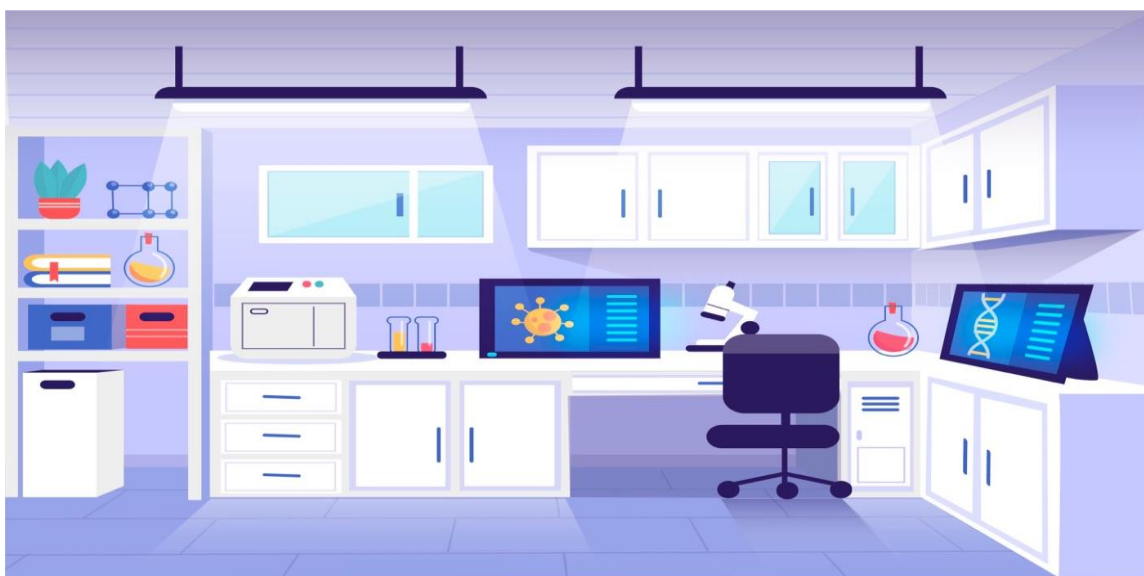


# MANUAL DE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR ENES JURIQUILLA

LICENCIATURA EN CIENCIAS GENÓMICAS  
LICENCIATURA EN NEUROCIENCIAS

## Protocolos para el análisis de ácidos nucleicos



Dra. Marisol De la Mora Curiel  
M. en C. Adriana González Gallardo  
Leo Josué Arteaga Vázquez  
Elvia Zoe Franco Hernández  
César Enrique Calvo Aspiros  
Ruy Andani Martínez Hernández  
Alan Edrei Flores Gaona.

2025





## Página Legal

*Manual de técnicas de biología molecular* © 2025 por De la Mora Curiel, M., González Gallardo A., Arteaga Vázquez, L., Franco Hernández E., Calvo Aspiros C., Martínez Hernández R., Flores Gaona, A. Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES), Unidad Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México, Blvd. Juriquilla 3001, 76230 Juriquilla, Querétaro. Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Atribución/Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visite <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Agradecemos a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) que a través del Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación (PAPIME) y bajo la clave de proyecto PE2000521, brindó financiamiento para la elaboración de este recurso titulado: “Manual de técnicas de biología molecular”.

Se permite compartir, copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato, así como adaptarlo, siempre que se otorgue el crédito adecuado a las autoras y autores, no se utilice con fines comerciales y se distribuya bajo la misma licencia que el original.

Cita sugerida (formato APA 7ª edición)

De la Mora Curiel, M., González Gallardo, A., Arteaga Vázquez, L. J., Franco Hernández, E. Z., Calvo Aspiros, C. E., Martínez Hernández, R. A., Flores Gaona, A. E. (2025). *Manual de prácticas de laboratorio en biología molecular*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Créditos de imagen de portada: "Designed by pikisuperstar / Freepik" Pikisuperstar. Vector de tecnología creado por pikisuperstar - [www.freepik.es](http://www.freepik.es)

## Aviso legal

El contenido de este material tiene fines exclusivamente educativos. Las autoras y autores no se hacen responsables del uso indebido de la información aquí contenida. Se recomienda que todas las prácticas de laboratorio se realicen bajo la supervisión de personal capacitado y en cumplimiento de las normas de bioseguridad vigentes.

## Contacto institucional

Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES), Unidad Juriquilla.  
Universidad Nacional Autónoma de México. Querétaro, México.  
Profesora de la Licenciatura de Ciencias Genómicas, Dra. Marisol De la Mora Curiel. Correo: [mari.dc@unam.mx](mailto:mari.dc@unam.mx)



## ACERCA DE LOS AUTORES

Académicas responsables del proyecto



**Dra. Marisol De la Mora Curiel**

Profesora de carrera Asociado “C” de T.C.  
Licenciatura en Ciencias Genómicas  
ENES Juriquilla. UNAM.



**M. en C. Adriana González Gallardo**

Técnico académico Tit. “B” de T.C.  
Unidad de Proteogenómica  
Instituto de Neurobiología. UNAM.

## Becarios participantes



**Leo Josué Arteaga Vázquez**  
Alumno de la Licenciatura en  
Ciencias Genómicas  
ENES Juriquilla. UNAM.



**Elvia Zoe Franco Hernández**  
Alumna de la Licenciatura en  
Ciencias Genómicas  
ENES Juriquilla. UNAM.



**César Enrique Calvo Aspiros**  
Alumno de la Licenciatura en  
Ciencias Genómicas  
ENES Juriquilla. UNAM.



**Ruy Andani Martínez Hernández**  
Alumno de la Licenciatura en  
Neurociencias  
ENES Juriquilla. UNAM.



**Alan Edrei Flores Gaona**  
Alumno de la Licenciatura en  
Neurociencias  
ENES Juriquilla. UNAM.



## CONTENIDO

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| Prefacio.....                                                   | IX  |
| Agradecimientos .....                                           | X   |
| Lista de abreviaturas .....                                     | XI  |
| Práctica no. 1 Introducción al laboratorio.....                 | 2   |
| Práctica no. 2 Técnicas de micropipteo .....                    | 26  |
| Práctica no. 3 Preparación de medios de cultivo .....           | 36  |
| Práctica no. 4 Extracción de adn sin y con kit para tejido..... | 41  |
| Práctica no. 5 Electroforesis en gel de agarosa.....            | 57  |
| Práctica no. 6 Reacción en cadena de la polimerasa .....        | 66  |
| Práctica no. 7 Extracción de arn sin y con kit .....            | 87  |
| Práctica no. 8 Secuenciación sanger.....                        | 99  |
| Práctica no. 9 Clonación de un gen .....                        | 116 |
| Práctica no. 10 Edición genética con CRISPR-CAS9.....           | 137 |
| Anexos.....                                                     | 146 |
| Anexo 1.....                                                    | 147 |
| Anexo 2.....                                                    | 150 |
| Anexo 3.....                                                    | 152 |

## **PREFACIO**

Este manual de laboratorio está realizado con el propósito de que los alumnos de licenciatura cuenten con una herramienta útil para la ejecución de los protocolos más comunes y rutinarios en biología molecular. Se encuentra ampliamente ilustrado con la intención de mostrar conceptos teóricos importantes en el fundamento de las técnicas y sobre todo para aclarar puntos clave en la ejecución de los procedimientos. Esperamos que este material sea de mucha utilidad tanto para los alumnos que realizan las prácticas como para los docentes que los acompañan e instruyen en el aprendizaje.

## **AGRADECIMIENTOS**

Nos gustaría comenzar por agradecer a nuestras familias el apoyo que nos brindaron para contar con el tiempo que requería la realización de esta obra.

Estamos muy agradecidos con el director de la ENES Juriquilla, el Dr. Raúl Paredes Guerrero, que nos apoyó en conseguir financiamiento para la adquisición del equipo de laboratorio necesario para la realización de las prácticas de biología molecular en la ENES Juriquilla. Actualmente el laboratorio ya se encuentra habilitado para la formación continua de los estudiantes.

Agradecemos a nuestras colegas académicas que revisaron los borradores de este manual y aportaron valiosos comentarios para mejorar el escrito: Dra. Rosalinda Tapia López, Dra. Mariel Ochoa Zavala y Dra. Vania Jiménez Lobato. De igual forma, se reconoce la revisión ortográfica y de estilo del presente manual realizada por la Mtra. Carolina De la Mora Curiel.

Finalmente, ofrecemos un especial agradecimiento a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), a través del Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación (PAPIME), proyecto PE200521, por el apoyo brindado en la adquisición de equipo para la escritura y edición del manual, así como de materiales para la ejecución de las prácticas y el otorgamiento de becas a las y los alumnos participantes.

## LISTA DE ABREVIATURAS

La siguiente es una lista completa de todas las abreviaturas usada a lo largo del manual.

|        |                                                                   |
|--------|-------------------------------------------------------------------|
| ADN    | Ácido desoxirribonucleico                                         |
| ARN    | Ácido ribonucleico                                                |
| CTAB   | del inglés <i>cetyl trimethyl ammonium bromide</i>                |
| DNAse  | del inglés <i>deoxyribonuclease</i>                               |
| EDTA   | Ácido etilendiaminotetraacético                                   |
| h      | hora                                                              |
| HCl    | Ácido clorhídrico                                                 |
| hrs.   | horas                                                             |
| L      | litro                                                             |
| mg     | miligramos                                                        |
| min.   | minutos                                                           |
| ml     | mililitros                                                        |
| mM     | milimolar                                                         |
| NaCl   | Cloruro de sodio                                                  |
| ng     | nanogramos                                                        |
| PCR    | del inglés <i>polymerase chain reaction</i>                       |
| pb     | pares de bases                                                    |
| qPCR   | del inglés <i>quantitative polymerase chain reaction</i>          |
| RT-PCR | del inglés <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> |
| s      | segundos                                                          |
| µg     | microgramos                                                       |
| µl     | microlitros                                                       |

## PRÁCTICAS DE LABORATORIO

**PRÁCTICA NO. 1**  
**INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO**

Autora

Marisol De la Mora Curiel

Tiempo estimado

1 h

**Introducción**

Inicialmente, el concepto de biología molecular se aplicó a los estudios sobre el ADN (ácido desoxirribonucleico) (Farfán, 2015) y posteriormente se extendió a investigaciones en química y fisiología enfocadas en la caracterización de moléculas biológicas (Morange, 2000). El desarrollo de métodos y técnicas para el estudio de procesos a nivel molecular ha permitido nuevas formas de aislar y manipular ácidos nucleicos. Asimismo, el conocimiento generado ha hecho posible imitar funciones biológicas como la replicación y la transcripción, mejorando su manipulación (Rapley & Whitehouse, 2015). Así, en un laboratorio de biología molecular se pueden llevar a cabo diversos procesos con los ácidos nucleicos y cada uno requiere de equipo especial.

En biología molecular, se requieren instrumentos que permitan extraer y analizar biomoléculas. Según la especialización, también pueden emplearse equipos para el cultivo de microorganismos o el trabajo con células y tejidos (Davis, 2012). No obstante, el uso de estos equipos debe hacerse con el conocimiento adecuado de su funcionamiento y cuidados, pues el uso inadecuado puede provocar daños al equipo o lesiones.

El propósito de esta práctica es familiarizar al estudiante con el material y equipo del laboratorio, mostrando que cada equipo cuenta con un manual de uso que debe revisarse cuidadosamente antes de operarlo y explicando paso a paso cómo tener un acercamiento correcto al instrumento, conocerlo y usarlo.

## **Objetivos de aprendizaje**

- Identificar el equipo básico de un laboratorio de biología molecular y puedan describir su función.
- Reconocer cuál es el principio de funcionamiento de los principales equipos utilizados en el laboratorio.
- Saber cuáles son las condiciones de uso seguro y adecuado del equipo de laboratorio.

## **Materiales y equipo**

1 espectrofotómetro (ej. NanoDrop).

1 termociclador punto final

1 termociclador tiempo real

1 centrífuga

1 microcentrífuga

1 micropipeta multicanal

1 micropipeta

1 agitador vortex

1 transiluminador

1 baño María

1 termoblock

1 máquina para hacer hielo

1 microscopio óptico

1 microscopio de fluorescencia

1 cámara de electroforesis

1 balanza granataria

1 balanza analítica

1 campana de flujo laminar

1 autoclave

## **Fundamento**

Esta práctica se basa en principios básicos de la biología molecular y en protocolos estándar de uso de equipo de laboratorio descritos en literatura especializada (Davis, 2012; Rapley & Whitehouse, 2015). No sustituye los manuales específicos de cada equipo, los cuales deben consultarse antes de su uso.

## **Procedimiento**

Para cada uno de los instrumentos descritos del apartado A) hasta el R), se realizarán los siguientes pasos:

1. Leer cuidadosamente la descripción de cada equipo.
2. Identificar físicamente cada instrumento dentro del laboratorio.
3. Revisar su función, cuidados, uso y principio de funcionamiento.
4. Marcar como revisado cada equipo una vez identificado.
5. Responder el cuestionario de análisis al finalizar la práctica.

## A) Espectrofotómetro de microvolumen

**Función:** medir la concentración de ácidos nucleicos.

**Cuidados y uso:** Generalmente se utiliza especificando lo que se desea medir, se calibra y se coloca un microlitro de la muestra. Apagar cuando no esté en uso.

**Principio funcional:** escanea longitud de onda de alta velocidad a través del espectro UV 195-400nm.



*Figura 1.1 Espectrofotómetro de microvolumen (ej. NanoDrop).*

☐ Revisado

## B) Termociclador punto final

**Función:** lleva a cabo los ciclos de temperatura para la PCR.

**Cuidados y uso:** Encender. Verificar el programa a correr. Colocar los tubos bien cerrados y ajustar la tapa. Dar inicio al programa. Apagar cuando no esté en uso.

**Principio funcional:** mantenimiento de distintas temperaturas necesarias para la reacción de PCR.

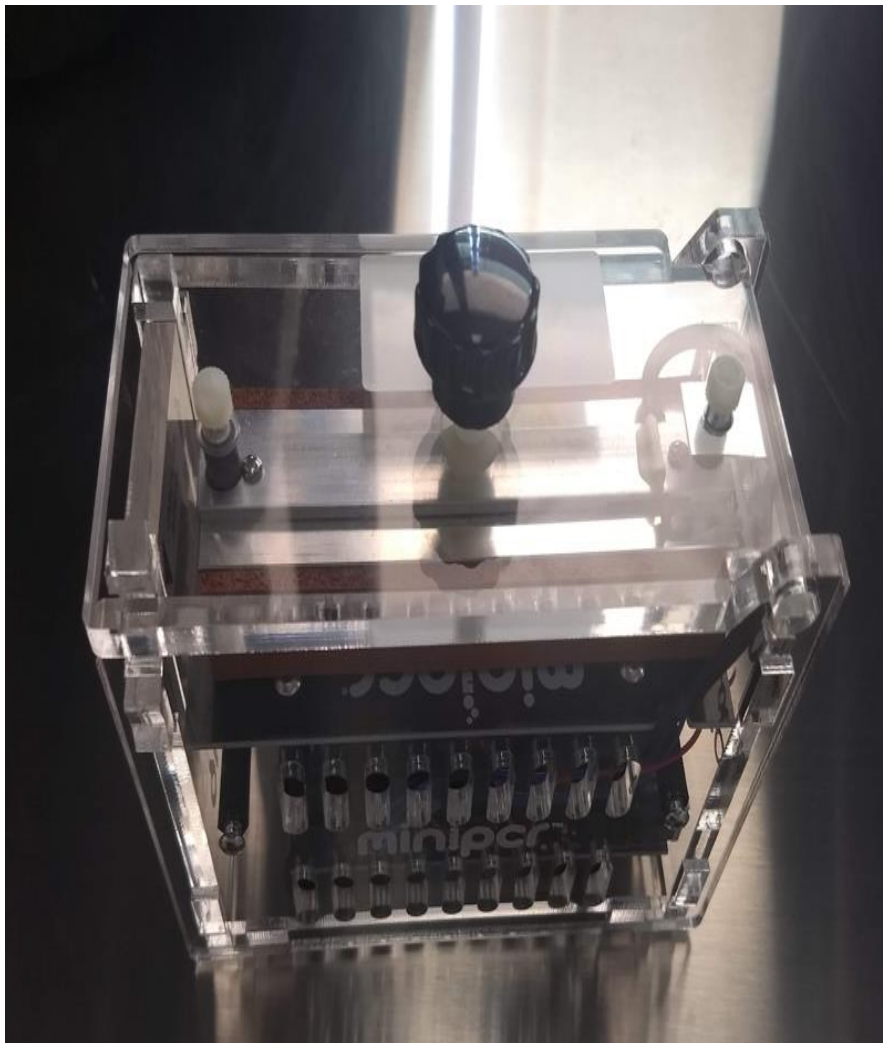


*Figura 1.2 Termociclador punto final.*



Revisado

### C) Centrífuga

**Función:** ayuda a separar y sedimentar muestras.

**Cuidados y uso:** Encender y programar con las revoluciones por minuto y tiempo necesarios. Cerrar bien los tubos con la muestra. Colocar equilibradamente los tubos y cerrar bien la tapa de la centrífuga. Apagar cuando no esté en uso.

**Principio funcional:** se basa en la densidad de las moléculas para que la fuerza centrípeta las separe según su densidad.



Figura 1.3 Centrífuga.



Revisado

#### D) Microcentrífuga

**Función:** baja el líquido de las paredes del tubo de pequeñas cantidades de muestra.

**Cuidados y uso:** Este aparato no tiene opción de programar, solo se colocan equilibradamente los tubos, bien cerrados. Se tapa la minicentrífuga y se mantiene encendida 30 o 60 segundos. Se abre la tapa y se retiran los tubos. Apagar cuando no esté en uso.

**Principio funcional:** se basa en la densidad de las moléculas para que la fuerza centrípeta las separe según su densidad.



*Figura 1.4 Microcentrífuga.*



Revisado

### E) Micropipeta multicanal

**Función:** permite dispensar pequeñas cantidades de líquido de varias muestras simultáneamente.

**Cuidados y uso:** Ajustar bien las puntas a la hora de tomar muestras, nunca permitir que el líquido toque la pipeta. Desechar las puntas después de su uso. Guardar sin puntas.

**Principio funcional:** se basa en un émbolo que succiona la cantidad del líquido deseado para que suba a la punta y después es expulsado.



Figura 1.5 Micropipeta multicanal.



Revisado

## F) Vortex

**Función:** agita muestras dentro de tubos.

**Cuidados y uso:** Este aparato tiene el modo de funcionar por presión al colocar los tubos o estar encendido todo el tiempo. Es recomendable, para una breve mezcla de la muestra: coloca el tubo durante unos segundos y retíralo. Apagar cuando no esté en uso.

**Principio funcional:** Posee un motor eléctrico con un eje de impulsión para crear agitación en la muestra.



Figura 1.6 Vortex.



Revisado

### G) Micropipeta

**Función:** tomar pequeños volúmenes de líquido.

**Cuidados y uso:** se deben ajustar bien las puntas a la hora de tomar muestras. Nunca permitir que el líquido toque la pipeta. Desechar las puntas después de su uso. Guardar sin puntas.

**Principio funcional:** se basa en un émbolo que succiona la cantidad del líquido deseado para que suba a la punta y después es expulsado.



*Figura 1.7 Micropipeta.*



Revisado

## H) Transiluminador

**Función:** permite visualizar moléculas marcadas con fluoróforos.

**Cuidados y uso:** colocar lentes de luz ultravioleta, encender y verificar que funcionan las lámparas. Usar la opción deseada y colocar el gel con la muestra. Cerrar la puerta donde se colocó la muestra y tomar la lectura. Apagar cuando no esté en uso. El transiluminador trabaja con luz ultravioleta de onda media (302 nm), por lo que debe evitarse al máximo mirarla directamente durante la visualización del ADN. La exposición a ella debe de ser mínima y EMPLEANDO SIEMPRE PROTECCIÓN PARA CARA, OJOS (careta y/o lentes) Y MANOS (guantes).

**Principio funcional:** utiliza radiación ultravioleta, en un espectro que varía entre longitudes de onda de 100 a 400 nm. La energía proveniente de la luz ultravioleta excita los fluoróforos usados para teñir las moléculas.



*Figura 1.8 Transiluminador.*

☐ Revisado

## I) Termoblock con agitación

**Función:** mantener la temperatura constante, en seco, para alguna reacción.

**Cuidados y uso:** encender y programar la temperatura y las revoluciones por minuto a las que se desee agitar la muestra, colocar las muestras. Retirar las muestras una vez terminado el programa y apagar el equipo.

**Principio funcional:** es un termostato de bloque seco que puede mantener la temperatura por largos periodos de tiempo.



Figura 1.9 Termoblock.



Revisado

## J) Termociclador tiempo real.

**Función:** lleva a cabo los ciclos de temperatura y la lectura de las copias para la PCR en tiempo real.

**Cuidados y uso:** encender, verificar el programa a correr y que la lectura de los canales de fluorescencia está encendida en la parte del ciclo donde se necesite leer. Colocar los tubos bien cerrados y ajustar la tapa. Dar inicio al programa. Apagar cuando no esté en uso.

**Principio funcional:** mantiene las distintas temperaturas necesarias para la reacción de PCR y además conforme ocurre la reacción va cuantificando el número de copias del gen que se están generando al cuantificar la fluorescencia del fluoróforo que se incluye en la reacción.

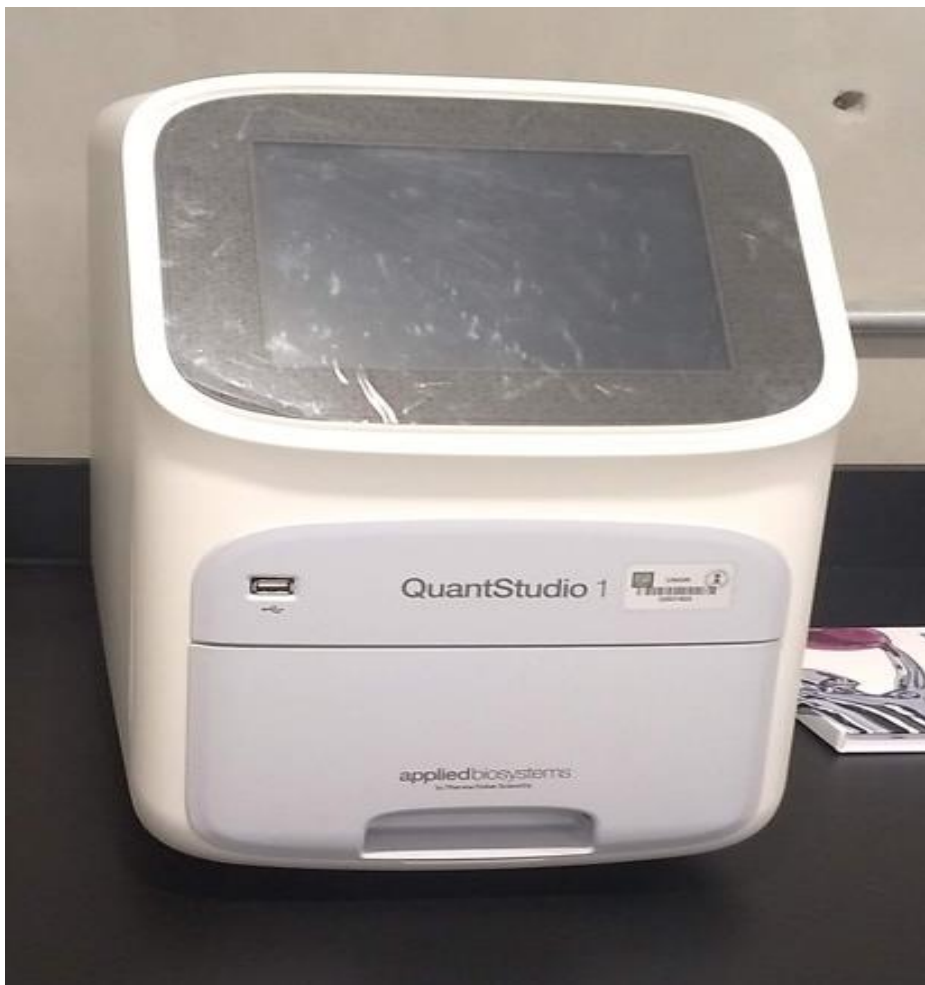


Figura 1.10 Termociclador tiempo real.



Revisado

## K) Baño María

**Función:** mantiene la temperatura constante para alguna reacción.

**Cuidados y uso:** llenar de agua destilada hasta la cantidad deseada, colocar un termómetro y encender. Verificar que el termómetro alcanzó la temperatura deseada y colocar las muestras. Al finalizar el tiempo, sacar las muestras y apagar el aparato. Una vez que bajó la temperatura retirar el agua. Apagar cuando no esté en uso.

**Principio funcional:** es un termostato que calienta agua y mantiene la temperatura largos periodos de tiempo.



Figura 1.11 Baño María.



Revisado

**L) Máquina para hacer hielo.**

**Función:** fabricar hojuelas de hielo.

**Cuidados y uso:** encender por lo menos 8hrs antes de necesitar el hielo.  
Abrir la tapa y tomar el hielo con la charola. Cerrar la tapa cuando no se use.

**Principio funcional:** se congela el agua líquida y se mantiene almacenada en forma de hojuelas.



*Figura 1.12 Maquina para hacer hielo.*

☐ Revisado

### **M) Microscopio de fluorescencia.**

**Función:** observar muestras marcadas con fluorocromos.

**Cuidados y uso:** marcar previamente las muestras con un fluorocromo. Colocar las muestras en la platina y después encender el microscopio. Apagar cuando no esté en uso.

**Principio funcional:** por medio de una longitud de onda se hace emitir fluorescencia a los fluorocromos con que ha sido marcada la muestra.



*Figura 1.13 Microscopio de fluorescencia.*

☐ Revisado

## N) Microscopio óptico

**Función:** sirve para observar muestras translúcidas.

**Cuidados y uso:** teñir previamente la muestra. Colocar las muestras en la platina y después encender el microscopio. Colocar el objetivo con el que se desea observar. Al finalizar retirar la muestra y apagar el microscopio.

**Principio funcional:** combinación de lentes que modifican la dirección de haces de luz y permiten ver una imagen magnificada.



*Figura 1.14 Microscopio óptico.*



Revisado

## Ñ) Cámara de electroforesis

**Función:** genera un medio cargado para la migración de moléculas.

**Cuidados y uso:** llenar de *buffer* la cámara, colocar dentro la charola con el gel. Cerrar la cámara, colocar los electrodos y ajustar la fuente de poder a las condiciones requeridas de voltaje. Encender la fuente de poder y dejar correr el gel el tiempo suficiente. Apagar la fuente de poder, abrir la cámara y retirar el gel. Después vaciar la cámara y enjuagarla con agua destilada. Dejar secar y guardar. Apagar cuando no esté en uso.

**Principio funcional:** crea un medio cargado donde los polos muestran cargas opuestas. Esto permite que las moléculas migren con el tiempo acercándose a la carga opuesta.



Figura 1.15 Cámara de electroforesis.



Revisado

## O) Balanza analítica

**Función:** pesa cantidades con un alto grado de precisión, rango entre 100 y 300 g.

**Cuidados y uso:** encender y tarar con charola vacía. Pesar la cantidad deseada, retirar la charola y apagar la balanza. Limpiar con una brocha cualquier exceso que haya caído fuera de la charola. Apagar cuando no esté en uso.

**Principio funcional:** compara masas de peso conocido con la masa de una sustancia de peso desconocido.

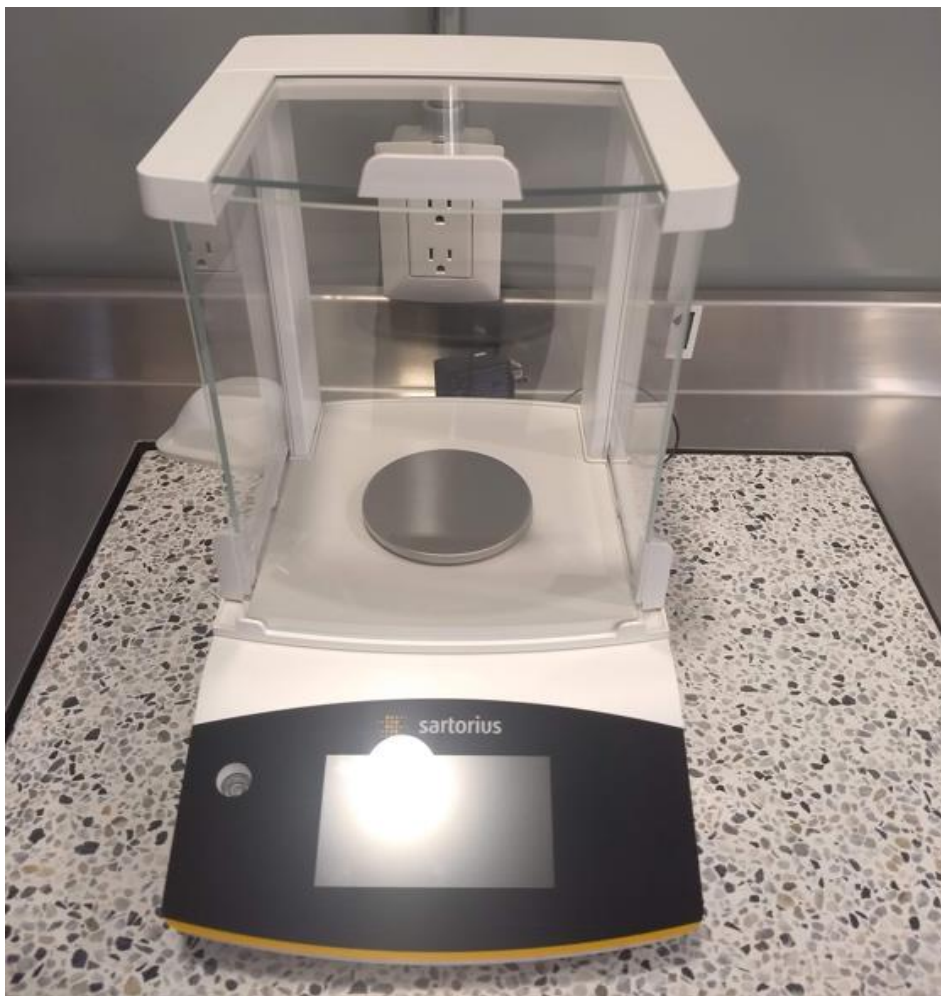


*Figura 1.16 Balanza analítica.*



Revisado

## P) Balanza granataria

**Función:** pesa cantidades muy pequeñas de sustancias, rango de 100-200 g algunas y otras de 2000-2500 g.

**Cuidados y uso:** encender y tarar con charola vacía. Pesar la cantidad deseada, retirar la charola y apagar la balanza. Limpiar con una brocha cualquier exceso que haya caído fuera de la charola. Apagar cuando no esté en uso.

**Principio funcional:** compara masas de peso conocido con la masa de una sustancia de peso desconocido.

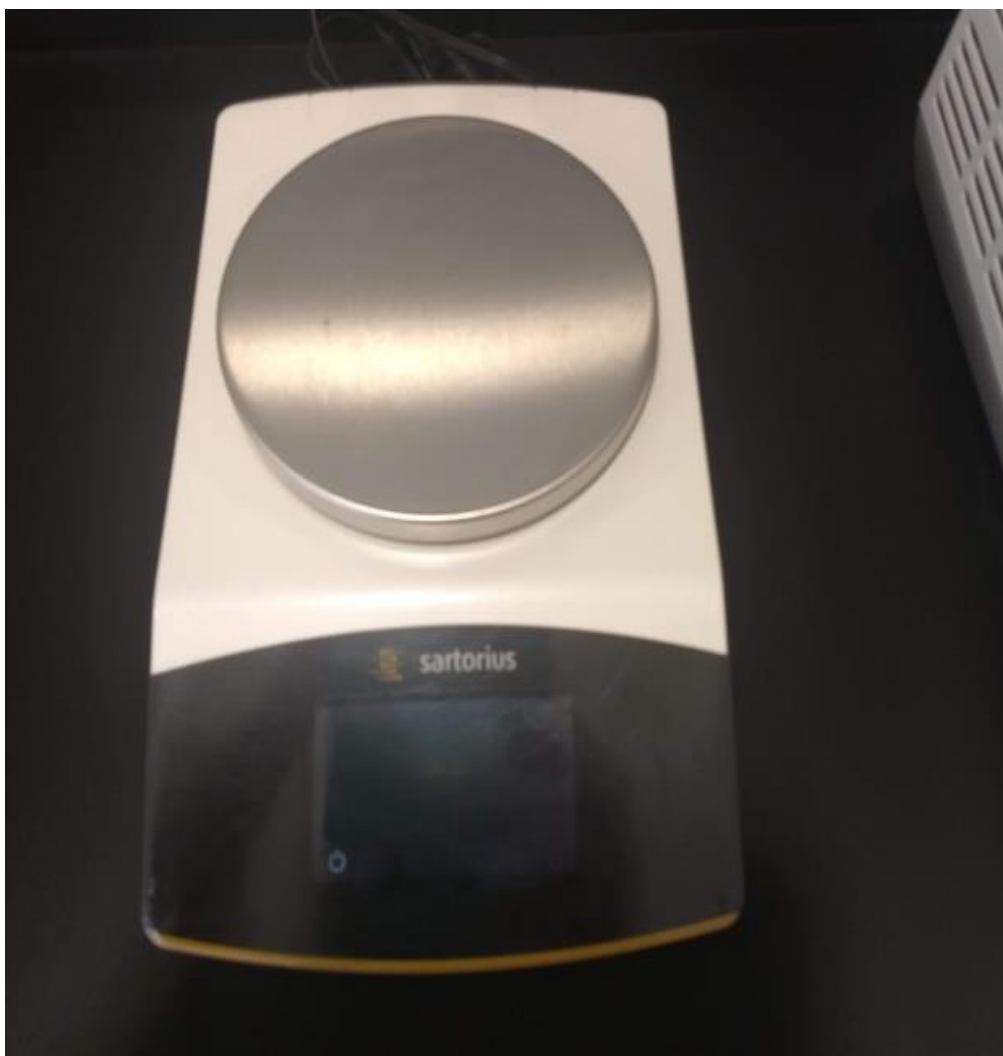


Figura 1.17 Balanza granataria.



