales siguen al anión cloruro, dejando detrás a las proteínas y obligándolas a seguirles en rápida carrera, pero con un nivel de polimerización mayor en el gel. Es realmente en este paso donde se produce la separación de las fracciones proteicas. Dichas fracciones podrán ser observadas con una coloración específica para proteínas.

En la figura resumimos los conceptos. Recomendamos al lector remitirse a bibliografía específica para profundizar en estos conceptos.

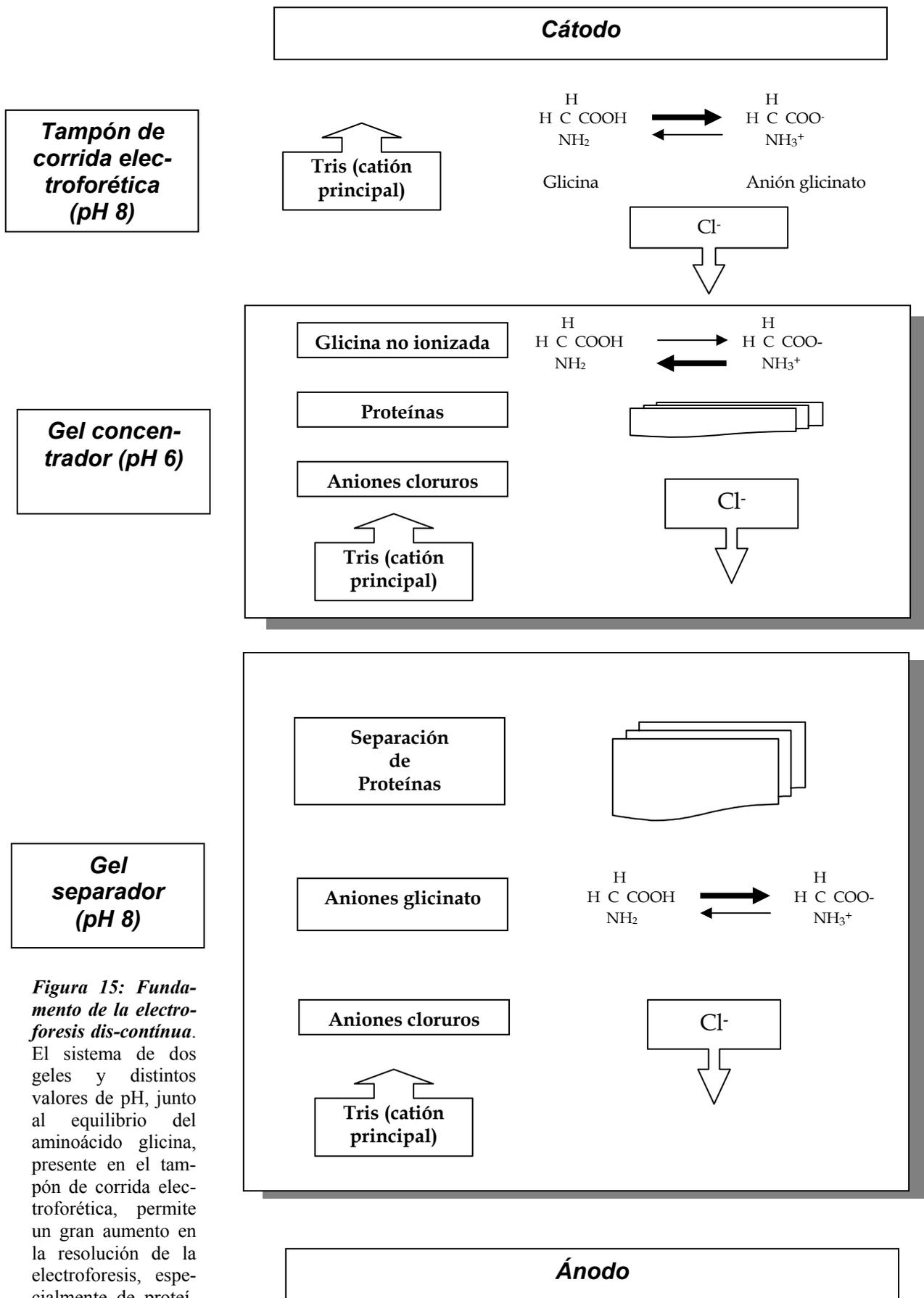


Figura 15: Fundamento de la electroforesis dis-continua. El sistema de dos geles y distintos valores de pH, junto al equilibrio del aminoácido glicina, presente en el tampón de corrida electroforética, permite un gran aumento en la resolución de la electroforesis, especialmente de proteínas.

Determinación del tamaño del poro

El tamaño del poro en un gel de poliacrilamida se determina por dos parámetros: contenido total de sólidos (%T) y la relación de bis-acrilamida a monómeros de acrilamida (%C).

$$\%T = \frac{\text{g (acrilamida+bisacrilamida)}}{100 \text{ mL}} \times 100 \qquad \%C = \frac{\text{g (bisacrilamida)}}{\text{g (acrilamida + bisacrilamida)}} \times 100$$

El %T es la relación de la suma de los pesos de monómeros de acrilamida y bisacrilamida en solución expresado como %p/v. Por ejemplo, un gel que contiene 20% T sería un gel que contiene un 20% p/v de acrilamida y bisacrilamida. De esta manera cuando %T aumenta, el tamaño de poro disminuye.

La segunda manera de ajustar el tamaño de poro es variar la cantidad de bisacrilamida. El %C es el porcentaje en peso de bisacrilamida referido a la suma de los pesos de acrilamida y bisacrilamida. Por encima y por debajo de 5%, el tamaño de poro se incrementa. El incremento en bisacrilamida da un gel más fuerte, una consideración importante a tener en cuenta en geles de acrilamida de bajo porcentaje.

Consideraciones importantes a tener en cuenta durante el trabajo con poliacrilamida

La solución de poliacrilamida no polimerizada es una solución neurotóxica. Puede ser adquirida en forma de solutos en polvo (tanto bis como acrilamida) por lo que al pesarse se requiere el uso de barbijos.

Aunque luego de la polimerización el gel ya no presente riesgos, es probable que gotas de solución sin polimerizar (ya que la polimerización no se producirá en presencia de oxígeno) puedan haber quedado en el área de trabajo, por ello se recomienda no quitarse los guantes para manipular dichos geles.

Los papeles, así como cualquier elemento plástico, que se utilicen para absorber y manipular la solución de poliacrilamida deben ser dispuestos apropiadamente como residuos de alto riesgo para la salud.

PROTOSCOLOS

SDS-PAGE

EQUIPAMIENTO

Fuente de poder
Cuba para electroforesis vertical
Cables de conexión
Matraces capaces de contener los volúmenes de las soluciones
Balanza analítica
Probetas capaces de medir los volúmenes requeridos
Micropipetas automáticas
Puntas (“tips”) azules y amarillas.

REACTIVOS

ELECTROFORESIS

Solución de acrilamida 38% (p/v) y metilbisacrilamida 2% (p/v). (Mantener la solución en frío y protegida de la luz).
Persulfato de amonio 10% (p/v).
Tampón del GEL SEPARADOR: Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 y SDS 0,4%
Tampón del GEL CONCENTRADOR: Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 y SDS 0,2 %
Tampón de MUESTRA 5 X: Tris-HCl 0,6 M pH 6,8, SDS 6% (p/v); glicerol 30% (v/v); 2-mercaptoetanol 20% (v/v), azul de bromofenol 0,01% (p/v).
SDS 10% (p/v).
N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED)
Tampón de CORRIDA ELECTROFORÉTICA: Tris 0,025 M; glicina 192 mM, pH 8,3; SDS 0,1% (p/v).

COLORACIÓN DE LOS GELES

Solución de TINCIÓN DE LOS GELES: ácido acético 10% (v/v), etanol 40% (v/v), azul de Coomassie 0,05% (p/v).
Solución de DECOLORACIÓN: ácido acético 10% (v/v), etanol 25% (v/v).

Preparación del gel

30. Ensamblar las placas de acuerdo con las instrucciones del equipo y marcar el límite superior del **gel separador** (aproximadamente 1 cm después de los dientes del peine).
31. Preparar 10 mL del **gel separador (10%)** mezclando las soluciones de acuerdo a la tabla. Recordar agregar el persulfato y el TEMED exactamente antes de verter el gel entre las placas (son los catalizadores de la reacción de polimerización). Colocarlo inmediatamente entre las placas con pipeta Pasteur y dejar polimerizar a temperatura ambiente, durante 45 minutos a 1 hora.

| Solución | | |
|---|----------|--------|
| | 7% | 12% |
| Tampón del GEL SEPARADOR (con SDS al 0,4 %) | 2,5 mL | 2,5 mL |
| Solución acrilamida – bisacrilamida 40% | 1,875 mL | 3 mL |
| Agua | 4,275 mL | 3, 25 |
| Glicerol | 1 mL | 1 mL |
| Persulfato de amonio 10% | 290 µl | 200 µl |
| TEMED | 6 µl | 4 µl |

32. Añadir una capa de 2 - 3 mm de etanol 95% o agua destilada sobre la superficie del gel en polimerización.
33. Retirar el etanol o agua depositados sobre la superficie del gel separador.
34. Preparar 5 mL del **gel concentrador (5%)**.

| Solución | Volumen |
|---|----------------|
| Tampón del GEL CONCENTRADOR (con SDS al 0,2%) | 1,23 mL |
| Solución acrilamida-bisacrilamida 40% | 0,56 mL |
| Agua | 2,69 mL |
| Persulfato de amonio 10% | 0,5 mL |
| TEMED | 5 µl |

35. Verter el **gel concentrador** e introducir los peines para formar los pocillos.
36. Dejar polimerizar durante 45 minutos a 1 hora.

Preparación de la muestra

1. Mezclar 1 volumen de la muestra de proteínas con 1/5 de volumen de tampón de muestra.
2. Desnaturalizar las proteínas a 100°C (Evitar no sobrepasar los 3 minutos de tiempo, para evitar que los tubos se abran durante el tratamiento, eventualmente se puede colocar una abrazadera para tapas de microtubos que se adquieren de firmas comerciales).
3. Colocar las muestras en hielo hasta su utilización.

Cargado y corrida electroforética

11. Quitar lentamente los peines.
12. Lavar los pocillos con agua destilada y luego con tampón de electroforesis. Llenar la cuba con el mismo tampón, asegurando cubrir todo el gel, antes de cargar la muestra.
13. Usando una micropipeta automática depositar en los pocillos del gel las muestras, sin exceder el límite de volumen del pocillo (no más de 30 a 35 µl aproximadamente).
14. Cuando se desee cargar en los pocillos la misma concentración proteica se recomienda el uso del método de Bradford para la cuantificación de proteínas.
15. Desarrollar la electroforesis a 7-10 V/cm. La electroforesis termina cuando el marcador del frente alcance la parte inferior del gel separador.
16. Abrir con cuidado para no romper el gel formado entre las dos placas de cristales que lo contienen.

Coloración de geles con Azul brillante de Coomassie

EQUIPAMIENTOS

Agitador (shaker)
Micropipetas automáticas
Balanza analítica
Probetas capaces de medir los volúmenes necesarios
Matraces para preparar las soluciones
Timer
Cubas para contener las soluciones de la coloración

REACTIVOS

Etanol absoluto
Ácido acético glacial
Agua destilada
Coomassie Brilliant Blue R-250

| Solución | Composición | Tiempo |
|---------------------------|---|----------------------|
| Fijación y coloración | Coomassie Brilliant Blue R-250 0,05% en ácido acético 10%; Etanol 50% | Toda la noche |
| Decoloración | Ácido acético 10%; Etanol 25% | Hasta ver las bandas |
| Lavado con agua destilada | | |

Interpretar y registrar la corrida electroforética coloreada

Preparación de soluciones

SOLUCIÓN STOCK DE ACRILAMIDA-BIS 50% (29:1)

Acilamida 48,3 g
Bis-acrilamida 1,7 g
Agua destilada csp 100 mL
Colocar a baño de maría para la disolución completa de los compuestos sólidos (aprox. 1 hr). Almacenar en frasco ámbar.

PERSULFATO DE AMONIO 10% (APS 10%)

Persulfato de amonio 10 mg
Agua destilada 100 µl
Preparar y utilizar en el momento.

TAMPÓN DEL GEL SEPARADOR: TRIS-HCL 1,5 M, pH 8.8 Y SDS 0,4 %

Pesar 18.16 g de Tris y disolverlo en 100 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Adicionar 4 mL de SDS al 10% p/v.
Mantener en heladera.

TAMPÓN DEL GEL CONCENTRADOR: TRIS-HCL 0,5 M pH 6.8 Y SDS 0,2%

Pesar 6,05 g de Tris y disolverlo en 100 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado.
Adicionar 2 mL de SDS al 10% p/v
Mantener en heladera.

TAMPÓN MUESTRA (5X)

| | |
|---|------------------|
| <i>Tris 0,6 M</i> | <i>0,73 g</i> |
| <i>SDS 6 %</i> | <i>0,6 g</i> |
| <i>Glicerol</i> | <i>3 mL</i> |
| <i>Azul de bromofenol 0,1%</i> | <i>1 mL</i> |
| <i>2- Mercaptoetanol</i> | <i>2 mL</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>csp 10 mL</i> |
| <i>Calentar hasta disolver y ajustar a pH 6,8</i> | |

SDS 10 %

Disolver 10g de SDS en 100 mL de agua. Calentar en baño termostatzado para disolver el SDS.

Mantener a temperatura ambiente.

TAMPÓN DE CORRIDA ELECTROFORÉTICA 1X (*Tris 0,025 M; Glicina 192 mM, pH 8,3; SDS 0,1%*)

| | |
|-----------------------|----------------|
| <i>Tris base</i> | <i>15,1 g</i> |
| <i>Glicina</i> | <i>72,1 g</i> |
| <i>SDS</i> | <i>5 g</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>5000 ml</i> |

Otra posibilidad para preparar el tampón de corrida electroforética:

TAMPON DE MIGRACIÓN 10 X

| | |
|---------------------------|--------------------|
| <i>Tris base (pH 8,3)</i> | <i>30 g</i> |
| <i>Glicina</i> | <i>144 g</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>csp 1000 mL</i> |

TAMPÓN DE ELECTROFORESIS 1 X

| | |
|---------------------------------|---------------|
| <i>Tampón de migración 10 X</i> | <i>100 mL</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>890 mL</i> |
| <i>SDS 10% p/v</i> | <i>10 mL</i> |

SOLUCIÓN DE DECOLORACIÓN

| | |
|------------------------------|-------------------|
| <i>Acido acético glacial</i> | <i>10 mL</i> |
| <i>Etanol absoluto</i> | <i>25 mL</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>csp 100 mL</i> |

SOLUCIÓN DE TINCIÓN

| | |
|---|----------------|
| <i>Coomassie Brilliant Blue R – 250</i> | <i>0,125 g</i> |
| <i>Etanol absoluto</i> | <i>100 mL</i> |
| <i>Ácido acético glacial</i> | <i>25 mL</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>125 mL</i> |

Electroforesis desnaturalizante para Ácidos Nucleicos

EQUIPAMIENTO

Fuente de poder
Cuba para electroforesis vertical
Cables de conexión
Matraces capaces de contener las soluciones
Balanza analítica
Probetas capaces de medir los volúmenes requeridos
Micropipetas automáticas
Puntas ("tips") azules y amarillas.

REACTIVOS

ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Solución de acrilamida 38% (p/v) y metilenbisacrilamida 2% (p/v). (Mantener la solución en frío y protegida de la luz).

Persulfato de amonio 10% (p/v).

Urea (concentración final 7 M).

N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED).

Tampón de CORRIDA ELECTROFORÉTICA: TBE 0,5 X (Partir de la solución stock 10 X: Tris base 0,89 M; Ácido bórico 0,89; EDTA 0,002 M).

Tampón de MUESTRA: Formamida 95%; xilencianol 5 mg/mL; azul de bromofenol 5 mg/mL.

COLORACIÓN DE LOS GELES

Solución de FIJACIÓN: ácido acético 0,5%; etanol 10%

Solución de TINCIÓN: 2 g/L de Ag No; ácido acético 0,5%; etanol 10%

Solución de REVELADO: Na (OH) 3%; Formaldehído 0,074%.

