

Universidad Juan Agustín Maza
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Bioquímica

BIOLOGÍA MOLECULAR y CELULAR

Guía de Trabajos Prácticos 2020

Profesor titular:

Dr. Quintero, Cristian

Profesor Adjunto:

Dra. López de Armentia, Milagros

JTP:

Dra. Gaii, Constanza

Lic. Moreno Sosa, María Tamra



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional
(CC BY-NC-SA 4.0)
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Biología Molecular y Celular

Cronograma de Trabajos Prácticos

TEMA	RESPONSABLES	FECHA
Semana de teoría	Cristian/Milagros	Desde el 3/8
T.P. L. N°1: Purificación de DNA humano y plasmídico	Constanza/Tamara	Viernes 14/8
T.P. L. N°2: Corte de ADN con enzimas de restricción	Constanza/Tamara	Viernes 21/8
T.P.L. N°3: Transformación de Bacterias con ADN plasmidico	Constanza/Tamara	Viernes 28/8
T.P. L. N°4: Fagocitosis (+ preguntas teóricas de Fagocitosis)	Constanza/Tamara	Viernes 4/9
T.P.L. N°5: Microscopía electrónica de transmisión y barrido- Microscopía confocal	Constanza/Tamara	Viernes 11/9
T.P.Aula. N°1: Autofagia, Endocitosis y Transporte Vesicular	Constanza/Tamara	Viernes 18/9
Semana del Estudiante (MESAS EXAMEN)		22-26 de septiembre
T.P.L N°6: Ciclo Celular	Constanza/Tamara	Viernes 2/10
T.P.Aula. N° 2: Manejo PubMed y Bioinformática (BLAST)	Constanza/Tamara	Viernes 9/10
T.P.L. N°7: Purificación de proteínas recombinantes	Constanza/Tamara	Viernes 16/10
T.P.L. N° 8: Western Blot y teoría de proteínas recombinantes	Constanza/Tamara	Viernes 24/10
T.P.L. N°9: Determinación de mycoplasma por PCR	Constanza/Tamara	Viernes 31/10

Índice

Trabajo Práctico de laboratorio N°1.....	7
Purificación de ADN humano y plasmídico.....	7
INTRODUCCIÓN.....	7
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	7
A. PURIFICACION DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE: pGFP-LC3	7
B-PURIFICACIÓN DE ADN HUMANO.....	9
Trabajo Práctico de laboratorio N° 2.....	11
Corte con enzimas de restricción y electroforesis de ADN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	11
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	13
A. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	13
B. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1% y VERIFICACIÓN DEL TAMAÑO DEL FRAGMENTO OBTENIDO.....	13
Trabajo Práctico de laboratorio N°3.....	15
Transformación bacteriana.....	15
OBJETIVOS	15
INTRODUCCIÓN.....	15
A. PREPARACIÓN DE PLACAS CONTROL Y CON ANTIBIÓTICOS (KANAMICINA/AMPLICILINA) ..	16
B. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES.....	17
PREGUNTAS	18
Trabajo práctico de laboratorio N°4.....	19
Fagocitosis	19
OBJETIVOS	19
INTRODUCCIÓN.....	19
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	20
A. FAGOCITOSIS <i>in vivo</i>	20
B. OBSERVACIÓN DE FAGOCITOSIS EN DIVERSAS CONDICIONES EN PREPARADOS FIJADOS	20
CUESTIONARIO	21

Trabajo práctico de laboratorio N°5	22
Microscopía electrónica de transmisión y barrido.....	22
Microscopía confocal.....	22
Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM)	22
F.C.M. UNCUYO	22
Trabajo práctico de aula N°1	23
Autofagia, endocitosis y transporte vesicular	23
Cuestionario	23
Trabajo Práctico de laboratorio N°6.....	25
Ciclo celular	25
OBJETIVOS:	25
INTRODUCCIÓN.....	25
Trabajo práctico de aula N°2	28
Bioinformática.....	28
OBJETIVOS	28
INTRODUCCIÓN.....	28
ACTIVIDADES PRÁCTICAS	29
1. BÚSQUEDA DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS	29
2. COMPARACIÓN DE DOS SECUENCIAS.....	32
3. DISEÑO DE PRIMERS.....	34
4. BUSQUEDA DE PUBLICACIONES CIENTIFICAS	36
Trabajo Práctico de laboratorio N°7.....	38
Producción de proteínas recombinantes	38
OBJETIVOS	38
INTRODUCCIÓN.....	38
A. CULTIVO E INDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE	40
B. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE	40
PREGUNTAS	41
Trabajo práctico de laboratorio °N8.....	42
Detección de proteínas por Western Blot	42
OBJETIVOS	42

INTRODUCCIÓN.....	42
A. Separación de proteínas: ELECTROFORESIS.....	42
B. Detección de proteínas: WESTERN BLOT	43
PROTOCOLO DE REALIZACIÓN DEL WESTERN BLOT.....	47
Trabajo práctico de laboratorio N°9.....	52
Diagnóstico molecular de <i>Mycoplasma genitalium</i>	52
OBJETIVOS	52
INTRODUCCIÓN.....	52
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	54
A- AMPLIFICACIÓN POR PCR DE MUESTRAS DE ADN.....	54
B- ANALISIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DEL PRODUCTO DE PCR AMPLIFICADO	56

Biología Molecular y Celular

Trabajo Práctico de Laboratorio N° 1

Purificación de ADN humano y plasmídico

INTRODUCCIÓN

Los plásmidos bacterianos son moléculas de DNA extracromosomales, circulares y autorreplicantes. En la naturaleza existe una gran variedad de plásmidos, *Escherichia coli* porta plásmidos de resistencia a antibióticos, a metales pesados, de resistencia a bacteriófagos, de producción de enzimas de restricción, de producción de aminoácidos poco frecuentes o de catabolismo de moléculas orgánicas complicadas. Algunos de estos plásmidos transfieren su DNA dentro de otras especies bacterianas, algunos sólo lo transfieren a otras *E.coli*, y otros no lo transfieren nunca.