Revisado

## Q) Campana de flujo laminar

**Función:** permite trabajar en condiciones de esterilidad.

**Cuidados y uso:** encender la campana y dejar que se esterilice con luz UV 10 min antes de empezar a trabajar. Encender la luz blanca y trabajar en ella, al finalizar limpiar el área de trabajo y apagar la campana. Apagar cuando no esté en uso.

**Principio funcional:** el motor de la campana aspira el aire, lo hace pasar por un filtro y luego a través de la superficie de trabajo mediante una corriente de aire laminar o unidireccional.



*Figura 1.18 Campana de flujo laminar.*



Revisado

## R) Autoclave

**Función:** permite esterilizar el material con el que se va a trabajar.

**Cuidados y uso:** programar previamente con el programa de esterilización que se necesite. Llenar de agua destilada el apartado destinado a ello. Colocar en la charola el material a esterilizar. Cerrar bien la compuerta y comenzar el programa deseado. Al terminar, secar con cuidado el material porque está caliente. Apagar el autoclave.

**Principio funcional:** mantiene una temperatura elevada por medio del contacto con el vapor de agua bajo presión, durante un período de tiempo suficiente para destruir todos los microorganismos.



Figura 1.19 Autoclave.



Revisado

## **Productos esperados**

Reconocimiento visual y funcional del equipo de laboratorio.  
Registro de revisión de cada instrumento.  
Comprensión del correcto uso de cada instrumento.  
Respuestas completas al cuestionario de análisis.

## **Análisis de resultados**

Si tuvieras que montar un laboratorio básico con presupuesto limitado, ¿qué equipo priorizarías y por qué?

Analiza un escenario donde se use incorrectamente un equipo de laboratorio. ¿Qué consecuencias podría tener en los resultados?

¿Cómo influye el correcto uso del equipo en la reproducibilidad de los experimentos?

## **Preguntas de reflexión**

¿Qué equipo consideras más crítico en biología molecular y por qué?

¿Qué riesgos existen al no seguir los protocolos de uso?

¿Cómo contribuye el conocimiento del equipo a la calidad de la investigación?

## **Conclusión**

Redacta un párrafo donde describas lo aprendido en esta práctica, considerando la importancia del equipo, su uso adecuado y su impacto en los resultados experimentales.

## **Bibliografía**

Davis, L. (2012). *Basic methods in molecular biology*. Elsevier.

Farfán, B. M. J. (2015). Biología molecular aplicada al diagnóstico clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(6), 788-793.

Morange, M. (2000). *A history of molecular biology*. Harvard University Press.

Rapley, R., & Whitehouse, D. (Eds.). (2015). *Molecular biology and biotechnology*. Royal Society of Chemistry

## **PRÁCTICA NO. 2**

### **TÉCNICAS DE MICROPIPETEO**

Autora

Elvia Zoe Franco Hernández

Tiempo aproximado

2 horas

#### **Introducción**

La medición precisa del volumen de líquidos es una habilidad fundamental en el laboratorio de biología molecular, ya que permite obtener resultados analíticos confiables en distintas áreas de investigación (Villarreal Gómez, 2020).

La medición de pequeños volúmenes, en el rango de microlitros ( $\mu\text{l}$ ) a mililitros (ml), requiere el uso de micropipetas. Estas pueden variar según su diseño, material y aplicación, por lo que su uso adecuado depende de técnicas específicas. En esta práctica se trabajará con micropipetas de desplazamiento de aire con accionamiento manual, debido a que son las más comunes en el laboratorio (Fuentes López et al., s. f.).

Las micropipetas de desplazamiento de aire funcionan mediante la generación de un vacío parcial cuando el pistón se desplaza hacia arriba, permitiendo la aspiración del líquido hacia la punta. Aunque existen distintos modelos, generalmente constan de partes como el cuerpo, el émbolo, el selector de volumen, la ventana indicadora, el expulsor de puntas y el cono de sujeción.

Aunque podemos encontrar formatos diferentes de micropipetas según la marca del fabricante, generalmente lo conforman las siguientes partes:

- Empuñadura o cuerpo principal de la micropipeta.



*Figura 2.1 Esquema general de las micropipetas.*

- Émbolo o botón de accionamiento usado para el llenado y dispensado de los líquidos. Presenta dos toques que indican la presión que debemos ejercer para absorber (1.er toque) y descargar (2.o toque) el líquido.
- Rueda o tornillo de ajuste del volumen con el que establecemos el volumen exacto que queremos dispensar.
- Ventana indicadora del volumen que muestra el volumen seleccionado.
- Botón de eyección o botón expulsor para desechar las puntas usadas.
- Cono o soporte de la punta.
- Eje de la micropipeta, que une la empuñadura o cuerpo con el soporte de la punta.

En algunos modelos puede tener acoplado el eyector.

- Bloqueo del ajuste del volumen: la mayoría de las micropipetas poseen este mecanismo para evitar cambios accidentales en la configuración de volumen seleccionado durante el pipeteo.

Los pasos estándar en el uso de micropipetas se describen a continuación:

## 1. Seleccionar la micropipeta según el volumen que se requiera tomar

Lo habitual es utilizar micropipetas donde se puede ajustar el volumen dentro de un rango, generalmente dicho rango se superpone ligeramente con los rangos de las diferentes micropipetas por lo que hay que tener en cuenta que la micropipeta con el rango más grande por lo general brindará una menor precisión.

## 2. Seleccionar el volumen a pipetear

Debemos girar la rueda de ajuste hasta que el valor adecuado aparezca en la ventana indicadora del volumen. Cuando se pasa de un volumen mayor a un volumen más pequeño, basta con ir bajando el dial para alcanzar el volumen deseado. Cuando se pasa de un volumen más pequeño a otro mayor, es importante girar primero la rueda del selector aproximadamente 1/3 de vuelta por encima del volumen a medir e ir bajando lentamente hasta llegar al volumen adecuado. En general, el indicador de volumen presenta 3 o 4 dígitos y se lee de arriba abajo.

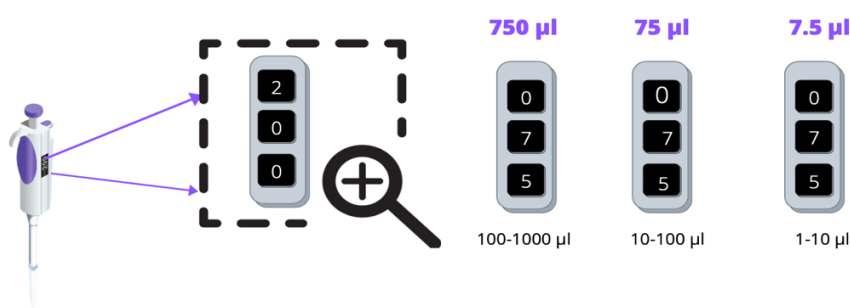


*Figura 2.2 Ejemplo de volumen en diferentes micropipetas.*

## 3. Posición de la micropipeta

Para llevar a cabo una correcta aspiración del líquido es muy importante mantener la micropipeta siempre en posición vertical. Manteniendo esta posición, deberemos presionar el émbolo o pistón con el pulgar hasta el primer

tope antes de introducirlo en el líquido; la profundidad de inmersión en el líquido dependerá del volumen.



Debemos mantener un ritmo constante y una velocidad adecuada para aspirar y dispensar el líquido, un pipetear muy rápido puede provocar la entrada de aire, provocando que el volumen de líquido no sea el deseado.

*Figura 2.3 Posición de la micropipeta.*

#### **4. Dispensar el líquido y expulsión de la punta**

La mejor técnica para dispensar el líquido (presionar el pistón hasta llegar al segundo tope) es dejarlo caer por la pared lateral del recipiente, aunque también se puede dosificar el líquido suavemente sobre la superficie o introducir ligeramente la punta. Es importante usar las puntas una sola vez por lo que siempre debemos depositar las puntas utilizadas en un contenedor según los reactivos con los que estemos trabajando.

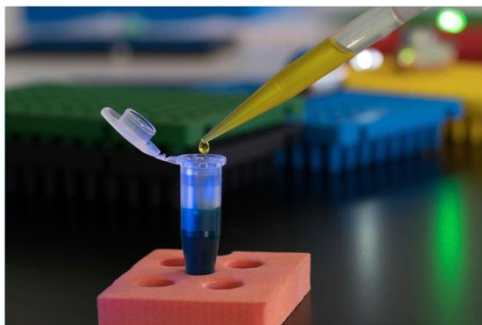


*Figura 2.4 Dosificación del líquido*

### **Tome las siguientes precauciones cuando utilice una micropipeta:**

Nunca gire el ajustador de volumen más allá del rango superior o inferior de la pipeta.

Nunca invierta ni coloque la micropipeta con la punta llena; el líquido puede volver al pistón.

Nunca permita que el émbolo retroceda después de extraer o expulsar líquido; esto podría dañar el pistón.

Nunca reutilice una punta que se haya utilizado para medir un reactivo diferente.

### **Objetivos de aprendizaje**

- Utilizar correctamente micropipetas para medir volúmenes en el rango de microlitros.
- Diferenciar los tipos de micropipetas y seleccionar la adecuada según el volumen requerido.
- Aplicar buenas prácticas para asegurar precisión y exactitud en el pipeteo.

### **Materiales y equipo**

- \* Colorantes (amarillo, verde, azul y rojo; 1 ml de cada uno)
- \* Glicerol (5 ml al 20%)
- \* Gradilla para tubos de 0.6 ml
- \* Micropipetas de volumen variable:
  - \* 1–10  $\mu$ l
  - \* 2–20  $\mu$ l
  - \* 20–200  $\mu$ l
  - \* 100–1000  $\mu$ l
- \* Puntas de micropipeta (aproximadamente 24 por alumno)
- \* Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml (aproximadamente por alumno)
- \* Plumón para etiquetado
- \* Balanza

## Fundamento

Esta práctica se basa en técnicas estándar de micropipeteo utilizadas en laboratorios de biotecnología y biología molecular (Ewald, 2015; LibreTexts, 2021; LabXchange, 2019). Se consideran tres técnicas principales: pipeteo normal, reverso y de muestras heterogéneas, cada una adecuada según las características del líquido.

## Actividad previa

Realizar la simulación virtual antes de la sesión de laboratorio:  
[<https://www.labxchange.org/>](<https://www.labxchange.org/>)

## Procedimiento

Pasos para el llenado de la tabla en la sección análisis de resultados de la práctica.

### 1. Pipeteo Normal (forward pipetting)

Recomendada para soluciones acuosas como tampones, ácidos diluidos y bases.

|                               |                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Aspiración del líquido</b> | 1. Presione el botón de accionamiento hacia abajo hasta el primer tope.<br>2. Deje que el botón de accionamiento se mueva hacia arriba completamente (hasta la posición inicial). |
| <b>Dispensado del líquido</b> | 3. Pulsar el botón de accionamiento a través del primero y segundo tope.                                                                                                          |
| <b>Observación</b>            | No debe quedar líquido en la punta después de la acción.                                                                                                                          |

1. Etiquete los tubos microcentrífuga vacíos con A, B, C y D, nombre y fecha.
2. Agregue las cantidades especificadas de cada solución como lo indica la siguiente tabla.

| <b>Tubo</b> | <b>Colorante<br/>Amarillo</b> | <b>Colorante<br/>Verde</b> | <b>Colorante<br/>Azul</b> | <b>Colorante<br/>Rojo</b> |
|-------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>A</b>    | 4.3 $\mu$ l                   | 5.5 $\mu$ l                | 2.2 $\mu$ l               | 0 $\mu$ l                 |
| <b>B</b>    | 6.3 $\mu$ l                   | 1.3 $\mu$ l                | 7.6 $\mu$ l               | 8.8 $\mu$ l               |
| <b>C</b>    | 41 $\mu$ l                    | 12 $\mu$ l                 | 33 $\mu$ l                | 14 $\mu$ l                |
| <b>D</b>    | 255 $\mu$ l                   | 110 $\mu$ l                | 340 $\mu$ l               | 195 $\mu$ l               |

3. Compare sus tubos con los tubos "clave" preparados por el profesor para obtener una idea de su nivel de precisión.
4. Calcula la cantidad de líquido que esperas tener en cada tubo, A, B, C y D.
5. Usa tu micropipeta como se indica en la tabla de Pipeteo Normal (forward pipetting) (aspiración y dispensado del líquido), para medir la cantidad de líquido que realmente has pipeteado

## 2. Pipeteo Reverso (reverse pipetting)

Esta técnica se usa para pipetear soluciones con una gran viscosidad o tendencia a formar espuma.

|                               |                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Aspiración del líquido</b> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Presione el botón de accionamiento hacia abajo hasta el segundo tope</li> <li>2. Deje que el botón de accionamiento suba completamente</li> </ol> |
| <b>Dispensado del líquido</b> | <ol style="list-style-type: none"> <li>3. Presione el botón de accionamiento hasta el primer tope</li> </ol>                                                                                |
| <b>Observación</b>            | Queda líquido en la punta después de la acción, este puede ser devuelto al contenedor inicial o tirarlo junto con la punta.                                                                 |

1. Etiquete los tubos microcentrífuga vacíos con E, F, G y H, nombre y fecha.
2. Pesar los tubos de microcentrífuga vacíos.
3. Agregue las cantidades especificadas de la solución 20% glicerol (proporcionada por el profesor) como lo indica la siguiente tabla:

| <b>Tubo</b> | <b>Solución</b> | <b>Técnica</b> |
|-------------|-----------------|----------------|
| <b>E</b>    | 2.3 $\mu$ l     | Normal         |
| <b>F</b>    | 48.7 $\mu$ l    | Normal         |
| <b>G</b>    | 2.3 $\mu$ l     | Reversa        |
| <b>H</b>    | 48.7 $\mu$ l    | Reversa        |

4. Pesar los tubos nuevamente y comparar con los pesos muestra proporcionados por el profesor.

### 3. Pipeteo de muestras heterogéneas

Esta técnica está especialmente indicada para pipeteo de muestras viscosas y se necesita pipetear el volumen total disponible.

|                               |                                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Aspiración del líquido</b> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Presione el botón de accionamiento hacia abajo hasta el segundo tope.</li> <li>2. Deje que el botón de accionamiento suba completamente.</li> </ol> |
| <b>Dispensado del líquido</b> | <ol style="list-style-type: none"> <li>3. Presione el botón de accionamiento hasta el primer tope.</li> </ol>                                                                                 |
| <b>Observación</b>            | Queda líquido en la punta después de la acción, éste puede ser devuelto al contenedor inicial o tirarlo junto con la punta.                                                                   |

### Productos esperados

- Preparación correcta de soluciones en tubos.
- Registros de volúmenes y pesos.
- Cálculo de errores experimentales.

### Análisis de resultados

#### Pipeteo normal

| Tubo | Volumen esperado | Volumen obtenido | % Error |
|------|------------------|------------------|---------|
| A    |                  |                  |         |
| B    |                  |                  |         |
| C    |                  |                  |         |
| D    |                  |                  |         |

#### Pipeteo reverso

| Tubo | Peso muestra | Peso obtenido | Error |
|------|--------------|---------------|-------|
| E    |              |               |       |
| F    |              |               |       |
| G    |              |               |       |
| H    |              |               |       |

¿Tu porcentaje de error fue inferior al 5%? Si su porcentaje de error estuvo por encima de este rango, explique las posibles causas.

¿Tus resultados fueron los correctos? ¿Cómo podría evitar errores en el futuro?

### Preguntas de reflexión

Si obtienes resultados inconsistentes en un experimento, ¿cómo evaluarías si el problema está en el pipeteo?

¿Qué errores comunes en el uso de micropipetas pueden afectar la precisión y cómo los corregirías?

Diseña una estrategia para asegurar la reproducibilidad en mediciones de volúmenes pequeños.

## **Conclusión**

Redacta un párrafo donde describas lo aprendido sobre el uso de micropipetas, la importancia de la técnica adecuada y su impacto en la precisión y reproducibilidad de los resultados.

## **Bibliografía**

Ewald, K. (2015). *Impact of pipetting techniques on precision and accuracy*.

Fuentes López, A., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, C. (s. f.). *Manejo de micropipetas*. Universitat Politècnica de València.

LabXchange. (2019). *Micropipetting simulation*.

LibreTexts. (2021). *Micropipetting*.

Villarreal Gómez, L. J. (2020). *Manual de prácticas de biomateriales*. Universidad Autónoma de Baja California.

## **PRÁCTICA NO. 3**

### **PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**

Autora

Marisol De la Mora Curiel

Tiempo estimado

2 horas

#### **Introducción**

Un medio de cultivo es una solución nutritiva utilizada para cultivar microorganismos. En muchos campos de la ciencia de manera directa o indirecta se utilizan los medios de cultivo; sus principales aplicaciones son diagnóstico clínico, detección de microorganismos patógenos, cultivo masivo de microorganismos productores de metabolitos, cultivo masivo de microorganismos productores de sustancias nutritivas y alimentos para la obtención de alimentos fermentados, pruebas de campo, entre otras. (Rodríguez Martínez C. y R. Zhurbenko, 2018).

Existen dos clases amplias de medios de cultivo: medios definidos y medios complejos. En los medios definidos la composición exacta de sus componentes es conocida. Los medios complejos están hechos de digestos de productos microbianos, animales o vegetales, como caseína (proteína de leche), carne de res (extracto de carne), soja (caldo de soja trípica), células de levadura (extracto de levadura), etc. Estos, son comercialmente disponibles en forma deshidratada y sólo necesita ser hidratado para usarse (Madigan, et al. 2015).

Otro tipo de clasificación se basa en la propiedad del medio de promover el crecimiento de determinados microorganismos, se clasifican en: generales, de enriquecimiento, selectivos y diferenciales. Los medios generales son aquellos que permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. Los medios de enriquecimiento son aquellos que favorecen el crecimiento de un determinado tipo de microorganismo, pero no inhiben totalmente el crecimiento

de otros. Los medios selectivos son aquellos que permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos y contienen sustancias que inhiben el crecimiento de determinados microorganismos. Finalmente, los medios diferenciales son aquellos en los que se ponen de manifiesto propiedades que un determinado tipo de microorganismos posee (Rodríguez Martínez C. y R. Zhurbenko, 2018).

Los medios de cultivo pueden ser clasificados teniendo en cuenta criterios muy diversos. Hasta el momento, no existe una clasificación única; otra clasificación, por ejemplo, se basa en el estado físico (sólidos, semisólidos o semilíquidos y líquidos). Los medios de cultivo líquidos se solidifican con agar, típicamente al 1-2%. Los medios sólidos inmovilizan las células, permitiéndoles crecer y forman masas visibles y aisladas llamadas colonias. Las colonias microbianas son de varias formas y tamaños dependiendo del organismo, las condiciones de cultivo, el suministro de nutrientes y otros parámetros fisiológicos (Madigan, et al. 2015).

### **Objetivos de aprendizaje**

- Preparar un medio de cultivo tipo Luria-Bertani siguiendo un protocolo estandarizado.
- Explicar las características y aplicaciones de los distintos tipos de medios de cultivo.
- Analizar la función de los componentes del medio en el crecimiento microbiano.

### **Materiales y equipo**

- 1 Vaso de precipitados de 2 L
- 1 Matraz Erlenmeyer de 2 L
- 1 Agitador magnético
- 1 Saca-agitador magnético
- 1 Cuadro de papel aluminio de 5x5 cm
- 5 Placas de vidrio o poliestireno 90 mm

#### Reactivos:

950 ml de H<sub>2</sub>O

10 g de Triptona

10 g de NaCl

5 g de Extracto de levadura

5 g de NaOH 5 N (para ajustar el pH)

7 g de Agar (para medio sólido)

0.1 g de ampicilina (para una concentración final de 100 µg/ml)

#### Equipo

1 Medidor de pH

1 Placa de agitación

1 Autoclave

1 Mechero Bunsen (para medio sólido)

#### Fundamento

Esta práctica se basa en protocolos generales de preparación de medios de cultivo, particularmente el medio Luria-Bertani (LB), ampliamente utilizado en microbiología molecular (Cold Spring Harbor Protocols, 2006; Madigan *et al.*, 2015). Los componentes del medio aportan nutrientes esenciales para el crecimiento bacteriano, mientras que el proceso de esterilización garantiza la ausencia de contaminantes.

#### Procedimiento

- 1.- Coloca en el fondo del vaso de precipitados el agitador magnético y vierte 500 ml de H<sub>2</sub>O.
- 2.- Coloca el vaso de precipitados sobre la placa de agitación y enciende está a 250 rpm.
- 3.- Agrega los 10 g de triptona poco a poco y verifica que se disuelva bien.
- 4.- Agrega los 10 g de NaCl poco a poco y verifica que se disuelva bien.
- 5.- Agrega los 5 g de extracto de levadura poco a poco y verifica que se disuelva bien.

- 6.- Revisa el pH de la solución y ajusta este a 7,0 con NaOH 5 N.
- 6.5 (solo para medio sólido) En este paso agregar 7 g de Agar.
- 7.- Retira el agitador magnético con el saca-agitador y apaga la placa de agitación.
- 8.- Agrega H<sub>2</sub>O hasta que el volumen final de la solución sea de 1 L.
- 9.- Vierte la solución en el matraz aforado y tápalo con el cuadro de papel aluminio.
- 10.- Esteriliza en la autoclave durante 20 min a 15 psi (1,05 kg/cm<sup>2</sup>) en ciclo líquido.
- 11.- Esperar a que enfríe a menos de 50 °C y añadir 0.1 g de ampicilina (concentración final 100 µg/ml) mezcla el medio agitándolo para evitar que se produzcan burbujas de aire.
- 12.- Para medio sólido, verter en las placas directamente del matraz; permitir aproximadamente de 30 a 35 ml de medio por placa de 90 mm. (Nota: el medio está listo para ser usado en forma de líquido).
- 13.- Para eliminar las burbujas del medio en la placa, flamee la superficie del medio con un mechero Bunsen antes de que se endurezca el agar.
- 14.- Cuando el medio se haya endurecido por completo, invierta las placas y guárdelas a 4°C hasta que las necesite.

Nota: Las placas deben retirarse del almacenamiento 1-2 h antes de su uso. Si las placas son frescas, “sudarán” cuando se incuban a 37°C. Cuando esta condensación cae sobre la superficie de agar/agarosa, permite que las colonias bacterianas o las placas de bacteriófagos se propaguen y aumenta las posibilidades de contaminación cruzada. Este problema se puede evitar limpiando la condensación de las tapas de las placas y luego incubando las placas durante varias horas a 37°C en posición invertida antes de usarlas.

### **Productos esperados**

- Preparación correcta de medio LB líquido y/o sólido.
- Placas de cultivo homogéneas y sin contaminación.
- Medio con pH y esterilidad adecuados.

## **Análisis de resultados**

Responde las siguientes preguntas:

Si un cultivo no crece como se esperaba, ¿qué variables revisarías primero y por qué?

¿Cómo modificarías un medio de cultivo para favorecer el crecimiento de un microorganismo específico?

¿Cómo afectan los cambios en la composición del medio a los resultados experimentales?

## **Preguntas de reflexión**

¿Por qué es importante la esterilización del medio?

¿Qué función cumple cada componente del medio LB?

¿Qué errores pueden afectar la calidad del medio preparado?

## **Conclusión**

Redacta un párrafo donde describas lo aprendido sobre la preparación de medios de cultivo, la importancia de sus componentes y su impacto en el crecimiento microbiano.

## **Bibliografía**

Cold Spring Harbor Protocols. (2006). LB (Luria-Bertani) liquid medium. <https://doi.org/10.1101/pdb.rec8141>

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). Brock biology of microorganisms. Pearson.

Rodríguez Martínez, C., & Zhurbenko, R. (2018). Manual BioCen de medios de cultivo (4ª ed.). Centro Nacional de Biopreparados.

## **PRÁCTICA NO. 4**

### **EXTRACCIÓN DE ADN SIN Y CON KIT PARA TEJIDO**

Autora y autor

Marisol De la Mora Curiel

Leo Josué Arteaga Vázquez

Tiempo estimado

2 días (6 horas por protocolo).

#### **Introducción**

El ácido desoxirribonucleico (ADN) consiste en dos cadenas largas de polinucleótidos compuestas de subunidades, los nucleótidos (grupo fosfato + azúcar + base nitrogenada). En el ADN hay cuatro tipos de bases: adenina, timina, citosina y guanina. El azúcar de los nucleótidos es la desoxirribosa la cual se compone de cinco átomos de carbono y la manera en la que se unen los nucleótidos es por medio de enlaces fosfodiéster entre el carbono 5' de uno y el carbono 3' de otro. Las cadenas se recorren una a la otra en sentido antiparalelo y son unidas por puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas de los nucleótidos, la adenina forma dos puentes de hidrógeno con la timina y la guanina forma tres con la citosina. Al unirse las dos cadenas de polinucleótidos, adquieren una forma de doble hélice con las bases nitrogenadas de los nucleótidos en la parte interna y la cadena de azúcar-fosfato en la parte externa, esto le confiere polaridad a la molécula de ADN, siendo positiva por dentro y negativa por fuera (Figura 4.1) (Alberts, 2015). Que sea polar es de vital importancia para la extracción del ADN.

La carga negativa y polaridad de la molécula de ADN nos permiten aislarla de otras biomoléculas que componen a las células. Básicamente, los protocolos de extracción consisten en romper de alguna forma los tejidos y luego las células, una vez hecho esto se colocan de forma serial reactivos que van “lavando” y eliminando otro tipo de biomoléculas hasta que únicamente nos quedamos con la molécula de ADN. Los pasos fundamentales en todo protocolo son: homogeneización del tejido (por ultrasonido, mecánicamente macerando con

nitrógeno líquido, químicamente con detergentes, proteasas y agentes caotrópicos), lisis celular (por medio de enzimas), separación de proteínas y lípidos (mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación), precipitación y rehidratación del ADN (Alejos-Velázquez et al. 2014).

El grado de pureza y calidad obtenido de ADN varía de un protocolo a otro, así como del tipo de tejido y organismo del que se extrae. Por lo regular se busca determinada pureza y calidad dependiendo del análisis posterior, si se desea hacer librerías genéticas o secuenciar genomas completos el grado de pureza y calidad requerido es mayor que si solo se desea hacer un análisis genético y PCR de un marcador (Vasselon et al. 2017).

Ahora, existen muchos kits de extracción de ácidos nucleicos que facilitan y hacen más eficiente el proceso de extracción, sin embargo, es conveniente saber al menos alguno de los protocolos tradicionales en el caso de no contar con un kit. En esta práctica se usará el protocolo modificado de extracción por CTAB (del inglés *cetyl trimethylammonium bromide*).

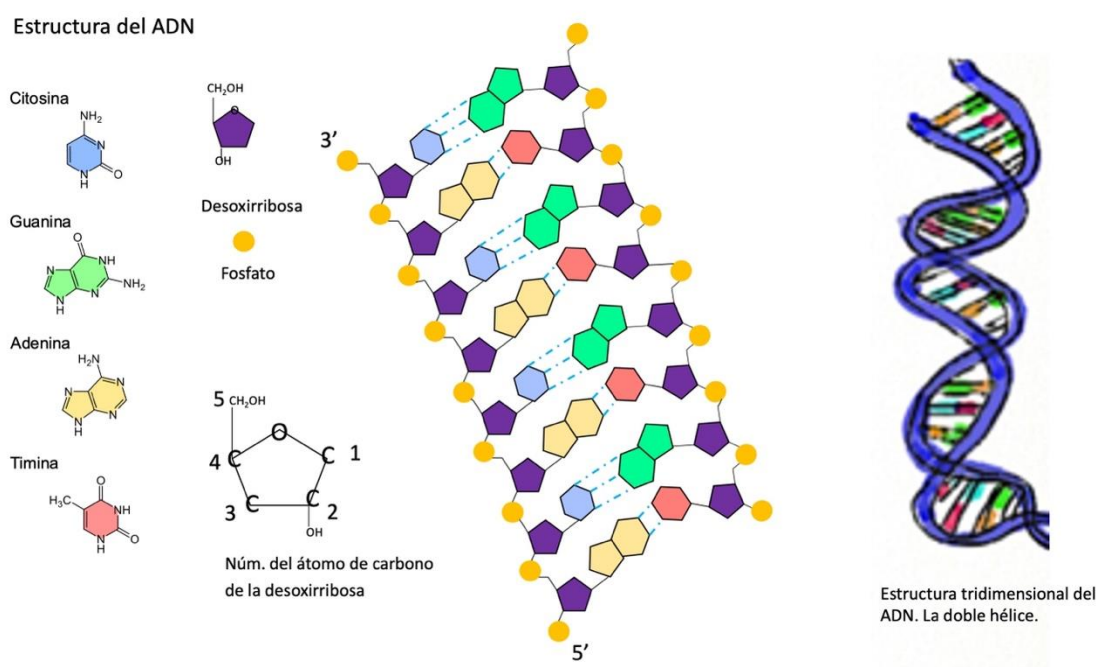


Figura 4.1 Estructura molecular del ADN y doble hélice.

## Objetivos de aprendizaje

- Aplicar técnicas de extracción de ADN a partir de muestras biológicas utilizando métodos con y sin kit.
- Comparar la eficiencia, pureza y rendimiento de ambos métodos de extracción.
- Evaluar la calidad del ADN obtenido mediante criterios experimentales.

## Materiales y equipo

### *Equipo para ambos protocolos*

- 1 centrífuga para microtubos de 1.5 ml, que pueda ser programada a 14,000 rpm.
- 1 minicentrífuga
- 1 termoblock
- 1 espectrofotómetro
- 1 micropipeta de 1-10  $\mu$ l
- 1 micropipeta de 20-200  $\mu$ l
- 1 micropipeta de 100-1000  $\mu$ l
- 1 gradilla para tubos de 1.5 o 2 ml
- 1 refrigerador
- 1 campana de extracción
- 1 termo para nitrógeno líquido

### Consumibles

- 1 par de guantes individual (por alumno).
- 10-20 puntas para micropipeta de 1-10  $\mu$ l (por alumno y/o muestra).
- 20-60 puntas para micropipeta de 20-200  $\mu$ l (por alumno y/o muestra).
- 10-20 puntas para micropipeta de 100-1000  $\mu$ l (por alumno y/o muestra).
- 1 mortero chico con pistilo estéril (o si se tiene TissueRuptor II o TissueLyser).
- 10 microtubos de 1.5 ml estériles (por alumno y/o muestra).
- 1 recipiente de unicel para verter el nitrógeno líquido.
- 1 marcador para etiquetar tubos.
- 1 contenedor de desechos líquidos.
- 1 contenedor de puntas y tubos utilizados.