Preparación previa de las placas de vidrio

1. Si las placas han sido usadas, sumergirlas en NaOH 10% durante 1 hora para quitar los restos de geles anteriores.
2. Lavarlas con agua común, destilada y desengrasarlos perfectamente con etanol 96°.

Preparación del gel

1. Cada placa de vidrio se prepara por separado cambiándose de guantes entre uno y el otro:

Vidrio Corto (donde el gel quedará adherido).

Preparar Solución de Unión (1 mL etanol + 5 µL acético + 3 µL Bind Silane).

Distribuir por todo el vidrio con una servilleta de papel seca.

Dejar secar 5 minutos.
 Quitar los restos con servilleta humedecida en etanol 96° pasándola 3 veces en distintos sentidos (NO EXCEDERSE).

Vidrio largo (anti-uni3n).

Aplicar silicona por toda la superficie con una servilleta.
 Dejar secar.
 Quitar el exceso con una servilleta mojada en agua.

2. Armar el equipo sin tocar con las manos libres, nivelarlo y disponerse a cargar el gel.
3. Preparar 10 mL de gel al 6%:

| Reactivo | Cantidad | Cuidados |
|--------------------------------|----------|--|
| UREA | 5 g | Disolver en un poco del agua correspondiente a los 10 mL finales |
| TBE 10X | 0,6 ml | Mezclar bien |
| Acrilamida – Bis 40% (19:1) | 1,5 ml | |
| Agua | 7,8 mL | Completar el volumen a 10 ml |
| Persulfato de amonio (APS) 10% | 80 µl | Justo antes de utilizar. Mezclar bien y cargar el sistema. |
| TEMED | 3-5 µl | |

4. Cargar el gel y colocar el peine.
5. Dejar gelificar (aproximadamente 1 hora).

Pre corrida

1. Quitar el peine, limpiar los restos de gel y armar la cuba colocándole TBE 0,5X.
2. Conectar el aparato a 40 – 45 watts fijos durante unos 20 minutos para que alcance unos 50°C.

Preparaci3n de muestras, carga y corrida del gel

1. Preparar las muestras con tamp3n de carga: 2,5 µl tamp3n de carga 2X + 2,5 µl de muestra. El tamp3n de carga contiene formamida como agente desnaturalizante.
2. Desnaturalizar a 95°C por 2 minutos y colocar en hielo.
3. Cargar el gel sin demorar demasiado. Correr a 60 watts.

Coloración de geles con Nitrato de Plata

EQUIPAMIENTOS

Agitador (shaker)
Micropipetas automáticas
Balanza analítica
Probetas capaces de medir los volúmenes necesarios
Matraces para preparar las soluciones
Timer
Cubas para contener las soluciones de la coloración

REACTIVOS

Etanol absoluto
Ácido acético glacial
Agua destilada
Nitrato de plata
Formaldehído
Na(OH) 3%

1. Una vez terminada la corrida, desmontar con cuidado el equipo.
2. Colocar el vidrio con el gel en las cubas conteniendo las respectivas soluciones, según:

| <i>Solución</i> | <i>Composición – Comentarios</i> | <i>Tiempo</i> |
|-----------------|--|--------------------------------|
| Fijación | Acido acético 0,5%; Etanol 10% | 2 min |
| Tinción | 2 g/L de Nitrato de plata en solución fijadora (10 % Etanol + Ácido acético 0,5 %) | 5 min |
| Lavado | No pasarse de 10 seg: es crucial | 10 seg |
| Revelador | Formaldehído 0,08% Na(OH) 3% Preparar fresco en el momento de usar. | Hasta que aparezcan las bandas |
| | Sumergir en la solución fijadora | 5 min |
| Lavado final | Agua destilada | 5 min |

3. Dejar secar y fotografiar.

Preparación de soluciones

SOLUCIÓN STOCK DE ACRILAMIDA-BIS 50% (29:1)

Acrilamida 48,3 g
Bis-acrilamida 1,7 g
Agua destilada csp 100 mL
Colocar a baño de María para la disolución completa de los compuestos sólidos (aprox. 1 hr). Almacenar en frasco ámbar.

PERSULFATO DE AMONIO 10% (APS 10%)

Persulfato de amonio 10 mg
Agua destilada 100 µl

Preparar y utilizar en el momento.

TAMPÓN DEL GEL SEPARADOR: TRIS-HCL 1,5 M, pH 8.8 Y SDS 0,4 %

Pesar 18,16 g de Tris y disolverlo en 100 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Adicionar 4 mL de SDS al 10% p/v.

Mantener en heladera.

TAMPÓN DEL GEL CONCENTRADOR: TRIS-HCL 0,5 M pH 6.8 Y SDS 0,2%

Pesar 6,05 g de Tris y disolverlo en 100 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentrado.

Adicionar 2 mL de SDS al 10% p/v

Mantener en heladera.

TAMPÓN DESNATURALIZANTE PARA MUESTRAS (2X): NaOH 10 mM; Formamida 95%; Azul de bromofenol 0,05 %; Xyleno cyanol FF 0,05 %

| | |
|---------------------------|------------------|
| <i>NaOH</i> | <i>4 mg</i> |
| <i>Formamida</i> | <i>9,5 mL</i> |
| <i>Xylenocyanol FF</i> | <i>50 mg</i> |
| <i>Azul de bromofenol</i> | <i>50 mg</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>qsp 10 mL</i> |

Mezclar bien. Centrifugar 3 minutos a 10000g y eliminar el precipitado. Almacenar refrigerado.

TAMPÓN DE CORRIDA ELECTROFORÉTICA: TBE 0,5 X

| | |
|-----------------------|--------------------|
| <i>TBE 10 X</i> | <i>50 mL</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>qsp 1000 mL</i> |

SOLUCIÓN DE FIJACIÓN

| | |
|------------------------------|-------------------|
| <i>Acido acético glacial</i> | <i>1,5 mL</i> |
| <i>Etanol absoluto</i> | <i>30 mL</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>qsp 300 mL</i> |

SOLUCIÓN DE AgNO₃

| | |
|-----------------------------|--------------------|
| <i>AgNO₃</i> | <i>2 g</i> |
| <i>Solución de fijación</i> | <i>qsp 1000 mL</i> |

SOLUCIÓN DE REVELADO

| | |
|-------------------------|---------------|
| <i>Na(OH)</i> | <i>4,5 g</i> |
| <i>Formaldehído 40%</i> | <i>300 µL</i> |
| <i>Agua destilada</i> | <i>150 mL</i> |

REPASO

En este apartado brindamos algunos ejemplos de aplicación práctica de los conceptos vertidos en el conjunto de temas anteriores.

Recomendamos a los lectores que intenten obtener por sus propios medios las respuestas y que posteriormente las verifiquen. Algunos ítems pueden contar con diversas respuestas que pueden ser alcanzadas por el razonamiento y el conocimiento de las bases generales de la biología molecular.

Se hace hincapié en la importancia de conocer las bases teórico-prácticas fundamentales, por ello prevenimos al lector acerca de la memorización de protocolos o preparación de soluciones. En un laboratorio siempre podremos recurrir a protocolos, sin embargo la capacidad de razonar frente a situaciones problemáticas es una capacidad mucho más importante a ser cultivada.

Por otro lado, en consideración a los alumnos o profesionales avanzados que puedan utilizar este texto, advertimos que los ejemplos son simplificaciones y generalizaciones con fines didácticos y/o demostrativos.

Los ejemplos están constituidos por consignas (en texto normal) con su consiguiente respuesta (en negrilla). Los escenarios se exponen en cursiva.

Luego de las aclaraciones pertinentes vayamos a los ejemplos:

EJEMPLO N°1

A) EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

A.1) Indicar los errores teóricos y prácticos cometidos por el joven practicante en el Laboratorio de Biología Molecular, justificando y exponiendo el modo teórico o práctico correcto:

“Un joven practicante se halla por primera vez solo en el Laboratorio de Biología Molecular, ya que su Jefe (¡solo por hoy!), no podía venir. Como encargo tiene que aislar DNA a partir de muestras de sangre. El practicante busca el protocolo y sin más se pone a manipular la muestra.

El primer error cometido en este párrafo se refiere al hecho de que el practicante no respeta las normas de bioseguridad. Distintos autores y entes científicos han establecido grupos de medidas de bioseguridad, a los que se remite al lector.

Es demasiado temprano, el joven no ha desayunado bien (y parece que tampoco ha dormido lo suficiente) por lo que decide apurarse. Mide 900 ul de BLGR (“Buffer de lisis de glóbulos rojos”) y lo agrega a la muestra, luego centrifuga algunos segundos (ya que no tiene ganas de esperar) y descarta el pellet obtenido, quedándose con el sobrenadante que es una solución rojiza.

El error cometido en este caso no tiene que ver con la medición de volúmenes sino que se refiere al hecho de que, según viéramos en el apartado de extracción de DNA, la adición de la solución de lisis de glóbulos rojos permitía la lisis de estos glóbulos, en tanto que los glóbulos blancos (donde se encuentra el DNA a aislar) no eran mayormente afectados, por lo que se concentrarían como un sedimento. Al deshacerse de este sedimento el practicante está afectando totalmente la extracción de DNA.

Luego de esto agrega BLGB y Sn de Proteinasa K, y pone a incubar a 30°C durante una hora. La solución que era rojiza se torna incolora y el practicante

acepta que la digestión ha terminado luego de unos 10 minutos. Se felicita por su buena estrella (ya que la digestión normalmente le toma una hora) y se dedica a purificar el producto. Para ello utiliza cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y luego centrifuga, porque según su conocimiento las proteínas precipitarán por el cambio de tensión iónica del medio y entonces deberá eliminar la fase inferior. Como recuerda el cloroformo es un solvente apolar, y como deduce que el DNA es polar, la fase acuosa ya debe tener el DNA disuelto, por lo que decide trasvasar la fase acuosa a un nuevo tubo y rotularlo como "DNA DE SANGRE".

Si bien algunos conceptos son correctos, el practicante comete varios errores. Por ejemplo la purificación de proteínas del extracto de DNA, utilizando solventes apolares, se fundamenta en la partición en solventes de las porciones hidrofóbicas proteicas y los lípidos celulares. Además, falta el paso de concentración de los ácidos nucleicos extraídos. Recordemos que luego de la purificación el DNA se halla disuelto en un gran volumen. Los alcoholes al deshidratar la molécula facilitan su concentración. En general es más útil trabajar con extractos concentrado de DNA, aunque si se han diluido demasiado pueden volver a concentrarse utilizando alcoholes. Por otro lado el paso final de lavado con etanol 70% adiciona un paso de arrastre de remanentes de impurezas y solventes. Sin embargo el etanol puede inhibir reacciones de PCR por lo que debe ser eliminado por completo antes de la resuspensión del DNA en agua o solución TE1.

El jovencito al menos aprendió un buena práctica de laboratorio: había escrito todo fielmente en su cuaderno de laboratorio, por lo que cuando el Jefe se incorporó al día siguiente y leyó el cuaderno del practicante decidió "pedirle amablemente que se retire de su Laboratorio para siempre".

Cuestiones:

A.1) ¿Cuáles son algunas de las buenas prácticas que debería observar en el manejo de las muestras?

Indicar algunas medidas de bioseguridad

A:2) ¿En qué paso el practicante cometió un error muy grave que invalidó todas las actividades posteriores? ¿Por qué?

El practicante eliminó el pellet que contenía los glóbulos blancos, que son los elementos nucleados de donde se obtienen los ácidos nucleicos, en consecuencia no podrá aislar los mismos.

A.3) ¿Cuáles son los principales contaminantes cuando se realiza la purificación de ácidos nucleicos? ¿En qué se basa la purificación de ácidos nucleicos utilizando solventes apolares?

Los principales contaminantes son las proteínas, pero se deben indicar también los lípidos y carbohidratos. La purificación de ácidos nucleicos utilizando solventes se basa en la solubilidad diferencial y en la desnaturalización proteica por parte de los solventes.

A.4) ¿Qué paso omitió el practicante? ¿Cuál es la utilidad del paso que ha omitido?

El practicante omitió el paso de concentración por precipitación y lavado del DNA, por lo que el mismo estará fuertemente contaminado con solventes que son inhibidores de enzimas como la Taq.

B) ELECTROFORESIS Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.1) Electroforesis

2.1.1) El Jefe de su Laboratorio de Biología Molecular le pide que prepare los reactivos que han de utilizar para una corrida electroforética, entregándole los siguientes datos:

TBE 10 X

| | | |
|---------------|-----------------------------------|------------------------|
| Tris base | 0,89 M (Solución madre: Tris 1 M) | 890 mL de Tris 1 M |
| Ácido bórico | 0,89 M (PM=61 g) | 54.3 g de ácido bórico |
| EDTA | 0,02 M (Sn madre: EDTA 0,5 M) | 40 mL de EDTA 0,5 M |
| H2O destilada | csp 1000 mL | |

m

BUFFER DE CARGA

| | | |
|--------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Glicerol | 60% (Sn Madre: Glicerol 100%) | 0,9 mL de glicerol 100% |
| Azul de Bromofenol | 0,01 % (reactivo en polvo) | 0,15 x 10 ⁻³ gr |
| Tris/EDTA | csp 1,5 mL | |

Indique (a modo de “fórmula”) cuanto ha de agregar de soluciones madre, o cuanto pesará de solutos, y la cantidad de solvente que ha de agregar para preparar las soluciones requeridas; por ejemplo:

Aaaa xMxxxx mL

Bbbb xxx g

La fórmula utilizada para preparar este tipo de soluciones es siempre la misma:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Donde

C_i representa la concentración inicial, es decir la concentración de la solución madre o stock.

V_i representa el volumen de la solución madre o stock que deberemos tomar para lograr una solución de concentración final **C_f** y un volumen final **V_f**

C_f representa la concentración final de la solución

V_f representa el volumen final total de solución que se decide preparar.

2.1.2) Además le pide que prepare 50 mL de agarosa al 1,5 % p/v. ¿Qué significa “agarosa al 1,5%”? ¿Cómo prepara el volumen de agarosa solicitado?

Agarosa al 1,5 % significa 1,5 g de agarosa por cada 100 mL de solución.

Un modo de preparación podría ser el siguiente: 0,75 g de agarosa + 50 mL de TAE o TBE 1X

¿Qué solvente utiliza:

a) agua destilada?

b) buffer de corrida 1 X?

c) agua de la canilla?

d) buffer de corrida 10 X?

2.2) Cuantificación de ácidos nucleicos

Cuestiones:

La relación A_{260}/A_{280} es un indicador de la pureza relativa de los ácidos nucleicos extraídos. Los picos de absorbancia para las proteínas se encuentran a 280 nm, en

tanto que el RNA presenta el pico a 260 nm. Los nucleótidos, por su parte, absorben a 260 nm incrementando marcadamente la relación A_{260}/A_{280} .

Cuestiones:

2.2.1) ¿Qué sucede con la relación A_{260}/A_{280} en el caso de una muestra de DNA pura? ¿Qué valor óptimo debería esperar?

El valor a esperar para una muestra pura de DNA es de 1,4 a 1,6 debido a la absorbancia de los ácidos nucleicos según se explica en el mismo enunciado de la pregunta.

2.2.2) ¿Qué sucede con la relación A_{260}/A_{280} en el caso de contaminación con proteínas? ¿Por qué?

Si el DNA extraído está contaminado con proteínas, la A_{280} aumenta con lo que la relación A_{260}/A_{280} disminuye. La razón es matemática, ya que al aumentar el valor de absorbancia a 280 nm aumenta el denominador.

2.2.3) En el caso de una muestra de DNA con elevada contaminación con RNA ¿qué sucederá con la relación A_{260}/A_{280} ?

Si está contaminado con RNA la A_{260} aumenta en exceso, por lo que la relación A_{260}/A_{280} es mucho mayor a 1,6. de hecho una muestra pura de RNA debe presentar una relación A_{260}/A_{280} de aproximadamente 2.

2.2.4) La relación A_{260}/A_{280} para una muestra pura de RNA es de 2.00 ¿espera encontrar un valor mayor o menor en la relación A_{260}/A_{280} , para una muestra de RNA contaminada con nucleótidos?