Durante la década del 70 se construyeron plásmidos artificiales a partir de plásmidos naturales para ser empleados en el laboratorio. Estos plásmidos artificiales y sus derivados son los vectores más utilizados en la tecnología del DNA recombinante. Todos los plásmidos utilizados como vectores de clonación, contienen tres rasgos característicos básicos: un replicón, un marcador de selección y un sitio de clonado. El replicón es un segmento de DNA que contiene el sitio donde comienza la replicación del DNA (comúnmente llamado origen de replicación, u *ori*) y que incluye genes codificantes de RNAs y proteínas necesarias para la replicación. El marcador de selección es un gen que codifica resistencia a algún antibiótico. El sitio de clonado es un sitio con múltiples secuencias blanco de enzimas de restricción, dentro del cual un DNA foráneo puede ser insertado sin interferir con la habilidad del plásmido para replicarse y sin conferirle ningún fenotipo de selección en su huésped. El proceso por el cual los plásmidos se introducen dentro de *E. coli* se denomina transformación. Las células que se utilizan como receptoras de los plásmidos deben ser "seguras", en el sentido de que no deben ser patógenas. Las bacterias transformadas se hacen crecer en agar en presencia del antibiótico adecuado, para su selección. El ADN plasmídico puede obtenerse a partir de dos métodos diferentes, uno de los cuales se llevará a cabo en el trabajo práctico y se explicará detalladamente.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A. PURIFICACION DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE: pGFP-LC3

A partir de 10 ml de un cultivo líquido (caldo) de medio LB (Luria Broth) con el antibiótico correspondiente, se obtiene el ADN plasmídico empleando el kit Wizard Minipreps (Promega), basado en la extracción alcalina del ADN, seguido de purificación mediante cromatografía de intercambio iónico.

Producción del Lisado

1. Centrifugar el cultivo 5 min a 1000 rpm. Descartar el sobrenadante.
2. Resuspender el pellet en 250 μ l de la Solución de Resuspensión, se puede vortexear para asegurarse la resuspensión completa.
3. Agregar 250 μ l de Solución de Lisis y mezclar invirtiendo el tubo varias veces.
4. Agregar 10 μ l de proteasa alcalina y mezclar por inversión. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Agregar 350 μ l de Solución de Neutralización y mezclar invirtiendo el tubo varias veces.
6. Centrifugar a 14000 rpm por 10 min (a máxima velocidad).

Unión del ADN plasmídico a la columna

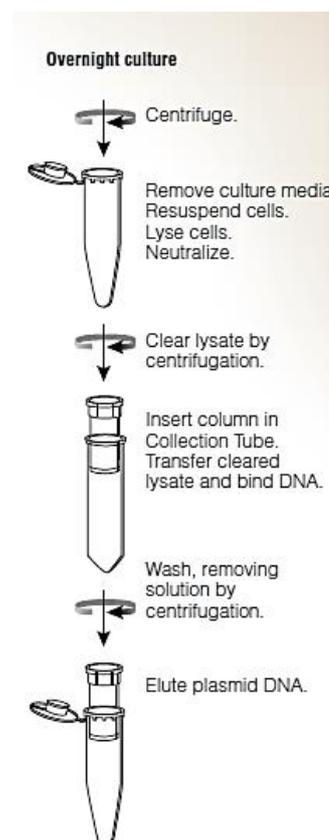
7. Insertar la columna de intercambio iónico en el tubo colector.
8. Tomar el sobrenadante del cultivo y transferir a la columna.
9. Centrifugar 1 min a 14000 rpm. Retirar la columna y descartar en contenido del tubo colector.

Lavado

10. Agregar 750 μ l de Solución de Lavado a la columna. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 min. Descartar el contenido del tubo colector.
11. Agregar 250 μ l de Solución de Lavado y centrifugar nuevamente a 14000 rpm por 2 min. Descartar el contenido del tubo colector.
12. Centrifugar nuevamente durante 1 min a 14000 rpm, para retirar el excedente de solución de lavado.
13. Retirar la columna y transferir a un tubo eppendorf limpio.

Elución

14. Eluir el ADN con 100 μ l de agua destilada limpia, incubando 1 min.
15. Centrifugar a 14000 rpm 1 min. Descartar la columna y guardar el eppendorf que contiene el líquido (ADN puro) rotulado en freezer a -20°C .



COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES DEL KIT WIZARD PLUS MINIPREPS

SOLUCIÓN	FUNCIÓN
SOLUCIÓN DE RESUSPENSIÓN: 50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNasa	Resuspender el pellet de bacterias.
SOLUCIÓN DE LISIS: 0,2 M NaOH 1% SDS	Lisis bacteriana
PROTEASA ALCALINA	Inactiva endonucleasas y otras proteínas liberadas durante la lisis bacteriana, que pueden afectar el ADN plasmídico.
SOLUCIÓN DE NEUTRALIZACIÓN: 4,09 M clorhidrato de guanidina 0.76 M acetato de potasio 2.1 M ácido acético glacial pH=4,2	Neutralizar el medio alcalino
SOLUCIÓN DE LAVADO: 60mM acetato de potasio 10 mM Tris-HCl 0.1 mM EDTA 0.2 etanol 60% pH=7,5	Lavado

B- PURIFICACIÓN DE ADN HUMANO

- Tomar 3 ml de sangre y colocarla en un Falcon de 15 ml con una gota de EDTA, llevar a 15 ml con Buffer de Lisis I (BL I), mezclar, centrifugar a 2000 rpm 5 min.
- Descartar sobrenadante y agregar 3-4 ml BLI, mezclar y centrifugar a 2000 rpm 5 min. Este paso asegura la completa eliminación de los eritrocitos y la hemoglobina, el preparado debe verse transparente, no rojo.
- Descartar sobrenadante y resuspender el pellet en:
 - 1,35 ml Buffer de Lisis II (BLII)
 - 38 µl SDS 10 %
 - 0,33 ml NaClO4 5M

Agitar vigorosamente por 10 seg. en vórtex

4. Agregar 0,6 ml NaCl 6M, agitar vigorosamente 15 seg. y centrifugar a 3000 rpm 10 min a temperatura ambiente.
5. Recolectar el sobrenadante y pasar a un tubo limpio que contenga 2,1 ml isopropanol. Tapar, mezclar suavemente y observar la aparición de DNA precipitado de aspecto mucoso.
6. Tomar precipitado con pipeta, lavar 2 veces con 1 ml de etanol 70 % por vez.
7. Redisolver en 150 μ l de agua estéril. Incubar a 55°C por 10-20 min para disolver. La molécula de ADN genómico es muy grande y no se disolverá si no se aplica calor.
8. Guardar rotulado a -20°C.

Los dos tipos de ADN obtenidos se guardarán a -20°C, ya que serán observados durante la realización del T.P. 2 mediante electroforesis en geles de agarosa.

SOLUCIÓN	FUNCIÓN
BUFFER DE LISIS I: 0,3M Sacarosa 10 mM Tris-HCl (pH = 7,5) 5 mM Mg ₂ Cl 1% Tritón X-100.	Lisa las células, pero estabiliza y conserva los núcleos. Los eritrocitos se lisan primero y se libera la hemoglobina.
BUFFER DE LISIS II: 0,075M NaCl 0,024M Na ₂ -EDTA 10% SDS 5m NaClO ₄	Lisa los núcleos y desnaturaliza las proteínas tales como nucleasas e histonas.

Biología Molecular y Celular

Trabajo Práctico de Laboratorio N° 2

Corte con enzimas de restricción y electroforesis de ADN

INTRODUCCIÓN

Las enzimas de restricción constituyen una poderosa herramienta empleada en la tecnología del ADN recombinante. Fueron descubiertas en la década del 70 por las investigaciones pioneras de Smith, Arber y Nathans quienes recibieron el premio nobel de medicina en 1978. Estas enzimas son endonucleasas de ADN extraídas de organismos procariotas (bacterias) en los cuales actúan como mecanismo de defensa para degradar el material genético extraño que ingrese en la célula, por ejemplo: infección por bacteriófagos. Las bacterias tienen la capacidad de metilar su DNA, lo cual sirve para distinguir entre el DNA extraño y el DNA propio. Las enzimas de restricción no pueden cortar DNA metilado, de este modo solo afectan el DNA foráneo (ej.: bacteriófago) y no el DNA bacteriano. Hay varios tipos de enzimas, las más usadas en la tecnología del ADN recombinante corresponden a las de tipo II.

Tipo I y Tipo III

Ambas tienen actividad de restricción (corte) y modificación (metilación) del ADN. Cortan a cierta distancia de la secuencia de reconocimiento. Las enzimas Tipo I cortan lejos del sitio de reconocimiento, ya sea río arriba o río abajo. Las enzimas Tipo III cortan de 25-27 bases antes o después de la secuencia que reconocen.

Ambos tipos necesitan ATP para moverse a través de la molécula de DNA, desde el lugar de reconocimiento hasta el sitio del corte.

Tipo II

Cortan en el sitio de reconocimiento y no metilan el ADN. Sólo requieren Mg^{++} como cofactor. No necesitan ATP. Algunas enzimas producen extremos romos y otras extremos solapados. Estos últimos son muy útiles en la recombinación de moléculas de ADN y son las que habitualmente se utilizan en laboratorios de Biología Molecular.