#### *Reactivos del kit Qiagen*

- RNase
- Buffer AP1
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Buffer P3

Adicionalmente al kit se requiere:

- Nitrógeno líquido\*
- Etanol (96–100%)

#### *Reactivos para el método CTAB (para su preparación ver anexo 1)*

- 0.2ml Agua destilada estéril libre de DNasas y RNasas
- Nitrógeno líquido\*
- RNasa A libre de ADNasa 10mg/ml
- Proteinasa K (opcional, si se tiene presupuesto)
- Buffer de extracción
- Etanol absoluto
- Acetato de sodio (NaAc) trihidratado 3M
- Mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1 (v / v)).
- Buffer TE

\*Nota: El nitrógeno líquido se consume rápidamente, pero se requiere muy poco para congelar las muestras. Tratar de colocar todas las muestras de los alumnos juntas cada una en tubos de 1.5 ml y vaciar el nitrógeno en un solo recipiente, inmediatamente después macerar las muestras. Así se requerirá como 1L de nitrógeno por cada 50 muestras. ATENCIÓN: Es un paso crítico la descongelación de las muestras, porque evita la actividad de nucleasas, inmediatamente después de triturado el tejido colocar el buffer correspondiente del siguiente paso.

## Fundamento

Esta práctica se basa en dos enfoques:

1. Método con kit comercial, que utiliza columnas de sílice para purificación rápida y eficiente.
2. Método CTAB, que emplea detergentes y solventes orgánicos para aislar ADN (Murray & Thompson, 1980; Allen et al., 2006).

El método CTAB es económico, pero requiere mayor manipulación y control experimental, mientras que los kits reducen errores y tiempo.

## Procedimiento

Antes de empezar, recuerda preparar con anticipación todas las soluciones que se utilizarán (ver el anexo 1), esterilizar los pistilos, tubos para microcentrífuga y puntas para micropipetas. Además, rotular los tubos con un marcador indeleble y tenerlo a la mano. Por último, encender el termoblock o baño maría para que se encuentren a la temperatura requerida.

### *Extracción de ADN con el kit DNAeasy de Quiagen*

1. Moler el tejido (de planta, insecto u hongo).
  - A) Usando un mortero y pistilo. Colocar el tejido en el mortero y agregar nitrógeno líquido, moler hasta obtener un polvo fino y transferir el polvo a un tubo de tamaño apropiado y dejar evaporar el nitrógeno líquido. No dejar que la muestra se descongele. Proceder inmediatamente al paso 2.
  - B) Usando TissueRuptor II. Poner la muestra ( $\leq 100$  mg de peso húmedo o  $\leq 20$  mg tejido liofilizado) en un microtubo de 2 ml. Agregar nitrógeno líquido al tubo y congelar la muestra por 30 s. Mantener la muestra sumergida en el nitrógeno líquido y romper por aproximadamente 30 s a máxima velocidad. Dejar evaporar el nitrógeno líquido y repetir, invirtiendo la posición de los tubos dentro del *adaptor set*. Proceder inmediatamente con el paso 2.

Alternativamente, el material fresco o liofilizado puede ser directamente roto en buffer de lisis (después del paso 2) sin usar nitrógeno líquido, pero esto puede causar el cizallamiento de ADN de gran peso molecular. No se recomienda la ruptura de material congelado en buffer de lisis porque esto puede resultar en bajo rendimiento y ADN degradado.

C) Usando TissueLyser. Poner la muestra ( $\leq 100$  mg de peso húmedo o  $\leq 20$  mg tejido liofilizado) en un microtubo de 2 ml con cerradura de seguridad junto con una cuenta de carburo de tungsteno de 3 mm. Congelar los tubos en hielo seco por 30 s. Si se usa tejido liofilizado, los tubos no necesitan congelarse en hielo seco.

Poner los tubos en TissueLyser *Adapter Set* 2 x 24 y fijarlos en las abrazaderas de TissueLyser. Inmediatamente triturar las muestras por 1 minuto a 30 Hz. Desmontar el *adaptor set*, remover los tubos y congelar en hielo seco por 30 s. Si se usa tejido liofilizado, los tubos no necesitan congelarse en hielo seco. Proceder al paso 2.

2. Agregar 400  $\mu$ l de buffer AP1 y 4  $\mu$ l de solución madre de RNasa A (100 mg/ml) a un máximo de 100 mg (peso húmedo) o 20 mg (seco) de tejido roto de planta u hongo y agitar en el vortex vigorosamente.

No deben verse grumos. Agite en el vortex o pipetee más para eliminar los grumos. Los grumos del tejido no se lisarán apropiadamente y así se conseguirá un bajo rendimiento de ADN. En casos raros, donde los grumos no puedan removerse con pipeta o con el vortex, un micropistilo desechable puede usarse.

**Nota:** No mezclar el buffer AP1 y la RNasa antes de usarse.

3. Incubar la mezcla por 10 min. a 65 °C. Mezclar 2–3 veces durante la incubación invirtiendo el tubo. Este paso lisa la célula.
4. Agregar 130  $\mu$ l de buffer P3 para el lisado. Mezclar e incubar por 5 min. en hielo. Este paso precipita el detergente, proteínas y polisacáridos.

5. Recomendado: Centrifugar el lisado por 5 min. a 20000 x g (14,000 rpm). Algunas plantas pueden generar lisados muy viscosos y grandes cantidades de precipitados durante este paso. Esto puede resultar en cizallamiento de ADN en el siguiente paso. En este caso, se obtienen resultados óptimos si la mayoría de estos precipitados se remueven centrifugándolos por 5 min. a 20,000 x g (14,000 rpm). Después de la centrifugación, aplicar el sobrenadante a la columna de giro de QIAshredder Mini y continuar con el paso 6.
6. Pasar el lisado con una pipeta a la columna de giro de QIAshredder Mini colocada en un tubo de colección de 2 ml y centrifugar por 2 min. a 20,000 x g (14,000 rpm).

Puede ser necesario cortar el extremo de la punta de la pipeta para aplicar el lisado en la columna de giro del QIAshredder Mini. La columna de giro del QIAshredder Mini remueve la mayoría de los precipitados y restos celulares, pero una pequeña cantidad pasará y formará una bolita en el tubo de colección. Tener cuidado de no perturbar esta bolita en el paso 7.
7. Transferir la fracción de flujo continuo del paso 6 a un tubo nuevo (no incluido) sin perturbar la bolita de restos celulares.

Típicamente se recuperan 450 µl de lisado. Para algunas especies de plantas se recupera menos lisado. En este caso, determinar el volumen para el siguiente paso.
8. Agregar 1.5 volúmenes de buffer AW1 al lisado aclarado y mezclar pipeteando. Por ejemplo, para 450 µl de lisado, agregar 675 µl de buffer AW1. Reducir la cantidad del buffer AW1 de acuerdo a si el volumen del lisado es menor. Un precipitado puede formarse después de la adición del buffer AW1, pero esto no afectará el procedimiento de DNeasy.

Nota: Asegurarse de que el etanol ha sido agregado al buffer AW1.

Nota: Es importante pipetear el buffer AW1 directamente en el lisado aclarado y mezclar inmediatamente.

9. Tomar con una pipeta de 650  $\mu$ l de la mezcla del paso 8, incluyendo cualquier precipitado que pueda haberse formado, y ponerlo en la columna de giro del DNeasy Mini colocada en un tubo de colección de 2 ml (incluido). Centrifugar por 1 minuto a  $\geq 6000 \times g$  (corresponde a  $\geq 8000$  rpm para la mayoría de las centrifugadoras) y descartar el flujo continuo. Reusar el tubo de colección de este paso en el siguiente.
10. Repetir el paso 8 al 9 con la muestra restante. Descartar el flujo continuo y el tubo de colección.
11. Poner la columna de giro del DNeasy Mini en un tubo de colección de 2 ml nuevo (incluido), agregar 500  $\mu$ l de buffer AW2 y centrifugar por 1 minuto a  $\geq 6000 \times g$  ( $\geq 8000$  rpm). Descartar el flujo continuo y reusar el tubo de colección en el paso 12. Nota: Asegurarse de que el etanol ha sido agregado al buffer AW2.
12. Agregar 500  $\mu$ l de buffer AW2 a la columna de giro del DNeasy Mini y centrifugar por 2 min. a  $20,000 \times g$  (14,000 rpm) para secar la membrana. Es importante secar la membrana de la columna de giro del DNeasy Mini porque el etanol residual puede interferir con reacciones posteriores. Este paso de centrifugado asegura que no se arrastre etanol residual durante la elución. Descartar el flujo continuo y el tubo de colección.  
Después de enjuagar con buffer AW2, la membrana de la columna de giro del DNeasy Mini usualmente solo se colorea un poco. En el raro caso de que la membrana quede significativamente colorada después del enjuague con buffer AW2, revisar la guía para resolver problemas (Troubleshooting Guide), página 53 de la documentación que viene con el kit.  
Nota: Después de centrifugar, remover la columna de giro del DNeasy Mini del tubo de colección cuidadosamente de manera que la columna no esté en contacto con el flujo continuo porque eso puede provocar que se arrastre etanol.

13. Transferir la columna de giro del DNeasy Mini a un tubo de microcentrifugado de 1.5 o 2 ml (no incluido) y pasar con una pipeta 100  $\mu$ l del buffer AE directamente en la membrana del DNeasy. Incubar por 5 min. a temperatura ambiente y después centrifugar por 1 minuto a  $\geq 6000 \times g$  ( $\geq 8000$  rpm) para eluir.

La elución con 50  $\mu$ l (en vez de 100  $\mu$ l) incrementa la concentración final de ADN en el eluyente significativamente, pero también reduce el rendimiento general de ADN. Si se cargan cantidades mayores de ADN ( $>20 \mu$ g), eluir con 200  $\mu$ l (en vez de 100  $\mu$ l) incrementa el rendimiento.

14. Repetir el paso 13 una vez.

Un tubo de microcentrifugado nuevo puede usarse para el segundo paso de elución para prevenir dilución del primer eluyente. Alternativamente, el tubo de microcentrifugado puede reusarse para el segundo paso de elución para combinar eluyentes.

Nota: No deberían eluirse más de 200  $\mu$ l en un tubo de microcentrifugado de 1.5 ml porque haría que la columna de giro del DNeasy Mini estuviera en contacto con el eluyente.

15. Añade 1 microlitro de buffer AE al espectrofotómetro para calibrarlo, limpia con un pedacito de papel y después coloca 1 microlitro de tu muestra para medir la concentración de ADN.

#### *Extracción de ADN con el método modificado de CTAB*

Precaliente el Buffer de extracción a 65 ° C durante el tiempo que se muele el tejido.

1a. Moler el tejido (de planta, insecto u hongo) usando un mortero y pistilo. Colocar el tejido en el mortero y agregar nitrógeno líquido, moler hasta obtener un polvo fino y transferir el polvo a un tubo de tamaño apropiado y dejar evaporar el nitrógeno líquido. *Nota: ver figura 3.2 para los pasos 1b, 2 y 3.*

1b. Moler el tejido (de planta, insecto u hongo) usando un tubo de 1.5 y un pistilo para pellet. Colocar el tejido en el tubo, vaciar nitrógeno en un recipiente de unicel y colocar el tubo de tal forma que sobrepase el tejido, pero con cuidado de que no se voltee el tubo ni se salga la muestra.

2. Añada 1.2 ml del buffer de extracción precalentado al polvo de tejido congelado y agite en el vortex durante 5 a 10s para mezclar bien.

3. Incubar a 65 ° C durante 30 min. en un termoblock o baño María e invertir los tubos cada 5 a 10 min. para permitir la mezcla.

#### PASOS OPCIONALES

*A. Retirar del termoblock e incubar 5 min. en hielo para bajar la temperatura.*

*B. Agregar 20 µl de RNAsa A, mezclar por inversión e incubar por 20 min. a 37 °C. Durante la incubación invertir los tubos dos o tres veces.*

*C. Agregar 10 µl de proteinasa K, mezclar por inversión e incubar a 56 °C por 20 min. Durante la incubación invertir los tubos dos o tres veces. NOTA: la proteinasa K se inactiva a más de 65 °C.*

*D. Subir la temperatura a 65 °C e incubar 5 min. Continuar con el paso 4.*

*Nota: ver figura 3.3 para los pasos 4, 5, 6, 7 y 8.*

4.- En un tubo de microcentrífuga de 2 ml nuevo colocar 800 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico. Prepare un tubo por muestra.

5. Retire los tubos del baño María y centrifugue a 13.500 x g durante 10 min a temperatura ambiente. Transfiera el sobrenadante a los tubos de microcentrífuga

con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico que se preparó en el Paso 4. Utilice una micropipeta de 100-1000  $\mu\text{l}$  con puntas de calibre compatibles.

NOTA: este paso es para retirar residuos no solubles mientras que en el sobrenadante se encuentra el ADN.

6. Cierre bien los tubos y mezcle suavemente invirtiendo los tubos durante 20 min a 20–22 °C (temperatura ambiente).

7. Separar las fases centrifugando la mezcla a 13,500 x g durante 10 min a temperatura ambiente en una microcentrífuga

8. Transfiera con cuidado la capa acuosa (superior) a un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 ml que contenga 800  $\mu\text{l}$  de isopropanol frío (almacenado a -20 °C) y mezclar invirtiendo el tubo e incubando a temperatura ambiente durante 10 min para precipitar el ADN. *Nota: ver figura 3.4 para los pasos 9 al 18.*

9. Centrifugar la mezcla a 13,500x g durante 10 min. a temperatura ambiente en una microcentrífuga.

10. Retirar el sobrenadante usando una micropipeta y luego resuspender el sedimento en 250  $\mu\text{l}$  de TE a temperatura ambiente, usando la micropipeta con una nueva punta.

11. Pipetee 2,5  $\mu\text{l}$  de RNasa sin ADNasa en la mezcla de muestra e incube a 37 ° C durante 30 min.

12. Pipetee 25  $\mu\text{l}$  de NaAc 3 M y mezcle por inversión varias veces.

13. Añadir 600  $\mu\text{l}$  de etanol preenfriado (-20 °C), mezclar e incubar a -20 °C durante 20-30 min para precipitar el ADN.

14. Centrifugue la mezcla a 13,500 x g durante 10 min. a temperatura ambiente en una microcentrífuga.

15. Retirar con cuidado el sobrenadante decantando o con una micropipeta y luego agregar 500  $\mu$ l de etanol frío (-20 °C) 70% (v / v). NOTA: el ADN está en el pellet. Despegue el pellet del fondo del tubo agitando rápidamente con vortex de 1 a 2 s, o dando golpes suaves con el dedo al fondo del tubo.

16. Centrifugar a 13,500 x g durante 10 min en una microcentrífuga a temperatura ambiente y eliminar el sobrenadante de etanol al 70%, teniendo cuidado de no perturbar el pellet.

17. Colocar los tubos para microcentrífuga de 1.5 ml en el concentrador de vacío a 500 atm a 55 °C por 10 min para secar el ADN. Si no se cuenta con un concentrador de vacío se pueden dejar los tubos abiertos hasta que se evapore el etanol; cubrirlos con una toalla de papel para que no se contaminen.

18. Revisar que el pellet de ADN se encuentra completamente seco; en caso de no estarlo repetir el paso 17 durante el tiempo que sea necesario

19. Rehidratar el ADN en 200  $\mu$ l de buffer TE o agua destilada estéril libre de DNAsas y RNAsas. Si el botón de ADN es pequeño se puede hidratar con 50 o 100  $\mu$ l.

20. Mide la concentración de ADN en el espectrofotómetro.

NOTA: - La electroforesis en gel de agarosa del ADN mostrará la integridad del ADN, mientras que la espectrofotometría dará una indicación de la concentración y limpieza.

A continuación, figuras que ilustran el método de extracción de ADN con el método modificado de CTAB, para cantidades precisas leer el texto.

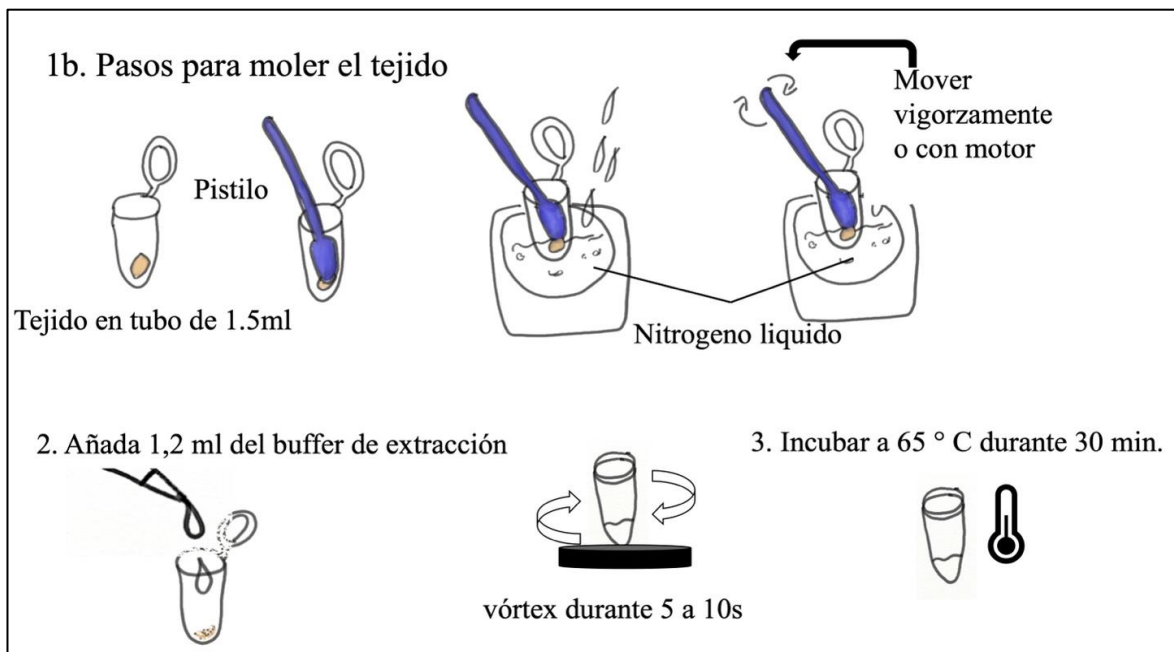


Figura 4.2 Pasos para la extracción de ADN (pasos1b, 2 y 3).

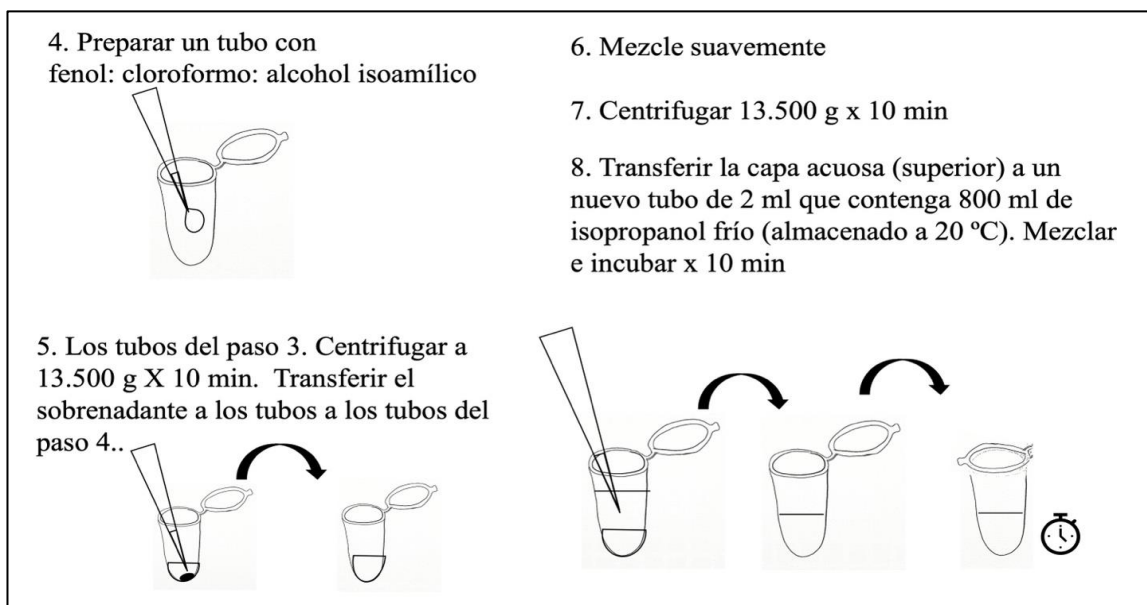


Figura 4.3 Pasos para la extracción de ADN (pasos 4, 5, 6, 7 y 8).

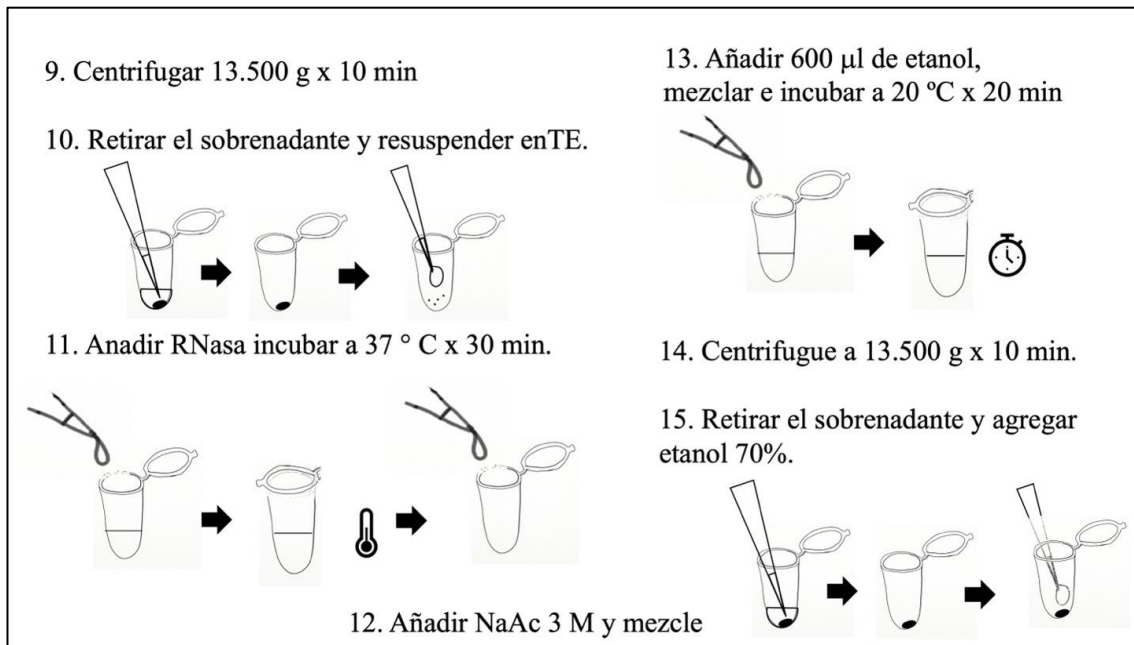


*Figura 4.4 Pasos para la extracción de ADN (pasos del 9 al 15).*

16. Centrifugar a 13.500 g x 10 min eliminar el sobrenadante de etanol.

17. Dejar los tubos abiertos hasta que se evapore el etanol!



18. Rehidratar el ADN en buffer TE.



*Figura 4.5 Pasos para la extracción de ADN (pasos del 16 al 18).*

## Productos esperados

Obtención de ADN genómico.

Diferencias observables entre métodos (rendimiento y pureza).

Datos de concentración y calidad del ADN.

## **Análisis de resultados**

Si el ADN obtenido presenta baja pureza, ¿qué etapas del procedimiento revisarías y cómo las optimizarías?

¿En qué situaciones elegirías un método con kit sobre uno tradicional? Justifica tu decisión.

Diseña una estrategia para mejorar el rendimiento de la extracción en muestras difíciles.

## **Preguntas de reflexión**

¿Qué ventajas y desventajas tiene cada método?

¿Qué factores afectan la calidad del ADN?

¿Por qué es importante evitar la degradación del ADN?

## **Conclusión**

Redacta un párrafo donde describas lo aprendido sobre los métodos de extracción de ADN, su complejidad, ventajas y aplicaciones.

## **Bibliografía**

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Hunt, T. (2010). *Biología molecular de la célula*.

Alejos-Velázquez, L. et al. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*. SEMARNAT.

Allen, G. C., Flores-Vergara, M. A., Krasynanski, S., Kumar, S., & Thompson, W. F. (2006). A modified protocol for rapid DNA isolation. *Nature Protocols*, 1 (5), 2320–2325.

Clark, M. S. (Ed.). (2013). *Plant molecular biology: A laboratory manual*. Springer.

Till, B. J., et al. (2015). *Low-cost methods for molecular characterization*. Springer.

Vasselon, V., et al. (2017). DNA extraction methods in biomonitoring. *Freshwater Science*, 36(1), 162–177.

## **PRÁCTICA NO. 5**

### **ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA**

Autor

Ruy Andani Martínez Hernández

Tiempo estimado

3 horas

#### **Introducción**

La electroforesis es una técnica empleada en biología molecular y otras disciplinas, la cual nos permite realizar una separación por tamaño y carga eléctrica de moléculas biológicas (incluyendo ácidos nucleicos y proteínas). Un par de ejemplos en dónde nos es útil visualizar el producto de una PCR en el gel son: para comprobar que nuestra PCR se realizó correctamente, para realizar un comparativo de presencia o ausencia de un gen entre diferentes muestras, para corroborar la integridad del producto amplificado y la especificidad de la reacción.

Esta técnica se lleva a cabo en una cámara de electroforesis, la cual puede ser vertical u horizontal (Figura 5.1). Esta cámara contiene dos electrodos a cada costado (uno negativo y uno positivo). Entre ambos electrodos tenemos un depósito, en el cual se colocará un gel de agarosa o de poliacrilamida. En este gel se lleva a cabo la mayor parte del proceso, ya que es dónde colocamos las muestras para la separación por cargas.

La diferencia entre usar un gel de agarosa o uno de poliacrilamida, va a depender del tamaño de molécula que trabajamos. Esto debido a que la porosidad del material del gel es distinta, siendo los geles de agarosa aquellos que poseen un mayor tamaño en comparación con los de poliacrilamida, por lo cual permite el paso de moléculas más grandes como las de un ácido nucleico, mientras que los de poliacrilamida permiten el paso de moléculas pequeñas como las de algunas proteínas. Sin embargo, la preparación de los geles de poliacrilamida debe tener un especial cuidado debido a la neurotoxicidad que posee su sustrato (acrilamida).

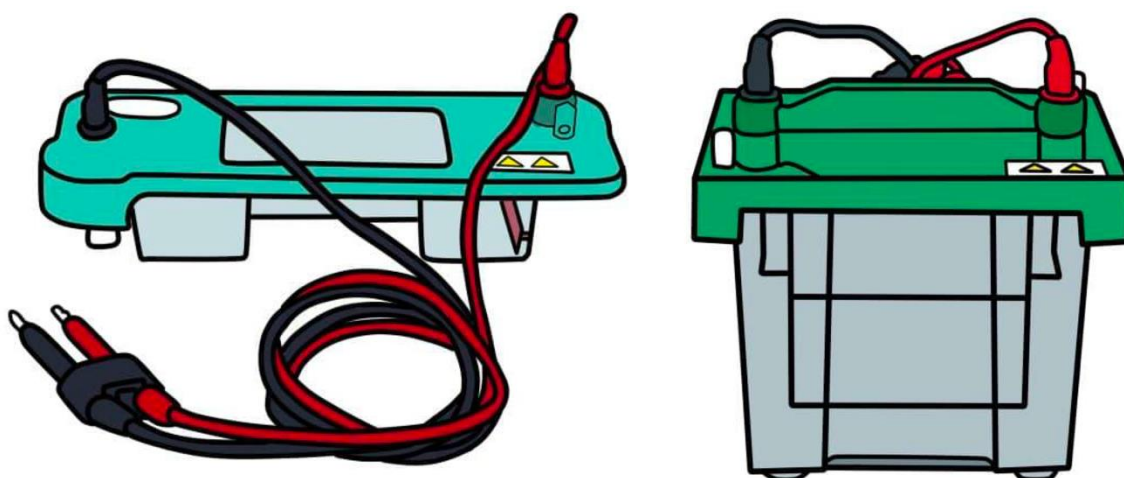


*Figura 5.1: Tipos de cámara de electroforesis, cámara horizontal (izquierda) y cámara vertical (derecha) (Nota. Ilustración elaborada por J.E. González Fuentes para esta práctica, 2021)*

De igual manera, en la cámara de electroforesis también debe colocarse una solución amortiguadora o buffer (un ejemplo es el TBE o TAE, compuesto por Tris, borato y EDTA usualmente usado a un pH de 8 y a una concentración de 1x). El buffer permite mantener nuestras muestras en las mejores condiciones, así como el transmitir la carga eléctrica por la cámara de electroforesis. En el caso del ARN y ADN, los pozos que se harán en el gel y dónde colocaremos las muestras, se deben colocar del lado del electrodo negativo, esto debido que la carga de estas sustancias (negativa) hará que se dirijan hacia el electrodo positivo (Figura 5.2).

Finalmente, hay que mencionar que el tiempo y voltajes necesarios para cada proceso de electroforesis que realicemos variaría dependiendo de la muestra empleada y el gel utilizado. Asimismo, para visualizar los resultados, también dependerá del gel utilizado y el tipo de muestra empleada. En el caso de usar ADN y gel de agarosa, para fragmentos de PCR <100 pb se puede programar la cámara de 80 a 100 V y correr el gel de 45 a 60 min. Para fragmentos de PCR de >100 pb a 250 pb, usar 100 a 115 V durante 1 a 1,5 horas. Después de este tiempo debemos colocar nuestro gel en un transiluminador para poder visualizar los resultados.

Un transiluminador es un instrumento que emite luz UV en distintas longitudes de onda. Para poder visualizar el gen amplificado es necesario entonces colocarle una molécula que se una al ADN, como un intercalante de bases (bromuro de etidio), un anticuerpo+fluoróforo (Diamond™) o una molécula con afinidad a la doble hebra de ADN (SYBR™ Green I), que sea capaz de excitarse con las longitudes de onda que emite el transiluminador.

Para saber el tamaño en pares de bases (pb) del producto amplificado, al mismo tiempo que se corre la muestra, en otro de los pozos es necesario colocar una referencia de peso molecular conocida como escalera, esta consiste en una muestra con fragmentos de ADN que van de 50 en 50 o de 100 en 100 aumentando sus pares de bases y por lo tanto migran según el tamaño. A estas escaleras también es necesario colocar la molécula colorante para visualizar en el transiluminador.

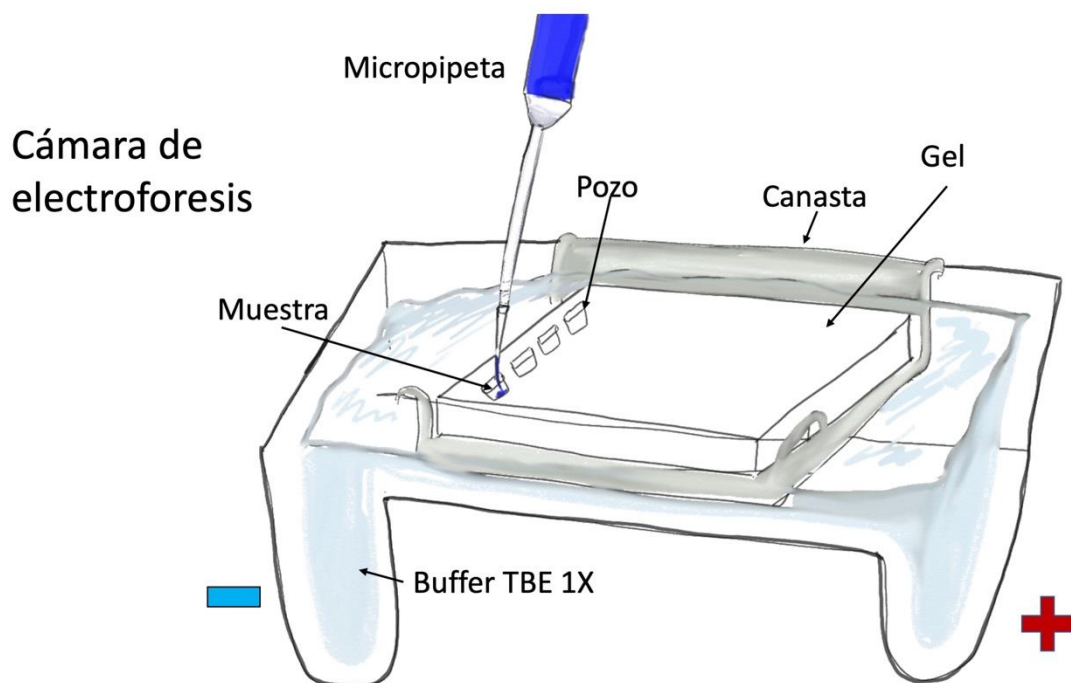


*Figura 5.2 Dirección del movimiento de ADN o ARN en cámara de electroforesis, del polo negativo al positivo.*

## Objetivos de aprendizaje

- Aplicar la técnica de electroforesis en gel de agarosa para la separación de ácidos nucleicos.
- Interpretar los resultados obtenidos en función del tamaño y la migración de las bandas.
- Analizar los factores que afectan la resolución y separación de fragmentos de ADN.