La contaminación con nucleótidos aumenta en exceso la relación A_{260}/A_{280} por lo que es de esperar que la relación supere el valor de 2,3

3) PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

Un investigador amigo suyo se está iniciando en el campo de la Biología Molecular y le pide unos consejos acerca de la PCR. Por ejemplo:

3.1) ¿Cómo utiliza el buffer de PCR que le ha venido de regalo cuando compró la Taq polimerasa? ¿cuántas veces concentrado debe quedar el buffer en la reacción? **El buffer se utiliza, en realidad “según indicaciones del fabricante” pero la concentración final alcanzada debe ser 1X.**

3.2) ¿Cuál es la utilidad del proceso de titulación del magnesio? ¿Cómo puede afectar la concentración de magnesio al rendimiento de la reacción?

El proceso de titulación de magnesio es una operación de puesta punto de la reacción de PCR que sirve para conocer la concentración óptima del cofactor para que la reacción alcance el máximo rendimiento. Variaciones en la concentración del magnesio pueden afectar la reacción aumentando o disminuyendo el rendimiento, o bien permitiendo o evitando la generación de productos no deseados. A pesar de ello, el rendimiento global total de la PCR también depende de otros factores tan importantes como el cofactor enzimático

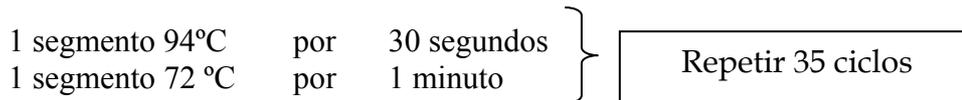
3.3) Además, su amigo investigador se enoja con la PCR porque no puede amplificar cuando aplica el siguiente protocolo (que copió al pasar por una página de Internet cuando revisaba su correo electrónico).

| | |
|-------------------------|------------------|
| <i>Buffer de PCR</i> | <i>1 X</i> |
| <i>Cl₂Mg</i> | <i>1.5 mM</i> |
| <i>dNTP's</i> | <i>200 mM</i> |
| <i>Taq pol</i> | <i>0,0002 U</i> |
| <i>Primer Sense</i> | <i>10 pmoles</i> |

¿Le falta algo al protocolo? ¿Qué le sugeriría cambiar, agregar o mejorar al protocolo?

Debería agregar el otro primer y aumentar el número de unidades de Taq. En realidad se pueden agregar más sugerencias, como sería una titulación de magnesio, etc. También se debe recordar adicionar el agua y la matriz de DNA.

3.4) A pesar de que Ud le sugirió todos los cambios necesarios el protocolo de su amigo continúa sin funcionar. Usted descubre la falla principal cuando observa el ciclado:



Luego de conocer que la T_m de los *primers* utilizados es de 56 °C ¿Cómo completaría el ciclado? ¿Qué representa cada uno de los segmentos en el ciclado de una reacción de PCR?

Al protocolo de ciclado le falta el segmento de hibridación a 56 °C. Debería agregarle un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por un par de minutos y si lo desea un ciclo final de cierre de amplificación a 72 °C por 5 min.

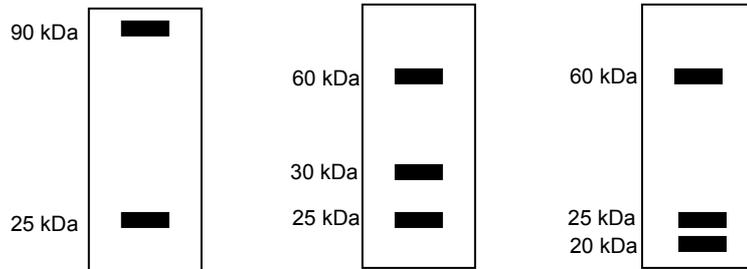
El primer segmento representa la desnaturalización a 94°C, el segundo la hibridación de los *primers* con la matriz a la T_m (56°C) y el tercero es la elongación del producto por la polimerasa a 72°C.

D) ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

D.1) Un investigador chino se encuentra estudiando la proteína “a-a-chis-ina” que se obtiene del bambú antitusivo de los matorrales del norte chino, y que al parecer curaría fantásticamente el resfrío al panda. Como en los zoológicos del mundo azota una epidemia de gripe entre los pandas, el investigador pone sus mejores esfuerzos en aislar la “a-a-chis-ina”. Luego de obtener los extractos, el investigador obtiene una proteína que cura fantásticamente el resfrío a los quirquinchos sudamericanos, así que la investiga mejor (visto y considerando los recientes acuerdos comerciales entre China y Sudamérica). La proteína en su estado nativo tiene un peso molecular de 115 kDa.

El investigador sembró 3 geles de poliacrilamida, sometiendo a la proteína pura a tres tratamientos por separado:

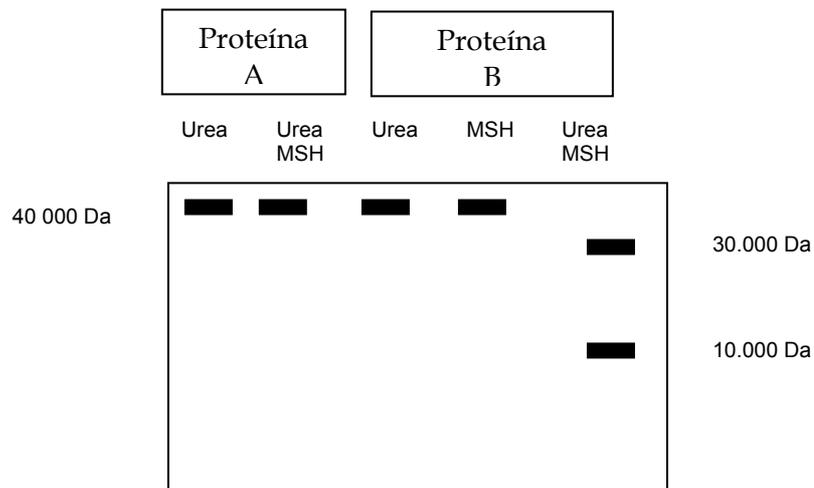
| | | | |
|--|----|----|----|
| Tratamientos previos: | 1 | 2 | 3 |
| SDS | SI | SI | SI |
| Mercaptoetanol (reduce puentes disulfuro) | NO | SI | SI |
| ENDO-H (cliva la unión proteína-azúcar) | NO | NO | SI |



Deduzca el número de subunidades, PM de cada una de ellas, uniones que las estabilizan y glicosilación de subunidades.

La proteína tiene 2 grandes subunidades: una de 90 kDa y otra de 25 kDa. La de 90 kDa presenta un puente de disulfuro que es reducido por el mercaptoetanol para generar dos porciones: una de 60 kDa y otra de 30 kDa. Por otra parte, la subunidad de 30 kDa se encuentra glicosilada y la glicosilación corresponde a 10 kDa de los 30 originales por lo que se genera la banda a 20 kDa. También es válida la suposición de que ambas subunidades tienen 5 kDa de glicosilación generando luego del tratamiento las bandas a 20 y 25 kDa.

D.2) Además el investigador aisló un par de proteínas que funcionan de modo espectacular como antitusivo en el resfrío del carpincho misionero y las estudia mejor. Ambas proteínas tienen el mismo peso molecular (40.000 Da), pero su composición de aminoácidos es muy distinta. Cuando el investigador trata la proteína A con urea, ya sea en presencia o en ausencia de mercaptoetanol, esta mantiene su peso molecular de 40.000 Da. La proteína B, en cambio se descompone en 2 subunidades (una de 30.000 y otra de 10.000 Da) SOLO cuando se la trata con urea y mercaptoetanol. Ni la urea ni el mercaptoetanol solos la disocian.



¿Qué puede decir acerca de las estructuras proteicas de A y B? ¿Puede proponer un modelo esquemático de sus estructuras?

La proteína A no tiene subunidades que puede desnaturalizar la urea, ni puentes de disulfuro que puedan ser reducidos por el mercaptoetanol. La proteína B tiene que ser primero desnaturalizada por urea para exponer un puente disulfuro que luego es reducido por mercaptoetanol, generando las 2 bandas del último carril.

EJEMPLO N°2

Patience Phillips había descubierto el gran secreto: la línea de belleza Bieu-Line de la Heldare Corporation era adictiva y producía graves efectos secundarios... por lo tanto la compañía debía “hacerla desaparecer”. Por esto Patience fue arrojada a los ductos de tratamientos de desechos y luego volcada junto a los desperdicios hacia el mar, donde debería morir... pero... fue salvada por “Midnight”, un misterioso gato de origen egipcio que al encontrarla sin vida, le infundió su aliento y por mágicos poderes le devolvió la vida, no ya a Patience, sino a la nueva mujer: “Gatúbela”...

A) EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Como Gatúbela estaba sumamente preocupada por la alergia a los perros (y su fuerte adicción al sushi y a la ensalada de ave) decidió consultarlo a usted, un biólogo molecular de renombre, completamente segura de que había sufrido alguna clase de extraña mutación que le brindó sus súper poderes. Luego de aceptar el caso, usted se dedica a iniciar el trabajo. El primer paso será el aislamiento de ácidos nucleicos.

Deberá contestar las siguientes **Cuestiones**:

A.1) ¿Qué muestras tiene a su disposición para extraer DNA, a los fines de estudiar el caso relatado?

Puede indicar todos los tipos de muestras como sangre, saliva, líquido sinovial, LCR, raspados celulares, pelo, uña. Por supuesto, siempre hemos de seleccionar aquella cuya obtención sea la más simple y menos traumática para el paciente considerando la utilidad posterior de los análisis.

A.2) ¿Qué cuidados de bioseguridad debe tener al manejar y procesar las muestras? (distintos a cuidarse de los arañazos de Gatúbela).

Nuevamente hacemos insistimos en la necesidad de conocer normas mínimas de bioseguridad, pero dada la gran cantidad de bibliografía fácilmente accesible no nos extendemos en este punto.

Luego de iniciar el proceso de extracción a partir de una muestra de sangre, recibe una llamada sumamente importante, por lo que su tiempo de digestión supera 1 hora, que es el tiempo establecido por su protocolo. Ud:

A.3) Rechaza la muestra y se deshace de ella (¿por qué?).

A.4) La deja en digestión más tiempo (¿por qué?).

A.5) No se preocupa mucho de que se haya ido el tiempo (¿por qué?).

Para este caso en particular, el tiempo de digestión no es de suma importancia, ya que lo importante es que se lisen los glóbulos blancos, esto puede llevar 1 hora o toda la noche (“overnight”) sin que ello afecte de modo importante la continuación del proceso.

Luego de agregar cloroformo: isoamílico (24:1) a la muestra, tras la digestión, centrifuga y obtiene 2 fases:

A.6) ¿Cuáles son los principales contaminantes cuando se purifican los ácidos nucleicos? ¿Qué función cumple el cloroformo: isoamílico? ¿Conoce otros métodos para purificar los extractos?

Es una pregunta similar al caso anterior, la cual se extiende a otros procesos de purificación de ácidos nucleicos. Como vimos en el apartado de extracción, las proteínas pueden ser eliminadas por extracto por la adición de sales en alta concentración que provocan su precipitación dejando en solución el DNA. Otros métodos comerciales utilizan columnas de purificación que retienen el DNA y permite la eliminación de otros contaminantes. El ácido nucleico retenido es luego eluido de la columna.

Finalmente utiliza alcoholes en los pasos finales del proceso de extracción de ácidos nucleicos:

A.7) ¿Cuál es la función de los alcoholes en los procesos de extracción? ¿Qué finalidad tiene “lavar” los ácidos nucleicos con etanol 70%?

Los alcoholes se usan para deshidratar el DNA y concentrarlo, además lo “lavan” de los solventes inhibidores enzimáticos como cloroformo o fenol. Sin embargo, el etanol también es inhibidor de enzimas, por lo que se recomienda su total eliminación antes de la resuspensión del DNA.

B) ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

B.1) Indique los errores teóricos y prácticos, justificando y exponiendo el modo teórico o práctico correcto:

Para continuar con su investigación decide verificar la calidad y cantidad del DNA extraído, para ello decide utilizar la electroforesis de ácidos nucleicos, utilizando como soporte agarosa. En realidad esta no es su especialidad, pero recordando viejos tiempos decide ponerse a trabajar (además, al fin y al cabo, Gatúbel se lo merece). Usted imagina que el soporte seleccionado le servirá por la reproducibilidad en la generación de los poros, y porque podrá verificar diferencia tan mínimas como un par de base (esta última es una característica de los geles de poliacrilamida, uno de los problemas de la agarosa es su falta de reproducibilidad en tamaño de poro de gel a gel). Por ello prepara un gel al 2 % p/v. A pesar de que no recuerda qué significan esas dos letras luego del por ciento, en su laboratorio siempre se han manejado en una unidad denominada g/L (gramos por litro) por lo que imagina que 2 % se refiere a eso: 2 gramos en un litro de solución (Incorrecto: 2% significa 2 g de soluto por cada 100 mL de solución). Como no preparará 1 L, sino 50 mL, su cálculo le indica: 0,1 gr de agarosa en 50 mL de agua de canilla (como se preparan todas las soluciones). (Incorrecto: se utiliza solución buffer de corrida electroforética TAE o TBE 1X, para permitir la migración y resolución de las bandas).

Una vez preparada la solución, la funde y la coloca en la cuba para iniciar la corrida. Prepara las muestras y las aplica a los pocillos. (Se olvida de agregarle el colorante bromuro de etidio o bien, debería colorear el gel luego de la corrida). A pesar de que sus conocimientos de electroquímica ya están bastante “oxidados”, recuerda que el DNA es un polianión, por lo que debe migrar hacia el cátodo (Incorrecto: el DNA migra hacia el ánodo, ya que posee carga negativa), así que ubica el peine en el extremo anódico (Incorrecto: el peine se debe

encontrar hacia el extremo catódico o sea en el polo negativo, porque el DNA migra hacia el polo positivo). Luego de permitir que la corrida se efectúe por 1 hora, utiliza un transiluminador para observar los resultados. Varias de las bandas se han caído de los pocillos, y cuando observa el gel con luz UV no distingue nada de fluorescencia. Confundido devuelve la muestra a su Técnico de laboratorio el que luego de 45 minutos le entrega los resultados en una foto instantánea. “Nunca fui amante de la electroforesis” rezonga usted.

Cuestiones:

B.2) ¿Cómo prepara 1000 mL del buffer corrida TBE 10 X (Tris base 0,89 M; Ácido bórico 0,89 M; EDTA 0,02 M) a partir de ácido bórico en polvo y las soluciones madre: Tris 1M y EDTA 0,5 M. El peso molecular del ácido bórico es de 61 g/mol.

Punto de resolución similar al ejemplo 1

B.3) ¿Qué ha sucedido con el punto de siembra escogido?

El punto de siembra para geles de ácidos nucleicos tiene que ser escogido en el cátodo, ya que el DNA migra hacia el ánodo. De lo contrario la corrida llevará a que las bandas se “caigan” del gel.

B.4) ¿Qué se le falta agregar para poder observar el producto utilizando luz UV? Debería haberle colocado el colorante bromuro de etidio al gel o teñirlo luego.

C) PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION: REACCIÓN EN CANDENA DE LA POLIMERASA)

Mientras en el Laboratorio se desarrollaba la electroforesis Ud se encuentra navegando en la página de la Biblioteca Virtual de la Secretaría de Ciencia y Técnica, vinculada a la base de datos “Science Direct”. Entre los artículos que encuentra, uno le llama la atención: “Mutación en individuos predispuestos provoca alergia a caninos. El artículo relata que el gen CMe-AchiK-1-Bronkio se encuentra mutado en personas alérgicas a los perros, por lo que usted decide investigar dicho gen, en la muestra proveniente de Gatúbela.

La secuencia del exón 1 del gen es la siguiente

5'GTATATAGTTTGAGGGTAATTTTATATAATAGTTTGAATAATTTTGTG
TAGTTTTGATTGCGTTTTGA

TTATAGTTTTTTTTATTTTTTATTATGAAGTTAGGTGTGGAATTTTTATT
TTTTA 3'

La línea indica donde se desea que hibriden los primers:

Cuestiones:

C.1) ¿Cuál es la secuencia de los primers? No olvide indicar la orientación de los mismos.

Se debe genera la secuencia complementaria y se deben ubicar las dianas hacia los extremos 3' ya que la polimerasa debe elongar en sentido 5'-3'. El gráfico solo muestra una de las cadenas, por lo que se debe generar la complementaria.