Electroforesis de ADN

La electroforesis en geles de agarosa es el método estándar utilizado para la separación, identificación y purificación de fragmentos de ADN. La técnica es simple y rápida de realizar; es capaz de resolver fragmentos de ADN que no pueden separarse adecuadamente por otros métodos. Además, la localización del ADN dentro del gel puede determinarse directamente mediante tinciones con colorantes fluorescentes intercalantes como Bromuro de Etidio, SYBR Green, SYBR Safe, u otros. Si resulta necesario las bandas pueden, asimismo, recuperarse del gel y utilizarse posteriormente con otros

propósitos. Los geles de agarosa pueden confeccionarse de varias formas, tamaños y porosidad; la elección de estos parámetros depende principalmente del tamaño de los fragmentos que se desean separar. Mediante concentraciones variables de agarosa, se pueden separar fragmentos de ADN desde 200 hasta aproximadamente 500 kb de longitud. Este tipo de geles usualmente se corren en configuración horizontal, en un campo eléctrico de fuerza y dirección constante.

Los geles se preparan fundiendo la agarosa en el buffer elegido hasta que se consigue una solución límpida. Posteriormente la solución se coloca en un molde y se deja solidificar. Una vez que esto sucede, la agarosa forma una matriz, cuya densidad está determinada por la concentración de la misma. Cuando se aplica un campo eléctrico a través del gel, el ADN, cargado negativamente a pH neutro, migra hacia el ánodo.

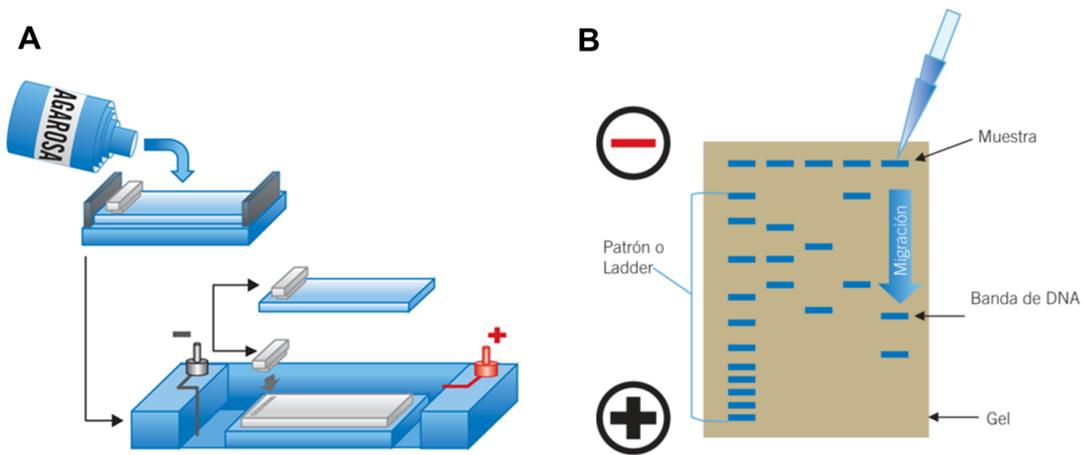


Figura 1: Esquema representativo de la preparación de un gel de agarosa (A) y la migración de las moléculas de ADN en el gel (B).

Las diferentes formas de ADN circular, circular abierto (1), lineal (2) y superenrollado (3) del mismo tamaño molecular migran de forma diferencial a través de los geles de agarosa.

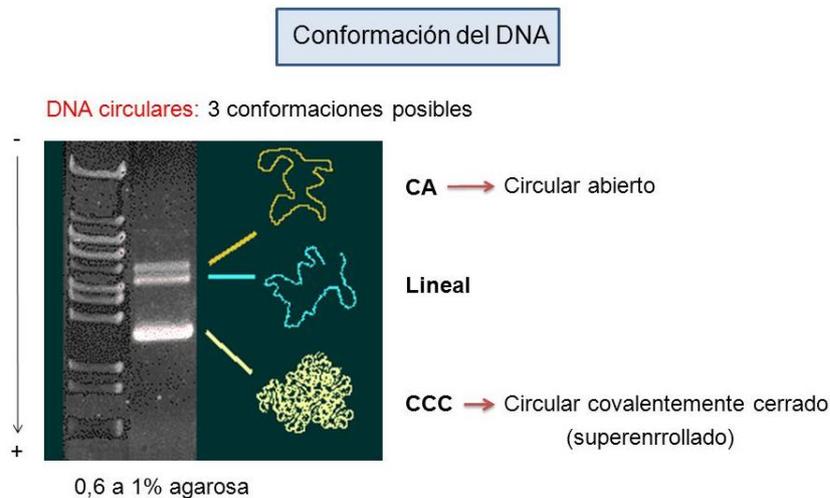


Figura 2: Esquema representativo de la separación de diferentes conformaciones de un ADN plasmídico.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El ADN plasmídico GFP-LC3 obtenido en el práctico anterior se someterá a la acción de la enzima de restricción Hind III, para ello se preparará la siguiente mezcla de reacción:

Agua tridestilada	5 µl
Buffer de reacción 10x	2 µl
BSA acetilada 1ug/µl	2 µl (incrementa la actividad de la enzima)
DNA	10 µl
Enzima de restricción	1µl

Mezclar con la pipeta, centrifugar por unos segundos. Incubar durante 20-30 minutos a 37°C en baño de agua.

Hind III proviene de *Haemophilus influenzae*

Reconoce esta secuencia: 5'... A^vAGCTT... 3'
3'... TTCGA^vA... 5'

La secuencia de corte para esta enzima se encuentra ubicada en el sitio de GFP, y solo reconoce un lugar para cortar.

B. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1% y VERIFICACIÓN DEL TAMAÑO DEL FRAGMENTO OBTENIDO

Pesar la cantidad adecuada de agarosa para preparar 50 ml de una solución al 1% en Buffer TAE 1X. Calentar en microondas hasta su disolución y armar el gel. Sembrar las muestras de ADN diluidas en Loading Buffer 6x. Además, sembrar paralelamente un marcador de pb (pares de bases).

Correr en cuba de electroforesis horizontal con buffer de corrida TAE durante 45 minutos a 100 V. Luego desarmar el gel y teñirlo con SYBR Safe. Observar al transiluminador. El reactivo SYBR Safe se intercala entre las bases del ADN y fluoresce con la luz UV, se desarrolló como una alternativa al bromuro de etidio (otro agente intercalante) altamente mutagénico.

En una electroforesis en agarosa de plásmido sin digerir con enzimas de restricción puede observarse 3 diferentes conformaciones (relajada, enrollada y superenrollada), que corresponden a 3 bandas. Las diferentes conformaciones tienen distinta movilidad electroforética. Cuando sometemos nuestro plásmido a la acción de enzimas de restricción con solo un sitio de reconocimiento y corte, el plásmido adquiere una conformación lineal y su movilidad electroforética se corresponde con el número de pares

de bases indicado por el marcador de pares de bases.

Biología Molecular y Celular

Trabajo Práctico de Laboratorio N° 3

Transformación bacteriana

OBJETIVOS

- Explorar el proceso biológico de la transformación bacteriana utilizando células bacterianas de *E. coli* y plásmidos.
- Observar y analizar los rasgos adquiridos por las células bacterianas transformadas. La presencia de colonias bacterianas demostrará la expresión del gen específico para el fenotipo GFPv.

INTRODUCCIÓN

Los plásmidos se pueden introducir en la célula bacteriana mediante un proceso denominado transformación. En este proceso se usan células bacterianas con la pared debilitada, que denominamos “competentes” al ser más susceptibles de incorporar DNA exógeno debido a la debilidad de su pared. El ADN plasmídico se incubaba con iones divalentes que neutralizan la carga de sus fosfatos facilitando la interacción con la membrana celular. Tras ser sometidas a un choque térmico (heat-shock), las bacterias competentes incorporarán el ADN del plásmido. A continuación, se inoculan las células en la superficie de placas de agar y se dispersan con ayuda de una varilla. Sólo algunas células captan el ADN plasmídico y se necesitará un método para la selección de las células que lo han incorporado. La estrategia más común es insertar en el plásmido un gen, llamado gen de selección, que generalmente confiere a las células resistencia a antibióticos. Sólo las células de *E. coli* que hayan incorporado una o más moléculas de plásmido podrán crecer en la placa de agar con antibiótico y formar una colonia visible después de 12 horas de incubación. El número de colonias resistentes al antibiótico pueden ser contadas.

Eficiencia de la transformación

En la práctica la transformación es altamente ineficiente, sólo una de cada 10.000 células incorpora con éxito el ADN plasmídico. Si las bacterias son transformadas con un plásmido que contiene un marcador selectivo y sembradas en placas de agar con un medio selectivo y no-selectivo, observaremos diferentes resultados. Las placas de agar con un medio no-selectivo permitirán crecer a las bacterias transformadas y las bacterias no transformadas. Por el contrario, en las placas de agar con el medio selectivo sólo crecerán las bacterias que expresan el marcador selectivo.

Puesto que cada colonia se origina a partir de una única célula transformada, nosotros podemos calcular la eficiencia de transformación, o el número de células transformadas por microgramo (μg) de ADN plasmídico. La eficiencia de transformación generalmente oscila entre 1×10^5 hasta 1×10^8 .

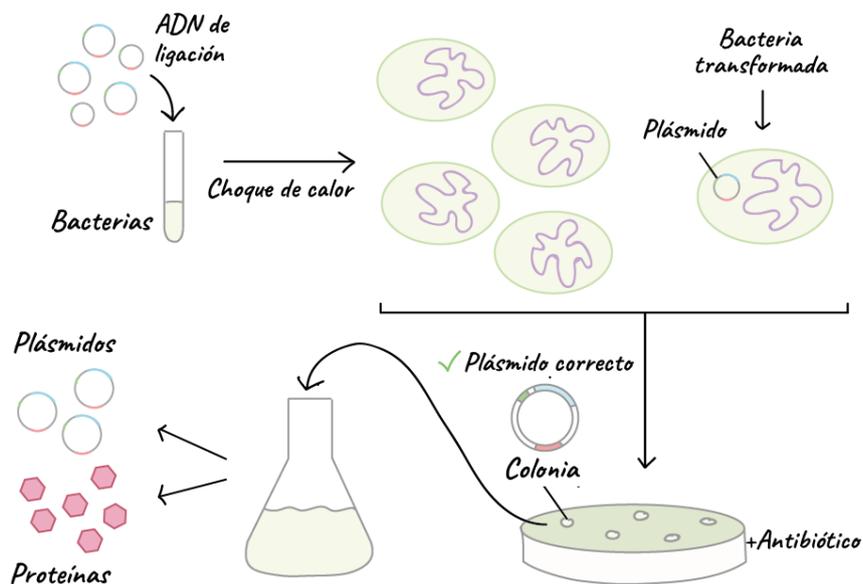


Figura 1: Esquema representativo de la transformación de bacterias con ADN plasmídico.