## Materiales y equipo

### Equipo:

- 1 fuente de poder
- 1 cámara de electroforesis
- 1 canasta y peine de la cámara de electroforesis
- 1 balanza analítica
- 1 microondas
- 1 micropipeta de 1 a 10  $\mu$ l

### Cristalería y consumibles

- 1 charola pequeña de plástico o papel (para pesar menos de un gramo de agarosa)
- 1 espátula pequeña (para tomar la agarosa)
- 1 matraz Erlenmeyer de 50 ml y de vidrio
- 5 cm de *parafilm*
- 10 puntas para micropipeta estériles de 1 a 10  $\mu$ l
- 1 probeta de 100 ml
- 1 par de guantes de nitrilo sin polvo

### Reactivos:

- 1 SYBR™ Green (SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain - 10,000X concentrate in DMSO. Invitrogen™ by Thermo Scientific, Cat. Num. S7563)

1 escalera molecular de 100 pb (100 bp DNA Ladder Invitrogen™ by Thermo Scientific, Cat. Num. 15628050)

1 Blue Dye (DNA Gel Loading Dye (6X) Invitrogen™ by Thermo Scientific, Cat. Num. R0611)

Agarosa grado molecular (Agarose I (Molecular Biology Grade) Thermo Scientific™ Cat. Num. 17850)

Buffer TBE 10x (UltraPure™ TBE Buffer, 10X Thermo Scientific™ Cat. Num. 15581044)

Muestra de ADN (usualmente producto de PCR).

## **Fundamento**

La electroforesis en gel de agarosa se basa en la migración de moléculas cargadas a través de una matriz porosa bajo la influencia de un campo eléctrico. La velocidad de migración depende del tamaño de los fragmentos y de la concentración del gel. Esta técnica es fundamental para la visualización y análisis de ácidos nucleicos (Yábar Varas, 2003).

## **Procedimiento**

Recuerda en todo momento usar guantes de nitrilo sin polvo y puntas de pipetas limpias para no contaminar tus muestras. Además, cuando saques tus muestras de ADN de -20 °C deja que se descongelen en hielo y mantenlas siempre en el hielo si no las estás manipulando, esto para evitar daños a tus muestras de ADN.

1. Verificar la capacidad de llenado de la cámara de electroforesis y el tamaño del gel. Ejemplo, si a la cámara le caben 50ml y a la canasta para hacer el gel 25 ml, se necesita 75ml de Buffer TBE1x.

2. Diluir el Buffer TBE 10x a 1x con agua destilada. Ejemplo, colocar en una probeta 10 ml de Buffer 10x y 90 ml de agua destilada para un volumen final de 100 ml.
3. Preparar el gel de agarosa, concentración 1%. Ejemplo, si la canasta de gel es para 25 ml, pesar 0.25 g de agarosa y colócalo en el matraz Erlenmeyer, añadir 25 ml de TBE 1x.
4. Colocar el matraz en el microondas de 0.5 a 1 min. Revisar todo el tiempo que la muestra no se salga del matraz, si está subiendo mucho parar el microondas, con guantes para cosas calientes, tomar el frasco y agítalo levemente con movimientos circulares. Volver a colocarlo dentro del microondas y continuar hasta que ya se vea la agarosa disuelta por completo.
5. Esperar a que se enfríe un poco y vierte la agarosa en la canasta, colocar con cuidado el peine. Dejar que solidifique unos 10 min. Verificar que ya está sólido antes de retirar el peine.
6. Retirar el peine con cuidado presionando levemente el gel a los lados del peine con el dedo índice para que se desprenda con facilidad, de lo contrario se podrían romper los pozos.
7. Llenar la cámara de electroforesis con suficiente TBE 1x.
8. Colocar el gel en la cámara llena de TBE 1x.
9. Añadir 1  $\mu$ l de SYBR Green a 1 ml de Blue Dye (buffer de carga). Esto porque el buffer de carga ya lleva el tinte y la mezcla queda a una proporción 1:1000.
10. Sobre los 5 cm de *parafilm* colocar 3  $\mu$ l del buffer con colorante (SYBR Green+ Blue Dye) por muestra y por escalera.

11. Añadir 2  $\mu$ l de tu muestra de ADN (producto de PCR) a los 3  $\mu$ l de mezcla de buffer con colorante en el *parafilm*, subir y bajar el líquido con la punta para que se mezcle bien.

12. Añadir 0.5  $\mu$ l de la escalera de peso molecular 100 pb a 3  $\mu$ l de mezcla de buffer con colorante en el *parafilm*, subir y bajar el líquido con la punta para que se mezcle bien.

13. Cargar las muestras en el gel. Con la micropipeta tomar todo el líquido (5  $\mu$ l de la muestra) y colocarlo en uno de los pozos del gel. Con otra punta tomar todo el líquido de la escalera (3.5  $\mu$ l) y colocarlo en otro de los pozos del gel. ATENCIÓN: tratar de ser lo más preciso posible a la hora de depositar la muestra en cada pozo del gel, si se perfora el gel con la punta se saldrá la muestra. (ver figura 5.2)

14. Cerrar la cámara de electroforesis y colocar los electrodos. Los electrodos van de la fuente de poder a la cámara de electroforesis y recordar que el polo negativo queda del lado de las muestras y el polo positivo queda al otro lado del gel, porque el ADN se moverá hacia lo positivo.

15. Encender la fuente de poder y dejar que corra por 30 min si el peso molecular de la muestra es menor a 300 pb, si es mayor aumentar 5 min por cada 100 pb más. ATENCIÓN: si el gel es muy corto checar periódicamente que no se vaya a salir la muestra.

16. Correr las muestras hasta 1/3 a 1/2 de la longitud del gel, sin dejar que el tinte se salga por la parte inferior del gel. Apagar la cámara y retirar la canasta con el gel.

17. Colocar el gel en un transiluminador UV, sin la canasta, y encenderlo, tomar lectura a una longitud de onda de 498 nm y tomar una fotografía.

18. Apague el transiluminador UV, y retire el gel. Depositar el gel en una charola de desechos contaminantes para que después sea desechado de forma segura.

### **Productos esperados**

Gel de agarosa con bandas visibles de ADN.

Identificación del tamaño de fragmentos mediante comparación con la escalera.

Registro fotográfico del gel.

### **Análisis de resultados**

Si las bandas de ADN no se observan claramente, ¿qué posibles causas considerarías?

¿Cómo modificarías las condiciones de la electroforesis para mejorar la resolución de fragmentos similares?

Analiza un gel con resultados inesperados y propone explicaciones plausibles.

### **Preguntas de reflexión**

¿Por qué el ADN migra hacia el polo positivo?

¿Cómo influye la concentración de agarosa en la separación?

¿Qué errores afectan la calidad de las bandas?

### **Conclusión**

Redacta un párrafo donde describas lo aprendido sobre la técnica de electroforesis, su utilidad y los factores que influyen en los resultados obtenidos.

### **Bibliografía**

Austin, C. (s. f.). *Electroforesis*. NHGRI Genome.gov.

Espinosa, L. (s. f.). *Guía práctica sobre la técnica de PCR*.

Park, D. (2011). *PCR protocols* (3rd ed.). Humana Press.

Yábar Varas, C. (2003). *Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN*. Instituto Nacional de Salud.

## PRÁCTICA NO. 6

### REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Autor y autora

Ruy Andani Martínez Hernández

Marisol De la Mora Curiel

Tiempo estimado

5 horas por protocolo

#### Introducción

La reacción en cadena de la polimerasa, o PCR por sus siglas en inglés, es una técnica de biología molecular con la cual podemos obtener múltiples copias de una secuencia de ADN de acuerdo con la información que posteriormente queramos obtener (Park, 2011). Es muy importante no dejar ningún contaminante cuando se hace la extracción del ADN, porque estos podrían inhibir la reacción de PCR. En la tabla 6.1 se muestran algunos inhibidores de la reacción de PCR.

| Nombre                | Concentración de inhibición |
|-----------------------|-----------------------------|
| Dodecilsulfato sódico | > 0.005%                    |
| Fenol                 | > 0.2%                      |
| Etanol                | > 1%                        |
| Isopropanol           | > 1%                        |
| Acetato de sodio      | > 5 mM                      |
| Cloruro de sodio      | > 25 mM                     |
| EDTA                  | > 0.5 mM                    |

Tabla 6.1 Inhibidores de la PCR (Schrader et al. 2012)

Si se quiere realizar una PCR “clásica”, sólo se podrá realizar si se trabaja con muestras de ADN, ya que como su nombre lo indica, se hace uso de una polimerasa para replicar múltiples veces la secuencia deseada. Las polimerasas son un grupo de enzimas, las cuales permiten la replicación de una secuencia de ADN; estas enzimas requieren de un molde (secuencia a replicar), un primer

o cebador (los cuales actúan como marcadores de dónde debe iniciar la replicación la polimerasa), y finalmente nucleótidos libres con los cuales construir la nueva secuencia de ADN, hay que mencionar que esta replicación se realiza en dirección 5' a 3' por la enzima ADN polimerasa. Para la PCR, el tipo de polimerasa que más se utiliza se conoce como Taq polimerasa, esta polimerasa proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*, y es la más utilizada en esta técnica debido a sus características termoestables y no es necesaria la primasa porque en la reacción se agregan los primer de ADN, secuencias complementarias al inicio y fin del gen que se desea amplificar. En el tubo de reacción se agregan entonces la Taq polimerasa, el primer F (*del inglés* hacia delante) y el primer R (*del inglés* “hacia atrás”), los nucleótidos, el buffer adecuado para el funcionamiento de la enzima, el Mg que es un cofactor de la polimerasa, el ADN con la secuencia de interés y agua (Figura 6.1).

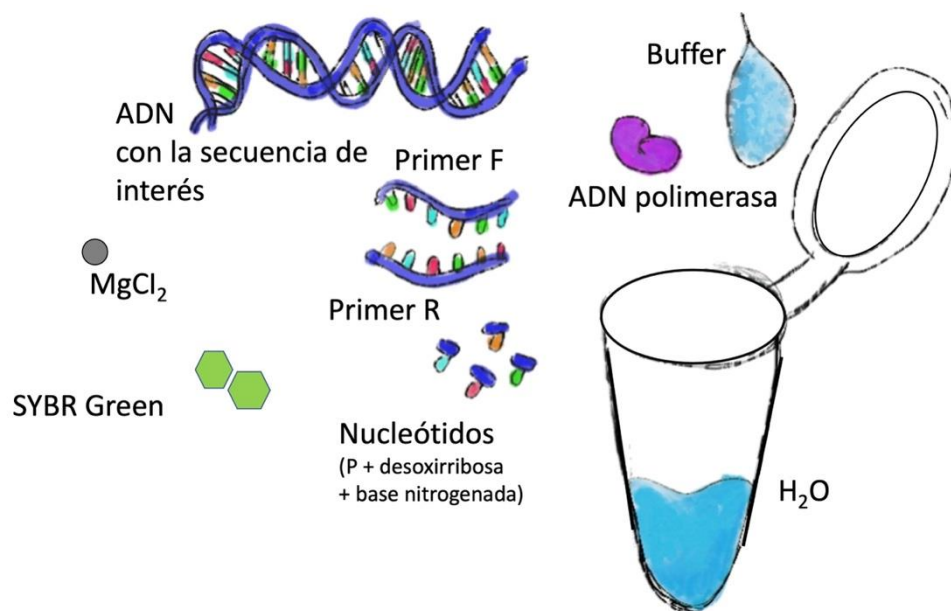


Figura 6.1 Componentes de la mezcla para la reacción de PCR.

Durante el proceso de la PCR, tenemos 3 pasos que se repiten, lo que se denomina un ciclo (figura 6.2). Pasos de la PCR (Rajalakshmi, 2017):

1. Desnaturalización: Mediante el uso de calor, separamos la doble hélice de ADN para obtener 2 hélices simples de la secuencia. Toda la molécula del ADN

queda separada en dos hebras ya que se rompen los puentes de hidrógeno que mantienen las uniones canónicas de las bases nitrogenadas. Usualmente la temperatura oscila entre los 94–98 ° C por un tiempo de 20–30 segundos.

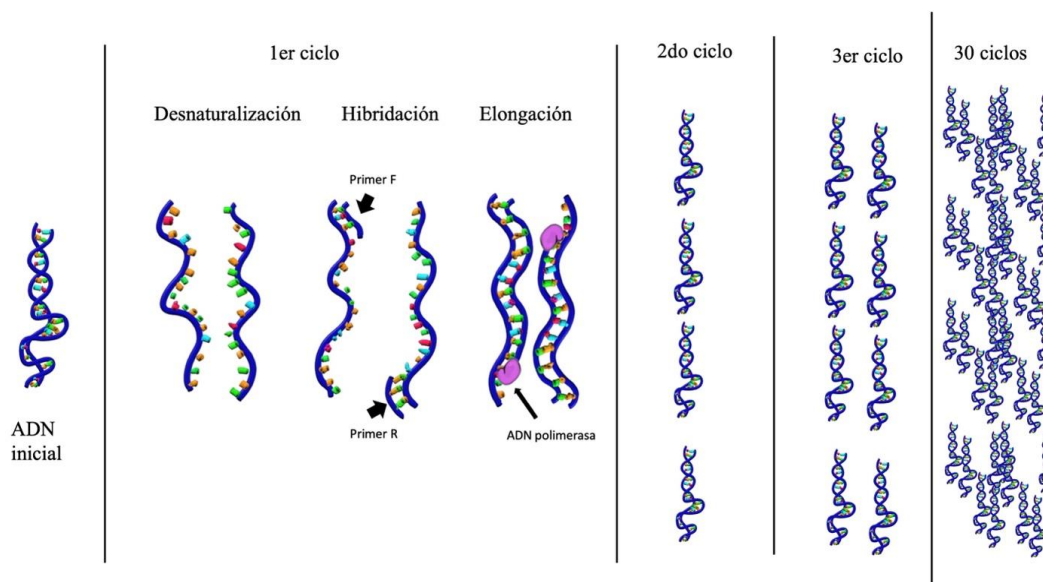


*Figura 6.2 Número de copias de ADN y ciclos de la PCR.*

2. Hibridación: En este paso, los cebadores / primers, se unirán a la secuencia que deseamos replicar, cada primer está diseñado para unirse a una secuencia específica. La temperatura de la reacción se reduce a 50–65 ° durante 20–40 segundos. En la PCR “clásica” se incluyen dos primers diferentes en la mezcla de reacción: uno para cada uno de los dos complementos monocatenarios que contienen la región diana. Durante este paso, la polimerasa se une al híbrido primer-molde y comienza la síntesis de ADN.

3. Elongación: En esta fase continua la elongación de la hebra de ADN. La Taq polimerasa utiliza los nucleótidos libres para ir añadiéndolos en la síntesis. La temperatura en este paso depende de la ADN polimerasa utilizada; la temperatura de actividad óptima es aproximadamente 75-80 ° C. El tiempo preciso requerido para el alargamiento depende tanto de la ADN polimerasa utilizada como de la longitud de la región diana del ADN para amplificar, la

mayoría de las ADN polimerasas polimerizan mil bases por minuto, por lo que un fragmento de 500 bases requerirá 30s.

Si deseamos hacer muchas copias o nuestro gen es una secuencia muy larga, aumentarán el número de ciclos. Usualmente un PCR convencional para fragmentos de aprox. 500 pb usa 30 ciclos. La fórmula utilizada para calcular el número de copias de ADN formadas después de un número determinado de ciclos es  $(2^n - 2n)x$ , donde  $n$  es el número de ciclos,  $x$  el número de copias iniciales de la secuencia diana y  $2n$  el número de copias obtenidas del primer ciclo. Por lo tanto, una reacción establecida para 30 ciclos da como resultado  $2^{30}$ , o 1.073.741.824, copias de la región diana de ADN de doble hebra original (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013). Sin embargo, dependiendo del tipo de ADN que se utilice (bacteriano, animal, vegetal, fúngico, etcétera), nucleótidos, polimerasa, primers, tamaño del gen, etc. tendremos variaciones en el número de ciclos, así como, el tiempo y temperatura necesarios para cada paso.

Adicionalmente, en varios protocolos se incluye una fase antes de los ciclos de desnaturalización y una fase final, después de los ciclos, de elongación final. Con el objetivo de que al inicio todos los puentes de hidrógeno se deshagan y el ADN quede en monocatenario. En el caso de la elongación final el objetivo es que todos los fragmentos que no quedaron copiados por completo terminen de ser sintetizados.

Existen varios tipos de PCR (ej. Hot start PCR, Methylation-specific PCR, Multiplex-PCR, etc.) algunos con un propósito muy específico para el análisis posterior y también otras variantes muy utilizadas como la PCR de transcripción inversa (RT-PCR) utilizando ARN como plantilla, que primero se transcribe en ADN mediante una transcriptasa inversa, o PCR en tiempo real (qPCR), que utiliza sondas fluorescentes para la detección del producto de PCR que proporciona información cuantitativa (Singh, et al. 2014).

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), permite a los investigadores copiar una secuencia de ARN y/o ADN y cuantificarla a medida que se hacen las copias. Los componentes de la reacción (Figura 6.3) varían un poco si se hace

en un solo paso a partir de ARN o ADNc o si se hace en dos pasos (primero la retrotranscripción y luego la qPCR). Este refinamiento implica el uso de tintes fluorescentes o sondas que marcan moléculas de ADN de doble hebra. Estos marcadores fluorescentes se unen a las nuevas copias de ADN a medida que se acumulan, lo que hace posible el monitoreo "en tiempo real" de la producción de ADN, los resultados de la qPCR consisten en curvas de amplificación (Figura 6.4) que pueden ser usadas para cuantificar la cantidad inicial de templado de moléculas de AND con gran precisión sobre un amplio rango de concentraciones (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013).

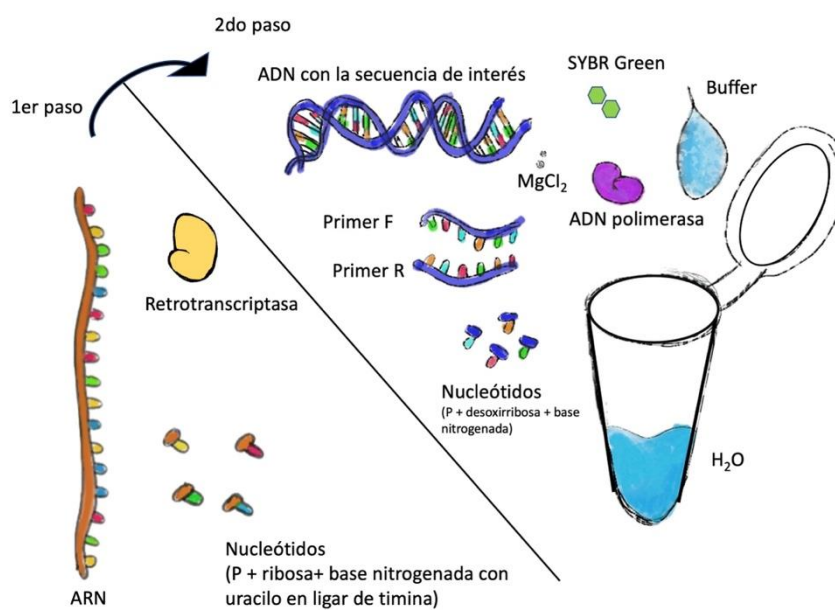


*Figura 6.3 Componentes de la qPCR en un solo tubo de reacción.*

A medida que aumenta el número de copias de genes con cada ciclo de PCR, la señal fluorescente se vuelve más intensa. Trazar la fluorescencia contra el número de ciclo y comparar los resultados con una curva estándar (producida por PCR en tiempo real de cantidades conocidas de ADN) permite determinar la cantidad de ADN presente durante cada paso de la reacción de PCR. Para cuantificar la expresión genética es posible usar ARN y por un RT convertirlo en ADN de cadena sencilla (ADNc). Cuando se parte de ARN se puede hacer una qPCR en un solo paso lo que implica hacer la RT-qPCR en la misma reacción o se pueden hacer por separado, primero la RT y después en otra reacción la qPCR.

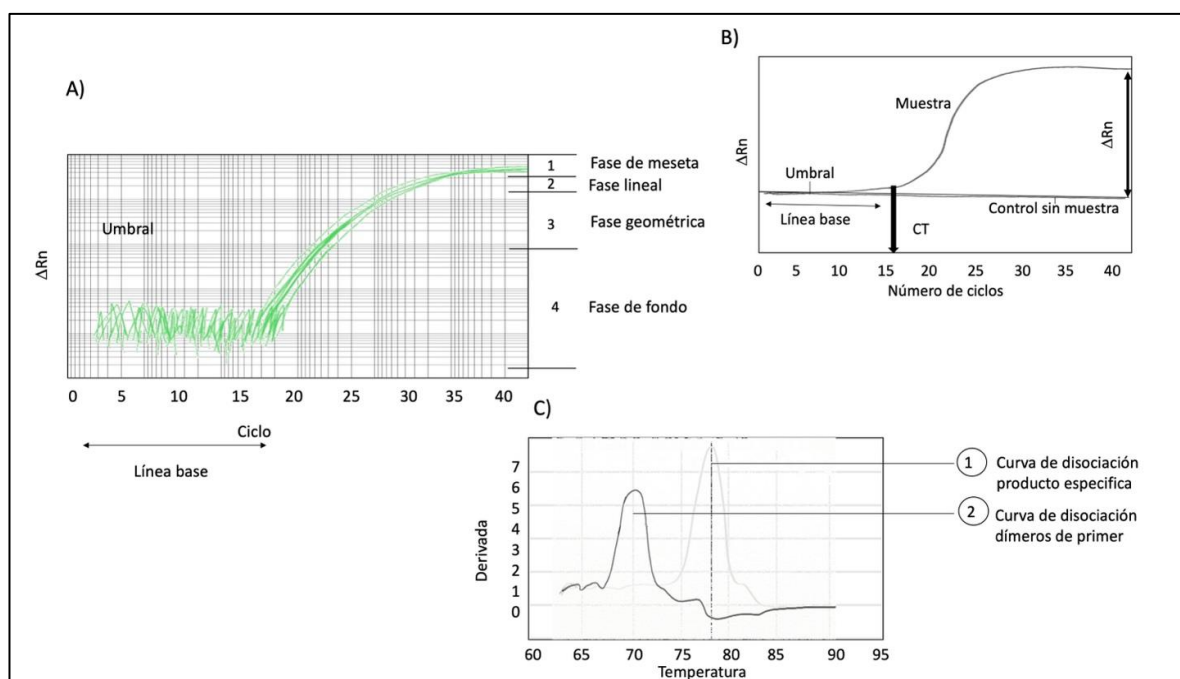


*Figura 6.4 Curvas de amplificación de la qPCR. A) Señal de fluorescencia de la amplificación con SYBR Green, B) señal de fluorescencia normalizada y C) curva de fusión que muestra la disociación del ADN bicatenario.*

## Principio de fluorescencia de la qPCR

Consiste en el uso de fluoróforos, moléculas que al ser excitadas por determinada longitud de onda emiten fluorescencia. SYBR Green I, por ejemplo, incrementa notablemente su tasa de emisión fluorescente al unirse al surco menor del ADN de doble cadena (ADNs) por un fenómeno conocido como transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia (FRET) y se excita a una longitud de onda de 480 nm. Tiene un pico de emisión de fluorescencia de 520 nm, lo que corresponde al espectro visible verde y de ahí su nombre (General description SYBR® Green I Sigma-Aldrich, CAT. Num 163795-75-3). Así a medida que aumentan el número de copias en la reacción de qPCR aumenta la señal de fluorescencia (Figura 6.4).

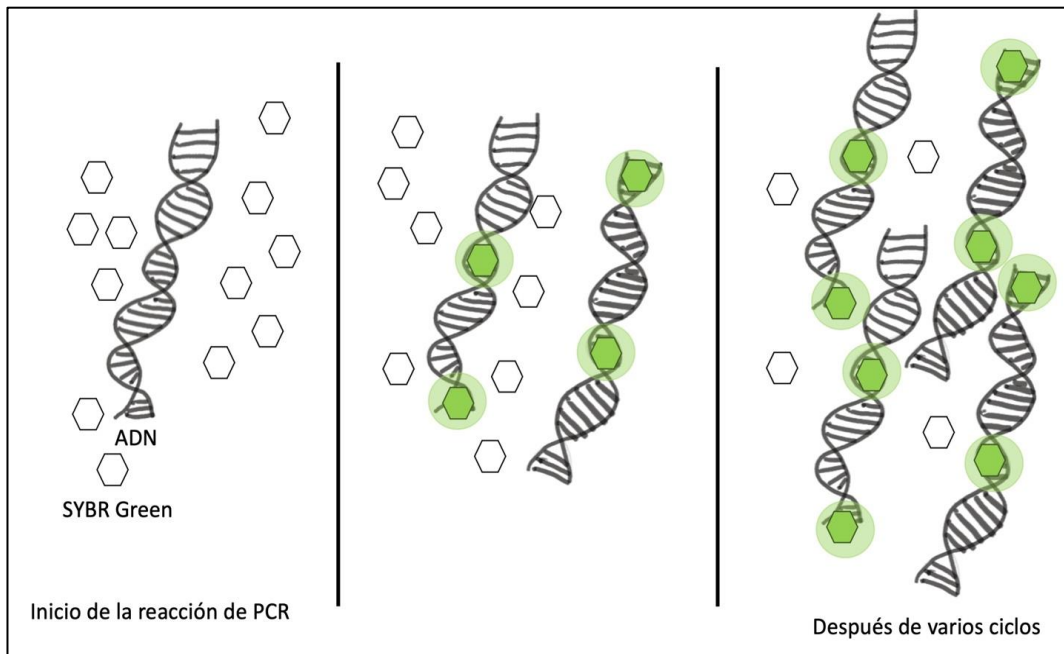


*Figura 6.4 Principio de fluorescencia del SYBR® Green I.*

### Objetivos de aprendizaje

- Aplicar la técnica de PCR para la amplificación de secuencias específicas de ADN.
- Explicar el fundamento de la PCR convencional y la qPCR.
- Comparar los resultados obtenidos mediante PCR clásica y PCR en tiempo real.

### Materiales y equipo

#### *Equipo para ambos protocolos*

Termociclador punto final (para PCR “clásica”)

Termociclador en tiempo real (para qPCR)

1 vórtex

1 microcentrífuga de spin

1 micropipeta 0.5 a 10  $\mu$ l

1 micropipeta 20 a 200  $\mu$ l

1 micropipeta 100 a 1000  $\mu$ l

10 puntas para micropipeta 0.5 a 10  $\mu$ l

5 puntas para micropipeta 20 a 200  $\mu$ l  
2 puntas para micropipeta 100 a 1000  $\mu$ l  
1 microtubos de 1.5 ml para preparar la reacción  
2 gradillas para tubos de 1.5 ml y 0.2 ml.  
1 recipiente para hielo  
1 tubo para PCR por muestra (0.2 ml) (para PCR “clásica” y RT-PCR)  
1 tira MicroAmp Optical 8-Cap Strip (para qPCR)  
1 tira MicroAmp Optical 8-Tube Strip (para qPCR)

*Reactivos para PCR “clásica”*

ADN genómico 100 ng/ $\mu$ l  
Primer F 10 mM  
Primer R 10 mM  
GoTaq® polymerase (PROMEGA Núm. cat. M3001)  
MgCl<sub>2</sub> 25 mM  
5X Colorless GoTaq® Reaction Buffer  
dNTPs 10 mM  
Agua estéril libre de RNAsas y DNAsas

*Reactivos para PCR cuantitativa en un solo paso:*

RNA íntegro 50 ng/ $\mu$ l  
Primer F  
Primer R  
Power SYBR Green RNA to C<sub>T</sub> 1 Step Kit. (Applied Biosystems™ Num. cat. 4389986)  
Mezcla Power SYBR® Green RT-PCR Mix (2x)  
SYBR™Green  
ADN polimerasa UP AmpliTaq Gold™  
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, and dUTP)  
ROX™ como referencia pasiva  
Buffer para optimizar la reacción.

Mezcla RT Enzyme Mix (125X)

Transcriptasa inversa ArrayScript™ UP

Inhibidor de la ARNasa

Agua estéril libre de RNAsas y DNAsas

*Reactivos para PCR cuantitativa en dos pasos:*

Primer paso. Para la retro-transcripción (RT)

RNA íntegro 50ng/ml

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor. (Applied Biosystems™ Num. cat. 4374967)

Buffer RT 10X

Primers aleatorios RT 10X

Mezcla dNTP 25X

Transcriptasa inversa MultiScribe™ (50 U/μl)

Inhibidor de la ARNasa (20 U/μl)

ROX™ como referencia pasiva

Buffer para optimizar la reacción

Agua estéril libre de RNAsas y DNAsas

Segundo paso. Para la qPCR

cDNA (10 ng/ml) o DNA genómico (100 ng/ml)

Primer F 300 nM

Primer R 300 nM

PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems™ Num. cat. A25741)

Dual-Lock™ Taq DNA Polymerase

Mezcla 2x con SYBR Green

dNTPs con mezcla de dUTP/dTTP

UDG termolábil

Agua estéril libre de RNAsas y DNAsas

## Fundamento

Para la PCR “clásica” se seguirá el protocolo de PROMEGA GoTaq® polymerase (consultado en 2021).

Para la qPCR se usará el método de curva estándar (ver anexo 3). Y se seguirán los protocolos de Applied Biosystems™ para qPCR en un solo paso: Power SYBR Green RNA to CT 1 Step Kit y qPCR en dos pasos (consultado en 2021): High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (consultado en 2021) y PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix User Guide (consultado en 2021).

Para evitar una baja señal en la qPCR se recomienda revisar el video: *Tips to overcome RT-qPCR challenges* (consultado en 2021) y responde: ¿Cuáles son los 5 factores que afectan la señal de la qPCR?

## Procedimiento

### PCR “clásica”

1. Prepare la mezcla maestra del PCR en un tubo de 1.5 ml y sobre hielo. La siguiente cantidad es para una reacción. Se recomienda hacer mínimo tres reacciones: una muestra, un control negativo (sin ADN) y un control positivo (de una muestra que se sabe que si amplifica el segmento de interés bajo estas condiciones). Coloque los reactivos en el tubo en el orden en que se enlistan:

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| 5x buffer                       | 5 µl    |
| MgCl <sub>2</sub> 2.5 mM.       | 2.25 µl |
| dNTP mix 10 mM                  | 1 µl    |
| primer F 10 mM                  | 1 µl    |
| primer R 10 mM                  | 1 µl    |
| GoTaq (5 U/µl)                  | 0.25 µl |
| Agua estéril libre de nucleasas | 8.5 µl  |
| Total                           | 19 µl   |

2. Mezcle pipeteándola hacia arriba y hacia abajo, de 5 a 10 veces seguidas, o colocar en el vortex 2 segundos.
3. Bajar el líquido de las paredes con un ciclo de centrifugación en la microcentrífuga.
4. Coloque 1 microlitro de ADN (20 ng/μl) en un tubo de 0.2ml.
5. Añade 19 μl de la mezcla maestra de PCR al tubo con el ADN. Añade 19 μl de la muestra maestra de PCR a un tubo de 0.2ml, con 1 microlitro de agua estéril (control negativo), y 19 μl de la muestra maestra de PCR al tubo con el ADN de una muestra que se sepa que amplifica la secuencia diana (control positivo).
- 6.- Pasa por el vortex por 1 segundo y por la microcentrífuga para bajar el líquido, cada tubo.
- 7.- Coloca los tubos, bien cerrados (para evitar evaporación) en el termociclador de punto final, y corre el programa de la tabla 5.2.

Tabla 5.2 Condiciones del programa de PCR para amplificar el gen COI.  
Duración aprox. 2 hrs.\*

Desnaturalización inicial (94 °C por 3 min); Luego 35 ciclos de Desnaturalización (94 °C por 1 min). Alineamiento (45 °C por 1 min). Extensión (72 °C por 1 min). Extensión final (72 °C por 10 min).

\* Depende de la marca y el modelo del termociclador, algunos hacen la transición de temperaturas más rápido que otros.

- 8.- Después de que finalice el programa, saca los tubos del termociclador y guarda la muestra a -20°C hasta que puedas correr una electroforesis en gel de agarosa para checar el tamaño del amplificado, cuantificar el ADN en el

espectrofotómetro para saber la cantidad y pureza de la muestra y finalmente mandar a secuenciar para conocer la secuencia.