El primer derecho o sense será: 5' TTTATATAATA 3'

El primer izquierdo o antisense será: 3' TTCAATCCACAC 5'

C.2) ¿Cuál es el tamaño del producto en pares de bases?

El tamaño del producto será de 87 pb: el tamaño del producto incluye también las bases que actúan como cebadoras.

C.3) ¿Cuál es la T_m de los *primers*? (Utilice la aproximación de: $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$).

Recordemos que tenemos dos *primers*, cada uno con una T_m correspondiente:

T_m primer 1 = 34°C

T_m primer 2 = 22°C

C.4) ¿Cuáles serán los componentes de la Master Mix para amplificar la región?

Los componentes serán los de una Master Mix común: solución tampón para PCR, Taq polimerasa, *primers*, dNTP's, Cl_2Mg , agua y matriz de DNA.

C.5) De acuerdo con la T_m obtenida: ¿qué protocolo de ciclado propone? ¿qué significa cada uno de los segmentos en el ciclado de una reacción de PCR?

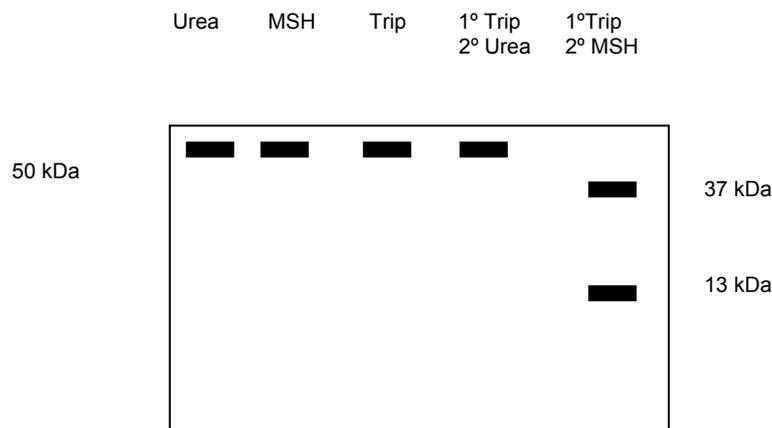
La respuesta es similar a la obtenida en el ejemplo anterior, sin embargo se debe indicar que el segmento de hibridación debe encontrarse a una temperatura cercana a la T_m obtenida: 20 a 22 °C en este caso, que no tiene sentido para una reacción de PCR por ser demasiado bajos. Se recomendaría en este caso cambiar la posición de los cebadores o rediseñarlos con el objeto de elevar la T_m .

D) ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Como no tuvo un gran éxito con la electroforesis y la reacción en cadena de la polimerasa. Ud se dispone a utilizar un acercamiento a la proteómica gatubelesca, haciendo uso de geles de poliacrilamida. Es así que Ud logra aislar un homólogo de la proteína "a-a-chisina" (célebre en laboratorios chinos, por curar el resfrío a los quirquinchos sudamericanos) en un extracto de proteínas sanguíneas. Sin embargo la mutación descrita por Ud afecta la estructura proteica: realiza los siguientes tratamientos:

- Urea
- Mercaptoetanol
- Tripsina (Dato: la tripsina cliva el enlace peptídico hacia el C-terminal de lisinas o argininas)
- Primero tripsina y luego urea
- Primero tripsina y luego mercaptoetanol.

El resultado es el siguiente gel:

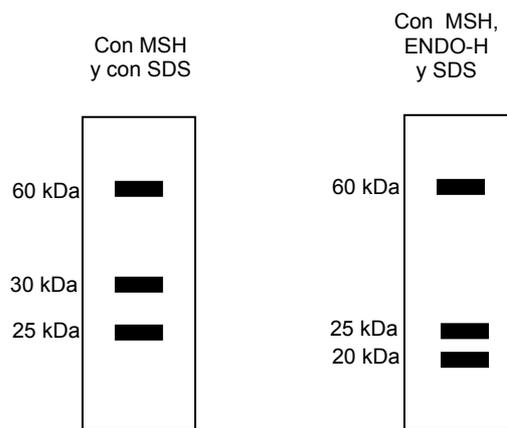


D.1) ¿Qué puede decir con respecto a la estructura proteica? ¿Qué hubiera sucedido si se invirtiera el orden de los tratamientos en el último caso?

Podemos realizar una aproximación a la estructura proteica diciendo que existen restos de lisinas o argininas que enmascaran un puente disulfuro, el cual puede ser expuesto luego del tratamiento con tripsina. Si el tratamiento se hubiera invertido solamente se hubiera obtenido la banda de 50 kDa. Sin embargo existen dificultades para proponer una única posibilidad con respecto a la estructura proteica.

D.2) ¿Cuál es el peso molecular de la proteína aislada? ¿Cuál es el número aproximado de aminoácidos que contienen la proteína nativa, y cada una de los fragmentos obtenidos en el último carril? Dato: PM de cada aminoácido = 110 Da. El peso molecular de la proteína aislada es 50 kDa. La proteína nativa tiene aproximadamente 454 aminoácidos. La unidad de 37 kDa tiene aproximadamente 336 aminoácidos y la 13 kDa tiene aproximadamente 118 aminoácidos.

La otra proteína aislada en realidad no tenía mucha utilidad, pero Ud no pudo resistir la tentación de caracterizar los bonitos cristales azules proteicos, obteniendo la siguiente información, tras correr un gel de poliacrilamida y teñirlo con Coomassie. El título indica los tratamientos realizados a la muestra. Son dos tratamientos realizados por separado a la misma muestra.



D.4) ¿Qué puede decir acerca de la estructura proteica?

Respecto a la estructura proteica podemos decir que existen 2 puentes disulfuro que se reducen por el tratamiento con mercaptoetanol, pero no sabemos cómo se unen. La proteína presente 3 subunidades. Por otra parte, el fragmento de 30 kDa tiene 10 kDa de glicosilación, o bien tanto el fragmento de 30 como el de 25 kDa presentan una glicosilación de 5 kDa, cada uno.

D.5) ¿Se le presenta alguna duda para resolver por completo la estructura? ¿Qué propone para salvar esta dificultad?

Se debería correr un gel desnaturalizante sin mercaptoetanol. Luego tratar la muestra con mercaptoetanol e intentar inferir como se unen las subunidades.

D.6) ¿Qué banda observaría si tiñera el gel de poliacrilamida con un compuesto afín a los carbohidratos?

Veríamos una banda ubicada a 30 kDa o bien una banda de 5 kDa quizás levemente intensa por ser en realidad dos bandas de igual tamaño.

TÉCNICAS EN BIOLOGÍA CELULAR: WESTERN BLOT

Fundamento teórico

Entre las diversas metodologías que nos permiten tener un acercamiento a la Biología celular, la metodología denominada Western Blot es una de las que nos brinda una gran cantidad de información, adaptándose a laboratorios de investigación, así como a laboratorios de diagnóstico médico.

Como hemos visto en apartados anteriores, las proteínas pueden ser convenientemente separadas, en función de sus pesos moleculares, gracias a diversas técnicas electroforéticas. Sin embargo, a veces es necesario constatar la presencia de una proteína en especial. Para cumplir este objetivo conjugamos el poder resolutivo de la electroforesis de poliacrilamida, con la especificidad de un anticuerpo en el reconocimiento de un antígeno proteico.

En líneas generales la aproximación del Western blot nos permite el reconocimiento de una fracción proteica, cuya presencia puede servir para estudiar (por ejemplo) la expresión proteica en un sistema biológico (por ejemplo cultivo celular) o bien está relacionada a antígenos bacterianos o virales. Así la metodología del Western blot es la técnica confirmatoria para el diagnóstico de la infección por el virus HIV.

Las proteínas presentes en un dado extracto son separadas mediante SDS-PAGE. Luego de ello las bandas proteicas del gel son transferidas a una membrana de nitrocelulosa (por capilaridad o bien aplicando un campo eléctrico) y finalmente esta membrana es puesta en contacto con un anticuerpo específico. Dicho anticuerpo reconocerá epitopes presentes en la proteína de interés, y posteriormente será reconocido por otro anticuerpo (anticuerpo secundario, capas de reconocer la porción Fc de las inmunoglobulinas) marcado con alguna molécula que permita luego la detección (por ejemplo biotina-estreptavidina o sistemas quimioluminiscentes) del conjunto.

Algunas nociones sobre marcaje de moléculas

Presentaremos algunos fundamentos acerca del marcaje de moléculas, especialmente anticuerpos, ya que también nos será de utilidad en el apartado de inmunohistoquímica:

A) **Marcadores radiactivos:** es un método muy frecuente en su elección, pero por supuesto se requieren instalaciones adecuadas a estos métodos de marcaje. Distintos isótopos pueden ser utilizados y usualmente la detección se basa en autorradiografía (impresión en una placa similar a la utilizada en las radiografías).

B) **Marcadores no radiactivos:** las distintas moléculas marcadoras pueden emitir señal que pueden ser detectadas por distintos medios, por ejemplo:

1. Espectrofotometría: la molécula marcadora es (o genera) un producto que puede detectarse por la absorción de luz, tanto en el espectro visible como en el ultravioleta.
2. Fluorimetría: se mide la luz emitida como consecuencia de la presencia de grupos fluoróforos.

3. Quimioluminiscencia: se mide la luz emitida como consecuencia de reacciones de este tipo (luciferasa, luminol).

| <i>Marcador</i> | <i>Detección del marcador</i> | <i>Sustrato de la reacción enzimática de detección</i> |
|--------------------|-------------------------------|--|
| Isótopo radiactivo | Autorradiografía | |
| Fluorocromo | Fluorimetría | |
| Peroxidasa | Reacción cromogénica | Tetrametilbencidina Derivados del α -naftol |
| | Reacción fluorogénica | |
| | Quimioluminiscencia | Derivados del dioxetano o de luminol |
| Fosfatasa alcalina | Reacción cromogénica | Azul de nitrotetrazolio |
| | Reacción fluorogénica | |
| | Quimioluminiscencia | Derivados del dioxetano |
| Oro coloidal | Microscopía | |

Grupos indicadores

Los grupos indicadores más comunes son la biotina y la digoxigenina (esteroide de la planta *Digitalis*). Ambos son fácilmente conjugables a otras moléculas: a la estreptavidina y a anticuerpos antidigoxigenina, respectivamente.

La detención de los productos que llevan biotina o digoxigenina se realizan de modo similar a la detección de inmunoensayos comunes.

Desarrollando la metodología del Western Blot

Para llevar adelante este procedimiento de gran utilidad en el reconocimiento específico de fracciones proteicas de interés requeriremos conocer los elementos con que trabajaremos:

1) Muestra: Extracto proteico

El paso fundamental para poder aplicar la tecnología del Western blot es contar con la muestra. Esta muestra estará constituida por el extracto obtenido del sistema bajo estudio. Así por ejemplo puede tratarse de suero humano, si se estudian las proteínas séricas, o bien un lisado viral, procariota o eucariota. Recordemos que esta metodología se aplica de modo extensivo en investigación, por lo que es usual que las muestras sean lisados de cultivos celulares.

2) Cuantificación del extracto

Una vez obtenida la muestra, esta debe ser cuantificada. Es importante conocer la cantidad sembrada en los geles para asegurarnos que podremos luego efectuar comparaciones. Por ejemplo, si estudiamos la expresión proteica en un sistema eucariota, pero sembramos mayor concentración de proteínas en el gel, probablemente al final obtengamos mayor señal. Esta señal mayor no significará aumento de la expresión, sino un artefacto debido a la falta de cuantificación.

Otras veces no es crítica la cuantificación del extracto. De todos modos se recomienda la cuantificación haciendo uso del método de Bradford.

3) SDS-PAGE

Tras la cuantificación del extracto (en caso de ser necesario) se debe realizar una SDS-PAGE según hemos visto en el apartado correspondiente, y con el cuidado de sembrar en cada pocillo la misma cantidad de proteínas.

La electroforesis se detiene cuando el frente de corrida alcance la migración apropiada y se quita el gel del sistema. Posteriormente se equilibra el gel en tampón de transferencia para seguir adelante con el procedimiento.

4) Transferencia

La corrida electroforética (con todas las bandas proteicas separadas) será transferida a una membrana de nitrocelulosa. No observaremos ninguna banda o color en el gel migrado, excepto el del frente de corrida.

Equilibraremos el gel migrado así como papeles de filtro y esponjas delgadas cortadas al tamaño del gel en **Tampón de Transferencia**. Dicho tampón tiene como base al mismo tampón de migración de la SDS-PAGE con el agregado de metanol, que facilitará la transferencia proteica a la nitrocelulosa.

La transferencia puede llevarse a cabo por capilaridad (colocando capas de papeles de filtro y esponjas delgadas en una cuba para que el tampón de transferencia atraviese el gel y deposite las bandas proteicas sobre la membrana, que se encontrará en contacto directo con dicho gel) o bien por la aplicación de un campo eléctrico.

Para la última alternativa dispondremos de un “sándwich” conformado por una esponja delgada, papeles de filtro, el gel migrado, la membrana de nitrocelulosa, papeles de filtro y otra esponja delgada. Se aplicará el campo eléctrico durante 1 hora, tiempo suficiente para que todas las proteínas sean transferidas.

Una finalizada la transferencia el gel puede ser desechado y la membrana es lavada en una solución tampón de lavado.

5) Bloqueo de la membrana

En los siguientes pasos de la metodología utilizaremos un anticuerpo para reconocer cierto epitopes de nuestro interés. Pero antes es necesario bloquear todos los sitios de la membrana que eventualmente provoquen un reconocimiento incorrecto de los anticuerpos.

Para el bloqueo utilizaremos leche descremada al 5% (usualmente preparada en solución tampón de lavado). Se coloca la membrana en un recipiente y se vierte la solución del agente bloqueante. El bloqueo puede llevarse a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente, o bien se puede detener el Western blot en este paso, bloqueando la membrana toda la noche, pero a 4°C (es decir en heladera).

Es útil en este paso contar con un agitador (“shaker”) para asegurar el íntimo contacto del agente bloqueante con todos los posibles puntos de la membrana.

6) Anticuerpo primario

Luego del bloqueo de la membrana, la misma está lista para la adición del anticuerpo primario.

El anticuerpo primario es un anticuerpo dirigido contra la proteína de interés. Las tecnologías difieren pero en general, si se trabaja con muestras de origen humano se necesita un anticuerpo que sea capaz de reconocer proteínas humanas. De este modo se generan anticuerpos monoclonales en ratones, capaces de reconocer proteínas humanas. Queda claro que según la especie donde haya sido producido el anticuerpo primario, será la elección el anticuerpo secundario que utilizaremos (por ejemplo si el anticuerpo primario es generado en ratones, tendremos que utilizar un anticuerpo secundario “anti-ratón” que puede ser producido inoculando un carnero, por ejemplo).

Usualmente las casas comerciales envían un vial concentrado de anticuerpo primario con una concentración recomendada de uso. Sin embargo los anticuerpos primarios adquiridos comercialmente suelen *titularse*. La “titulación” en este caso se refiere a la prueba de distintas concentraciones, con el objeto de conocer cual es la que brinda la mejor y/o mayor señal.

La membrana con la transferencia debe ser bañada en el anticuerpo primario.

El contacto de la membrana con el anticuerpo puede ser de 1 hora a temperatura ambiente, o bien toda la noche (“over nigh”) a 4°C. En general la disminución de la temperatura dificulta la interacción antígeno-anticuerpo, pero mejora los resultados finales.

7) Lavado

Luego del tiempo de exposición de la membrana al anticuerpo primario se procede al lavado de dicha membrana. Se utilizan 4 baños de 10 minutos con solución tampón de lavado.

Luego del lavado la membrana se someterá al anticuerpo secundario.

8) Anticuerpo secundario

Como indicáramos anteriormente es importante conocer la procedencia del anticuerpo primario para la selección del anticuerpo secundario. Con este cuidado se procede a poner en contacto la membrana con la solución de anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente.