Las bacterias van a ser transformadas con un plásmido que codifica para la Proteína Fluorescente Verde o GFP, por sus siglas en inglés, *green fluorescent protein*. Esta proteína es producida por la medusa *Aequorea victoria* y emite fluorescencia en la zona verde del espectro. El interés de la GFP desde el punto de vista biotecnológico reside en que esta proteína se comporta como una señal luminosa capaz de expresarse en células. Al llevar la fluorescencia incorporada en su estructura, la bioluminiscencia de la GFP puede producirse y mantenerse espontáneamente en aquellas células vivas que incluyan el gen que la codifica, sin necesidad de añadir otros agentes o cromóforos.

Materiales

Plásmido GFPv	Antibiótico (kanamicina)
Eppendorf estériles	Mechero
Células competentes	Tips blancos y amarillos
Hielo	Placas de Petri
LB caldo	Estufa de 37°C
Lb agar	Calentador de 42°C
Espátula de Drigalsky	

A. PREPARACIÓN DE PLACAS CONTROL Y CON ANTIBIÓTICOS (KANAMICINA/AMPLICILINA)

Preparado previamente por los docentes:

1. Preparar el medio líquido LB (medio Luria-Bertani) según la receta siguiente: a 950ml de agua destilada añadir:

Triptona 10g	Completar el volumen con agua hasta 1L.
Extracto de levadura 5g	Esterilizar en autoclave, durante 20', 120°C.
NaCl 10g	

En el trabajo práctico

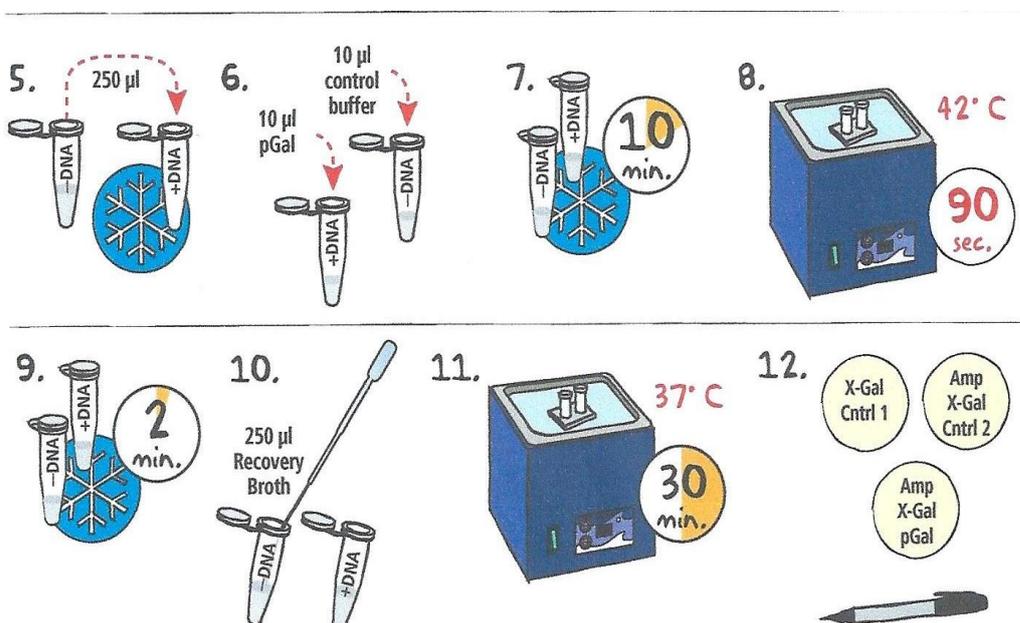
2. Cuando el medio se retira de la autoclave, se agita suavemente para mezclar bien el agar con el medio. Dejar enfriar el medio hasta unos 50°C y luego se añade kanamicina/ampicilina a una concentración de 0.1 mg/ml. Agitar bien sin hacer burbujas y rellenar las placas con unos 15 ml de medio aproximadamente.

3.- Cuando el medio haya solidificado totalmente, están listas para usarse. Alternativamente, las placas se invierten y almacenan a 4°C. Para prevenir la contaminación todo el proceso debe realizarse utilizando un mechero bunsen/fisher o una campana de cultivo.

B. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Para la transformación de células bacterianas con un plásmido se utilizarán células competentes, pertenecientes a los tipos DH5 de *E. coli*, previamente preparadas con CaCl₂ y conservadas a -70°C en alícuotas de 100 µl.

1. Descongelar las células en hielo y añadir 50 µl en un tubo Eppendorf.
2. Añadir 1 µl del ADN del plásmido y mantener 25-30' en hielo.
3. Someter la mezcla a un choque térmico a 42°C, durante 90 segundos y poner en hielo inmediatamente, durante 2 minutos.
4. Agregar 400 µl de LB caldo sin antibiótico y llevar a baño de agua o estufa a 37°C durante 15 minutos
5. Sembrar las células en placas de agar con kanamicina (antibiótico de selección para GFPv) y extenderlas sobre la superficie cuidadosamente con ayuda de la espátula de Drigalsky. Se cultivará las bacterias con y sin ADN en placas con y sin antibiótico (4 placas en total). En el trabajo práctico se analizará el resultado esperado para cada placa y la utilidad de éstas para controlar distintas variables del proceso de transformación.
6. Incubar toda la noche a 37°C, en una estufa.
7. Al día siguiente, comprobar el crecimiento de colonias bacterianas, resistentes a kanamicina que además deberán presentar fluorescencia verde al transiluminador UV.
8. Calcular la eficiencia de la transformación, expresada en N° de transformantes/µg de DNA.