Nota: Podemos revisar la *práctica de electroforesis* para visualizar el amplificado y para cuantificar el ADN ver la *práctica de extracción de ADN*.

### Protocolo para qPCR en un solo paso.

1. Diseñar el programa para correr su ensayo. Configure el método de ejecución con las siguientes condiciones:

- Tipo de experimento: curva estándar
- Reactivo: reactivos SYBR <sup>TM</sup> Green
- Reportero: SYBR <sup>TM</sup>
- Apagador: Ninguno
- Colorante pasivo de referencia: ROX <sup>TM</sup>
- Velocidad de rampa: estándar
- Incremento de la rampa de la curva de fusión: continuo
- Volumen de reacción (μl): 10
- Condiciones de ciclo térmico:

|                                                              |       |        |
|--------------------------------------------------------------|-------|--------|
| Transcripción inversa                                        | 48 °C | 30 min |
| Activación de AmpliTaq ADN polimerasa Gold®, UP (Ultra puro) | 95 °C | 10 min |
| Ciclos 40                                                    |       |        |
| Desnaturalizar                                               | 95 °C | 15 s   |
| Alineamiento / Extensión                                     | 60 °C | 1 min. |

|                            |       |      |
|----------------------------|-------|------|
| Curva de fusión (Opcional) |       |      |
| Desnaturalizar             | 95 °C | 15 s |
| Alinear                    | 60 °C | 15 s |
| Desnaturalizar             | 95 °C | 15 s |

2. Coloque los tubos para el Power SYBR® Green RT-PCR Mix (2X), RT Enzyme Mix (125X), primers y el ARN en hielo. Una vez descongelados todos los reactivos, invierta suavemente los tubos para mezclar y volver al hielo. No agite los tubos con vortex.

3. Prepare la mezcla maestra del qPCR un solo paso en un microtubo de 1.5 ml sobre hielo. La siguiente cantidad es para una reacción. Se recomienda hacer mínimo cinco reacciones: una muestra (y dos réplicas de la misma), un control negativo (sin ADN) y un control positivo (de un gen constitutivo, que significa que se sepa que se expresa en ese tejido o célula). Coloque los reactivos en el tubo en el orden en que se enlistan:

|                                                    |         |
|----------------------------------------------------|---------|
| Power SYBR Green RNA to C <sub>T</sub> 1 Step Kit. | 5 µl    |
| Primer F 100-200 nM                                | 1 µl    |
| Primer R 100-200 nM                                | 1 µl    |
| RT Enzyme Mix (125X)                               | 0.08 µl |
| Agua estéril libre de RNAsas y DNAsas              | 1.92 µl |
| Volumen total de la reacción                       | 9 µl    |

ATENCIÓN: Mantenga la mezcla Power SYBR Green RT-PCR (2X) protegido de la luz hasta que esté listo para usarlo. La exposición excesiva a la luz puede afectar el tinte ROX™ y el tinte verde SYBR®

4. Mezcle la mezcla maestra de PCR pipeteándola hacia arriba y hacia abajo, de 5 a 10 veces seguidas, o colocar en el vortex 2 segundos.

5. Bajar el líquido de las paredes con un ciclo de centrifugación en la microcentrífuga.

6. Coloque 1 microlitro de RNA íntegro 50ng/ml por tubo en el la tira de tubos o por pozo en la placa óptica de 0.2ml (haz 2 réplicas más por cada muestra).

7. Añade 9  $\mu$ l de la mezcla maestra de qPCR a la tira de tubos ópticos con el ARN. Añade 9  $\mu$ l de la mezcla maestra a un tubo de 0.2ml, con 1 microlitro de agua estéril (control negativo), y 9  $\mu$ l de la mezcla maestra al tubo con el ARN de un gen constitutivo (control positivo).

8. Selle la tira de tubos o la placa de reacción con película adhesiva óptica o tapas ópticas, luego vortex por 1 segundo y centrifugue brevemente la tira de tubos o la placa de reacción. Por ejemplo, centrifugue a 140 x g durante 60 segundos.

9.- Coloca la tira de tubos o placa, bien cerrados (muy importante para evitar la evaporación) en el termociclador para tiempo real, y corre el programa.

8.- Una vez que termine de correr, analiza tus datos en las gráficas del programa que corriste. La muestra puede ser desechada o en su caso si se desea corroborar que no hubo contaminación hacer un gel de agarosa y checar que solo hay una banda de amplificación. Ver la *práctica de electroforesis*.

### **Protocolo para qPCR en dos pasos.**

#### *Primer paso. Para la retro-transcripción (RT)*

1. Coloque los tubos para el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit y el ARN en hielo. Una vez descongelados todos los reactivos, invierta suavemente los tubos para mezclar y volver al hielo. No agite los tubos con vortex.

2. Prepare la mezcla maestra del RT-PCR un solo paso en un tubo de 1.5 ml y sobre hielo. La siguiente cantidad es para 1 reacción

|                                    |             |             |
|------------------------------------|-------------|-------------|
| 10X RT Buffer                      | 2.0 $\mu$ l |             |
| 25X dNTP Mix (100 mM)              | 0.8 $\mu$ l |             |
| 10X RT Random Primers              | 2.0 $\mu$ l |             |
| MultiScribe™ Reverse Transcriptase |             | 1.0 $\mu$ l |

|                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| RNase Inhibitor                       | 1.0 $\mu$ l  |
| Agua estéril libre de RNAsas y DNAsas | 3.2 $\mu$ l  |
| Volumen total de la reacción          | 10.0 $\mu$ l |

3. Pipetee 10  $\mu$ l de mezcla maestra 2X RT en un tubo de 0.2 ml.
4. Pipetee 10  $\mu$ l de muestra de ARN en el tubo de 0.2 ml con la mezcla maestra, pipeteando hacia arriba y hacia abajo dos veces para mézclalo bien.
5. Tapar el tubo y centrifugar brevemente para bajar el contenido y eliminar cualquier burbuja de aire.
6. Coloque el tubo en hielo hasta que esté listo para cargar el termociclador.
7. Programe el termociclador utilizando las siguientes condiciones:

*Tabla 5.3 Condiciones del programa de RT- PCR\*. Duración aprox. 2h 15 min.*

|        | Paso 1  | Paso 2   | Paso 3 | Paso 4     |
|--------|---------|----------|--------|------------|
| Temp.  | 25 °C   | 37 °C    | 85 °C  | 4 °C       |
| Tiempo | 10 min. | 120 min. | 5 min. | Indefinido |

\* Estandarizado para *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (ver guía de usuario).

8. Coloque los tubos del paso 7 en el termociclador y corra el programa. Al finalizar saque sus muestras y apague el equipo.
9. Guarde sus muestras a -20 hasta que realice el segundo paso.

## Segundo paso. qPCR

1. Diseñar el programa para correr su ensayo. Configure las condiciones de ciclo térmico utilizando las condiciones de ciclo térmico de PCR predeterminadas que se especifican en las siguientes tablas de acuerdo con el instrumento, parámetros del ciclo y temperaturas de fusión de los primers específicos.

|                                                               |             |        |        |
|---------------------------------------------------------------|-------------|--------|--------|
| Modo de ciclado estándar (primer $T_m > 60^{\circ}\text{C}$ ) |             |        |        |
| Paso                                                          | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
| Activación UDG                                                | 50 °C       | 2 min  |        |
| ADN Polimerasa Dual-Lock™                                     | 95 °C       | 2 min  |        |
| Desnaturalización                                             | 95 °C       | 15 s   | 40     |
| Alineación/extension                                          | 60 °C       | 1 min  |        |

|                                                               |             |        |        |
|---------------------------------------------------------------|-------------|--------|--------|
| Modo de ciclado estándar (primer $T_m < 60^{\circ}\text{C}$ ) |             |        |        |
| Paso                                                          | Temperatura | Tiempo | Ciclos |
| Activación UDG                                                | 50 °C       | 2 min  |        |
| ADN Polimerasa Dual-Lock™                                     | 95 °C       | 2 min  |        |
| Desnaturalización                                             | 95 °C       | 15 s   | 40     |
| Alineación                                                    | 55–60 °C[1] | 15 s   |        |
| Extensión                                                     | 72 °C       | 1 min  |        |

2. Configure el instrumento para que realice un paso de disociación predeterminado. Se puede realizar un paso de disociación hasta 72 horas después de la ejecución de la PCR en tiempo real si la placa se almacena en la oscuridad y hasta 24 horas después de la ejecución de la PCR en tiempo real si la placa está expuesta a la luz.

Condiciones de la curva de disociación (etapa de la curva de fusión).

| Paso | Tasa de<br>rampa | Temperatura  | Tiempo      |
|------|------------------|--------------|-------------|
| 1    | 1.6 °C/s         | 95 °C        | 15 s        |
| 2    | 1.6 °C/s         | 60 °C        | 1 min       |
| 3    | <b>0.15 °C/s</b> | <b>95 °C</b> | <b>15 s</b> |

3. Utilice la siguiente configuración para los instrumentos *Applied Biosystems*™. En este caso estamos usando el *Quant Studio 1*.

- Tipo de experimento: curva estándar
- Reactivo: reactivos SYBR™ Green
- Reportero: SYBR™
- Apagador: Ninguno
- Colorante pasivo de referencia: ROX™
- Velocidad de rampa: estándar
- Incremento de la rampa de la curva de fusión: continuo

4. Establezca el volumen de reacción apropiado para el tipo de placa que se utiliza para su reacción de PCR.

5. Ya está listo para introducir los tubos. Proceda a preparar la reacción.

6. Agite la mezcla maestra verde PowerUp™ SYBR™ para mezclar bien.

7. Descongele las muestras de cADN (o ADN genómico) y los primers en hielo, agítelos para mezclarlos y luego centrifugue brevemente para bajar el líquido de las paredes.

8. Prepare la mezcla maestra del qPCR segundo paso en un tubo de 1.5 ml y sobre hielo. La siguiente cantidad es para una reacción. Se recomienda hacer mínimo cinco reacciones: una muestra (y dos réplicas de la misma), un control negativo (sin ADN) y un control positivo (de un gen constitutivo, que significa que

se sepa que se expresa en ese tejido o célula). Coloque los reactivos en el tubo en el orden en que se enlistan:

|                                       |      |
|---------------------------------------|------|
| PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (2X). | 5 µl |
| Primer F (150 nM a 300 nM)            | 1 µl |
| Primer R (150 nM a 300 nM)            | 1 µl |
| Agua estéril libre de RNAsas y DNAsas | 2 µl |
| Volumen total de la reacción          | 9 µl |

9. Mezcle bien los componentes, luego centrifugue brevemente para bajar el contenido y elimine las burbujas de aire.

10. Coloque 1 µl de cADN (10 ng/ml) o AND genómico (100 ng/ml) por tubo o en la tira de tubos ópticos o por pozo en la placa óptica de 0.2 ml (haz 2 réplicas más por cada muestra).

11. Añade 9 µl de la mezcla maestra de qPCR a la tira de tubos ópticos con el ADN. Añade 9 µl de la mezcla maestra a un tubo de 0.2 ml, con 1 microlitro de agua estéril (control negativo), y 9 µl de la mezcla maestra al tubo con el ADN de un gen constitutivo (control positivo).

12. Selle la tira de tubos o la placa de reacción con película adhesiva óptica o tapas ópticas, luego vortex por 1 s y centrifugue brevemente la tira de tubos o la placa de reacción. Por ejemplo, centrifugue a 140 x g durante 60 segundos.

13.- Coloca la tira de tubos o placa, bien cerrados (muy importante para evitar la evaporación) en el termociclador para tiempo real, y corre el programa.

14.- Una vez que termine de correr, analiza tus datos en las gráficas del programa que corriste. La muestra puede ser desechada o en su caso si se desea corroborar que no hubo contaminación hacer un gel de agarosa y checar que solo hay una banda de amplificación. Ver la *práctica de electroforesis*.

## **Análisis de datos qPCR**

1. Anota los siguientes parámetros y compara entre la pendiente de la curva estándar y la curva estándar relativa de las muestras: pendiente, eficiencia de amplificación, valores  $R^2$ , intersección con el eje y, valores CT, y valores atípicos.
2. En el gráfico de expresión génica (curva estándar relativa y comparativa experimentos de TC) ¿Hay diferencias en la expresión génica, observas desviación estándar en los grupos replicados?
- 3.- Gráficos de amplificación: ¿Cuáles son los valores de línea base y umbral?, ¿hay valores atípicos?
- 4.- Tabla de resultados. ¿Cuáles son los valores CT para cada pocillo y para cada grupo replicado?  
(Opcional) Curva de fusión ¿cuál es el número de picos de  $T_m$ ? ¿Qué indica cada uno?

## **Productos esperados**

Amplificación de fragmentos específicos de ADN.  
Curvas de amplificación en qPCR.  
Determinación de valores Ct y eficiencia.

## **Análisis de resultados**

Analiza en qué situaciones experimentales elegirías PCR clásica o qPCR y justifica tu decisión.

Interpreta un resultado experimental de qPCR e identifica posibles errores en el procedimiento.

Propón una aplicación real de la qPCR en investigación biomédica.

## Preguntas de reflexión

- ¿Qué factores afectan la eficiencia de PCR?
- ¿Por qué es importante evitar contaminantes?
- ¿Qué indica un valor Ct bajo o alto?

## Conclusión

Redacta un párrafo donde describas lo aprendido sobre PCR, su importancia, aplicaciones y dificultades experimentales.

## Bibliografía

Park, D. (2011). *PCR protocolo* (3rd ed.). Humana Press.

Pérez de Castro, A. M. (2011). *Reacción en cadena de la polimerasa*.

Rajalakshmi, S. (2017). Different types of PCR techniques.

Schrader, C., et al. (2012). PCR inhibitors. *Journal of Applied Microbiology*.

Singh, J., et al. (2014). PCR applications.

Rodríguez-Lázaro, D., & Hernández, M. (2013). Real-time PCR.

## Manuales y protocolo en línea:

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (consultado en el 2021). Disponible en: [https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0017977\\_highcap\\_cDNA\\_RT\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0017977_highcap_cDNA_RT_UG.pdf)

PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix User Guide(consultado en el 2021). Disponible en: [https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0013511\\_PowerUp\\_SYBR\\_Green\\_Master\\_Mix\\_User\\_Guide.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0013511_PowerUp_SYBR_Green_Master_Mix_User_Guide.pdf)

[Up mastermix UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0013511_PowerUp_mastermix_UG.pdf)([https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0013511\\_PowerUp\\_mastermix\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0013511_PowerUp_mastermix_UG.pdf))

Power SYBR Green RNA to CT 1 Step Kit y qPCR en dos pasos (consultado en el 2021). Disponible en: <https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/4391003D.pdf>

PROMEGA GoTaq® polymerase (consultado en 2021). Disponible en: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/gotaq-pcr-core-systems-protocol.pdf>

## **Video**

*Tips to overcome RT-qPCR challenges.* (Consultado en 2021). Video. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/reverse-transcription/superscript-iv-vilo-master-mix.html>

## **PRÁCTICA NO. 7**

### **EXTRACCIÓN DE ARN SIN Y CON KIT**

Autores

Alan Edrei Flores Gaona

Marisol De la Mora Curiel

Tiempo estimado

5 horas por protocolo

### **Introducción**

El ARN o ácido ribonucleico (en inglés RNA) usualmente se encuentra en forma de una sola cadena compuesta por moléculas de fosfato, el azúcar ribosa, y las bases nitrogenadas: adenina, guanina, citosina y uracilo. A diferencia del ADN la composición química de ARN solo difiere aparentemente en dos aspectos menores: un grupo hidroxilo en lugar de un átomo de hidrógeno en la ribosa y la ausencia de un grupo metilo en una de sus cuatro bases (figura 7.1). Ahora se reconoce, que el ARN es mucho más rico e intrincado en estructura que el ADN y mucho más versátil en función de lo que se apreció al principio. Sabemos que puede formar estructuras secundarias por medio de puentes de hidrogeno en uniones no canónicas entre las bases y, además, asociarse con proteínas para cumplir funciones específicas, por ejemplo, los ribosomas y la telomerasa, incluso algunos (las ribozimas) tienen actividad catalítica (Watson, et al. 2014).

En la célula hay muchos tipos de ARN, lo encontramos como ARN mensajero (en inglés mRNA), ARN ribosomal (en inglés rRNA), ARN de transferencia (en inglés tRNA), ARN pequeños nucleares (en inglés snRNA), ARN de interferencia (en inglés miRNA), ARN piwi (en inglés piRNA), ARN largos (en inglés lncRNA), etc. También podemos encontrar distintas cantidades de ARN dependiendo del tipo de tejido (tabla 7.1).

La estabilidad y degradación de la molécula de ARN se ve comprometida por la estructura que tenga y el largo de la secuencia de nucleótidos. De forma

general es susceptible a la oxidación, misma que puede ocurrir dentro de las células vivas, *in vitro* e incluso a bajas temperaturas. Para evitar la degradación, las muestras de ARN generalmente se almacenan congeladas a -20° C o -80° C o bajo nitrógeno líquido. Se recomienda utilizar reactivos estabilizantes como el RNAProtect Tissue Reagent®.

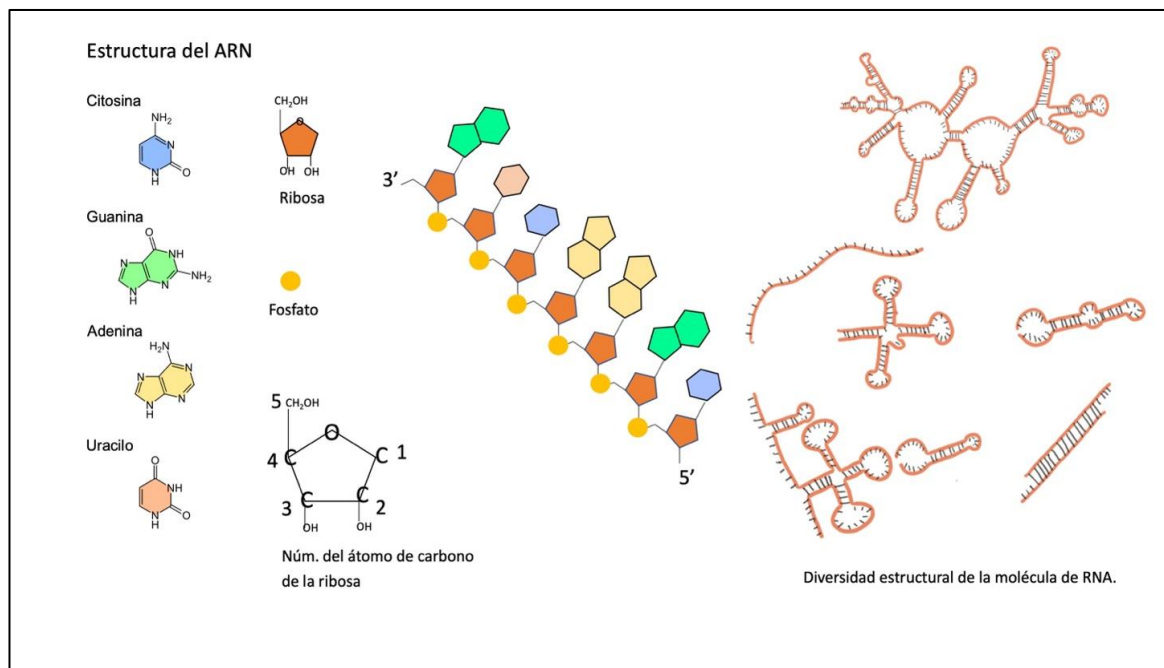


Figura 7.1 Estructura molecular del ARN y diversidad estructural.

## Objetivos de aprendizaje

- Aplicar técnicas de extracción de ARN a partir de muestras biológicas.
- Evaluar la integridad y pureza del ARN obtenido.
- Analizar las diferencias entre los métodos de extracción con y sin kit.

*Tabla 7.1 Distintas cantidades de ARN en tejidos.*

|                                               |                                                      |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|                                               |                                                      |
| Tejidos/número de células                     |                                                      |
| 5 mg de tejido o $2.5 \times 10^6$ células    | 10 $\mu$ g del cual 0.3 $\mu$ g ARNm, 8 $\mu$ g ARNr |
| 1 g de tejido o $5 \times 10^8$ células       | 2 mg del cual 60 $\mu$ g ARNm, 1.6 mg ARNr           |
|                                               |                                                      |
| Cultivo de células ( $1 \times 10^6$ células) |                                                      |
| NIH/3T3                                       | 10 $\mu$ g                                           |
| HeLa                                          | 15 $\mu$ g                                           |
| COS-7                                         | 35 $\mu$ g                                           |
|                                               |                                                      |
| Tejidos de rata/ratón (10 mg)                 |                                                      |
| Embrión de 13 días                            | 25 $\mu$ g                                           |
| Riñón                                         | 23-30 $\mu$ g                                        |
| Pulmón                                        | 10-20 $\mu$ g                                        |
| Hígado                                        | 40-60 $\mu$ g                                        |
| Bazo                                          | 30-40 $\mu$ g                                        |
| Timo                                          | 40-50 $\mu$ g                                        |
|                                               |                                                      |
| Levadura ( $1 \times 10^7$ células)           |                                                      |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>               | 25 $\mu$ g                                           |
|                                               |                                                      |
| Plantas (100-mg hojas)                        |                                                      |
| <i>Arabidopsis</i>                            | 35 $\mu$ g                                           |
| Maíz                                          | 25 $\mu$ g                                           |
|                                               |                                                      |

Fuente: datos modificados de Qiagen (2006), Applied Biosystems (2010). *Cold Spring Harb Protoc* 2010.

## **Materiales y equipo**

### Equipo

- 1 baño María o Termoblock.
- 1 motor de pistilos.
- 1 centrífuga para microtubos de 1.5 ml.
- 1 mini centrífuga (de spin, solo para bajar el líquido de las paredes de los tubos).
- 1 micropipeta de 1-10  $\mu$ l.
- 1 micropipeta de 20-100  $\mu$ l.
- 1 micropipeta de 100-1000  $\mu$ l.

### Consumibles

- Varios pistilos de plástico libres de ARNasa (Kontes®). Uno por cada muestra.
- 20 tubos de 1.5 ml, estériles y libres de ARNasas.
- 1 par de guantes de nitrilo sin polvo por estudiante.
- 1 embudo mediano, refrigerado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- 1 embudo pequeño, refrigerado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- 1 recipiente para hielo.
- 1 gradilla para microtubos de 1.5 ml.
- 50 puntas para micropipeta de 1-10  $\mu$ l, estériles y libres de ARNasas.
- 50 puntas para micropipeta de 20-100  $\mu$ l, estériles y libres de ARNasas.
- 50 puntas para micropipeta de 100-1000  $\mu$ l, estériles y libres de ARNasas.

### Reactivos sin kit

- 50–100 mg de tejido animal congelado o recién extraído.
- Hielo.
- TRIzol (TRIzol™ Reagent, Invitrogen™ by ThermoFisher Scientific Num. cat. 15596026), almacenar a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Cloroformo (Chloroform, Sigma-Aldrich Num. cat. C2432 CAS 67-66-3).

- Isopropanol (2-Propanol, Sigma-Aldrich Num. cat. I9516 CAS 67-63-0).
- Etanol al 75%. (Diluir con agua estéril, Ethyl alcohol, Pure Sigma-Aldrich Num. cat. E7023 CAS 64-17-5).
- Agua estéril libre de RNAsas.

#### Reactivos con kit

- 2–mercaptoethanol (2–Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich Num. cat. M6250 CAS 60-24-2).
- Etanol (Ethyl alcohol, Pure Sigma-Aldrich Num. cat. E7023 CAS 64-17-5).
- PBS (Phosphate buffered saline).
- PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™ by ThermoFisher Scientific Num. cat. 12183020).

Buffer de lisis

Buffer de lavado I

Buffer de lavado II

Agua libre de ARNasa

Columnas con filtro (con tubos de recogida)

Tubos de recogida

Buffer de recuperación

- Agua estéril libre de RNAsas.

#### Fundamento

El protocolo con kit se basa en el \*\*PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™)\*\*\*, mientras que el protocolo sin kit utiliza el método clásico de extracción con \*\*TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, 2007)\*\*.

Ambos métodos se fundamentan en la lisis celular, separación de fases o unión a columnas, eliminación de contaminantes y recuperación del ARN puro.

## Procedimiento

### ***Protocolo con kit, PureLink™ RNA Mini Kit.***

1. Antes del primer uso del kit. Prepare el buffer de lavado II. Añada 16 ml de etanol al 96-100% al buffer de lavado II. Marque la casilla de la etiqueta del Wash Buffer II para indicar que se añadió etanol. Almacene el buffer de lavado II con etanol a temperatura ambiente.
2. Antes de cada uso del kit. Preparar buffer de lisis nuevo. Agregue 10 µl de 2-mercaptoetanol por cada 1 ml de buffer de lisis en un tubo libre de RNasa. Siempre la proporción de mezcla es Buffer de lisis con 1% de 2-mercaptoetanol.
3. Mantener las muestras congeladas en nitrógeno líquido hasta el momento de la extracción.
4. Moler el tejido (de planta, insecto u hongo) usando un tubo de 1.5 y un pistilo para pellet. Colocar el tejido en el tubo, vaciar nitrógeno en un recipiente de unicel y colocar el tubo de tal forma que sobrepase el tejido, pero con cuidado de que no se voltee el tubo ni se salga la muestra. Procure que no se descongele.
5. Añadir 600 µl del buffer de lisis con 2-mercaptoetanol a la muestra. Tape el tubo e invierta varias veces para mezclar bien.
6. Centrifugue el homogeneizado a  $\sim 2600 \times g$  durante 5 min., luego transfiera el sobrenadante a un tubo limpio libre de RNasa. Deseche el pellet.
7. Añadir el mismo volumen de etanol al 100% que hay en el tubo de sobrenadante. Proporción 1:1.
8. Pasar por el vortex para mezclar completamente y para dispersar cualquier precipitado visible que puede formarse después de agregar etanol.

9. Transfiera hasta 700  $\mu$ l de la muestra (incluido cualquier precipitado restante) a una columna con filtro (con el tubo colector).
10. Centrifugar a 12000  $\times$  g durante 15 s a temperatura ambiente. Deseche el sobrenadante y vuelva a insertar el tubo recolector. (NOTA: Si está procesando la cantidad máxima de muestra inicial, puede centrifugar hasta 10 min., para que el lisado pase por completo a través del filtro de la columna).
11. Repita los pasos 9 y 10 hasta que se haya procesado toda la muestra.
12. Añada 700  $\mu$ l de buffer de lavado I a la columna con filtro. Centrifugar a 12000  $\times$  g durante 15 s a temperatura ambiente. Deseche el sobrenadante y el tubo colector. Coloque un nuevo tubo colector.
13. Añada 500  $\mu$ l del buffer de lavado II con etanol, a la columna del paso 11 que ahora tiene un nuevo tubo colector.
14. Centrifugar a 12000  $\times$  g durante 15 s a temperatura ambiente. Deseche el sobrenadante y el tubo colector. Coloque un nuevo tubo colector.
15. Repita los pasos 13 a 14, una vez.
16. Deseche el tubo colector e inserte en la columna con filtro en un tubo de recuperación (tubo de 1.5 ml estéril).
17. Agregue de 30  $\mu$ l a 3  $\times$  100  $\mu$ l de agua libre de RNasa al centro del filtro de la columna centrifugada.
18. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
19. Centrifugar a 12000  $\times$  g durante 2 min a temperatura ambiente. (NOTA: Puede repetir los pasos 17 al 19, una vez más para tratar de eluir todo el RNA

que pudiera quedar en el filtro y no olvide recoger todos los eluidos en el mismo tubo colector).

20. Almacenar a -20 hasta su uso o -70 si no se usara en un buen tiempo.

***Protocolo sin kit, TRIzol Reagent.***

1. Mantener las muestras congeladas en nitrógeno líquido hasta el momento de la extracción. Los pasos del protocolo se ilustran en la figura 7.2.

2. Homogeneizar el tejido con un mortero de pellets en 800 µl de TRIzol ®. La cantidad de tejido a usar varía entre 50–100 mg por cada 1 ml de TRIzol ®.

3. Incubar el homogeneizado a temperatura ambiente durante 5 min.

4. Añada 160 µl de cloroformo. Agite vigorosamente durante 15 s (no usar vortex) e incube durante 3 min a temperatura ambiente. La cantidad de cloroformo es de 0.2 ml por cada 1 ml de TRIzol ®.

5. Centrifugue los tubos a 12000 x g durante 15 min a 4 ° C. La mezcla se separa en una fase fenol-cloroformo rojo inferior, una interface y una fase acuosa superior incolora (ésta contiene el ARN).

6. Transferir la fase acuosa incolora a un tubo de microcentrífuga nuevo, inclinando el tubo en ángulo de 45 grados y pipetearlo con cuidado. (IMPORTANTE: no perturbar ni transferir nada de la fase color rojo ni la interface, de ser necesario dejar un poco de fase acuosa para no transferir nada de estas fases. La fase color rojo y la interface se pueden guardar a 4° toda la noche si se desea extraer ADN o proteínas después; si no, desechar).

7. Añadir al tubo 400 µl de isopropanol para precipitar el ARN.

8. Dejar incubar a temperatura ambiente durante 10 min.

9. Centrifugar el tubo a 12000 x g a 4 ° C, por 10 min. El precipitado de ARN total forma una pastilla blanca similar a un gel en el fondo del tubo.
10. Deseche el sobrenadante con una micropipeta, retírelo cuidadosamente y sin tocar el precipitado.
11. Resuspenda el precipitado con 1 ml de etanol al 75% por 1 ml de reactivo TRIzol <sup>™</sup> utilizado para la lisis. (Nota: El ARN se puede almacenar en etanol al 75% durante al menos 1 año a –20 ° C, o a 4 ° C al menos 1 semana).
12. Agite la muestra en vortex brevemente, luego centrifugue por 5 min. a 7500 x g a 4 ° C.
13. Deseche el sobrenadante con una micropipeta.
14. Dejar secar al aire el sedimento de ARN de 5 a 10 min. (IMPORTANTE. No seque el sedimento mediante centrifugación al vacío. No deje que el sedimento de ARN se seque demasiado para garantizar la solubilización total del ARN. Las muestras de ARN parcialmente disueltas tienen un A230 / 280 proporción <1.6).
15. Resuspenda el sedimento en 20 a 50 µl de agua libre de ARNasas, EDTA 0,1 mM o solución SDS al 0,5%, siempre pipeteando arriba y abajo. (IMPORTANTE: No disuelva el ARN en SDS al 0,5% si el ARN se va a utilizar en reacciones enzimáticas posteriores).
16. Incube en un baño de agua o bloque de calor a una temperatura de 55 a 60 ° C durante 10 a 15 min., esto ayuda a la resuspensión. Después de esto queda listo para usarse.
17. Puede verificar la cantidad de ARN por espectrofotometría.
18. Se recomienda almacenar a -70°C. Otras opciones son almacenar en nitrógeno líquido y con algún reactivo protector de RNA.

A continuación, figuras que ilustran el proceso de extracción por el método de TRIzol Reagent.