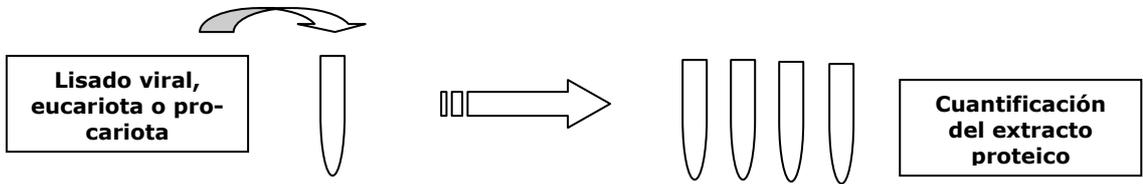
Se procederá a lavar nuevamente la membrana con el objeto de eliminar todo el anticuerpo secundario no unido.

9) Detección y revelado

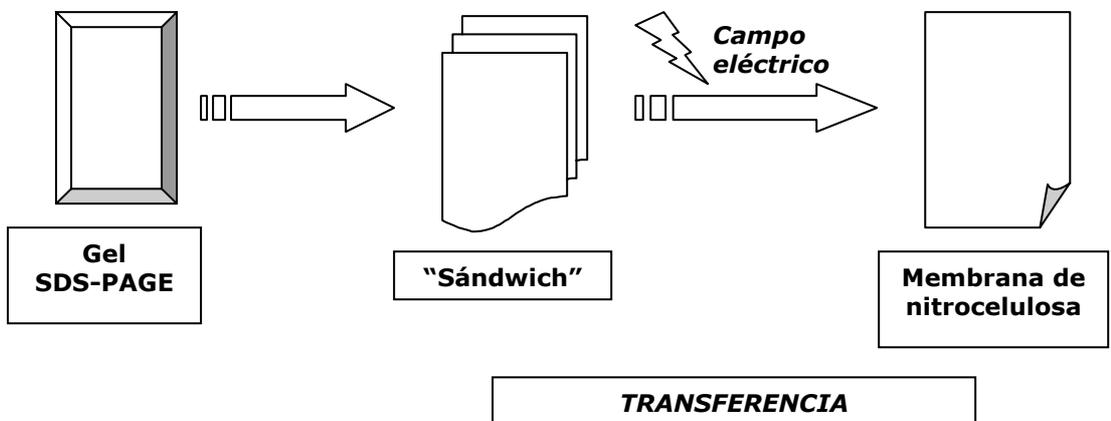
Muchos de los anticuerpos secundarios vienen marcados con moléculas de biotina, la cual presenta gran afinidad por la molécula estreptavidina. A su vez la estreptavidina se halla conjugada a una enzima (por ejemplo peroxidasa) que cuando cuente con su sustrato será capaz de generar un producto insoluble que precipitará en el lugar de reconocimiento.

Otras metodologías de detección se han expuesto en la tabla al inicio del capítulo.

A) Obtención de la muestra y cuantificación del extracto proteico



B) SDS-PAGE y transferencia



C) Aplicación de los anticuerpos 1º y 2º

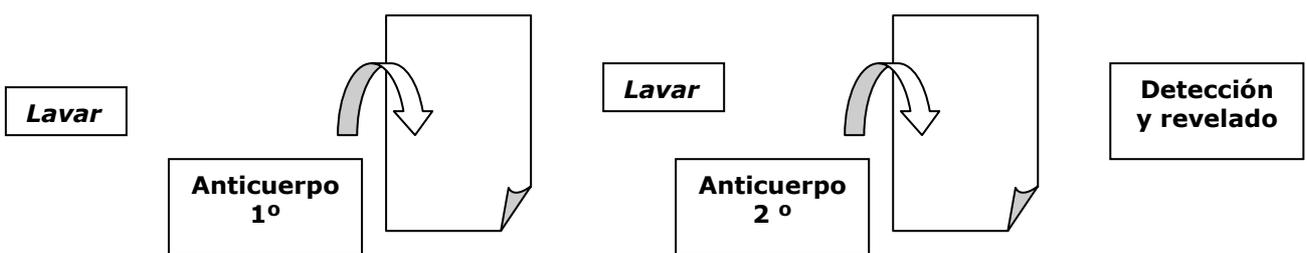


Figura 16: Técnica del Western Blot. La técnica permite la detección proteica basándose en la separación mediante una electroforesis discontinua y el reconocimiento de la proteína por anticuerpos específicos con posterior revelado de la reacción antígeno-anticuerpo.

PROTOCOLO
WESTERN BLOT

EQUIPAMIENTO

Fuente de poder
Cuba para electroforesis vertical
Cuba para transferencia
Bloques de hielo
Sistema de armado de “sandwichs” para transferencia
Membranas de nitrocelulosa
Papeles absorbentes (tipo Whattmann)
Cables de conexión
Matraces capaces de contener los volúmenes de las soluciones
Balanza analítica
Probetas capaces de medir los volúmenes requeridos
Micropipetas automáticas
Puntas (“tips”) azules y amarillas.

REACTIVOS

WESTERN BLOT

Solución de acrilamida 38% (p/v) y metilbisacrilamida 2% (p/v). (Mantener la solución en frío y protegida de la luz).
Persulfato de amonio 10% (p/v).
Tampón del GEL SEPARADOR: Tris-HCl 1,5 M, pH 8.8 y SDS 0,4%
Tampón del GEL CONCENTRADOR: Tris-HCl 0,5 M pH 6.8 y SDS 0,2 %
Tampón de MUESTRA 5 X: Tris-HCl 0,6 M pH 6.8, SDS 6% (p/v); glicerol 30% (v/v); 2-mercaptoetanol 20% (v/v), azul de bromofenol 0,01% (p/v).
SDS 10% (p/v).
N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED).
Tampón de CORRIDA ELECTROFORÉTICA: Tris 0,025 M; glicina 192 mM, pH 8,3; SDS 0,1% (p/v).
Tampón de TRANSFERENCIA: Tris 0,025 M; glicina 192 mM, pH 8,3; SDS 0,1% (p/v); metanol 20%.
Anticuerpo primario contra la proteína de interes (se recomienda de origen monoclonal en ratón) titulado.
Anticuerpo secundario “antiratón” en carnero.
Sistema de detección y revelado.
Tampón de LAVADO 10X: Tris 100 mM; ClNa 1,5M; TWEEN 20 0,1%(1X).

Preparación del gel

1. Ensamblar las placas de acuerdo con las instrucciones del equipo y marcar el límite superior del **gel separador** (aproximadamente 1 cm después de los dientes del peine).

- Preparar 10 mL del **gel separador (10%)** mezclando las soluciones de acuerdo a la tabla. Recordar agregar el persulfato y el TEMED exactamente antes de verter el gel entre las placas (son los catalizadores de la reacción de polimerización). Colocarlos inmediatamente entre las placas con pipeta Pasteur y dejar polimerizar a temperatura ambiente, durante 45 minutos a 1 hora.

| Solución | Volumen | |
|---|----------|--------|
| | 7% | 12% |
| Tampón del GEL SEPARADOR (con SDS al 0,4 %) | 2,5 mL | 2,5 mL |
| Solución acrilamida – bisacrilamida 40% | 1,875 mL | 3 mL |
| Agua | 4,275 mL | 3, 25 |
| Glicerol | 1 mL | 1 mL |
| Persulfato de amonio 10% | 290 µl | 200 µl |
| TEMED | 6 µl | 4 µl |

- Añadir una capa de 2 - 3 mm de etanol 95% o agua destilada sobre la superficie del gel en polimerización.
- Retirar el etanol o agua depositados sobre la superficie del gel separador.
- Preparar 5 mL del **gel concentrador (5%)**.

| Solución | Volumen |
|---|---------|
| Tampón del GEL CONCENTRADOR (con SDS al 0,2%) | 1,23 mL |
| Solución acrilamida-bisacrilamida 40% | 0,56 mL |
| Agua | 2,69 mL |
| Persulfato de amonio 10% | 0,5 mL |
| TEMED | 5 µl |

- Verter el **gel concentrador** e introducir los peines para formar los pocillos.
- Dejar polimerizar durante 45 minutos a 1 hora.

Preparación de la muestra

- Mezclar 1 volumen de la muestra de proteínas con 1/5 de volumen de tampón de muestra.
- Desnaturalizar las proteínas a 100°C (Evitar no sobrepasar los 3 minutos de tiempo, para evitar que los tubos se abran durante el tratamiento, eventualmente se puede colocar una abrazadera para tapas de microtubos que se adquieren de firmas comerciales).
- Colocar las muestras en hielo hasta su utilización.

Cargado y corrida electroforética

- Quitar lentamente los peines.

12. Lavar los pocillos con agua destilada y luego con tampón de electroforesis. Llenar la cuba con el mismo tampón, asegurando cubrir todo el gel, antes de cargar la muestra.
13. Usando una micropipeta automática depositar en los pocillos del gel las muestras, sin exceder el límite de volumen del pocillo (no más de 30 a 35 μ l aproximadamente).
14. Cuando se desee cargar en los pocillos la misma concentración proteica se recomienda el uso del método de Bradford para la cuantificación de proteínas.
15. Desarrollar la electroforesis a 7-10 V/cm. La electroforesis termina cuando el marcador del frente alcance la parte inferior del gel separador.
16. Abrir con cuidado para no romper el gel formado entre las dos placas de cristales que lo contienen.

Transferencia

17. Estabilizar los papeles de filtro y las esponjas en tampón de transferencia durante 10 minutos. Estabilizar el gel luego de la migración en el mismo tampón.
18. Quitar el gel del sistema y dejarlo adherido a uno de los cristales. Observar el sentido de siembra, eliminar la parte del gel que contiene los pocillos y realizar una marca orientativa (por ejemplo, arriba a la derecha, según el sentido de la siembra).
19. Levantar con una espátula ancha el gel y depositarlo en tampón de transferencia.
20. Formar el “sándwich”. Organizarlo del siguiente modo: una parte del sistema de formación del sandwich se ubica hacia el cátodo (polo negativo en general de algún color, por ejemplo negro), a partir de este colocar 1 esponja estabilizada, un par de papeles de filtro estabilizados en tampón de migración, el gel migrado con la marca orientativa, la membrana, papeles de filtro estabilizados y finalmente 1 esponja estabilizada. Cerrar el sistema formador de “sándwich” y colocarlo en la cuba de transferencia. Recordar que las proteínas migrarán hacia el ánodo (el SDS presente en todo el sistema le brinda carga negativa).
21. Ubicar el “sándwich”. Colocar el bloque de hielo en el compartimiento correspondiente.
22. Aplicar el campo eléctrico durante 1 hora a máxima potencia.
23. Al teminar la hora eliminar el “sándwich” y repetir la marca orientativa cortando la esquina de la membrana de nitrocelulosa (ser cuidadoso por que puede tener proteínas transferidas).
24. Lavar en tampón de lavado 10 minutos con agitación

Bloqueo de la membrana

25. Preparar leche descremada al 5% en tampón de lavado.
26. Colocar la solución de leche y la membrana en un recipiente.
27. Utilizar un agitador y permitir el contacto durante 1 hora a temperatura ambiente. En este paso se puede suspender el Western Blot, permitiendo el bloqueo de la membrana durante toda la noche a 4°C.

Lavados

28. Luego del bloqueo quitar la membrana del recipiente y lavarla 1 vez con tampón de lavado durante 10 minutos con agitación. Se recomienda contar con un recipiente con suficiente profundidad como para sumergir la membrana.

Anticuerpo primario

29. Luego del lavado sumergir la membrana en la dilución apropiada de anticuerpo primario, según la proteína de interés.
30. Permitir la interacción antígeno-anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente, o bien 16 horas a 4°C. Se recomienda el uso de un agitador.

Lavados

31. Luego de permitir la interacción antígeno-anticuerpo primario, quitar la membrana del recipiente y lavarla 4 veces con tampón de lavado durante 10 minutos cada lavado. Se recomienda contar con un recipiente con suficiente profundidad como para sumergir la membrana y contar con un agitador.

Anticuerpo secundario

32. Luego del lavado sumergir la membrana en la dilución apropiada de anticuerpo secundario, según el anticuerpo primario utilizado. En general las diluciones de anticuerpo secundario son mucho mayores a las utilizadas en el caso del anticuerpo primario.
33. Permitir la interacción anticuerpo 2°-anticuerpo 1° durante 1 hora a temperatura ambiente. Se recomienda el uso de un agitador.

Lavados

34. Luego de permitir la interacción antígeno-anticuerpo primario, quitar la membrana del recipiente y lavarla 4 veces con tampón de lavado durante 10 minutos cada lavado. Se recomienda contar con un recipiente con suficiente profundidad como para sumergir la membrana y contar con un agitador.

Detección y revelado

35. Según el marcaje presente en el sistema proceder al revelado de la membrana.
36. Registrar los resultados obtenidos.

RECURSOS INFORMÁTICOS EN EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Fundamento teórico

Durante las últimas décadas el gran avance científico y tecnológico llevó a la investigación biológica a las puertas de la Proteómica. Con el Proyecto Genoma Humano concluido y sumado al aporte de Proyectos Genoma de distintos organismos modelos, y el reciente desarrollo de la genómica funcional, se está produciendo una acumulación exponencial de información, la cual se encuentra disponible a través de diferentes bases de datos.

La disponibilidad de información crucial para el desarrollo de nuevos proyectos ha provocado un cambio de paradigma en la investigación biológica y esto demanda profesionales que cuenten con una formación mínima en **Bioinformática** y puedan acceder a utilizar los recursos mencionados.

El acceso a bibliografía especializada, el manejo de modelos moleculares y de programas que permitan el cruzamiento y manejo de la información disponibles de las bases de datos internacionales, son solo algunas de las herramientas imprescindibles para la investigación en biología.

En este sentido el acceso a la base de datos del **National Center for Biotechnology Information (NCBI)**, USA, permite nexos con las principales bases de datos bibliográficas, permitiendo una conexión de alta velocidad y de fácil acceso. Además se puede hacer uso de las herramientas que permiten ubicar secuencias publicadas o descritas en el desarrollo de los diferentes Proyectos Genoma, teniendo acceso a la visualización de dicha ubicación a través de un mapa virtual, el cual facilita además el cruzamiento con otra información disponible, como son las secuencias STS y SNP, además de la posición de otros genes y secuencias disponibles en la base de datos.

Con respecto a la manipulación tendiente a lograr aplicaciones tecnológicas de la información disponible, puede accederse a programas gratuitos que facilitan el análisis de las secuencias en busca de posibles secuencias que sirvan de cebadores o de sondas, y que de esta manera permitan la amplificación o la detección por hibridación de las secuencias de manera experimental. En este sentido el programa **Primer 3** se presenta como herramienta ampliamente conocida y de fácil utilización.

Por otra parte, mediante nexos (*links*) que se presentan en las mismas bases de datos puede accederse a secuencias y modelos cristalinos de diferentes proteínas, cuya estructura ya ha sido dilucidada. De esta manera pueden obtenerse modelos moleculares que pueden analizarse mediante diferentes programas de visualización, de los cuales **RasMol** se ha presentado como una aplicación gratuita, de fácil acceso y manipulación, con un lenguaje sencillo que permite la aplicación en cursos básicos de biología. Este programa permite la visualización de modelos a través de diferentes formas puntualizando la posición de los aminoácidos, lo que se presta para trasladar la información obtenida desde el análisis bibliográfico a la estructura cristalina.

Por otro lado, también se encuentran disponibles modelos que permiten el estudio de interacciones entre diferentes biomoléculas como por ejemplo las interacciones proteínas-proteínas y proteínas-DNA.

Conociendo la Bioinformática

Pubmed: haciendo uso de su poder.

Fundamento Teórico

Existen muchos caminos para iniciar una investigación en Biología Molecular haciendo uso de las herramientas de Bioinformática. Una de las vías más sencillas y lógicas es iniciar la investigación en la búsqueda bibliográfica.

Cuando solo tenemos el nombre de una proteína, o de un gen, o contamos con muy poca información respecto a un tema dado, debemos iniciar una búsqueda de datos. Para ello podemos hacer uso de un recurso de la página del *NCBI (National Center for Biotechnology Information)*: **PUBMED**.

PUBMED representa la biblioteca virtual más importante de la página del *NCBI* (y seguramente una de las más importantes del mundo) y como lo indica su nombre, recopila información acerca de **PUBLICACIONES MEDICAS**, soportado por *NLM (National Library of Medicine)* y de diversas áreas de investigación. Se puede acceder a esta herramienta a través de dos direcciones:

- www.pubmed.com
- www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

Ambas direcciones nos devolverán una pantalla muy sencilla de interpretar, donde se puede observar el logotipo de la herramienta PUBMED.