PREGUNTAS

Para el aprovechamiento del trabajo experimental es imprescindible saber exactamente qué se está haciendo en cada momento y por qué. Recuerde que la experiencia de laboratorio es intransferible y no la encontrará en ningún libro; por lo tanto, las oportunidades desaprovechadas durante el trabajo experimental en el laboratorio difícilmente puedan recuperarse con posterioridad. Es por ello que sugerimos resolver el siguiente cuestionario antes de venir al trabajo experimental. Por favor, consulte y despeje cualquier duda al respecto con los docentes.

- 1) ¿Qué función cumple cada una de las soluciones utilizadas en el TP?
- 2) ¿Qué procedimientos puede emplear para cuantificar el ADN plasmídico?
- 3) ¿Qué son las células competentes?
- 4) ¿Por qué se realiza una incubación sin antibiótico selectivo inmediatamente después de transformar?
- 5) ¿Cómo se hace para obtener colonias aisladas luego de la transformación?

Biología Molecular y Celular

Trabajo práctico de Laboratorio N° 4

Fagocitosis

OBJETIVOS

- Visualizar el fenómeno de fagocitosis mediante microscopía óptica.
- Comparar la eficiencia de la fagocitosis en diversas condiciones.
- Reconocer el requerimiento de actina y de PI-3K para el proceso fagocítico.

INTRODUCCIÓN

La fagocitosis es una forma especial de endocitosis mediada por receptores que constituye el principal mecanismo de defensa del huésped. Este proceso involucra la ingestión de grandes partículas (microorganismos, restos celulares) formando grandes vesículas, los fagosomas, cuyo diámetro varía entre 1 a varios micrómetros. En los protozoos, la fagocitosis constituye un sistema de alimentación, las grandes partículas atrapadas en los fagosomas, acaban en los lisosomas y los productos de los procesos digestivos posteriores pasan al citoplasma donde son utilizados como alimento.

En mamíferos, la fagocitosis es llevada a cabo por células especializadas denominadas fagocitos profesionales como los monocitos, macrófagos y neutrófilos que eliminan patógenos como bacterias o levaduras y que limpian restos de células muertas y depósitos arteriales de grasa. También pueden participar otros tipos celulares considerados fagocitos no profesionales.

La fagocitosis se inicia con el reconocimiento del ligando por receptores presentes en la superficie celular. Dichos ligandos pueden ser componentes endógenos de la partícula a ser internalizada, por ejemplo, lipopolisacáridos de la pared bacteriana (conteniendo azúcares como manosa o fucosa) o la fosfatidilserina (fosfolípidos) en células apoptóticas. La internalización provocada por este tipo de ligando endógenos se conoce como **no opsonizada**. En la internalización **opsonizada**, las partículas a ser fagocitadas están recubiertas por proteínas producidas por el huésped, llamadas opsoninas, tales como componentes del complemento (C3bi) o la inmunoglobulina G (IgG). Los fagocitos profesionales tienen receptores de reconocimiento específico para azúcares, fosfatidilserina, complemento (CR3) e inmunoglobulina G (Fc Rs), entre otros.

La interacción partícula-receptor desencadena una serie de eventos que involucran la activación de kinasas con fosforilación de los fosfolípidos presentes en la membrana plasmática. La activación de fosfatidilinositol-3-kinasa (PI-3Ks) produce derivados fosforilados del inositol que favorecen a la fusión de los extremos de los pseudópodos que rodean a la partícula para finalmente formar el fagosoma. La Wortmanina es un potente inhibidor de PI-3Ks, inhibiendo la internalización de las partículas.

Durante la fagocitosis, también se produce la remodelación del citoesqueleto de actina. Tanto en la emisión de pseudópodos que se produce en el modelo de cierre relámpago, como en la fagocitosis gatillo que

involucra la emisión de grandes “ruffles” de membrana plasmática (que no solo engloban al microorganismo, sino a parte del medio extracelular), es crucial la polimerización de actina. Debido a ello, agentes inhibidores del ensamble de actina (Citocalasina D o Latrunculina) o agentes quelantes de calcio (EDTA o BAPTA) suprimen la fagocitosis. Otro mecanismo que también suprime la fagocitosis es la alcalinización de la vía fagocítica, en este caso se usan agentes alcalinizantes como NH_4Cl , metilamina, etc.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se estudiarán preparados fijados y teñidos de macrófagos que previamente fueron incubados con partículas para ser fagocitadas en diferentes condiciones.

Se observarán fenómenos de fagocitosis in vivo por microscopía óptica.

Materiales:

- Macrófagos Raw cultivados en T25 conteniendo aproximadamente 5×10^5 células.
- Medio de cultivo D-MEM solo (sin agregado de Suero Fetal Bovino (SFB)).
- Partículas a fagocitar (partículas de latex o glóbulos rojos de carnero)
- Buffer PBS.
- Wortmanina (200 μm).