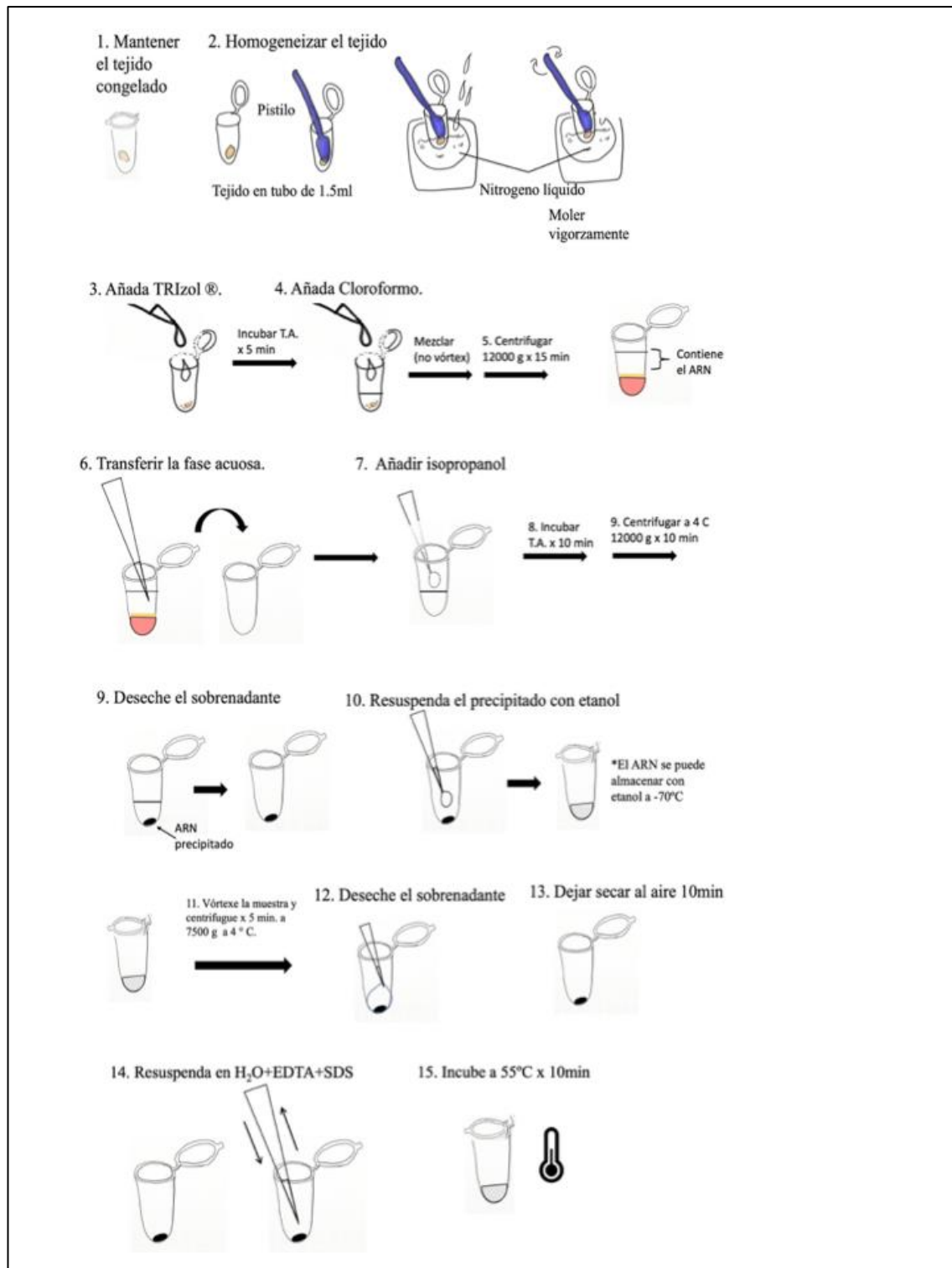


Figura 7.2 Pasos de extracción de ARN.

## **Productos esperados**

ARN total extraído de alta pureza.

Relación A260/280 cercana a 2.0.

Bandas definidas en gel (si se analiza).

Mayor pureza con kit y mayor rendimiento variable con TRIzol.

## **Análisis de resultados**

¿Qué factores pueden comprometer la integridad del ARN y cómo los controlarías en el laboratorio?

Si detectas degradación de ARN, ¿cómo determinarías en qué etapa ocurrió?

Propón mejoras al protocolo para trabajar con muestras altamente sensibles a degradación.

## **Preguntas de reflexión**

¿Qué factores comprometen la integridad del ARN?

¿En qué etapa pudo ocurrir la degradación?

¿Qué mejoras implementarías para muestras sensibles?

## **Conclusión**

Redacta la conclusión de la práctica incluyendo los siguientes aspectos: describe qué se aprendió al extraer ARN mediante dos metodologías distintas y explica la importancia del manejo adecuado de las muestras para evitar su degradación. Compara ambos métodos teniendo en cuenta que el uso de kit es más rápido y reproducible, mientras que el método con TRIzol permite obtener mayores cantidades, pero implica un mayor riesgo de error.

## **Bibliografia**

Rosato, E. (Ed.). (2007). *Circadian rhythms: Methods and protocols* (Vol. 362). Humana Press.

Thermo Fisher Scientific. (2007). *TRIzol Reagent User Guide*.

Watson, J. D., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2013). *Molecular biology of the gene* (7th ed.). Pearson.

## **PRÁCTICA NO. 8**

### **SECUENCIACIÓN SANGER**

Autor

Leo Josué Arteaga Vázquez

Tiempo estimado

3 a 4 horas

### **Introducción**

La secuenciación es una de las técnicas más importantes en biología, con ésta se recupera la información contenida en el genoma (el ácido desoxirribonucleico, ADN) y se puede interpretar de una manera más sencilla, representando cada uno de los nucleótidos de la secuencia por una de cuatro letras: A, adenina; T, timina; C, citosina y G, guanina. La técnica de secuenciación de Sanger fue inventada en 1977 por Frederick Sanger y fue de las primeras técnicas de secuenciación. Esta técnica se basa en el aprovechamiento de las ADN polimerasas para añadir 2'.3'-didesoxinucleótidos, ddNTP (análogos de los 2'-desoxinucleótidos, dNTP, que carecen del grupo hidroxilo en el carbón 3') (Figura 8.1). En la actualidad, la tecnología que se usa, basada en el principio de la secuenciación Sanger, fue desarrollada por Applied Biosystems y consiste en una modificación de la PCR con dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos que se incorporan durante la síntesis de la cadena ADN, pero al carecer del grupo hidroxilo 3', se impide terminar la cadena.

Los ingredientes esenciales para llevar a cabo la secuenciación Sanger por electroforesis en capilar son: (1) el ADN que queremos secuenciar, (2) un primer, (3) la polimerasa para llevar a cabo la síntesis de ADN, (4) desoxinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) y (5) didesoxinucleótidos marcados con fluoróforos (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) (Figura 8.2)

Una vez que tenemos los elementos necesarios, hacemos la PCR donde se van a ir generando fragmentos de distintos tamaños al ir agregándose dNTPs

y de vez en cuando ddNTPs. Cuando se agregue un ddNTP, se terminará la síntesis de ADN y el fragmento quedará con una cabeza de ddNTP (Figura 8.3). Ya que obtenemos los fragmentos, corremos la electroforesis capilar. Dentro del aparato de electroforesis capilar, los fragmentos son arrastrados, de acuerdo a su tamaño, los más pequeños primero y al final los más grandes, por una corriente eléctrica desde lado negativo al positivo del capilar y a medida que van pasando por el capilar, un láser lee el fluoróforo unido al ddNTP de acuerdo a su longitud de onda y así se va generando la secuencia que al final se guarda en un archivo scf o abi (Figura 8.4).

Los fragmentos de secuencia pasan a través de un capilar donde van pasando por tamaño, un lector de fluorescencia va registrando el nucleótido marcado con el fluoróforo.

Estos archivos pueden incluir, además del cromatograma procesado (trace), el dato crudo leído por el secuenciador automático, la secuencia de nucleótidos y las calidades. Los secuenciadores de Applied Biosystems generan los datos en formato abi. Los ficheros abi se pueden leer con distintos programas: chromas (Win), el Sequence Scanner (Win) o el *trev* del paquete de análisis Staden (Mac, Pc, Linux). (Bioinformatics at COMAV is licensed under a Creative Commons Reconocimiento 4.0 International License.)

A partir de los cromatogramas hay que obtener la secuencia de nucleótidos, proceso que se conoce como *basecalling*. Los programas mencionados anteriormente en automático hacen el *basecalling*, pero siempre es conveniente revisar manualmente que la base asignada sea la correcta. Existen algunos conceptos claves en la lectura de los cromatogramas estos son la calidad de lectura cómo la probabilidad de estimación correcta de cada uno de los nucleótidos en la secuencia, ruido que se refiere a la señal de fondo en la lectura de la fluorescencia, resolución que es la capacidad de poder distinguir la señal de fluorescencia entre una base y otra.

A continuación, las figuras referidas hasta el momento:

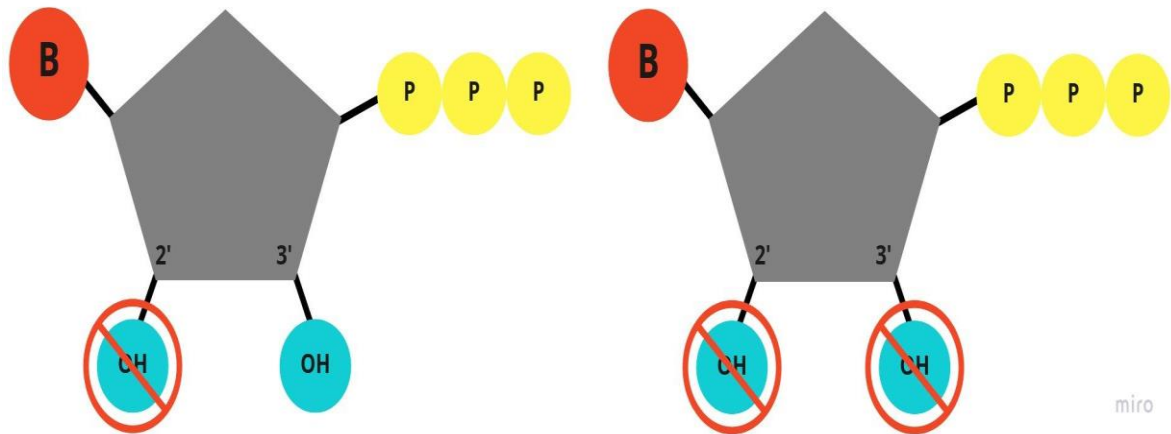


Figura 8.1 Los nucleótidos trifosfato tienen grupos hidroxilo en los carbonos los 2' y 3' del azúcar, los desoxinucleótidos carecen del grupo hidroxilo del carbono 2' y los dideoxinucleótidos usados en la secuenciación Sanger, carecen de ambos grupos hidroxilo.

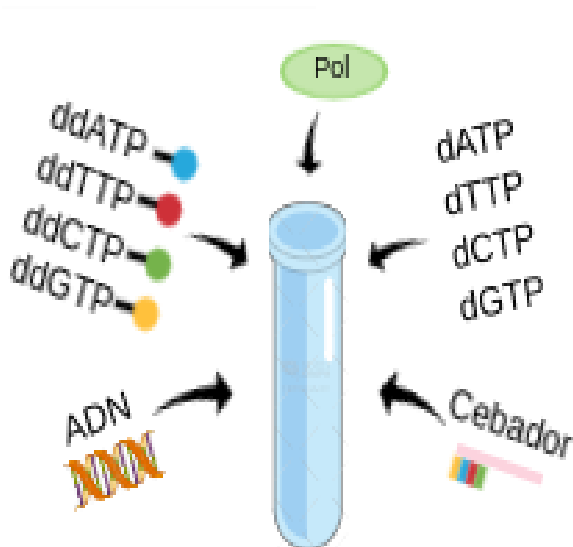


Figura 8.2 En un tubo se agregan los componentes necesarios para llevar a cabo la secuenciación de Sanger con electroforesis en capilar: (1) el ADN que se quiere secuenciar, (2) un cebador o primer, (3) la polimerasa para llevar a cabo la síntesis de ADN, (4) desoxinucleótidos y (5) dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos.



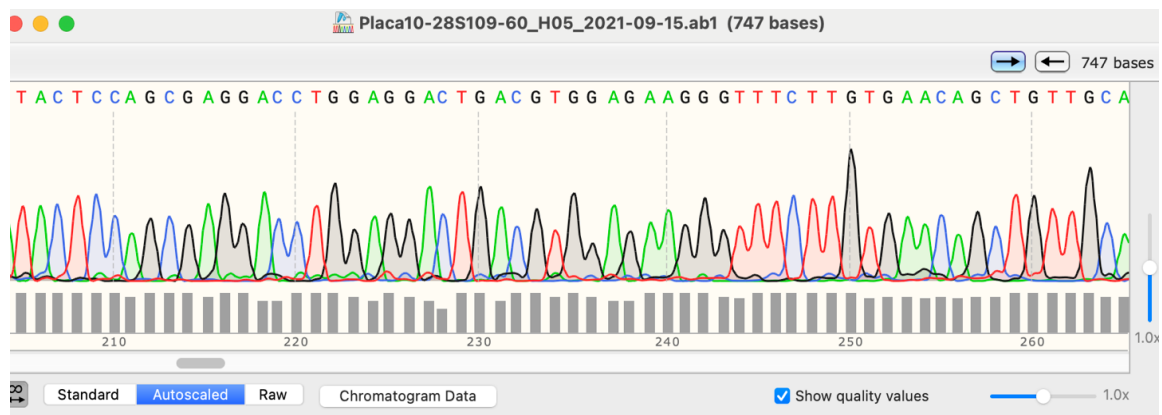


*Figura 8.5. Ejemplo de un cromatograma (Nota. Captura de pantalla de una secuencia de M. De la Mora Curiel, visualizada en SnapGene Viewer (versión 5.3.2))*

## Objetivos de aprendizaje

- Explicar el fundamento de la secuenciación de ADN por el método de Sanger.
- Analizar los componentes y etapas del proceso de secuenciación.
- Interpretar resultados de secuenciación para la identificación de secuencias nucleotídicas.

## Materiales y equipo

Equipo

Computadora

Software de análisis de secuencias

Software

SnapGene Viewer

Navegador web

Datos

Archivos de secuenciación en formato .ab1

Herramientas en línea

BLAST

## Fundamento

Para esta práctica se usarán datos de secuenciación Sanger de secuencia parcial de COI, especie *Trichobaris texana* y se analizarán con el programa SnapGene® Viewer 5.3.2. El programa se puede descargar desde su página oficial <https://www.snapgene.com/> (cualquier programa de análisis de secuencias Sanger sirve).

## Procedimiento

Análisis de secuencias

1. Una vez que hemos descargado los datos e instalado el programa, lo abrimos SnapGene® Viewer 5.3.2 y esto es lo primero que vemos:

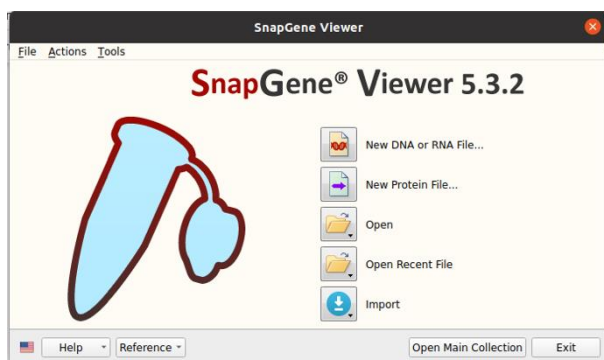


*Figura 8.6 Pantalla de inicio de SnapGene Viewer (versión 5.3.2). Nota. Captura de pantalla obtenida mediante SnapGene Viewer (versión 5.3.2) por Leo J. Arteaga Vázquez.*

2. Podemos hacer clic en Open para abrir nuestros archivos ab1. Damos clic en open y seleccionamos uno de nuestros archivos.

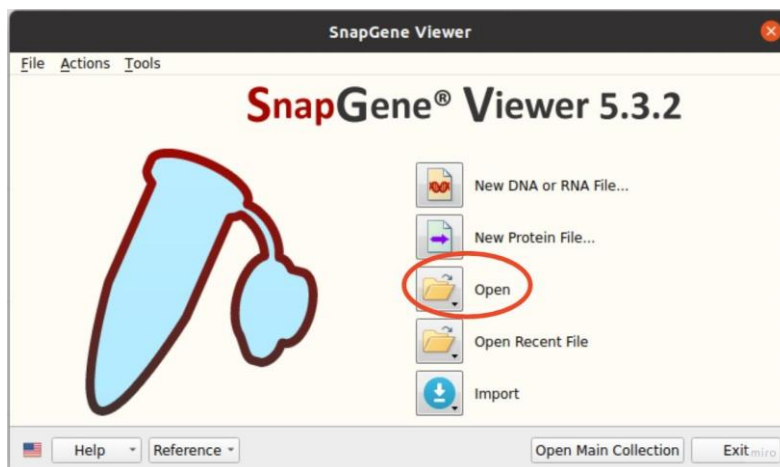


Figura 8.7 Menú de inicio de SnapGene Viewer (versión 5.3.2). (Nota. Captura de pantalla obtenida mediante SnapGene Viewer (versión 5.3.2) por Leo J. Arteaga Vázquez).

3. Al abrir un archivo 1texanaF.ab1 se presentará esta ventana:

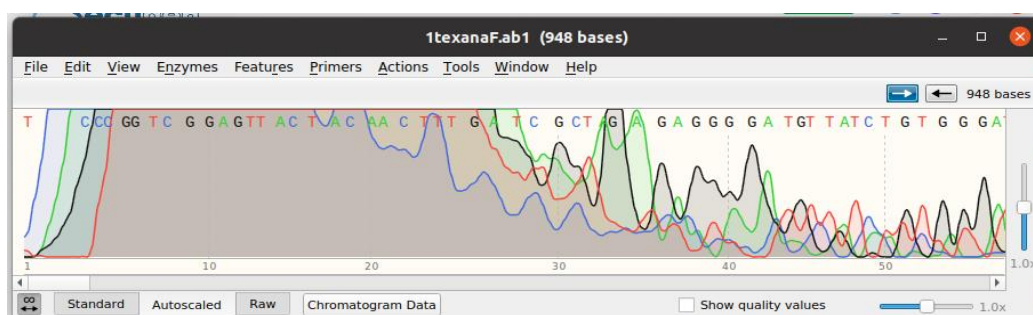


Figura 8.8 Ventana de visualización de cromatogramas de SnapGene Viewer (versión 5.3.2). (Nota. Captura de pantalla obtenida mediante SnapGene Viewer (versión 5.3.2) por Leo J. Arteaga Vázquez).

4. Es indispensable comparar la secuencia con las secuencias disponibles en las diferentes bases de datos ubicadas en Internet. Este tipo de análisis se pueden llevar a cabo mediante programas de cómputo, el más usado el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). De esta manera se verifica si se logró secuenciar el fragmento que se esperaba. Para este paso lo primero que

debemos hacer es obtener la secuencia en texto o formato FASTA, esto lo podemos conseguir presionando el botón “Chromatogram Data”.

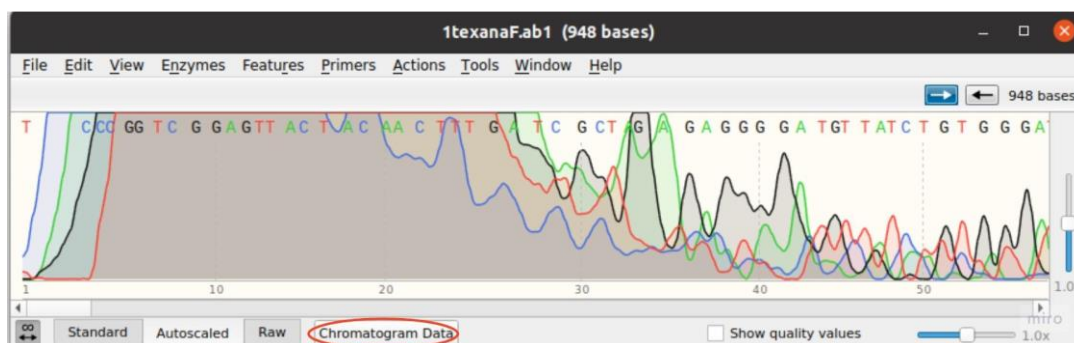


*Figura 8.8 Botón “Chromatogram Data” de la ventana de SnapGene Viewer (versión 5.3.2) . (Nota. Captura de pantalla obtenida mediante SnapGene Viewer (versión 5.3.2) por Leo J. Arteaga Vázquez).*

Y se abrirá la siguiente ventana, de ahí podemos copiar la secuencia.

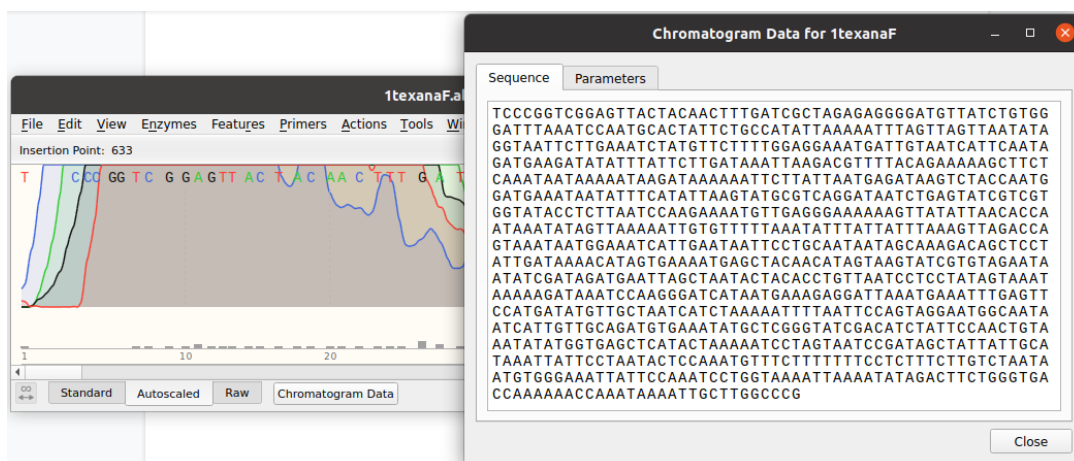


*Figura. 8.9 Secuencia fasta. (Nota. Captura de pantalla obtenida mediante SnapGene Viewer (versión 5.3.2) por Leo J. Arteaga Vázquez).*

Alternativamente, podemos exportar un archivo fasta si presionamos en File -> export.

Podemos pegar la secuencia o subir el archivo a la página de BLAST NCBI: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

## 5. Interpretación de cromatogramas de secuencia y evaluación de cromatogramas.

Una vez que hemos confirmado la identidad de nuestra secuencia, procedemos a analizar la calidad de la secuencia en el cromatograma, para ello se revisan distintos factores como: el ruido, la resolución, los tamaños de las señales, entre otros. A continuación, se muestran algunos ejemplos de los distintos factores a considerar

**Ruido:** A continuación, se muestran diferentes grados de ruido en cromatogramas. Posibles causas del ruido de fondo son: una contaminación de otro ADN o una contaminación con otro primer (normalmente el primer reverso utilizado en la PCR). Todas las imágenes son impresiones de pantalla visualizadas en el programa SnapGene® Viewer 5.3.2.

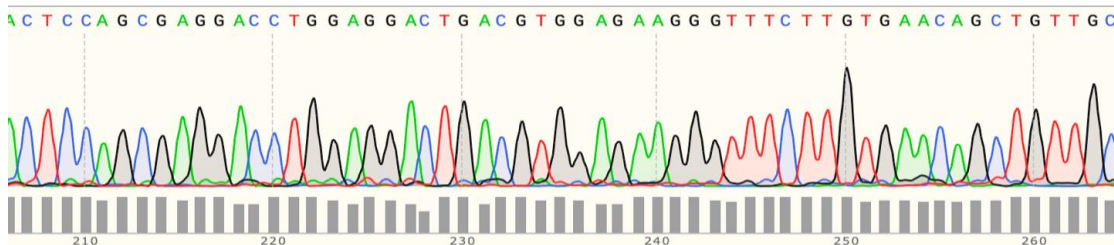


*Figura 8.10. Detalle de la secuencia genética donde se observa un cromatograma sin ruido. (Nota. Fragmento de una captura de pantalla de una secuencia de M. De la Mora Curiel, visualizada por Leo J. Arteaga Vázquez en SnapGene Viewer (versión 5.3.2)).*

### Cromatograma con algo de ruido

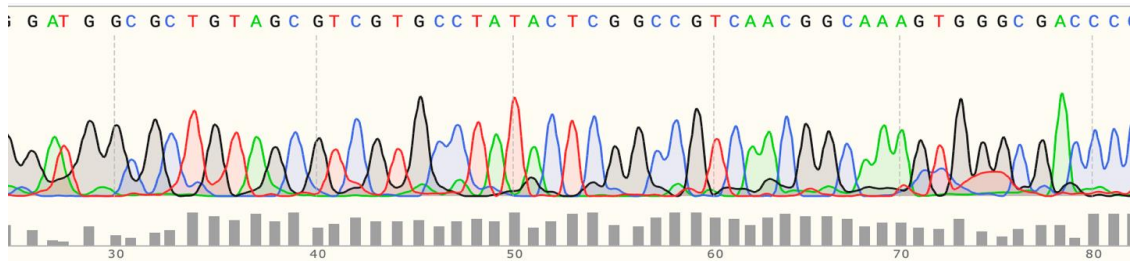


*Figura 8.11. Detalle de la secuencia genética donde se observa un cromatograma con algo de ruido. (Nota. Fragmento de una captura de pantalla de una secuencia de M. De la Mora Curiel, visualizada por Leo J. Arteaga Vázquez en SnapGene Viewer (versión 5.3.2)).*

### Cromatograma con mucho ruido.

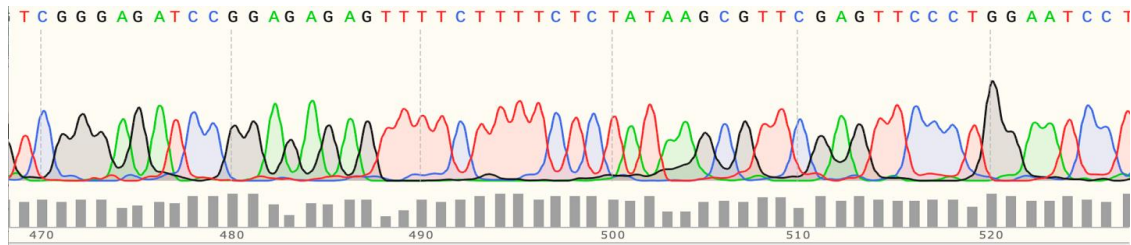


*Figura 8.12. Detalle de la secuencia genética donde se observa un cromatograma con mucho ruido. (Nota. Fragmento de una captura de pantalla de una secuencia de M. De la Mora Curiel, visualizada por Leo J. Arteaga Vázquez en SnapGene Viewer (versión 5.3.2)).*

**Errores en el *basecalling*.** Algunas veces el secuenciador automático no es capaz de colocar los picos correspondientes a las distintas bases a una distancia equidistante, o las separa mucho o las junta. Los picos de fluorescencia no se distinguen con claridad, se superponen unos sobre otros. Por ejemplo, esto sucede con frecuencia en el dinucleótido GA.

Mal espaciado bien interpretado.

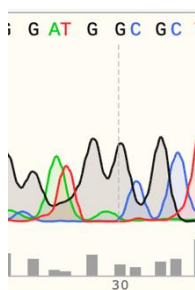


*Figura 8.13 Detalle de cromatograma de secuencia que muestra mal espaciado bien interpretado. (Nota. Fragmento de una captura de pantalla de una secuencia de M. De la Mora Curiel, visualizada por Leo J. Arteaga Vázquez en SnapGene Viewer (versión 5.3.2)).*

Mal espaciado que introduce una N extra.

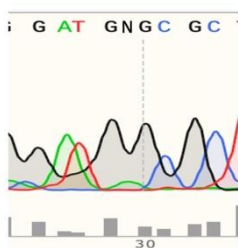


*Figura 8.14 Detalle de cromatograma de secuencia que muestra mal espaciado que introduce una N extra. Nota. Fragmento de una captura de pantalla de una secuencia de M. De la Mora Curiel, visualizada por Leo J. Arteaga Vázquez en SnapGene Viewer (versión 5.3.2)).*

Mal espaciado y fondo que introduce una base extra.

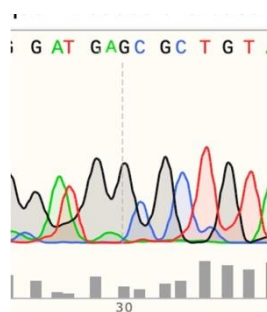


*Figura 8.15 Detalle de cromatograma de secuencia que muestra mal espaciado y fondo que introduce una base extra. (Nota. Fragmento de una captura de pantalla de una secuencia de M. De la Mora Curiel, visualizada por Leo J. Arteaga Vázquez en SnapGene Viewer (versión 5.3.2)).*

Los programas de *basecalling* suelen interpretar los heterocigotos como N. Hay programas especializados en detectar estos picos dobles y en etiquetarlos adecuadamente.

Heterocigoto C/T.

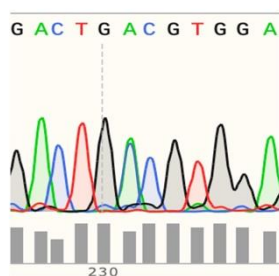


*Figura 8.16 Detalle de cromatograma de secuencia de un heterocigoto C/T. (Nota. Fragmento de una captura de pantalla de una secuencia de M. De la Mora Curiel, visualizada por Leo J. Arteaga Vázquez en SnapGene Viewer (versión 5.3.2)).*

**Resolución.** Incluso las buenas secuencias pierden resolución al avanzar la secuencia, debido a la cromatografía, y a que la polimerasa usualmente se desprende de la secuencia a los 600pb. Este es uno de los motivos que hacen que las lecturas no tengan más de 700-800 pb. En el caso de secuencias blanco muy largas por ejemplo 1000 pb es recomendable contar con un par de primers internos.

Resolución buena.

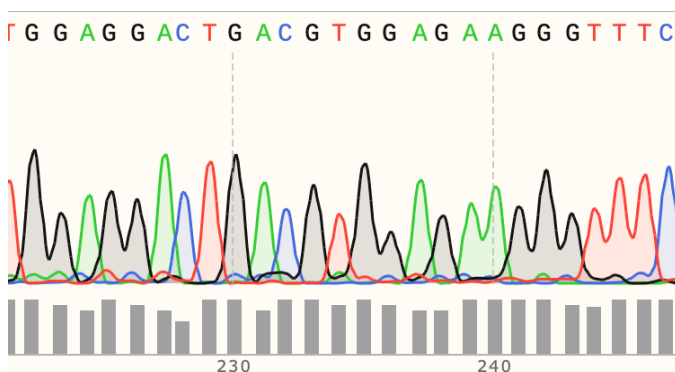


*Figura 8.17 Detalle de cromatograma de secuencia con resolución buena. (Nota. Fragmento de una captura de pantalla de una secuencia de M. De la Mora Curiel, visualizada por Leo J. Arteaga Vázquez en SnapGene Viewer (versión 5.3.2)).*

Resolución aceptable.

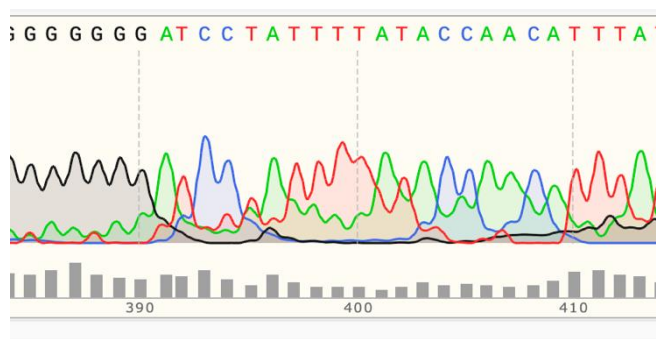


*Figura 8.18 Detalle de cromatograma de secuencia con resolución aceptable. (Nota. Fragmento de una captura de pantalla de una secuencia de M. De la Mora Curiel, visualizada por Leo J. Arteaga Vázquez en SnapGene Viewer (versión 5.3.2)).*

Resolución mala.

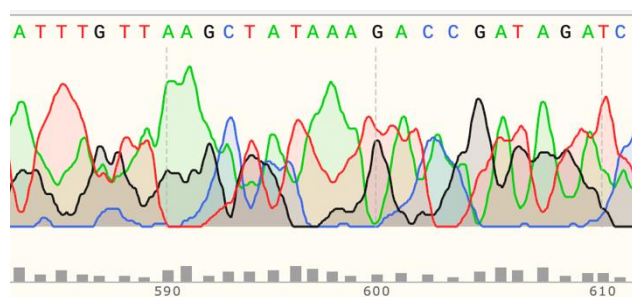


*Figura 8.19 Detalle de cromatograma de secuencia con resolución mala. (Nota. Fragmento de una captura de pantalla de una secuencia de M. De la Mora Curiel, visualizada por Leo J. Arteaga Vázquez en SnapGene Viewer (versión 5.3.2)).*

En algunas ocasiones puede haber problemas en la reacción de secuenciación que impiden tener una buena secuencia. Es necesario diagnosticar el problema para solucionarlo.