Figura 17: Pantalla inicial de Pubmed. La porción mostrada pertenece a la página principal de la dirección www.pubmed.com

Para comenzar la búsqueda no hace falta más que indicar (en inglés) el tema de la búsqueda y hacer click en el botón “Go”. En el campo “for” se pueden incluir nombres de proteínas, genes, palabras claves acerca de un tema o bien nombres de autores o revistas.

La siguiente pantalla corresponde a los resultados de la búsqueda. En general, las primeras búsquedas devuelven una gran cantidad de ítems, que si bien pueden ser importantes, tienden a complicar la búsqueda, por lo que lo más útil es delimitar la búsqueda. Para ello debemos hacer click en la pestaña “Limits”, lo que nos devolverá una pantalla que muestra un conjunto de campos que pueden ser completados, limitando los criterios de búsqueda. Estos campos incluyen, entre otros, autor, año de publicación, fecha de publicación, revista donde se halla la publicación y otros.

Por otro lado, es un recurso muy útil depurar la búsqueda según el tipo de publicación que nos interese. Cuando tenemos muy poco conocimiento acerca de un tema dado, lo más conveniente es buscar “Reviews” (revisiones) que consisten en tratados acerca de

un tema en particular que recopilan un conjunto de experimentos o teorías, lo que nos permite tener una comprensión global acerca del tema en cuestión. Otros tipos de publicaciones son los *artículos*, también conocidos como separatas, que versan sobre un experimento dado o una teoría en particular, por lo que se debe tener conocimiento previo acerca del tema aludido. El término más general es un término en inglés: “*paper*”.

Como primer paso siempre es bueno tener un conocimiento global acerca de lo que nos interesa por lo que se suele optar por limitar la búsqueda bibliográfica, inicialmente a revisiones.

Las búsquedas de bibliografía se facilitan bastante si contamos con los nombres de autores, fechas y revistas de publicación. En ocasiones nos interesará conocer los artículos originales de los que se valió un autor dado para escribir su libro, por lo que podemos recurrir a la *Bibliografía* recomendada al final de cada capítulo para luego acceder a la versión digital de dicha información.

PRÁCTICA

En esta práctica buscaremos información acerca de un tema propuesto por el profesor a cargo y limitaremos la búsqueda a revisiones.

a) Ingresa a la herramienta de búsqueda bibliográfica **PUBMED** (www.pubmed.com o bien www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). En el campo “*Search for*” ingresa (en inglés) la palabra clave, nombre de proteína, gen o autor propuesto. Has click en “*Go*”. Seguramente obtendrás un gran número de ítems.

b) Limita la búsqueda haciendo click en la pestaña “*Limits*” e indica que el tipo de publicación de interés sean las revisiones (“*Reviews*”).

c) La pantalla te devolverá las revisiones, apareciendo el título o bien los autores en color azul y subrayado, lo que indica que son *links* (eslabones o hipervínculos) que puedes recorrer simplemente haciendo click. Lamentablemente la mayoría de las publicaciones no están disponibles gratuitamente, por lo que quizás solo encontrarás acceso al resumen de la publicación.

Sin embargo no tenemos que desanimarnos, ya que revistas muy prestigiosas en el mundo son gratuitas, tal es el caso de los **Processings of the National Academy of Science (PNAS)** de Estados Unidos. En la actualidad, todas las bases de datos internacionales tienen convenios que les permiten entrecruzar la información entre ellas, por lo que usualmente podemos encontrar revisiones y artículos que se encuentran disponibles gratuitamente. Con solo hacer click en el vínculo (*link*) “**Full text (PDF)**” tenemos acceso a la versión **PDF** (formato de archivos del software **Acrobat Reader**), lo que nos permitirá almacenar la revisión o artículo en un disquete o bien en el disco rígido de nuestra computadora.

A pesar de las múltiples opciones que brinda esta herramienta, en pos de la sencillez de esta guía, te dejaremos a ti la posibilidad de explorarla. Hasta aquí has aprendido lo básico de una búsqueda bibliográfica, y suele ser suficiente para iniciar una investigación, a partir de datos mínimos.

Es importante recordar que todas las herramientas que presenta la página del *NCBI* se encuentran profusamente vinculadas entre sí, por lo que podemos fácilmente pasar de una herramienta a otra. Cuando conozcas el uso de todas ellas, será más fácil el desarrollo de una búsqueda, ya que no tendrás que (necesariamente) seguir pasos rígidos de protocolos informáticos.

Human Map Viewer : el visor de mapas

Fundamento Teórico

Podemos acceder al *Human Map Viewer* desde la página del *NCBI*. Siguiendo el hipervínculo en la columna a la derecha, se puede ver la página de inicio del *Map Viewer*.

Nuevamente, en vías de la sencillez de esta guía, haremos una búsqueda básica. En el campo “**Search**” de la página de inicio de *Map Viewer*, seleccionaremos “*Homo sapiens (human)*”, del menú desplegable que constituye una lista de organismos acerca de los cuales se tiene información completa en el base del *NCBI*. El campo “**for**” nos permite indicar el objeto de nuestra búsqueda: puede incluir el nombre o símbolo de un gen, el nombre de un marcador o de una enfermedad (**re-cuerda ingresar los términos en inglés**). Luego de esto, has click en “**Go!**”.

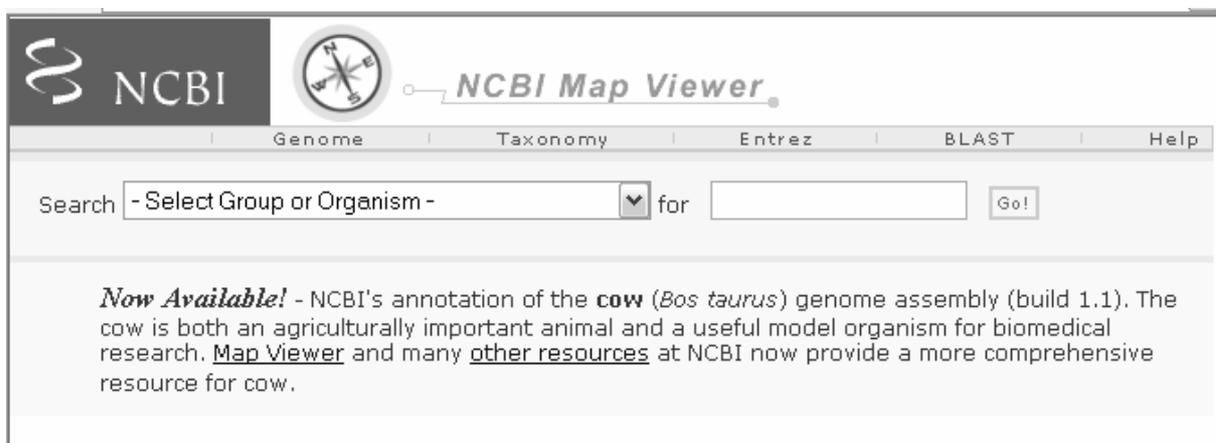


Figura 18: Página de inicio de *Map Viewer*

Map Viewer nos devolverá una pantalla donde se indicarán de un modo muy gráfico, el número de “**hits**” (que corresponde al número de ítems encontrados según nuestro criterio de búsqueda) y en que cromosomas se encuentran. Debajo del diagrama se encuentra una sencilla tabla donde se resumen los ítems hallados. La utilidad de esta tabla radica en que nos indica en que tipo de mapas se encuentran mapeados los ítems que buscamos.

Por otro lado, en esta tabla encontraremos una clave constituida por letras (en general son dos) y números. Esta clave es el número de acceso de GenBank.

¿Qué es GenBank?

GenBank surgió en la década de los 80's como una fuente primaria que recogía las secuencias nucleotídicas. Sin embargo, actualmente se puede obtener mucho más que la mera secuencia a partir de un número de secuencia de GenBank. Además, con la herramienta GenBank Full, se han ampliado las posibilidades de búsqueda, ya que se puede contar rápidamente con un resumen técnico muy útil y completo acerca del ítem deseado.

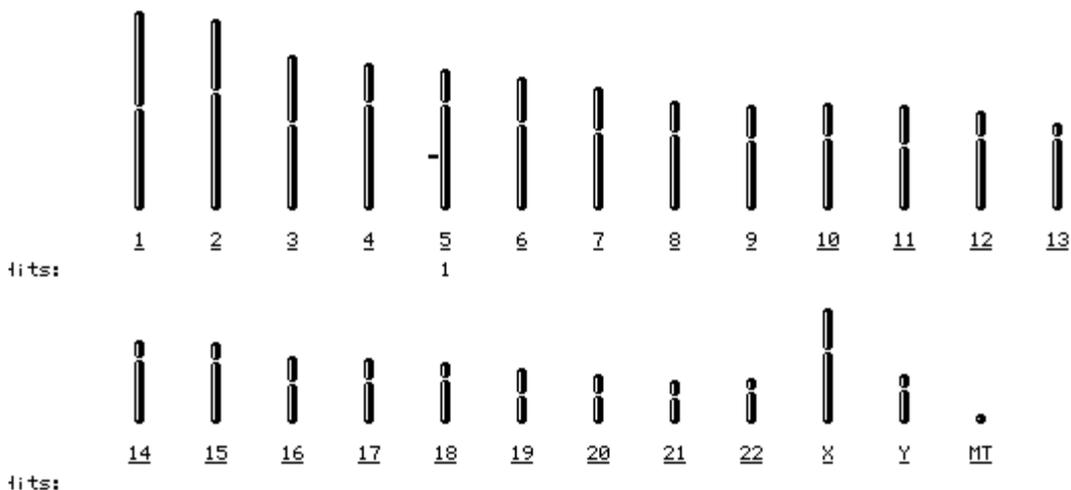
Desde los laboratorios de investigación, clonación y secuenciación de todo el mundo, cada elemento secuenciado es ingresado a GenBank y le es asignada una clave que lo distingue. Esta clave es única para cada secuencia y lamentablemente no guarda mucha relación con el elemento al cual es asignada, por lo cual es conveniente tenerla registrada si se hace uso de dicha clave en, por ejemplo, un proyecto de investigación. Constantemente, desde la administración de GenBank (que depende del *National Center for Biotechnology Information*) se realizan esfuerzos por depurar las bases de datos especialmente de secuencias repetidas y por otro lado, los grandes portales de bioinformática (como NCBI, EMBL, DDBJ y EBI) se encuentran vinculados entre sí, por lo que se puede entrecruzar información fácilmente entre ellos.

La siguiente es la segunda pantalla que nos devolverá *Map Viewer*.

Homo sapiens genome view

B

Build 35.1 statistics



■ Search results for query "AJ223013": 1 hit

En este caso se muestra un gráfico de los 22 cromosomas humanos, más los cromosomas X e Y y el genoma mitocondrial (MT), indicándose con una marca roja el número de resultados hallados ("*hits*").

Debajo del gráfico se encuentra la tabla, a la que nos referíamos anteriormente, donde se indican los tipos de mapas (que contienen nuestro objeto de búsqueda) y a los que se puede tener acceso simplemente haciendo click sobre el vínculo "*Map*

element”. Un mismo elemento puede estar mapeado en diferentes tipos de mapas. En este último caso, en la última columna aparecerán varios hipervínculos. Observaremos luego de hacer click sobre un hipervínculo de mapa, una pantalla que nos indicará gráficamente el mapa. Esta tercera pantalla de *Map Viewer* entrega bastante información, y en realidad es cuestión de recorrerla. Para ello indicaremos algunos datos útiles:

- En las primeras líneas de la pantalla tenemos información acerca de la posición del elemento (por ejemplo cromosoma en el que se ubica).
- Hacia la izquierda de la pantalla tenemos un práctico ideograma que nos muestra en que banda del cromosoma nos encontramos y la región que corresponde. Encima del mismo se indica la posición que se observa en el gráfico del mapa.
- En la siguiente línea se nos indica cual es el **Mapa Maestro** (“*Master Map*”). Este “*Maestro Maestro o Master Map*” es que el se presenta de modo predefinido siempre con los mayores detalles. Por otra parte, el **Mapa Maestro** siempre se mostrará gráficamente como el último mapa hacia la derecha. Según nuestros intereses, quedará en nuestras manos cambiar el **Mapa Maestro** por otro que se ajuste a nuestro criterio de búsqueda.
- La línea que se ubica exactamente encima de los mapas indica el nombre de cada mapa. Muchos de estos mapas tienen nombres que intuitivamente nos permiten reconocer de que tipo se trata, por ejemplo para ítems que se encuentran descritos y localizados utilizando un mapa citogenético, el nombre de dicho mapa es GENES_CYTO. Otros nombres de mapas son menos indicativos de sus características. (Por ejemplo el término dbSNP se refiere a la base de datos de Polimorfismos de Nucleótidos Simples).
- Finalmente debajo del gráfico de estos mapas se encuentra un práctico resumen de cada mapa donde se indican la región mostrada, los genes encontrados en dicha región o bien los genes encontrados en todo el cromosoma. La información de este resumen dependerá, obviamente, de los tipos de mapas de que dispongamos.

Sin embargo, podemos seguir obteniendo mucha más información desde el *Map Viewer*. Para ello podemos hacer click en el vínculo “*Maps & Options*” que se encuentra en el extremo superior derecho de esta pantalla. Se nos desplegará una nueva ventana que permite un gran número de opciones. Entre otras funciones nos permite, por ejemplo, cambiar la región mostrada, y agregar (o quitar) mapas.

En la columna de la izquierda, bajo el campo “*Available maps*” (“*Mapas disponibles*”) se encuentran los mapas disponibles y que pueden utilizarse, mientras que en la columna de la derecha se listan los *Mapas Mostrados* (“*Maps Displayed*”). Para agregar un mapa tenemos que hacer click sobre el nombre de un mapa del campo “*Available maps*” y luego hacer click en el botón “*ADD*”. Para quitar un mapa tenemos que hacer click sobre el mapa no deseado en el campo “*Maps Displayed*” y luego hacer click en el botón “*REMOVE*”.

Por otra parte, si deseamos conocer con mayor detalle un mapa dado podemos seleccionarlo en el campo “*Maps displayed*” y hacer click sobre el botón “*Make*

Master”, lo que convertirá al mapa seleccionado en el mapa maestro y nos entregará todos los detalles disponibles.

Recordemos que para que todos estos cambios tengan efecto tenemos que hacer click sobre el botón “APPLY” que se encuentra en el extremo inferior izquierdo de la ventana.

Un ejemplo

Un tipo de mapa muy útil es el denominado GENES_SEQ el cual grafica la organización de intrones/exones de los genes y se crea por alineamiento del mRNA de los genes dados, con el genoma. Cuando se lo convierte en mapa maestro (**“Maps&Options”, “Make Master”**), se observan *links* a la derecha del símbolo (clave) de los genes. Estos links apuntan a obtener información adicional sobre el gen dado.

- **“sv”**, o **Sequence Viewer**, muestra la posición del gen en el contexto genómico, incluyendo la secuencia nucleotídica y las proteínas codificadas.
- **“ev”** o **Evidence Viewer**, brinda a los usuarios la evidencia biológica que apoya a un modelo génico en particular. Además este *link* nos permite conocer todos los mRNAs descritos y también las **EST’s** (*expressed sequence tags*).
- **“hm”** es un link al **Mapa de Homología Humano-Ratón** del *NCBI*, mostrando secuencias genómicas con homología predicha entre genomas de humano y de ratón.
- **“seq”** permite a los usuarios obtener la secuencia genómica de la región en formato de texto.
- **“mm”** es un link al **Model Maker**, un programa que permite a los usuarios crear sus propios modelos génicos seleccionando exones individuales.

Con esta guía sencilla, deberás recorrer la página ya que brinda mucha información, profusamente vinculada con todas las herramientas que ofrece la página y con otras bases de datos internacionales.

Por otro lado, con estas indicaciones deberíamos ser capaces de cumplir lo siguiente:

PRÁCTICA

Con la proteína o gen propuesto por el profesor:

a) *Localiza en que cromosoma se encuentra, y fijate cual es el número de vínculos que hallas para un ítem dado de búsqueda.*

Deberás entrar a la página de inicio de *Map Viewer* seleccionar **“Homo sapiens (human)”** como organismo y en el campo **“for”** indicar la búsqueda.

b) *Cambia los mapas presentados, con el objeto de encontrar STS’s, SNP’s y STR’s en la región mostrada.*

Has click en el opción **“Maps & Options”** y selecciona los mapas de STS (STS o bien UniSTS), SNP (dbSNP’s) y el de STR’s. Has click en **“ADD”** y luego obser-

va gráficamente que marcadores encuentras cercanos al gen buscado. Cada uno de los marcadores aparecerá como un hipervínculo al que puedes tener acceso haciendo click sobre el mismo, para acceder a mucha mayor información sobre el mismo.

c) Encuentra información general acerca del gen de interés.

Una vía para encontrar mucha información y de un modo muy rápido es haciendo click sobre el nombre o símbolo del gen en cuestión. Esto nos devolverá una pantalla muy completa, donde podrás obtener datos acerca de las características generales del gen, bibliografía, marcadores (como STS y otros). Otra información muy importante es la secuencia de los mRNA's, profusamente vinculados a otras herramientas en la página del *NCBI*.

d) Selecciona un exón del gen y copia su secuencia, para luego diseñar primers para su amplificación.

Para ello ve a "**Maps & Options**" y has **Mapa Maestro** (botón "**Make Master**") al mapa GENES_SEQ (puedes elegir otros mapas si así lo deseas, lo importante es ver en detalle la opción "**ev**"). Has click sobre la opción "**ev**" que se encuentra en la fila a la derecha del gen de interés.

Esto te devolverá una pantalla ("**Evidence Viewer**") que te indicará muchos datos acerca de los diferentes mRNA's descriptos y la densidad de EST's utilizando un práctico código de colores. Luego se presenta una versión gráfica de la información mostrada y más abajo se indica el número de exones.

Supongamos que tiene varios exones y deseamos seleccionar una parte del exón 1 para luego diseñar *primers* para amplificar esta porción. Para ello debemos seguir en esta página, hasta encontrar la descripción del exón 1, debajo del cual se nos entregará la clave de acceso y su extensión (si está descripto utilizando un mapa de contigios la clave se iniciará con NM_ seguido de un número y al lado la extensión en el mapa de contigios). Copiaremos esta información, y volviendo a la página inicial del *NCBI* indicaremos: **Search NUCLEOTIDE for** (clave de acceso hallada) click en **GO!** (o directamente presionar *enter*). Luego haremos click sobre el vínculo entregado lo que nos devolverá una nueva pantalla con descripciones del exón. En esta nueva pantalla encontraremos un campo denominado **Range from** (debemos colocar el primer número hallado al lado de la clave para el exón obtenida en "**Evidence Viewer**") **to** (colocaremos el segundo número): estamos limitando la secuencia al exón elegido únicamente. Luego, al lado del botón **Display** seleccionaremos **FASTA** (que es un formato que nos permite obtener las secuencias nucleotídicas representadas por las cuatro letras: A, G, C y T) y finalmente presionar "**Display**". Así obtendremos la secuencia del exón seleccionado en formato **FASTA** que se puede copiar (simplemente puedes seleccionar "pintando" con el ratón la secuencia del exón de interés y darle "**Copiar**" desde el menú "**Edición**" de la barra del **Explorador de Internet**) y luego pegar en programas de análisis de *primers*, por ejemplo **Primer3** que luego explicaremos.

Sin dudas el *Map Viewer* nos permite un gran número de acciones, y nos vincula a una gran cantidad de información, pero quedará a deseo de los lectores continuar profundizando en las utilidades de esta herramienta. Para ello se cuentan con revisiones muy completas en bioinformática y con tutoriales en la propia página del *NCBI*.

Diseñando y analizando primers

Fundamento Teórico

Como sabemos, la **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)** es una técnica revolucionaria para la Biología Celular y Molecular. Después de su desarrollo en la década de los 80's, se ha convertido en una de las técnicas básicas de investigación biológica, ampliamente utilizada debido a su rapidez, especificidad y flexibilidad. Entre sus aplicaciones generales encontramos la generación de sondas, clonación, secuenciación, diagnóstico clínico y tipificación de individuos y microorganismos, siendo entonces muy utilizada en medicina forense y en estudios filogenéticos y poblacionales.

Como la PCR es una herramienta de suma importancia, a la que suelen desembarcar muchas investigaciones, es necesario conocerla y disponerse a utilizarla en cada momento que ello sea necesario. Aunque siempre tenemos que poner a punto una reacción de PCR antes de hacer uso extensivo de ella, uno de los pasos fundamentales es contar con los "*primers*" y con las características de los mismos. Esto nos permitirá sortear exitosamente uno de los pasos primordiales para obtener la mejor calidad y cantidad de producto de amplificación.

Surge entonces la pregunta: si no existen *primers* descritos para amplificar una región dada... ¿cómo los podemos diseñar y analizar? Sin dudas, tendremos que recurrir a los recursos informáticos básicos, muchos de los cuales se encuentran gratuitamente en Internet.

Para diseñar y analizar un par de *primers* para ser usados en una reacción de PCR contamos con varios programas. En esta sencilla guía introductoria, haremos uso de uno denominado **Primer3**.

El programa **Primer3** está soportado económica y tecnológicamente por el *Howard Hughes Medical Institute and National Institutes of Health, National Human Genome Research Institute*). Es un programa gratuito (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) y además se encuentra disponible (también gratuitamente) su lenguaje de programación.

Este software permite especificar un gran número de variables y obtener *primers* según las indicaciones solicitadas. Además permite agregar el número de acceso de la secuencia, que se halla en las bases de datos internacionales. También permite discriminar las regiones de la secuencia que se deben incluir, las que se deben excluir y el rango de tamaños del producto. Por otra parte, el software incluye la posibilidad de especificar las características mínimas de los *primers* deseados, como Tm, porcentaje de GC, máxima autocomplementariedad, y otros parámetros. También presenta las mismas facilidades si se está buscando y analizando una sonda, por ejemplo, para utilizarse en trabajos de hibridación.

La página principal del programa consiste en un gran recuadro en blanco, en donde debemos "pegar" la secuencia en formato FASTA. Anteriormente vimos como podíamos bajar una secuencia y copiarla, entonces en este momento necesitaremos "pegarla" en este recuadro. Debemos asegurarnos de que no existan espacios en blanco tras haber pegado la secuencia de interés.

Exactamente debajo de este recuadro, se encuentran 3 columnas con cuadros de marca () que nos permiten seleccionar que es lo que deseamos obtener como salida del programa. Tildando (click) en los cuadros de marca de las columnas

externas se obtienen cebadores, y tildando solo la columna del centro se obtiene como salida una sonda.

Aunque a primera vista la cantidad de opciones que ofrece el software es abrumadora, se cuenta con claras referencias al lado de cada una de las mismas, por lo que bastará prestar un poco de atención para comprender cual es su significado. Como indicamos anteriormente en vistas de la sencillez de esta guía, nos centraremos en algunos puntos:

- Luego de pegar la secuencia de interés, tildaremos las columnas externas para obtener un par de *primers*, o bien la columna interna si nos interesa obtener una sonda.
- También podemos especificar el rango de tamaños esperado para el producto deseado. En general se permite que **Primer3** coloque predeterminadamente la cifra o bien se seleccionan varios rangos de tamaño de producto. También se puede seleccionar el rango específico si contamos con datos que nos permitan conocer el tamaño del producto que buscamos amplificar.
- Luego, siguiendo con la barra de navegación o de scroll hacia abajo, nos encontraremos con una sección denominada “**General Primer Picking Conditions**”, (o **Condiciones Generales de Obtención de Primers**), donde podremos especificar algunos ítems muy importantes: tamaño del *primer* (mínimo, óptimo y máximo), Tm del *primer* (mínima, óptima y máxima), porcentaje de GC (mínimo, óptimo y máximo).
- Para poder obtener los *primers* (o sonda) debemos hacer click en el botón “Pick *primers*”.

Existen otros campos para completar, pero a los fines de esta guía se reservan a la curiosidad del lector (que encontrará instructivos muy sencillos en la propia página web). El resto de los campos se podrán observar utilizando la barra de scroll.

Los resultados se presentarán en una tabla, cuyo título es “**Primer3 Output**” (“**Salida de Primer3**”). Los datos que entrega la tabla se presentan en 7 columnas con 2 filas que corresponden a cada uno de los *primers* (*left*-izquierdo; *right*-derecho):

“*start*” indica la posición del nucleótido en donde se inicia la secuencia del cebador.

“*len*” indica la longitud en pares de bases de cada uno de los *primers*.

“*tm*” indica la temperatura de fusión de los *primers*, en °C.

“*gc%*” indica el porcentaje de GC.

“*seq*” presenta la secuencia de los *primers*.

Se presentan además 2 columnas cuyo significado es más complejo:

“**3**”: “**Máxima Complementariedad 3**” (o también denominado Alineamiento Global Anclado en 3’) es un puntaje máximo permisible cuando se testea la com-

plementariedad entre los *primers* izquierdo y derecho. **Se toma para predecir la probabilidad de generación de dímeros de *primers* durante la reacción de PCR.**

Por ejemplo:

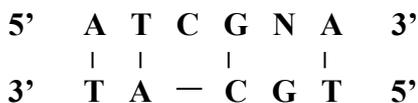


El puntaje de este alineamiento es 7. El puntaje es siempre positivo y un valor de 0 indica que no existe alineamiento global razonable anclado en 3'.

“ANY”: Complementariedad Máxima (o también denominada Autocomplementariedad Local): refleja el máximo alineamiento local permisible. **Se toma como predictora de la tendencia de los *primers* a hibridar entre ellos.**

Cuando se analiza un par de *primers* el sistema de puntuación que presenta **Primer 3**, entrega 1 punto por cada base complementaria, resta 0,25 puntos por una unión de cualquier base (también indicada como N) con otra base dada (N), resta 1 punto por cada error y resta 2 puntos por cada lugar vacío. Solo espacios vacíos de pares de bases simples son permitidos.

Por ejemplo:



es permitido y presenta un valor de 1.75. El puntaje siempre es positivo, y un puntaje de 0 indica que no hay alineamiento local razonable entre los dos *primers*.

Debajo de la tabla principal, el programa Primer 3 suele entregar otras opciones como posibles pares de *primers* cuyas características se ajustan con menor eficacia a las indicaciones inicialmente entregadas por el usuario. Eventualmente pueden llegar a transformarse en opciones útiles, por lo que se recomienda resguardarlas.

PRÁCTICA

Con lo indicado debemos ser capaces de poder diseñar y analizar las características mínimas de un par de *primers*.

a) Debes tener la secuencia de interés (en apartados anteriores describimos como hacer para conseguirla) en formato FASTA. Luego ingresa al programa **Primer3** (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Si no cuentas con la secuencia, es útil que cuentes con la clave de acceso correspondiente a la secuencia de interés.

b) Pega la secuencia en el recuadro en blanco y asegúrate de que no hayan quedado espacios en blanco.

c) Asegúrate además de tener tildados los recuadros de opción que se presentan bajo el recuadro de secuencias. Si tildas los recuadros de los extremos, el resultado entregado será un par de *primers*; si tildas el recuadro del centro, el resultado entregado será una sonda.

d) Por otro lado procede a completar algunos campos de interés:

“Product size ranges”: rangos de tamaño de producto.

“Primer size”: tamaño de *primers*.

“Primer tm”: Tm del primer.

“Primer GC%”: porcentaje de GC en el primer.

Para el caso de las sondas se deben completar campos muy similares bajo el apartado **“Hyb Oligo (Internal Oligos) General Conditions”** (lo encontrarás utilizando la barra de scroll, hacia abajo de la pantalla).

e) Para obtener la secuencia de los *primers* (o sonda) has click en el botón **“Pick Primers”**, que se encuentra o bien bajo el recuadro en donde has pegado la secuencia o bien bajo el apartado de **“Oligos Internos”**.

f) Analiza las características de los oligos obtenidos. Ante cualquier duda puedes acceder a los documentos de ayuda del programa.

Programas de Visualización Molecular :

RasMol un recurso muy apropiado

Fundamento teórico

Sin dudas, uno de los mayores retos para el estudio de la Biología Celular y Molecular es poder visualizar las estructuras que tanto estudiamos. Es complicado imaginarse estructuras tan diminutas (y tan importantes) pero como estas están sujetas a diversas leyes estructurales, su forma puede ser presentada utilizando lenguajes informáticos. Sin embargo, la generación de estructuras tridimensionales es un proceso bastante complejo, tanto desde el punto de vista de la investigación básica (tendiente a dilucidar estructuras), como desde el punto de vista del poder de proceso informático de las computadoras con que contamos.

En la actualidad, la generación de modelos informáticos tridimensionales es un recurso que encuentra utilidad en el diseño de medicamentos, estudios de interacciones entre diversas biomoléculas, etc. Varias revistas se encargan de publicar y recopilar los avances logrados con *softwares* cada vez más poderosos y con mayor utilidad para usuarios relativamente poco entrenados.

Hace unas décadas nos hubiera sido imposible imaginar que sería posible diseñar tridimensionalmente un receptor celular, delineando finamente todas sus características, y con este modelo crear medicamentos a medida, para uso o investigación. Lo más improbable en realidad hubiera sido que esta información pudiera estar a mano de cualquier persona con mínimos conocimientos en el tema, presentadas de un modo tan claro.

Por otro lado, por ejemplo las interacciones entre el DNA y las proteínas (tan importantes en la mayoría de los procesos estudiados en la biología molecular) se pueden resolver a escala atómica y molecular utilizando recursos bioinformáticos sencillos y disponibles gratuitamente en Internet.

A veces le resultará más interesante al investigador o al estudiante simplemente hacerse la idea de la proteína o de la estructura molecular con la que trabaja (o planea trabajar) o a la que le dedica tanto tiempo estudiando ¡por lo que es sumamente agradable “conocerla cara a cara”!

Uno de los recursos más simples que se pueden hallar gratuitamente es el programa **RasMol**, un programa fácil pero a la vez sofisticado para visualizar estructuras moleculares, creado por Roger Sayle en 1992, en continua actualización por la comunidad científica internacional.

Características generales de RasMol

Abrir un fichero: para tener acceso a alguna estructura tenemos que tenerla guardada en el disco rígido bajo el formato PDB (de “*protein data base*”). (**FILE – OPEN**). Una vez abierto el fichero, la imagen estará en el centro.

Rotación de la molécula: utilizando el ratón, puedes mover la molécula tanto en el eje X como en el Y. Si mantienes presionado el botón izquierdo, el movimiento se produce en los dos ejes simultáneamente.

Identificación de átomos y residuos: RasMol permite al usuario situarse sobre cualquier objeto que se observe en la pantalla. **RasMol Command Line (Línea de Comandos de RasMol)** indicará el nombre de los átomos o residuos y su posición.

Cambio de aspecto de la molécula: a través del menú **Display** se puede cambiar el aspecto de la estructura.

Display - Wireframe: estructuras de alambre.

Display - Sticks: los mismos alambres, pero un poco más gruesos.

Display - Backbone: muestra simplemente el esqueleto de la molécula.

Display - Spacefill: sirve para mostrar el espacio que ocuparía realmente la molécula ya que cada átomo se representa como una esfera. Como suele presentarse un aspecto (a veces) complicado de observar, se suele optar por **Display - Ball & Sticks** que muestra la estructura utilizando “bolitas” y “palillos”.

Una representación muy útil para las estructuras secundarias de las proteínas es **Display - Ribbon**. La opción **Display - Strands** es una representación similar a la de Ribbons pero en lugar de presentar superficies sólidas, presenta una serie de finas líneas paralelas que siguen el esqueleto de la molécula.

Para conseguir la representación que deseamos hay que saber que las órdenes dadas a través de los menús cambian la representación de la molécula en la pantalla, mientras que las órdenes tecleadas en la ventana de comandos superponen la representación deseada a la ya preexistente.

Variación de los colores presentados predeterminadamente: RasMol permite cambiar los colores a las moléculas o a parte de ellas. Los colores por defecto son gris para C, azul para N, y rojo para O y P. Los H no se suelen pintar. Este esquema es el de Corey, Pauling y Koltin (CPK).

Menú **Colours:**

Colours - Group: colorea cada residuo de la cadena de acuerdo a su posición dentro de la misma.

Colours - Shapely: coloreará cada residuo con un color específico según las propiedades de cada residuo.