Posibles causas para los problemas en las secuencias:

- No había ADN molde
- No había primer
- El primer no ha reconocido al molde
- Había poco ADN molde
- Hay muchos dímeros de primer

Hay señal, pero la resolución es mala desde el principio:

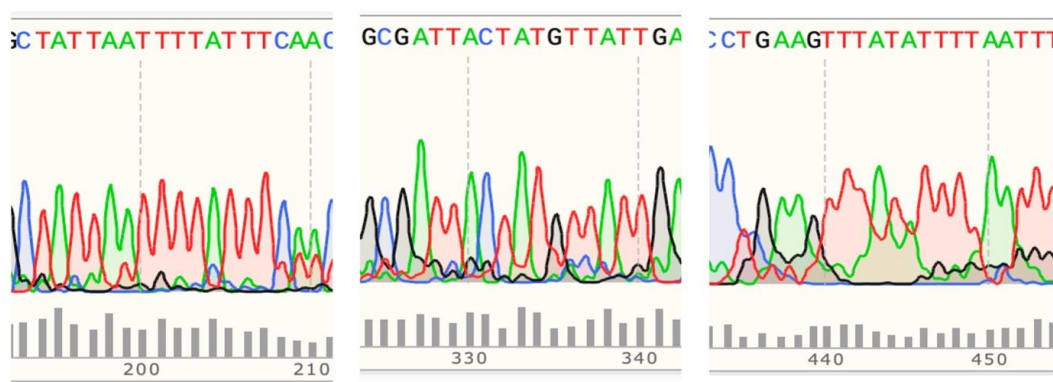


*Figura 8.20 Detalle de cromatograma de secuencia con ventanas a lo largo de la secuencia, muestra mala resolución. (Nota. Fragmento de una captura de pantalla de una secuencia de M. De la Mora Curiel, visualizada por Leo J. Arteaga Vázquez en SnapGene Viewer (versión 5.3.2)).*

Posible causa: Puede que haya un contaminante en la muestra que afecta a la cromatografía.

La señal y la resolución son buenas, pero hay varias bandas en cada posición:

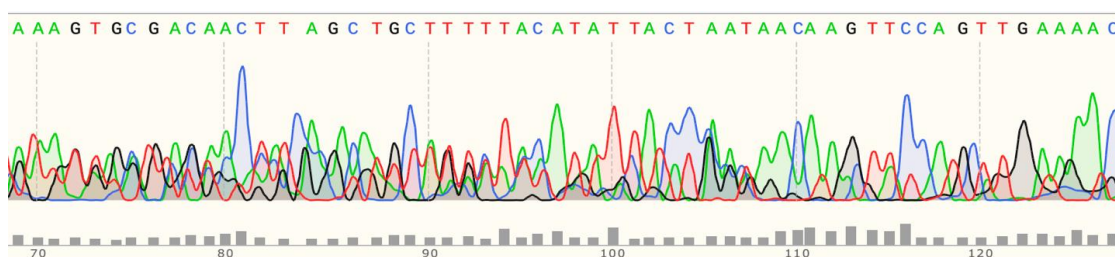


*Figura 8.21 Detalle de cromatograma de secuencia muestra buena resolución. (Nota. Fragmento de una captura de pantalla de una secuencia de M. De la Mora Curiel, visualizada por Leo J. Arteaga Vázquez en SnapGene Viewer (versión 5.3.2)).*

Varios moldes en la reacción:

- El primer se une en varias posiciones del molde
- Se están secuenciando varios productos
- Los primer de la PCR original no se han eliminado

Pérdida gradual de señal en los tamaños grandes:

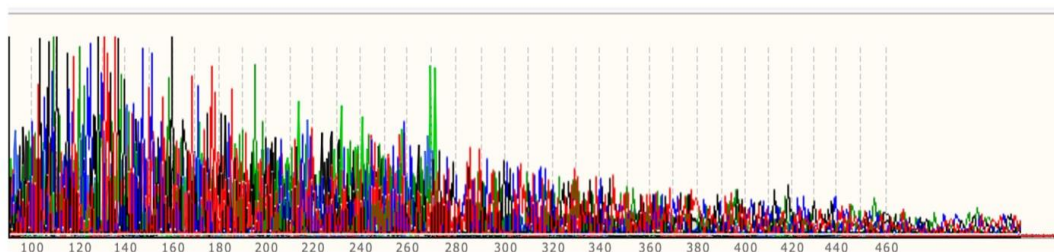


*Figura 8.22 Detalle de cromatograma de secuencia muestra pérdida de resolución. (Nota. Fragmento de una captura de pantalla de una secuencia de M. De la Mora Curiel, visualizada por Leo J. Arteaga Vázquez en SnapGene Viewer (versión 5.3.2)).*

La señal es buena al principio, pero disminuye rápidamente:

- Exceso de sales en el molde
- Exceso de ADN molde
- Contaminante que inhibe a la polimerasa

Un gran pico rompe la secuencia en un punto concreto.

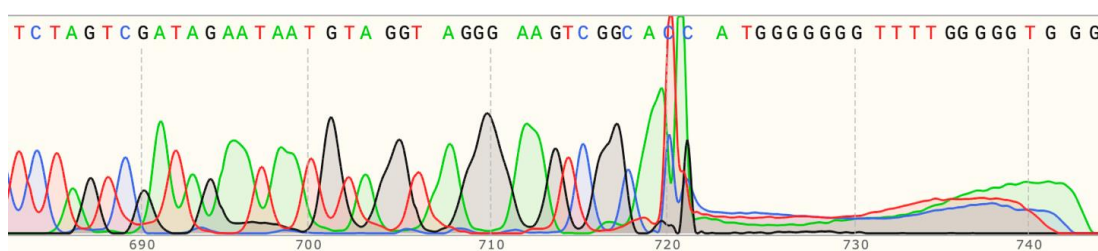


*Figura 8.23 Detalle de cromatograma de secuencia con un pico grande. (Nota. Fragmento de una captura de pantalla de una secuencia de M. De la Mora Curiel, visualizada por Leo J. Arteaga Vázquez en SnapGene Viewer (versión 5.3.2)).*

Posible causa: ddNTPs mal eliminados de la reacción de secuenciación.

La señal es buena hasta un punto concreto y después disminuye bruscamente:

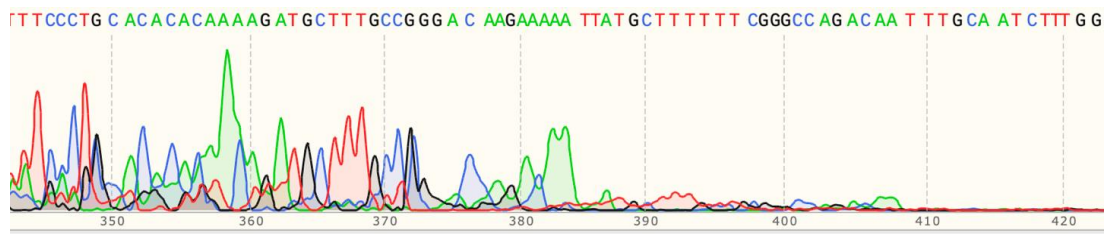


*Figura 8.24 Detalle de cromatograma de secuencia con pérdida de la señal. (Nota. Fragmento de una captura de pantalla de una secuencia de M. De la Mora Curiel, visualizada por Leo J. Arteaga Vázquez en SnapGene Viewer (versión 5.3.2)).*

Posible causa: Estructura secundaria en el ADN molde.

6. Ahora que hemos visto ejemplos de cromatogramas de buena y de mala calidad, revisamos nuestros archivos y seleccionamos los de mejor calidad.
7. Ahora seleccionamos uno de nuestros archivos y volvemos a correr BLAST como lo habíamos hecho anteriormente, seleccionado en organismo “*Trichobaris*”.
8. En los resultados, seleccionamos diferentes especies (al menos un récord por especie) y hacemos clic en Distance tree of results, esto abrirá otra ventana donde se mostrará el árbol generado por las secuencias de los récords seleccionados.

## Productos esperados

Secuencia de ADN en formato texto o FASTA

Cromatogramas interpretables

Identificación de la secuencia mediante BLAST

Árbol filogenético con secuencias relacionadas

## **Análisis de resultados**

¿Cómo evaluarías la calidad de una secuencia obtenida antes de utilizarla en análisis posteriores?

Si obtienes una secuencia ambigua, ¿qué decisiones tomarías para resolverla?

Analiza en qué casos la secuenciación Sanger sigue siendo preferible frente a otras tecnologías.

## **Preguntas de reflexión**

¿Cómo evaluarías la calidad de una secuencia antes de usarla?

Si obtienes una secuencia ambigua, ¿cómo la resolverías?

¿En qué casos la secuenciación Sanger es preferible frente a otras tecnologías?

## **Conclusión**

Redacta la conclusión de la práctica considerando los siguientes puntos: explica qué se comprendió el principio de la secuenciación Sanger y su aplicación en la identificación de secuencias de ADN. Describe el aprendizaje en la interpretación de cromatogramas, la evaluación de la calidad de las secuencias y el uso de herramientas bioinformáticas para su análisis.

## **Bibliografía**

Brown, T. A. (2020). *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*. John Wiley & Sons.

Applied Biosystems. (2009). *DNA sequencing by capillary electrophoresis*.

Abelson, J. N., & Simon, M. I. (1997) *Methods In Enzymology*. Academic Press; 1er edition.

## **PRÁCTICA NO. 9**

### **CLONACIÓN DE UN GEN**

Autora

Elvia Zoe Franco Hernández

Tiempo estimado

2 días (4 horas cada uno)

#### **Introducción**

La clonación de ADN es una técnica de biología molecular que permite hacer copias idénticas de un fragmento de ADN. El procedimiento consiste en insertar un gen de un organismo, a menudo denominado "ADN exógeno", en el material genético de un portador denominado vector. Los vectores pueden ser bacterias, levaduras, virus o plásmidos (ADN circular extra cromosómico de bacterias). Existen múltiples usos de la clonación génica, por ejemplo, la terapia génica, productos biofarmacéuticos y para fines de análisis génico (Bertero, 2017).

Para comenzar con la clonación de un gen, es necesario la amplificación de éste. Ya identificado se inserta en el plásmido, el cual es un fragmento de ADN circular. La inserción se llevará a cabo cortando con enzimas de restricción y ligando con una ADN ligasa teniendo como resultado un ADN recombinante. El ADN recombinante es insertado en un huésped el cual generalmente es una bacteria, este paso es conocido como transformación; para la incorporación de este al huésped es necesario someterla a altas temperaturas. Cabe mencionar que sólo algunas de las bacterias serán capaces de tal incorporación, las cuales serán utilizadas para el estudio de tal gen (Bertero, 2017).

Dentro del proceso de clonación múltiples pasos concretos son necesarios a seguir para poder introducir el fragmento sintetizado *in vitro*, ya sea vía PCR o con enzimas de restricción, a un organismo hospedero generalmente una bacteria de fácil crecimiento y no patogénica que coordinará su crecimiento

con la replicación de la molécula o fragmento de ADN. Una sola célula modificada que lleva el ADN recombinante deseado se puede cultivar fácilmente de manera exponencial para generar copias idénticas virtualmente ilimitadas de este ADN. Como tal, la clonación molecular se puede ver como una "reacción en cadena de la polimerasa (PCR) *in vivo*", en la que se puede aislar y expandir un fragmento de ADN deseado. Sin embargo, la clonación molecular permite más flexibilidad, mejor fidelidad, mayores rendimientos y menores costos que una PCR (Bertero, 2017).

Los vectores tradicionales comúnmente utilizados en el laboratorio representan una versión más pequeña de los plásmidos naturales, estos incluyen varias características básicas: origen de replicación, un gen de resistencia a los fármacos y sitios de restricción únicos para facilitar la inserción de fragmentos de ADN (Bertero, 2017). Aparte de esta estrategia, se han desarrollado muchas otras técnicas de clonación molecular, como se muestra en la siguiente tabla.

*Tabla 4.1 Descripción de las principales metodologías de clonación molecular (Bertero, 2017).*

| Método de clonación                            | Descripción general                                                                                                                              | Rendimiento  | Costo |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------|
| Tradicional (Basado en enzimas de restricción) | Requiere de una secuencia de reconocimiento por parte de las enzimas de restricción.                                                             | Bajo a Medio | Bajo  |
| Clonación con PCR                              | La clonación por PCR implica la ligación directa de un fragmento de ADN generado por PCR sin usar enzimas de restricción para cortar el inserto. | Alto         | Medio |
| Clonación independiente de ligación (CIL)      | La clonación se lleva a cabo agregando secuencias cortas de ADN                                                                                  | Bajo         | Medio |

|                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |      |      |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|
|                                       | al fragmento a clonar que son homólogas al vector de destino. Se forman extremos complementarios entre el vector y el inserto con exonucleasas para crear extremos 5'. El plásmido resultante tiene cortes que el organismo huésped repara de forma eficaz.                              |      |      |
| Clonación perfecta (seamless cloning) | De manera similar a CIL, esto se basa en la adición de regiones de homología en cada extremo de los fragmentos que se van a clonar. Luego, la acción combinada de una exonucleasa que crea extremos 3', una ADN polimerasa y una ADN ligasa permiten la generación del ADN recombinante. | Bajo | Alto |
| Clonación Recombinante                | Utiliza recombinasas de ADN capaces de “intercambiar” fragmentos de ADN entre dos moléculas que contienen sitios de recombinación. Primero, los sitios de recombinación se insertan mediante PCR a cada lado                                                                             | Alto | Alto |

|  |                                                                                                                                                                                          |  |  |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|
|  | del inserto a clonar, luego esto se recombina con un vector donante (clon de entrada). Este clon de entrada se recombina nuevamente con un vector de destino para la construcción final. |  |  |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|

Un experimento de clonación molecular tradicional se puede dividir en nueve pasos (Bertero, 2017):

### 1. Selección del organismo huésped

Los organismos hospedadores más comúnmente utilizados son las cepas de laboratorio no patógenas de *E. coli*. Varias cepas de *E. coli* están disponibles en el mercado y han sido diseñadas genéticamente para un rendimiento óptimo en determinadas aplicaciones (ej. *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ , diseñada para maximizar la eficiencia de transformación).

### 2. Selección del vector de clonación

El plásmido más básico debe contener por lo menos los siguientes elementos de ADN:

- Origen de replicación (ORI). Esto recluta la maquinaria de replicación del ADN y permite la propagación del plásmido.
- Marcador seleccionable. Esto permite la selección de bacterias que contienen plásmidos. Los más utilizados son los genes de resistencia a fármacos, como los que confieren resistencia a ampicilina, kanamicina o cloranfenicol.

Además, hay varios elementos accesorios que se pueden encontrar en la mayoría de los plásmidos comunes:

- Sitio de clonación múltiple (MCS). Una región diseñada para contener múltiples sitios de enzimas de restricción para facilitar el procedimiento de clonación.
- Promotor. Esto impulsa la expresión del ADN clonado.
- Señal de poliadenilación. Este se localiza después del ADN clonado e induce la terminación de la transcripción del ARN mensajero (ARNm) por poliadenilación.

### **3. Preparación del vector**

Existen dos métodos principales de preparación de los vectores:

- Enzimas de restricción. Se pueden generar extremos romos o pegajosos dependiendo de la enzima de restricción. El vector una vez que se ha digerido se purifica por tamaño usando electroforesis.
- PCR. Este método genera extremos romos que pueden cortarse aún más mediante enzimas de restricción. El paso de amplificación del vector permite introducir nuevos sitios de restricción u otras secuencias deseadas al final del vector mediante el uso de primers modificados que contienen tales secuencias, pero el vector resultante tiene el potencial de contener mutaciones introducidas durante la PCR por lo que el vector debe purificarse antes de la ligación.

#### **Nota:**

Si el vector preparado tiene extremos que tienen el potencial de volver a ligarse sin la presencia del inserto deseado, los grupos fosfato deben eliminarse de los extremos 5' para evitar que esto suceda.

Los extremos del ADN generados por las enzimas de restricción retienen grupos fosfato en los extremos 5' pero la ADN ligasa para generar el ADN recombinante requiere la presencia de un grupo fosfato en el extremo 5'

de un fragmento de ADN para unir covalentemente dos fragmentos, por esta razón se eliminan *in vitro* utilizando enzimas como la fosfatasa alcalina.

#### **4. Preparación del inserto**

El primer paso es la preparación de una cantidad abundante del fragmento de ADN, que puede provenir de múltiples fuentes:

- ADN genómico. Antes de la clonación, se corta con una enzima de restricción o se cizalla mecánicamente para producir fragmentos con el tamaño deseado.
- ADN complementario (ADNc). Se trata de ADN bicatenario obtenido a partir de ARNm celular mediante transcripción inversa.
- ADN plasmídico. Esto ya contiene la secuencia de interés que debe transferirse a un nuevo vector.
- ADN sintético. Esto se puede crear *in vitro* sin utilizar ninguna plantilla de ADN preexistente. Antes de la clonación, estos fragmentos se tratan como si fueran productos de PCR, es decir, se requiere la secuenciación del producto clonado, ya que el procedimiento de PCR a menudo introduce mutaciones.

Independientemente de su origen, el ADN del inserto debe contener extremos que sean compatibles con los del vector preparado como se describió anteriormente.

#### **5. Generación del ADN recombinante**

Una vez preparados, el vector y los insertos son mezclados, llevándose a cabo la reacción de ligadura de ADN dependiente de trifosfato de

adenosina (ATP), para este procedimiento es comúnmente utilizando enzimas como la ADN ligasa T4.

## **6. Introducción del ADN recombinante en el organismo huésped.**

Existen dos formas principales:

- Competencia química. Este procedimiento aumenta la permeabilidad de la membrana celular al ADN. Esto se logra mediante el pretratamiento de las células con químicos (a menudo cloruro de calcio) en condiciones frías, seguido de un breve pulso de choque térmico.
- Electroporación. Las células se someten a una breve descarga eléctrica que genera pequeños poros en la superficie celular, lo que permite la entrada del ADN plasmídico; esta tecnología tiene una mayor eficiencia en comparación con la transformación química.

## **7. Selección de los clones de organismos que contienen los vectores.**

Las bacterias son cultivadas en medio de cultivo que contiene el agente de selección (generalmente un antibiótico). Esto permite la selección de los organismos que portan el marcador de ADN de resistencia a fármacos y, por lo tanto, el plásmido deseado.

## **8. Detección de clones con las moléculas de ADN recombinante deseadas**

Esto se puede lograr mediante tres estrategias principales:

- PCR de colonias. La presencia del inserto deseado se identifica realizando una PCR directamente en una colonia bacteriana.
- Examen por enzimas de restricción. El plásmido se aísla primero del clon bacteriano y luego se somete a una digestión de restricción que genera fragmentos de ADN de un cierto tamaño solo si está presente el ADN recombinante deseado.

- Secuenciación de ADN. Esto se realiza en plásmidos aislados y se utiliza para confirmar la presencia del inserto y correcta secuencia.

## **9. Expansión y aislamiento del ADN recombinante**

Después de la selección, el clon bacteriano que lleva el ADN recombinante deseado se expande en cultivo líquido para amplificar el plásmido.

Finalmente, la clonación es un procedimiento muy útil que nos permite aumentar la cantidad de producción de una secuencia, estudiar un solo producto genético (ya sea ARN o proteína) y construir organismos transgénicos que porten y expresen un gen (Sgaramella and Bernardi 2001).

A continuación, seguiremos el protocolo tradicional para la clonación de un gen en *E. coli*.

## **Objetivos de aprendizaje**

- Aplicar los principios de la clonación molecular para la inserción de un gen en un vector.
- Explicar las etapas del proceso de clonación, incluyendo digestión, ligación y transformación.
- Analizar los resultados de la clonación mediante métodos experimentales.

## **Materiales y equipo**

### **Material biológico**

- ADN genómico. Será el inserto. En este caso producto de PCR.
- ADN plasmídico. Plásmido pUC19. Será el vector. (Thermo Scientific™, Num. cat. SD0061).
- Cepa de bacterias competentes, *E. coli strain DH5α* (Thermo Scientific™, Num. cat. 18265017).

## Enzimas de restricción y reactivos

EcoRI (Promega, Núm. cat. R6011).

Buffer H 10X Buffer.

Suero de albumina bobina, acetilado.

BamHI (Promega, Núm. cat. R6021).

Buffer E 10X Buffer.

Suero de albumina bobina, acetilado.

Buffer MULTI-CORE™ 10X Buffer.

## Enzima ADN ligasa

T4 DNA ligase (Promega, Núm. cat. M1801).

T4 DNA Ligase 10X Buffer.

- Kit para purificación de productos de PCR en gel de agarosa.

PureLink® Quick & Easy Gel Extraction Catalog numbers K2100-12 and K2100-25.

- Ampicilina (50 mg/ml en agua destilada).
- Medio líquido LB broth (Thermo Scientific™, Núm. cat. 10855021).
- Agar LB (Thermo Scientific™, Núm. cat. 22700025).
- Solución X-Gal (Thermo Scientific™, Núm. cat. R0941).
- IPTG (Thermo Scientific™, Num. cat. 34060).
- Agua destilada.

Opcional. Si se desea hacer el paso final de aislamiento de plásmidos sin kit, comprar reactivos y preparar soluciones del Anexo 2.

### **Equipo:**

- Microtubos de 1.5 ml.
- Micropipetas de 1-20 y 20-200 µl.
- Puntas de micropipeta de 1-20 y 20-200 µl.

- Baño María o termoblock.
- Centrífuga refrigerada con una capacidad mínima de 4000 rpm.
- Incubadora con agitador.
- Esparcidor de vidrio.
- Asa de siembra.
- Cajas de Petri 9cm de diámetro.
- Tubos de cultivo.
- Microcentrífuga.

## **Fundamento**

Esta práctica se basó en el protocolo de Bertero, et al. (2017) porque no existe un protocolo universal de clonación. Vamos a trabajar con producto de PCR como el ADN a insertar, y usaremos enzimas y reactivos de Thermo Scientific™ y PROMEGA™.

Para preparar el producto de PCR, se recomienda seguir la práctica de PCR y hacer un PCR tradicional (sinónimo de PCR punto final) usando el particular la enzima polimerasa GoTaq Polymerase de PROMEGA™ (Núm. cat. M3001), o cualquier otra enzima que también genere productos de PCR con extremos 3'A.

En el paso de la digestión, es posible hacer esta con una enzima (digestión simple) y con dos (digestión doble). Aunque ambas enzimas tengan su propio buffer las especificaciones técnicas señalan que es recomendable usar uno solo que mantenga el 100% de la actividad de una y al menos el 75% de actividad de la otra. En esta práctica se hará una doble digestión con las enzimas EcoRI (buffer optimo H) y BamHI (optimo buffer E), el proveedor PROMEGA, recomienda el uso del buffer E cuando la reacción se realiza con las dos enzimas.

El procedimiento se puede dividir en 5 días, por lo que los cortes están indicados con letra azul. Se recomienda leer todo el protocolo antes de su ejecución para prever los pasos siguientes. Durante el procedimiento se usan

geles de agarosa para verificar los productos, por lo que se recomienda recurrir a la práctica de Electroforesis en esos pasos del procedimiento.

## Procedimiento

### Paso 1. Preparación del ADN plasmídico y generación del ADN recombinante en una sola reacción:

1. En un tubo de 1.5ml prepara la reacción que se indica a continuación:

|                                                     |       |
|-----------------------------------------------------|-------|
| Plásmido pUC19 (50 ng/μl)                           | 3 μl  |
| ADN, producto de PCR (100 ng/μl)                    | 30 μl |
| Buffer E 10X Buffer                                 | 5 μl  |
| Suero de albumina bobina, acetilado (BSA)           | 5 μl  |
| Enzima 1, EcoRI                                     | 1 μl  |
| Enzima 2, BamHI                                     | 1 μl  |
| ddH <sub>2</sub> O añadir hasta un volumen final de | 50 μl |

2. Incubar a 37°C por 1hr.

3. Corre un gel de agarosa al 0.2% para verificar el tamaño del vector y inserto. Usa un carril para un vector sin cortar solo, otro para el inserto y una escalera de referencia.

4. Purifica del gel el vector cortado y el inserto. Para este paso se siguió el manual del kit de purificación de productos de PCR PureLink® Quick & Easy Gel Extraction de ThermoFisher. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K210012> . Procedimiento del manual.

5. Ponga un baño María o termoblock a 50°C.

6. Selecciona las bandas en el gel que contengan el vector y el inserto, seleccionado el tamaño adecuado de la banda (vector+inserto) y cortando el rectángulo, muy justo, de agarosa que lo contiene.

7. Pesar el rectángulo de gel que contiene el fragmento de ADN utilizando una báscula a 0,001 g.

8. Coloque el rectángulo en un tubo y añadir el buffer L3 según la siguiente tabla.

| <b>Gel de agarosa</b> | <b>Tubo de polipropileno</b> | <b>Volumen de buffer</b>                        |
|-----------------------|------------------------------|-------------------------------------------------|
| Mayor o igual a 2%    | 1.7 ml                       | 3:1 (ej. 1.2 ml de buffer L3 por 400 mg de gel) |
| Menor a 2%            | 5 ml                         | 6:1 (ej. 2.4 ml de buffer L3 por 400 mg de gel) |

9. Coloque el tubo con el rectángulo de gel y el buffer L3 en un baño de agua a 50 °C o en un bloque térmico. Incube el tubo a 50 °C durante 10 minutos. Invertir el tubo cada 3 minutos para mezclar y asegurar la disolución del gel.

Nota: Los geles de alta concentración (>2 % de agarosa) o las porciones grandes de gel pueden tardar más de 10 minutos en disolverse.

10. Después de que la porción de gel parezca disuelta, incube el tubo durante 5 minutos.

Opcional: para rendimientos óptimos de ADN, agregue 1 volumen de gel de isopropanol a la porción de gel disuelto. Mezclar bien.

**IMPORTANTE:** Agregue etanol al buffer de lavado (W1) de acuerdo con la etiqueta de la botella antes de continuar con el siguiente paso.

11. Pipetee la pieza de gel disuelto en una columna de extracción con un tubo de lavado. Utilice 1 columna por 400 mg de gel de agarosa. Nota: La capacidad del depósito de la columna es de 850  $\mu$ l.

12. Centrifugar la columna a  $>12\ 000$  g durante 1 minuto. Deseche el flujo y coloque la columna en el tubo de lavado.

13. Agregue 500  $\mu$ l del buffer de lavado (W1) que contenga etanol a la columna.

14. Centrifugar la columna a  $>12\ 000$  g para 1 minuto. Deseche el flujo y coloque la columna en el tubo de lavado.

15. Centrifugar la columna a máxima velocidad durante 1-2 minutos. Deseche el flujo.

16. Coloque la columna en un tubo de recuperación. Agregue 50  $\mu$ l de buffer de elución (E5) al centro de la columna. Incubar el tubo durante 1 minuto a temperatura ambiente.

17. Centrifugar el tubo a  $>12\ 000$  g durante 1 minuto.

18. El tubo de elución contiene el ADN purificado. Guarde el ADN purificado a 4  $^{\circ}$ C para uso inmediato o a  $-20\ ^{\circ}$ C para almacenamiento a largo plazo.

## **Paso 2. Reacción de ligación**

1. En un tubo eppendorf colocar la siguiente mezcla:

Vector DNA 100 ng

Insert DNA  $> 400$  ng

10x T4 DNA ligase buffer

2 m l

T4 DNA ligase

1 m l

ddH<sub>2</sub>O añadir hasta un volumen final de

20 m l

2. Incubar durante la noche a temperatura ambiente.

3. Verificar el mini gel usando 10  $\mu$ l de la mezcla de reacción y un marcador de peso molecular de ADN (almacenar el resto de la mezcla de reacción a -20 ° C y hasta el momento de su uso con las células competentes).

Nota: La verificación del mini-gel después de la ligadura es para asegurarse de que no quede ninguna banda que corresponda al tamaño del plásmido digerido. Si esta banda está presente, la ligadura no ha tenido lugar o ha sido ineficaz.

### **Paso 3. Introducción del ADN recombinante en las células competentes**

1. Deje que las células competentes, *E. coli strain DH5 $\alpha$* , se descongelen en hielo (30 min).

2. Añada 20  $\mu$ l de la reacción de ligadura o del control negativo a unos 200  $\mu$ l de células (la relación entre la reacción de ligación y *E. coli* debe ser de al menos 1:10).

3. Mezcle suavemente para evitar dañar las células (no pipetear hacia arriba y hacia abajo).

4. Incubar en hielo durante 30 min.

5. Choque de calor a 42°C durante 1 min.

6. Añada inmediatamente 1 ml de medio LB broth a temperatura ambiente.

7. Incubar a 37° C durante 1 h con agitación (100-150 rpm).

8. Mientras se incuban las células, preparar la placa selectiva. Pesar 15 g de agar por 1 litro de solución del medio L-Broth, agregar ampicilina hasta una

concentración final de 100  $\mu\text{g}$  / ml.) verter en una caja de Petri. Dejar solidificar y agregar 44  $\mu\text{l}$  de una solución IPTG / X-Gal (4  $\mu\text{l}$  de IPTG y 40  $\mu\text{l}$  de X-Gal) y extiende sobre la superficie de la placa.

9. Dejar reposar 10 min aproximadamente.

10. Saque las células de incubación del paso 6 y centrifugue las bacterias a baja velocidad (7500 rpm) durante 2 min.

11. Aspire todo menos 100  $\mu\text{l}$  de LB.

12. Re-suspenda con cuidado el pellet y esparza los 100  $\mu\text{l}$  de manera uniforme en el plato selectivo preparado en el paso 7.

13. Incubar durante la noche a 37°C con los platos al revés.

**Nota:** Las colonias transformadas que contienen el vector y el inserto son blancas, las colonias con el vector religadas son azules.

- El sitio de clonación múltiple para los plásmidos se ha insertado en el gen que codifica el fragmento amino-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa. Este fragmento, en presencia de un inductor, IPTG, complementará una forma defectuosa de  $\beta$ -galactosidasa en el huésped. Si se induce, las bacterias producen ambos fragmentos enzimáticos y cuando se colocan en placas sobre medios que contienen X-Gal producen colonias de color azul. Si se inserta un fragmento de ADN en el sitio de clonación, el fragmento complementario se inactiva y no se produce color. Por tanto, las colonias que contienen un fragmento de ADN son blancas.
- A menudo, el color azul no está bien desarrollado. Deje los platos en la nevera durante la noche y esto oscurecerá el color.

**Nota:** No todas las colonias se transforman bien, esto debe tenerse en cuenta al seleccionar las transferencias de colonias, es decir, una señal baja puede ser el resultado de una transformación deficiente y no necesariamente debido a un inserto de bajo número de copias y para posteriores usos del plásmido.

#### **Paso 4. Verificación de clones con las moléculas de ADN recombinante deseadas:**

Una vez que se ha llevado a cabo la primera selección de clones y se ha reducido el número de colonias, se puede llevar a cabo una selección adicional de los clones. Picando con un asa la colonia seleccionada (las blancas en la placa selectiva) y volviendo a crecerla durante toda la noche en un tubo con Agar LB+ampicilina. Este paso adicional a menudo es necesario para verificar la validez de la señal obtenida, debido a los posibles problemas de transformación incorrecta o para verificar la duplicación de inserciones dentro de las colonias seleccionadas. Se puede hacer un PCR y verificar el tamaño de los plásmidos o extraer el ADN plasmídico y tratarlo con enzimas de restricción o mandar secuenciar el plásmido.

Actualmente existen muchos kits diferentes en el mercado para el aislamiento rápido de plásmidos, aunque estos tienden a ser costosos, a continuación se presenta un método rápido y confiable basado en Birnboim y Doly (1979), este procedimiento para extraer ADN plasmídico de células bacterianas es lo suficientemente simple como para permitir el análisis por electroforesis en gel de 100 o más clones por día, además produce ADN plasmídico lo suficientemente puro como para ser digerible por enzimas de restricción.

1. Use un asa de siembra para tomar un poco de la colonia seleccionada (las blancas en la placa selectiva) e inocularlas en tubos de cultivo con 5ml de medio LB + ampicilina (100 mg/ml). Incubar toda la noche a 37° C con agitación (100-150 rpm).

2. Transfiera 0.5 ml a un microtubo de 1.5 ml, y el resto se almacena a -20 °C después de la adición de glicerol al 40%.
3. Centrifugar durante 3 min. y cuidadosamente con un aspirador de punta fina se retira el sobrenadante, y el sedimento celular es resuspendido completamente en 100 µl de solución I.
4. Después de 30 min. periodo de incubación a 0 ° C, se añaden 200 µl de solución II y el tubo se mezcla por inversión. NOTA: La suspensión debe volverse casi transparente y ligeramente viscosa.
5. El tubo se mantiene durante 5 min. a 0 ° C y luego 150 µl de la solución III es añadido.
6. El contenido del tubo se mezcla suavemente por inversión durante uno segundos durante los cuales se forma un coágulo de ADN. El tubo se mantiene a 0 ° C durante 1h. Esto para permitir la mayor parte de las proteínas, ARN de alto peso molecular y ADN de cromosomas se precipiten.
7. Se centrifuga durante 5 min. Se transfieren 400 µl del sobrenadante a un segundo tubo de centrifuga. Pequeñas cantidades de material flotante pueden ser transferido en este momento. Se agrega un ml de etanol frío y el tubo se mantiene a -20 ° C durante 30 min.
- 8.- El precipitado se recoge por centrifugación durante 2 min., y el sobrenadante se elimina por aspiración.
- 9 El pellet se disuelve en 100 µl de acetato de sodio 0,1 M / Tris-HCl 0,05 M (pH 8) y se precipita con 2 volúmenes de etanol frío. Después de 10 min. a -20°C, el precipitado es formado de nuevo por centrifugación como antes. El pellet se disuelve en 40 µl del buffer TE.