Colours - Chain: se consigue ver cuantas cadenas distintas hay en la imagen.

Colours - Structures: permite visualizar las estructuras secundarias presentes.

También se puede colorear homogéneamente una molécula desde la ventana de comandos: escribiendo *color white* toda la molécula se pone en color blanco. Si escribes *color cpk* todo vuelve a los patrones por defecto.

PRÁCTICA

En esta práctica vamos a realizar un análisis básico de la hemoglobina. La estructura tridimensional de la hemoglobina fue determinada por Perutz, y esta investigación se inició en 1936, cuando Perutz inicia su tesis doctoral en Inglaterra. En esa época la mayor estructura tridimensional resuelta era la de la ftalocianina, un pig-

mento de 58 átomos. Perutz se propuso resolver una estructura cientos de veces mayor. Finalmente, en 1959, Perutz obtiene una imagen de densidad electrónica a baja resolución de esta proteína, estudiando la oxihemoglobina de caballo. Sin dudas, nuestro estudio será más sencillo, ya que actualmente tenemos la estructura de la hemoglobina en un formato tridimensional de computación.

Para iniciar el estudio de esta importante proteína, vamos a abrir un fichero: el archivo **hemobio.pdb**:

FILE-OPEN.

Este fichero contiene la estructura de la hemoglobina, la proteína de transporte de oxígeno más importante en humanos.

INICIANDO EL ANÁLISIS

Como la molécula es muy compleja, asegúrate de tener inicialmente seleccionada la opción **Display – Wireframe**.

La hemoglobina es una estructura tetramérica, por ello para observar sus cuatro subunidades selecciona **Colours – Chain**.

Los grupos hemo se ubican en una especie de “bolsillos” u oquedades generados por la estructura proteica. Veamos ahora como están dispuestos los grupos **hemo**:

Rasmol> reset (elimina selecciones y modificaciones anteriores).

Rasmol> select not protein y se seleccionarán 299 átomos, para verlos mejor puedes ejecutar **Display - Spacefill**. Lo que se ha hecho es quitar de la presentación de la molécula a todas las cadenas proteicas, por lo que se han ilustrado los que quedan, esencialmente los grupos hemo y las moléculas de agua presentes.

Podrás observar mucho mejor la posición de los grupos hemo, pero también están presentes las moléculas de agua. Posiciónate sobre un átomo diferente a los del grupo hemo y confirma que se trata de moléculas de agua.

Cuando lo hagas observarás, por ejemplo:

Atom: O 0 Hetero: HOH 121

Para que podamos ver mucho mejor los grupos hemo, debemos quitar las moléculas de agua presente, para hacerlo ejecuta:

Rasmol> restrict not water (ocultará todo lo seleccionado que no sea agua).

Haciendo click sobre los átomos sabremos de cuales se trata.

Como sabemos, el átomo protagonista del grupo hemo es el hierro. Podemos seleccionarlo para destacar su posición central. Ejecuta:

Rasmol> select iron

Display-Spacefill

Posicionándote sobre cualquier átomo de hierro podrás saber a que cadena pertenece.

Otro modo mucho más sencillo es:

Rasmol> restrict hem

Display - Sticks

SELECCIONANDO PARTES DE LA MOLÉCULA

Se pueden seleccionar la proteína (*protein*), el DNA (*dna*), las moléculas de agua (*water*), cada aminoácido por su nombre y los cationes (“*Cd*”) y ligandos (*ligands*). Algunas palabras claves para seleccionar porciones interesantes de la molécula son:

| Proteínas | Ácidos Nucleicos | Comunes |
|--|---------------------------------------|--|
| Acidic, alpha, acyclic, amino, aliphatic, cystine, helix, aromatic, Basic, charged, sidechain, cyclic, sheet(s) turn, hydrophobic, surface, neutral, polar | Purine, pyrimidine, nucleic, rna, dna | Backbone, bonded, hydrogen, selected, ions, hetero, ligand, solvent. |

Para seleccionar todos los átomos de la cadena A y mostrarla en modelo de bolas hay que proceder según:

Rasmol> reset

*Rasmol> select *: A*

Display-Spacefill

Para seleccionar la cadena B y ponerla en cintas:

*Rasmol> select *:B*

Display-Ribbon

Incluso podemos hacer:

*Rasmol> select *D*

Display- Ball & Stick

CARACTERÍSTICAS DE LA MOLÉCULA

Rasmol> reset

Edit Select all

Rasmol> color magenta

Display-Cartoons

Colours -Structure (se observa bien donde están los residuos hidrofóbicos).

Rasmol> select not polar

Rasmol> color green

Así podrás observar que los residuos apolares se distribuyen especialmente en el centro, y la superficie presenta los residuos polares. Para aclarar aún más esta situación, veamos:

Rasmol> reset

Edit – Select all

Display – Spacefill

Rasmol> select charged or polar

Rasmol> color red

Options – Slab Mode

ESTRUCTURAS SECUNDARIAS

Para localizar las hélices α , las hojas β y las regiones sin estructura, vamos a ver:

Rasmol> reset

Edit-Select All (se puede escribir también *select **).

Rasmol> select all

Display-Backbone

Colours-structure (solo aparecerán trozos en rojo y gris).

PUENTES DE HIDRÓGENO Y DISULFUROS

Rasmol> reset

Edit- Select all

Display-wireframe (si no es así, no se elimina lo que no interesa).

Colours-Structure

Rasmol> restrict helix (solo se verán las hélices α).

Rasmol> centre selected (la selección estará en el centro).

Display-Backbone

Rasmol> hbond 0.5 (engrosa los puentes de hidrógeno a 0,5 Å).

Rasmol> color hbonds yellow.

Los puentes de hidrógeno aparecen “flotando” en el espacio porque los átomos entre los que se forman no se muestran. Una manera más real de verlos es conectarlos al esqueleto con

Display-Cartoons

Rasmol> set hbonds backbone

Rasmol> hbonds off (elimina los puentes de hidrógeno).

CONOCIENDO LA FUNCIÓN

La hemoglobina es capaz de transportar muy eficazmente el oxígeno. El proceso de oxigenación de la hemoglobina fue extensamente estudiado, y se obtuvieron conclusiones impresionantes acerca de las actividades de la hemoglobina: esta proteína es, sin dudas, un claro ejemplo de la adaptación de una estructura al cumplimiento de una función específica.

El hierro es capaz de formar enlaces coordinados con cuatro átomos de nitrógeno de los grupos pirrólicos, en tanto que la quinta posición de coordinación es ocupada por un residuo aminoacídico: la histidina distal. La sexta posición está reservada para la unión con el oxígeno. Por otra parte, otro residuo aminoacídico (la histidina proximal) actúa a modo de impedimento estérico, evitando que se una cualquier otro elemento o molécula a la sexta posición de coordinación del hierro.

La coordinación del hierro con la histidina proximal, desplaza al átomo metálico fuera de la estructura planar del anillo tetrapirrólico (aproximadamente unos 0,3 Å del plano). Cuando se produce el uso de la sexta posición de coordinación por el oxígeno, se provoca el “estiramiento” del hierro hacia el plano, afectando la estructura secundaria de la proteína, de modo tal que se permite más fácilmente la oxigenación de las otras subunidades. Este modelo se conoce como la “oxigenación cooperativa”.

Veamos ahora como se puede visualizar esta característica sorprendente de la hemoglobina:

Edit-Select all

Display- Wireframe

Colours – CPK

Rasmol>restrict hem

Display – Ball & Sticks

Rasmol> select his (se seleccionaran todas las histidinas).

Display Sticks

Rasmol>color yellow

Rasmol>select hem:c, his58:c, his87:c

Hemos seleccionado las histidinas distal y proximal. Si acercas la molécula podrás ver fácilmente como la histidina proximal ocupa la quinta posición de coordinación con el hierro, en tanto que la proximal crea una especie de “codo” que evita la entrada de otros elementos o moléculas distintas al oxígeno. Existen además otros impedimentos estéricos ejercidos por diversos residuos aminoacídicos. Para ver que sucede “en los alrededores” del grupo hem, puedes ejecutar lo siguiente:

Rasmol> select within (3.6, hem) (selecciona átomos que se encuentran a 3,6 Å en torno al hem).

Display Sticks

Si te posicionas sobre las diversas bolillas podrás obtener una descripción acerca de a que aminoácido pertenecen. Por ejemplo hallarás un residuo de fenilalanina, que también contribuye al impedimento estérico. Para verlo ejecuta:

```
Rasmol> select phe43
```

Display - Sticks

PRÁCTICA II

Esta práctica está basada en “Bioquímica Aplicada” (Claros y cols, Septem Ediciones, 2001)

Abrir el archivo **1d66.pdb**:

File-Open.

Este fichero contiene la información sobre Gap4p, un regulador de la transcripción unido a DNA.

SELECCIONAR MOLÉCULAS

(Deja la molécula con la selección Colours-chain y Display-Wireframe) Esta opción es muy útil para resaltar solo unas partes de la molécula o eliminar aquellas que no necesitamos. Por ejemplo escribe en la ventana de órdenes:

```
Rasmol> reset (elimina selecciones y modificaciones anteriores).
```

```
Rasmol> select not (protein or dna) y se seleccionarán 55 átomos, para verlos ejecuta Display-spacefill. Lo que se ha hecho es no seleccionar ni el DNA ni la proteína, por lo que se han ilustrado los que quedan, esencialmente las moléculas de agua presentes. Pero pueden haber moléculas que no sean de agua. Para verlo, escribe:
```

```
Rasmol> restrict not water (ocultará todo lo seleccionado que no sea agua) (para que esto funcione bien deben verse las moléculas como alambres-wireframe).
```

Haciendo click sobre los átomos sabremos de cuales se trata. Muchas moléculas se han obtenido cristalinas, utilizando iones metálicos, por ejemplo Zn, Cd u otros. Aunque en la molécula original el cofactor es Zn, aparece Cd puesto que el primero se sustituyó por el segundo para la cristalización. Veamos que átomos interactúan con el Cd.

```
Rasmol> reset
```

```
Rasmol> select cd
```

Display-Spacefill

```
Rasmol> select within (2.6, cd) (selecciona átomos 2,6 Å en torno al Cd).
```

Display-Spacefill

CONTACTOS ENTRE DNA Y PROTEÍNA

La proteína se asocia establemente al DNA mediante enlaces no covalentes. Los átomos implicados en este contacto se pueden visualizar de la siguiente forma:

Rasmol> reset

Display-Backbone

Rasmol> color green

Rasmol> backbone 0 (cero) (disminuye el grosor del esqueleto al mínimo).

Rasmol> rotate z 91 (giro más preciso que con el ratón).

Rasmol> translate y -17 (traslación de la molécula).

Rasmol> zoom 200 (la molécula ha sido centrada sobre el DNA y aumentada).

Rasmol> select dna

Rasmol> color white

Rasmol> spacefill

Se puede observar la estructura del DNA, con sus surcos mayor y menor. Recuperar las órdenes anteriores con la tecla que tiene la flecha hacia atrás y añadir “*and backbone*”

Rasmol> select dna and backbone

Rasmol> color yellow

Ahora se puede ver el esqueleto del DNA (fosfatos y ribosa) en amarillo y las bases nitrogenadas en blanco. La proteína sigue estando en alambres. Procediendo como en el caso del Cd:

Rasmol> select within (3.1, dna) and not dna and not water.

Rasmol> dots (los átomos seleccionados aparecen punteados).

Rasmol> spacefill 0.6 (superponemos esta presentación con la de los puntos).

Rasmol> color cpk (aparecen átomos “azules” que son N).

Ahora se ven los átomos de contacto en la proteína como pequeñas esferas azules dentro de esferas verdes punteadas (dots), mientras que los átomos de oxígeno con puentes de hidrógeno son esferitas rojas. Haciendo click sobre los N que están en el centro se obtiene la descripción. Ahora seleccionamos las Arg en ambas cadenas:

Rasmol> select arg51

Display-Balls & Sticks

Colours-CPK (se ve claramente la posición de las argininas).

LIGANDOS, COFACTORES Y OTRAS MOLÉCULAS

Así se verán moléculas de agua, cationes y cofactores, si están presentes. Para ello:

Rasmol> reset

Edit- Select all

Display-Backbone

Rasmol> select ligand (seleccionará las moléculas de Cd).

Display-Spacefill

Rasmol> select hetero (seleccionará también las moléculas de agua).

Rasmol> color white

Display-Spacefill (se ve el Cd y las moléculas de agua en blanco).

BIBLIOGRAFÍA

1. Claros, M.; Saéz, C.; Alba, F.; Ramos, F. *Bioquímica Aplicada Diseño Experimental y Análisis de Datos*; Septem Ediciones; 2001; Madrid, España.
2. Luque, J.; Herráez, A. *Biología Molecular e Ingeniería Genética*; Hartcourt Ediciones; 2001; Alcalá de Henares, España.
3. Mueller, R.; Young, I. *Genética Médica*; Marban Ediciones; 2001; Madrid, España.
4. Lewin, B. *Genes VII*; Marban Ediciones; 2001; Madrid, España.
5. Conn, E.; Stumpf, P.; Bruening, G.; Doi, R. *Bioquímica Fundamental*; Limusa Ediciones; 1996; México DF, México.
6. Albert, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, D. *Biología Molecular de la Célula*; 1999; Editorial Omega, Barcelona, España.
7. Lodish; Berk; Zipurski; Matsudaira; Baltimore; Darnell; *Biología Celular y Molecular*; 2001; Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
8. *I Curso Teórico-Práctico: Introducción a la Genómica, Transcriptómica y Proteómica*. 17 al 21 de agosto de 2004. Fac. Cs. Ex. Qcas y Nat. Universidad Nacional de Misiones; 2004; Posadas, Misiones.
9. *Programa de Formación en Biología Celular y Molecular: Curso Biología Molecular Básica*. Fac. Cs. Ex. Qcas y Nat. Universidad Nacional de Misiones; 2004; Posadas, Misiones.
10. Borrensen, A.; Hovig, E. *Constant denaturant gel electrophoresis as a rapid screening technique for p53 mutations*; Proc Natl Acad Sci USA 88:8405-8409, 1991.
11. Fisher, S.; Lerman, L. *DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory*; Proc Natl Acad Sci USA 80: 1579-1583, 1983.
12. *Briefings in Bioinformatics*; Stewart Publications; 4 (2): 179-184; 2003.
13. Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Thein, S. I. *Hypervariable minisatellite regions in human DNA*; Nature 314: 67-73; 1985.
14. Bugert, P.; Keneck, C.; Kovacs, G. *A 33 pb minisatellite repeat upstream of the "mutated in colon cancer" gene at chromosome 5q21*; Electrophoresis 19: 1362-1365; 1998.
15. Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*; Boston, John Wiley & Sons, 1994-1997.
16. Abdel-Rahman, S. Z.; Nouraldeem, A. M.; Ahmed, A. E. *Molecular interaction of [2, 3-14C] acrylonitrile with DNA in gastric tissue of rat*; J Biochem Toxicol; 1994; 9: 191-198.
17. Miller, S. A.; Dykes, D. D. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*; Nuc Ac Res 16(3) 1215; 1988.

18. Bassan, B. J. & Caetano-Anollés, G. *Silver staining of DNA in polyacrylamide gels*; Appl Biochem Biotechnol 42: 181-188; 1993.
19. Sambrook & Russell.; *Molecular Cloning. A laboratory manual*; NY, Cold Spring Harbor; 3rd ed.; 2001.
20. Orita, M.; Suzuki, Y. *Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polimerase chain reaction*; Genomics 5 (4): 847-849; 1989.
21. Orita, M.; Iwahana, H.; *Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms*; Proc Natl Acad Sci USA 86 (8): 2766-2770, 1989.
22. Parimoo, S.; *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Somenath Mitra Inc Ed; 2003.

Esperamos que este modesto aporte le haya sido de utilidad al lector y confiando en poder seguir creciendo en este rumbo que hoy iniciamos, les dejamos nuestros correos para poder compartir consultas, críticas y sugerencias que contribuyan a esta causa.

Ariel Ernesto Cariaga Martinez
ariel9682@yahoo.com.ar

Pedro Darío Zapata
pdr_dario@yahoo.com

Cátedra de Biología Celular y Molecular
Carrera de Bioquímica
bcmb@fceqyn.unam.edu.ar