**Nota:** Este método da como resultado una preparación bastante impura pero que aún restringe y permite la escisión del inserto por enzimas de restricción o la amplificación por PCR. Si se requiere una preparación más pura, se puede agregar un paso de cloroformo de fenol.

### **Almacenamiento de los plásmidos:**

Se puede almacenar fácilmente para su uso en el futuro o una revisión adicional.

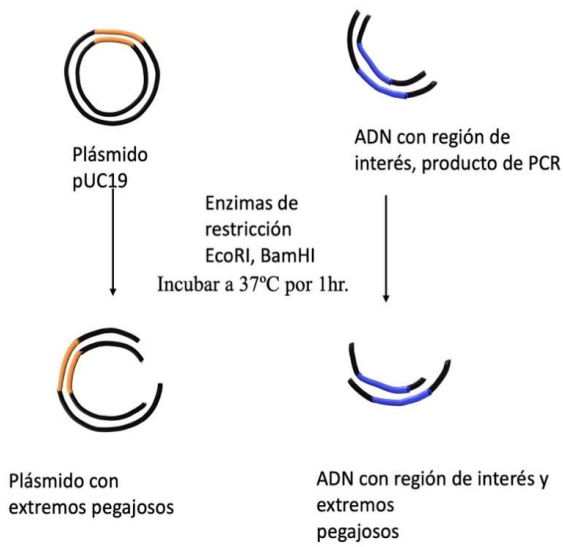
Almacenamiento de la librería: Agregue 30 µl de glicerol al 50% a cada parte de la placa y almacenar a -70° C.

Plásmidos individuales: Si es necesario guardar plásmidos específicos, inocular un cultivo de 2 ml e incubar durante la noche con agitación a 37 ° C. Retire 850 µl del cultivo a un tubo de microcentrífuga, agregue 150 µl de glicerol al 50%. Agite en el vortex para mezclar y congelar en nitrógeno líquido. Almacenar a -70 ° C.

**Nota:** Para volver a crecer los cultivos almacenados, raspe los cultivos congelados con un asa de inoculación de alambre o un palillo de dientes estéril e inocule una placa de agar o un cultivo líquido que contenga los antibióticos apropiados. Crecer durante la noche a 37° C. No descongelar el cultivo congelado, ya que esto reduce drásticamente su vida útil.

Figuras que ilustran el proceso de clonación de un gen.

**Paso 1. Preparación del ADN plasmídico y generación del ADN recombinante en una sola reacción.**



**Paso 2. Reacción de ligación**

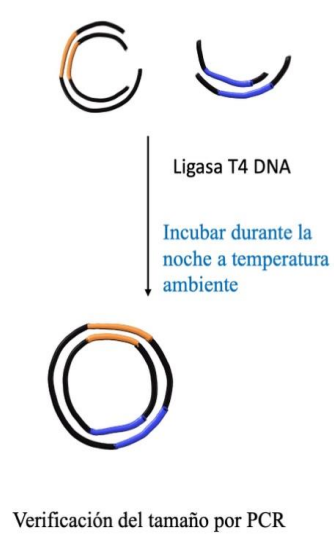


Figura 9.1 Pasos en la clonación de un gen (parte 1).

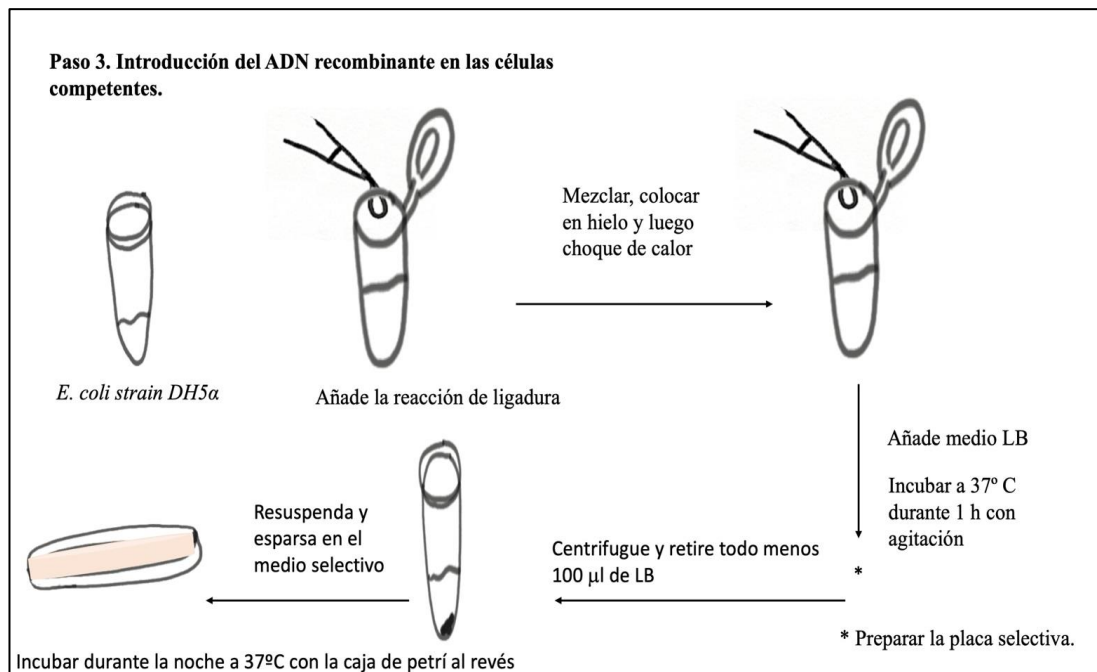


Figura 9.2 Pasos en la clonación de un gen (parte 1).

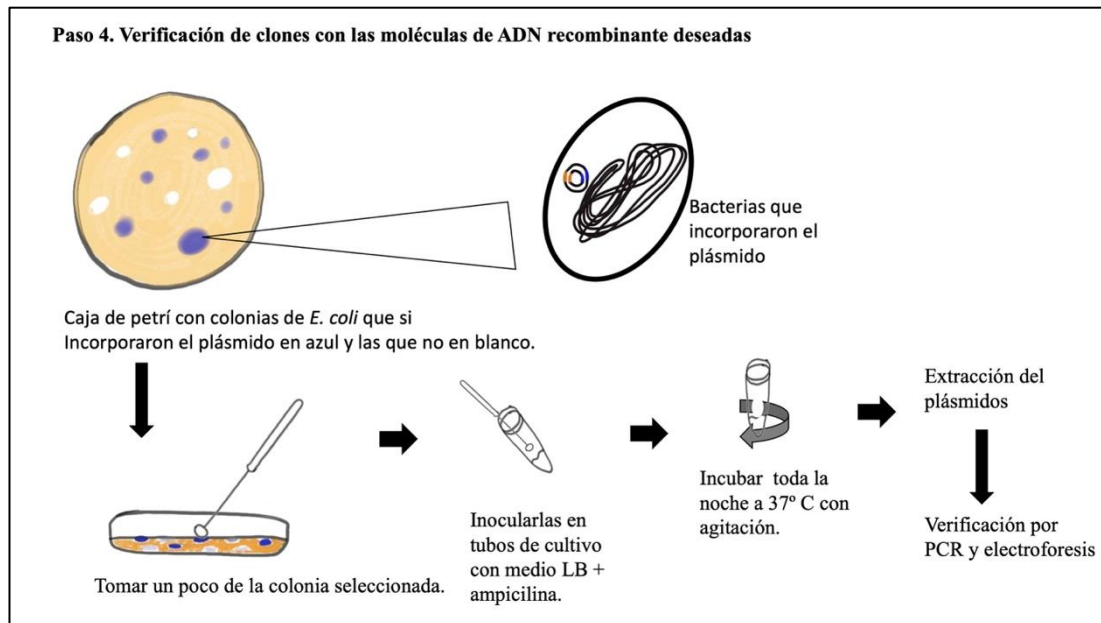


*Figura 9.3 Pasos en la clonación de un gen (parte 1).*

## Productos esperados

Colonias bacterianas transformadas

ADN recombinante

Confirmación del inserto

Plásmidos aislados

## Análisis de resultados

Responde las siguientes preguntas:

Si la clonación no fue exitosa, ¿qué pasos del proceso revisarías primero y por qué?

¿Cómo confirmarías que el gen insertado es el correcto?

Diseña una estrategia para aumentar la eficiencia de transformación.

## Preguntas de reflexión

¿Cuál es la función de las enzimas de restricción en el proceso de clonación y por qué es importante que el corte sea específico?

¿Por qué es necesario purificar el ADN después de la digestión y antes de la ligación?

¿Qué factores pueden afectar la eficiencia de la ligación entre el vector y el inserto?

Si obtuviste pocas o ninguna colonia blanca, ¿qué etapa del proceso podría haber fallado y por qué?

## Conclusión

Redacta la conclusión mencionando el propósito de la práctica, las etapas principales de la clonación (digestión, ligación, transformación y selección) y la importancia de cada una para obtener ADN recombinante. Incluye la relevancia de verificar los resultados y destaca la utilidad de esta técnica en biotecnología e investigación genética.

## Bibliografía

Bertero, A. (2017). *Basic Science Methods for Clinical Researchers* || *Methods of Cloning*, 19–39 .doi:10.1016/B978-0-12-803077-6.00002-3

Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), 1513-1523.

Lessard, J. C. (2013). *[Methods in Enzymology] Laboratory Methods in Enzymology: DNA Volume 529* || *Molecular Cloning*, 85–98. doi:10.1016/B978-0-12-418687-3.00007-0

Sgaramella, V. and A. Bernardi (2001). *Encyclopedia of Genetics* || *DNA Cloning*, 544–550. doi:10.1006/rwgn.2001.0350

PROMEGA Manuals. *Assembly of Restriction Enzyme Digestions TM367*.

## **PRÁCTICA NO. 10**

### **EDICIÓN GENÉTICA CON CRISPR-CAS9**

Autor

César Enrique Calvo Aspiros

Tiempo aproximado

2 horas/día, 4 días consecutivos

#### **Introducción**

El sistema CRISPR/Cas involucra un complejo enzimático guiado por una secuencia de ácido ribonucleico (ARN), el cual se considera parte de los mecanismos de defensa que usan las bacterias y las arqueas para evitar la invasión por un ácido desoxirribonucleico (ADN) extraño. Sería algo similar a unas tijeras capaces de cortar de una manera muy precisa y totalmente controlada cualquier molécula de ADN. En general, el sistema CRISPR/Cas funciona en tres etapas para desarrollar una respuesta inmune completa. (Lagunas, 2019)

En la primera, pequeños fragmentos de ADN derivados de los virus (bacteriófagos) o plásmidos invasores se incorporan cerca de una zona del genoma bacteriano con una gran cantidad de secuencias palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) las cuales, en la segunda etapa, se transcriben y generan un ARN no codificante largo, denominado ARN CRISPR (pre-crRNA), el cual se procesa mediante unas proteínas conocidas como Cas y otros factores del huésped para producir crRNA cortos y maduros. Finalmente, el crRNA maduro se ensambla con la proteína Cas y forma un complejo que reconoce a los ácidos nucleicos extraños y destruye las secuencias complementarias al segmento incorporado mediante la actividad endonucleasa de las enzimas Cas, con lo cual protege a la célula de futuras intrusiones del mismo invasor. (Lagunas, 2019)

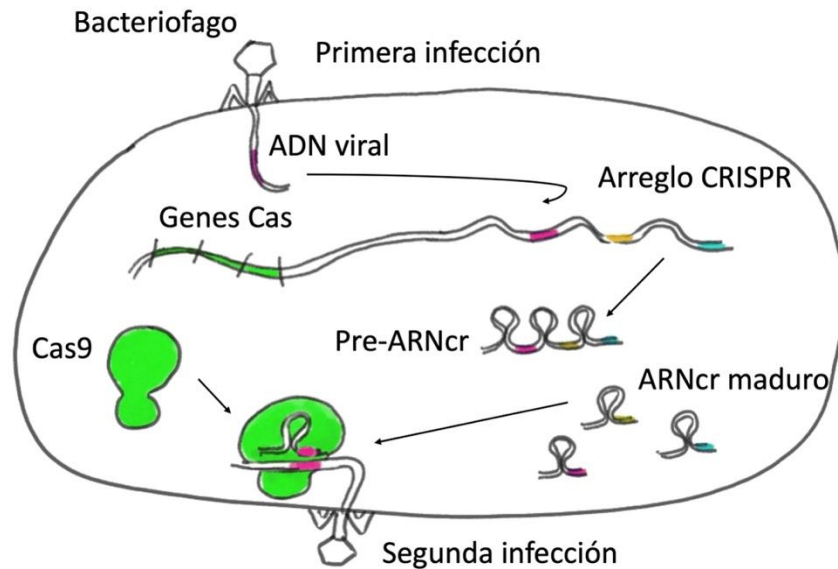


*Figura 10.1 Inmunidad propiciada por el sistema CRISPR/Cas en bacterias.*

Se han identificado tres tipos (I-III) de sistemas CRISPR en bacterias y arqueas de los cuales el sistema CRISPR Tipo II es el mejor caracterizado. Este consta de la nucleasa Cas9, la matriz crRNA que codifica los ARN guía y un crRNA transactivador auxiliar requerido (tracrRNA) que facilita el procesamiento de la matriz crRNA en unidades discretas. Cada unidad de crRNA contiene una secuencia guía de 20 nt y una repetición directa parcial, donde la primera dirige a Cas9 a un objetivo de ADN de 20 pb a través del par de bases de Watson-Crick. El ARNcr y el ARNtracr se pueden fusionar para crear un ARN quimérico de guía única (ARNsg). Además, modificaciones en la nucleasa Cas pueden hacer que esta genere cortes de doble cadena lo que permite integrar una platilla de ADN para la reparación de ese fragmento y así integrar una secuencia de ADN al genoma del hospedero, opcionalmente si no se integra una platilla el corte se reparará con una mutación puntual que modificara el marco de lectura ocasionando organismos knockout para cientos genes (Ran et al. 2013).

Debido a la capacidad del sistema CRISPR/Cas de integrar un ADN externo y guiar un corte en un sitio muy específico, esta herramienta se utilizó para desarrollar una técnica de edición genética que hoy día es una de las más populares, gracias a su facilidad de diseño, simplicidad de uso y alta eficiencia, lo cual permite una gran cantidad de aplicaciones. Al cambiar la secuencia guía

del ARN en el crRNA, este sistema se puede programar para apuntar hacia prácticamente cualquier secuencia de ADN de interés en el genoma y generar una ruptura de doble cadena. Ésta, al ser reparada, y dependiendo el mecanismo utilizado, puede hacer que se inserten o eliminen secuencias aleatorias, para provocar mutaciones o reemplazar una secuencia. Por lo tanto, el sistema CRISPR/ Cas proporciona una plataforma poderosa para la edición del genoma, que incluye el silenciamiento o la eliminación de genes, mutagénesis y correcciones de secuencias específicas (Lagunas, 2019).

### **Objetivos de aprendizaje**

- Aplicar el sistema CRISPR-Cas9 para la modificación dirigida de secuencias de ADN.
- Explicar el mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas9 en la edición genética.
- Evaluar los resultados de la edición genética en función de los cambios fenotípicos o genéticos observados.

### **Materiales y equipo**

#### *Materiales del Kit “Bacterial CRISPR and Fluorescent Yeast Combo”*

Medio de Agar YPD Media aprox. 5g

Agar YPD que contiene antibiótico G418 aprox. 5g

1 botella de vidrio de 250 ml con tapa de rosca

14 cajas de Petri 10 x 1.5 cm

1 micropipeta de 10-100  $\mu$ l

11 pipetas Pasteur de plástico con bulbo

1 caja de puntas de micropipeta de 200  $\mu$ l aprox. 96 piezas

1 gradilla para tubos de microcentrífuga de 0.5 ml y 1.5 ml

25 tubos de microcentrífuga de 0.5 ml

6 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml con YPD

1 tubo de centrífuga de 50 ml

- 1 par de lentes con filtro para luz UV
- 1 lámpara de luz azul
- 5 asas de inoculación de plástico
- 1 esparcidor de células de plástico
- 5 pares de guantes de nitrilo

Mezcla de transformación de levadura, 1 tubo con:

Buffer de transformación de levadura 40% PEG 8000, 200 mM de acetato de nitrilo (LiAc) y 0.1 mg/ml de ADN de esperma de salmón (ADN monocatenario).

- 1 tubo con cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*
- 1 tubo con plásmido de expresión de levadura GFP 100 ng/μl
- 1 tubo de 1 ml de agua estéril

Equipo

Refrigerador a 5 °C

Incubadora o baño María a 42 °C

### Fundamento

Para esta práctica se usará el “Bacterial CRISPR and Fluorescent Yeast Combo kit” de la empresa The Odin. Para más información visitar: <https://www.the-odin.com/bacterial-crispr-and-fluorescent-yeast-combo-kit/>

### Procedimiento

|       |                                 |
|-------|---------------------------------|
| Día 1 | Hacer los medios de cultivo     |
| Día 2 | Transformación de las levaduras |
| Día 3 | Realizar los cultivos           |
| Día 4 | Revisar si funcionó la edición  |

## DÍA 1

1. Primero, preparar los medios sólidos para que crezca la levadura. Asegúrese de etiquetar la tapa de las cajas de Petri con el tipo de medio, ya que el medio se ve igual una vez preparado. Tome el tubo con la etiqueta " YPD Agar Media" y vierta su contenido en un vaso de precipitado de 250 ml, con una probeta agregar 150 ml de agua destilada.
2. Caliente el vaso de precipitado teniendo cuidado de no dejar que la solución hierva. Sabrá que está listo cuando la solución se vea amarillenta y transparente, posteriormente déjela enfriar por aproximadamente 20 – 25 min.
3. Mientras la solución permanece tibia, preparar las cajas de Petri, recuerde crear un ambiente estéril con ayuda de los mecheros Bunsen. Una a la vez, retire la tapa de 7 cajas y vierta lo suficiente de agar del vaso hasta cubrir la mitad inferior de la caja. Vuelva a poner la tapa.
4. Deje enfriar durante al menos una hora antes de usar (puede enfriar más rápido poniéndolos en el refrigerador, pero no los congele). Si es posible, deje reposar las cajas durante un par de horas o toda la noche para que se evapore la condensación. Luego guárdelo en su refrigerador a 4°C boca abajo para que la condensación no gotee en el agar. Las placas se almacenarán durante 1-2 meses. Repetir el proceso para Agar YPD con antibiótico G418.

Creación de levaduras competentes para la transformación.

5. Tome uno de los tubos de levadura deshidratada, agregue agua destilada y estéril hasta cubrir y agite hasta que se disuelva todo.
6. Luego, usando una micropipeta, colocar 100  $\mu$ l de la solución de levadura en una caja Petri con agar YPD y usando un asa de inoculación, esparcir suavemente. Recuerde siempre cambiar las puntas de las pipetas entre usos para evitar mezclar accidentalmente los restos que quedan en la punta.

7. Dejar que las levaduras crezcan durante la noche aprox. de 12-24 horas, o hasta que se vean colonias de levaduras en la caja.

## **DÍA 2**

8. Agregar 100  $\mu$ l de la mezcla de transformación de levadura a un tubo de microcentrífuga.
9. Usando un asa de siembra, raspar suavemente un poco de las colonias de levadura de su caja Petri y mezclar en la solución de transformación. La mezcla de transformación de levadura contiene: A) 40% polietilenglicol (PEG) 8000: Puede proteger el ADN cargado hasta ayudarlo a ingresar a la célula y hacer que la membrana celular sea más porosa. B) Acetato de litio 100 mM (LiAc): Puede proteger y neutraliza la carga negativa del ADN para que sea más probable que entre en la célula. C) ADN portador monocatenario (SS): ayuda al ADN a entrar en la levadura durante el proceso de transformación. Se cree que evita que las nucleasas digieran el plásmido y también se une a la membrana celular de la levadura, lo que facilita que el ADN del plásmido ingrese a la célula.
10. Busque el tubo de ADN con la etiqueta "Yeast GFP Expression Plasmid" y con la micropipeta, agregar 10  $\mu$ l a su mezcla de células competentes.
11. Incubar el tubo durante hora en agua a  $\sim 42^{\circ}\text{C}$ .
12. Agregar 1.5 ml de agua destilada a uno de los tubos de microcentrífuga de medio YPD y agite para disolver el YPD.
13. Con la micropipeta, agregar 900  $\mu$ l de medio YPD a la mezcla de células competente que contiene ADN.
14. Incube el tubo toda la noche a temperatura ambiente.

### **DÍA 3**

15. Sacar una caja de Petri con el medio YPD G418 del congelador y dejarla calentar a temperatura ambiente. Con una pipeta, agregar toda su mezcla de transformación sobre la placa.
16. Con un asa de inoculación, esparcir suavemente la levadura alrededor de la placa y dejarla secar durante 10 min. antes de colocar la tapa. Voltear la placa para evitar que se condense y gotee sobre la levadura.
17. Incube la placa a 30°C durante 1-3 días.

### **DÍA 4**

18. Usa los lentes con filtro de luz UV y dirige la luz azul a la placa de Petri. Si las levaduras se diseñaron correctamente, deberían brillar con un color verde fluorescente.

#### **Productos esperados**

Crecimiento de colonias de *Saccharomyces cerevisiae* en medio selectivo (YPD + G418).

Obtención de levaduras transformadas con el plásmido que contiene el sistema CRISPR-Cas9 y el gen GFP.

Expresión de fluorescencia verde (GFP) en células editadas, observable bajo luz UV/azul.

Evidencia de edición genética y selección exitosa mediante comparación con células no transformadas.

#### **Análisis de resultados**

¿Qué factores considerarías para diseñar una edición genética eficiente y específica?

Si la edición no produce el efecto esperado, ¿cómo analizarías el problema?

Reflexiona sobre las implicaciones éticas del uso de CRISPR en distintos contextos.

### **Preguntas de reflexión**

¿Cómo influye el diseño del ARN guía en la precisión y eficiencia del sistema CRISPR-Cas9?

¿Qué factores experimentales pudieron afectar el éxito de la transformación y la expresión de la proteína GFP?

¿Por qué es importante utilizar un sistema de selección (como el antibiótico G418) en este tipo de experimentos?

¿Qué ventajas y posibles riesgos tiene el uso de CRISPR-Cas9 en la edición genética de organismos?

### **Conclusión**

Redacta la conclusión incluyendo el objetivo de la práctica y el aprendizaje del funcionamiento del sistema CRISPR-Cas9. Describe de forma general el proceso realizado (transformación, selección y observación de fluorescencia) y su relación con la edición genética.

Menciona la importancia de factores como la precisión del diseño, las condiciones experimentales y la verificación de resultados. Finalmente, destaca la relevancia de esta técnica en la investigación genética y sus implicaciones científicas y éticas.

## **Bibliografía**

Lagunas, F. A., (2019). Sistema CRISPR/Cas. *Ciencia*, 70(4). Disponible en:  
[https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/online/X2\\_70\\_4\\_1200\\_CRISPR\\_L.pdf](https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/online/X2_70_4_1200_CRISPR_L.pdf)

[Consultado el 20 de Febrero del 2021]

Ran, F. A. F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), 2281-2308.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

### Reactivos y soluciones extracción de ADN

Lista de reactivos y su número de registro CAS.

- Nitrógeno líquido (CAS N° 7727-37-9)
- Ribonucleasa A libre de ADNasa (Sigma-Aldrich, cat. No. R4642, CAS N° 9001-99-4)
- CTAB, también conocido como bromuro de hexadeciltrimetil amonio (Calbiochem, gato. no. 219374, CAS N° 57-09-0)
- Etanol absoluto (Aaper Alcohol Co., CAS N° 64-17-5)
- Acetato de sodio (NaAc) trihidratado (Sigma-Aldrich, cat. No. S-7670)
- Mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1 (v / v)); Ambion, cat. No.9730) ¡PRECAUCIÓN! La mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico es cáustica y produce humos. Úselo solo en una campana de extracción y use guantes y protección para los ojos. O comprar reactivos por separado: Alcohol isoamílico (CAS N° 123-51-3), cloroformo (CAS N° 67-66-3) y fenol (CAS N° 108-95-2).
- Etilendiamina disódica (EDTA; Fisher Scientific, cat. No. S311) ó Ácido etileno diamino tetracético di sódico (CAS N° 6381-92-6)
- Clorhidrato de tris (hidroximetil) aminometano (Tris HCl; Sigma-Aldrich, gato. no. T5941, CAS N° 1185-53-1)
- Tris hidroximetil aminometano (Trizma base; Sigma-Aldrich, cat. No.T-1503, CAS N° 77-86-1)
- NaCl (Fisher Scientific, cat. No. S271, CAS N° 7647-14-5)

- HCl (Fisher Scientific, nº de cat. A144). PRECAUCIÓN: El HCl es cáustico y produce humos; evite el contacto usando protección para los ojos y guantes. Usar solo en una campana de extracción.
- NaOH (Fisher Scientific, cat. No. S318). PRECAUCIÓN: El NaOH es cáustico; evitar contacto mediante el uso de protección para los ojos y guantes.
- 2-Mercaptoetanol (bME; Sigma-Aldrich, cat. No. M6250, CAS Nº 60-24-2) PRECAUCIÓN: bME es tóxico. Úselo solo en una campana de extracción y evite el contacto usando protección y guantes.
- Isopropanol (CAS Nº 67-63-0)

## **Recetas de soluciones**

### **1.0 M Tris HCl stock, pH 8.0**

Hay dos opciones disponibles, dependiendo de la disponibilidad de Trizma base y Trizma HCl. El primero, uso de la Trizma base y HCl concentrado, describe el uso de base Trizma 1.0M, en la cual el pH es reducido usando HCl concentrado. El segundo utiliza una mezcla de Trizma base y Trizma HCl mezclado en una proporción que da como resultado Tris HCl 1.0M a pH 8.0 a 25 ° C.

### **Preparación del stock de Trizma base y HCl concentrado**

Disuelva 121,1 g de Trizma base en 700 ml de H<sub>2</sub>O. Ajuste el pH a 8.0 usando HCl concentrado. Aproximadamente, se requieren 50 ml de HCl concentrado. Lleve el volumen total a 1.0 litro con H<sub>2</sub>O. PRECAUCIÓN: Use HCl en una campana extractora y evite el contacto usando protección y guantes.

### **Preparación del stock de Trizma base y Trizma HCl**

Disuelva 53 g de Trizma base y 88,8 g de Trizma HCl en 700 ml de H<sub>2</sub>O para un pH final de 8,0 a 25°C. Trae el volumen total a 1.0 litro con H<sub>2</sub>O.

### **0,5 M de reserva de EDTA**

Disuelva 186,12 g de EDTA (sal disódica dihidratada) en 750 ml de H<sub>2</sub>O. Agregue aproximadamente 20 g de gránulos de NaOH y use NaOH 5 M solución para ajustar el pH final a 8.0. **m CRÍTICO** Es importante utilizar solo EDTA sodico. El EDTA solo no se disolverá, a menos que se agregue NaOH.

#### **Solución Fenol: Cloroformo: isoamílico 25:24:1**

Mezclar en la campana de extracción 50 ml de fenol, 48 ml de cloroformo y 2 ml de alcohol isoamílico. Mantener almacenado a -20°C.

#### **Stock de NaCl 5 M**

Añada 292,2 g de NaCl en 700 ml de H<sub>2</sub>O y ajuste el volumen a 1,0 l con H<sub>2</sub>O.

#### **Buffer TE**

Mezcle 10 ml de Tris 1 M, pH 8,0, con 2 ml de EDTA sodico 0,5 M y llevar el volumen final a 1,0 litro con H<sub>2</sub>O.

#### **Acetato de Sodio (NaAc) 3 M**

Mezcle 408,24 g de NaAc con 700 ml de H<sub>2</sub>O. Trae el volumen final a 1.0 litro con H<sub>2</sub>O.

#### **Buffer de extracción**

Para hacer 250 ml, mezcle 25 ml de Tris 1M, pH 8.0, 70 ml de 5M NaCl, 10 ml de EDTA 0,5 M y 5 g de CTAB, y llevar el volumen final a 250 ml con H<sub>2</sub>O. **ATENCIÓN:** Agregue 0.5–1% (v / v) de bME a la extracción buffer inmediatamente antes de su uso para disminuir la posibilidad de oxidación. **ATENCIÓN** La calidad del CTAB es fundamental. Utilice solo moléculas de alta pureza CTAB grado biológico.

#### **Etanol al 70%**

Mezcle etanol absoluto y H<sub>2</sub>O en una proporción de 70% de etanol: 30% H<sub>2</sub>O (v / v). Mantener la solución a -20°C.

#### **Solución madre de ribonucleasaA**

Mezclar en H<sub>2</sub>O para una concentración final de 10 mg/ml.

## ANEXO 2

### Reactivos para aislamiento de plásmidos sin kit

Lista de reactivos y sus números de registro CAS.

- Lisozima (Thermo Scientific™, Núm. cat. 89833)
- Glucosa 50 mM (Thermo Scientific™, Núm. cat. 15023021)
- NaOH 0,2 N (N.º CAS 1310-73-2, Honeywell Fluka 35261-1L)
- SDS, dodecil sulfato de sodio al 1% (Thermo Scientific™, Núm. cat. 28312)
- CDTA (tetracetato de ciclohexano diamina) (N.º CAS 87095-89-4)
- Clorhidrato de tris (hidroximetil) aminometano (Tris HCl; Sigma-Aldrich, gato. no. T5941, CAS N° 1185-53-1)
- Ácido acético glacial (Fisherscientific, Núm. cat. 10171460 CAS -64-19-7).
- Ribonucleasa A libre de ADNasa (Sigma-Aldrich, cat. No. R4642, CAS N° 9001-99-4)
- Glicerol (CAS N° 56-81-5)

Recetas de soluciones

#### **Solución I. Solución de lisozima**

2 mg / ml de lisozima, glucosa 50 mM, CDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8,0). Preparar diariamente a partir de lisozima cristalina y soluciones madre de los otros componentes. Conservar a 0 ° C.

#### **Solución II. Solución alcalina de SDS**

NaOH 0,2 N, dodecil sulfato de sodio al 1% (SDS). Almacenar a temperatura ambiente; estable durante aproximadamente 1 semana.

#### **Solución III. Solución con alto contenido de sal**

Acetato de sodio 3 M (pH 4,8). Preparar disolviendo 3 moles de acetato de sodio en un volumen mínimo de agua, ajustando el pH a 4,8 con ácido acético glacial y luego ajustando el volumen a 1: 1. Almacenar a temperatura ambiente.

CDTA (tetracetato de ciclohexano diamina) es un agente quelante que es más soluble en alcohol y forma complejos más fuertes con iones metálicos que el EDTA.

Solución madre de ARNasa A (1 mg / ml en Tris-HCl 5 mM, pH 8,0) calentando a 100°C durante 10 min.

## **ANEXO 3**

### **Programa de qPCR en Termociclador Quant Studio 1**

#### *Selección del método de cuantificar el objetivo y cantidad de muestras*

1. Seleccione un método para determinar la cantidad de objetivo en las muestras:

- Curva estándar: utiliza una curva estándar para determinar la cantidad absoluta de un objetivo en una muestra. Usado típicamente para cuantificación de la carga viral.
- Curva estándar relativa: utiliza curvas estándar para determinar el cambio en la expresión de un objetivo en una muestra en relación con el mismo objetivo en una muestra de referencia. Usado para cuantificación relativa si la eficiencia de amplificación del objetivo y la eficiencia de amplificación de la endógena de los controles no son aproximadamente iguales.
- CT comparativo: utiliza fórmulas aritméticas para determinar el cambio en la expresión de un objetivo en una muestra en relación con el mismo objetivo en una muestra de referencia. Lo mejor para un alto rendimiento mediciones de la expresión génica relativa de muchos genes en muchas muestras.

2. Determine la cantidad de muestras en su experimento:

- Muestras o desconocido: muestras en las que la cantidad de el objetivo es desconocido.
- Estándares (curva estándar y curva estándar relativa experimentos): muestras que contienen cantidades estándares conocidas. Un conjunto de estándares que contiene una gama de cantidades es una serie de diluciones estándar.
- Muestra de referencia (curva estándar relativa y experimentos comparativos de TC): la muestra utilizada como base para los resultados de cuantificación relativa. También llamado calibrador.

Nota: Applied Biosystems recomienda realizar al menos 3 réplicas técnicas de cada reacción.