A. FAGOCITOSIS *in vivo*

1. Crecer los macrófagos en suspensión.
2. Lavar las células con buffer fosfato y agregar medio de cultivo celular.
3. Dividir las células en 2 tubos (A) control y (B) Wortmanina.
4. Agregar Wortmanina al tubo B (el volumen de la droga se indicará en el práctico) e incubar 10 min.
5. Agregar las partículas a fagocitar (la proporción macrófagos/partículas se indicará en el práctico)
6. Incubar 1h a 37°C en baño termostático. Mezclar suavemente los tubos aproximadamente cada 10 minutos, para evitar que las células sedimenten en el fondo del tubo.
7. Montar 10 μl entre porta y cubre.
8. Observar al microscopio óptico, comparar el índice fagocitar (células que han fagocitado al menos una partícula/ N° de células totales) en condiciones control respecto al tratamiento con Wortmanina.

B. OBSERVACIÓN DE FAGOCITOSIS EN DIVERSAS CONDICIONES EN PREPARADOS FIJADOS

1. Utilizar los preparados otorgados por los docentes, para visualizar el proceso de fagocitosis
2. Observar al microscopio a 40X.
3. Cuantificar el número de partículas fagocitadas (internalizadas) por célula.
4. Se entregarán 3 condiciones: A, B y C. Contar aproximadamente 50 células y calcular el promedio para poder dilucidar qué condición es control y cuáles son las tratadas con inhibidores (Citocalasina D o Wortmanina).

CUESTIONARIO

- 1- Esquematice la vía fagocítica.
- 2- ¿Qué elementos del citoesqueleto están involucrados en el proceso de fagocitosis?
- 3- ¿Qué ocurre si células incubadas con bacterias para fagocitar se las trata previamente con un inhibidor de la bomba protónica?
- 4- ¿Qué ocurre si se incuban macrófagos a 4°C con bacterias a fagocitar?
- 5- La eficiencia de la fagocitosis bacteriana por los macrófagos se incrementa uniendo anticuerpos a la superficie bacteriana. Sobre la base de descripciones previas de la estructura de anticuerpos, ¿a qué porción de la molécula de inmunoglobulina está dirigido el receptor del macrófago para el anticuerpo unido a la bacteria? Diseñe un experimento para probar la propuesta.

Biología Molecular y Celular

Trabajo práctico de Laboratorio N° 5

Microscopía electrónica de transmisión y barrido

Microscopía Confocal

Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM)

F.C.M. UNCUYO

Los alumnos visitarán el Instituto de Histología y Embriología Mendoza (I.H.E.M), en las Jornadas de Puertas Abiertas del Instituto, ubicado en la Facultad de Ciencias Médicas de la UNC para conocer Microscopios electrónicos, de Barrido y Confocal, así como también las instalaciones del dicho instituto.

Biología Molecular y Celular

Trabajo Práctico de Aula N° 1

Autofagia, endocitosis y transporte vesicular

Cuestionario

- 1.- Esquematizar y describir el proceso de endocitosis.
- 2.- ¿Qué tipo de vesículas con cubierta se conocen?
- 3.- ¿Qué es la cubierta de clatrina? ¿Cuál es el mecanismo de formación? ¿Cuál es su función?
- 5.- ¿Qué función cumple la dinamina en el proceso de endocitosis y de qué manera la cumple?
- 6.- ¿Por qué mecanismo se desarma la cubierta de clatrina en las vesículas que la contienen?
- 7.- ¿Qué son las COP y qué función cumplen?
- 8.- ¿Qué son las SNAREs y qué función cumplen? ¿Qué tipo de fusión entre endosomas se conocen?
- 9.- ¿Qué son las proteínas Rab, qué función cumplen y cómo es su ciclo de activación e inhibición?
- 11.- ¿Qué modelos de fagocitosis se conocen?
- 12.- ¿Qué elementos del citoesqueleto están involucrados en el proceso de fagocitosis?
- 13.- ¿Qué mecanismos de citotoxicidad a bacterias presentan los fagocitos?
- 14.- ¿Qué efecto tiene la baja temperatura (4°C) y la citocalasina B sobre la fagocitosis?
- 15.- ¿Qué ruta de transporte sigue una enzima lisosomal y una de secreción (amilasa pancreática) desde el momento de su síntesis?
- 16.- ¿Qué son los receptores a manosa-6-fosfato y qué función cumplen?
- 17.- ¿Cuál es el efecto de la brefeldina A sobre la ruta biosintética-secretoria?
- 18.- Se desea conocer la localización sub-Golgi de una enzima, ¿Qué droga utilizaría? Si luego de utilizarla, la enzima ahora tiene localización en el ER ¿Cuál era/n la/s cisterna/s en las cuales estaba inicialmente?
- 19.- Para investigar sobre la vía de transporte de una proteína Rab recientemente descrita, ¿Cuál de los siguientes experimentos realizaría y por qué?
 - a- Fraccionamiento subcelular
 - b- Microscopía de fluorescencia
 - c- Video-microscopía
 - d- Uso de mutantes restrictas a GDP o GTP
 - e- Western Blot
- 20.- ¿Qué tipo de ensayo/s realizaría para verificar si una proteína X viaja desde el ER al complejo de Golgi utilizando vesículas COPII?
- 21.- ¿Cómo frenaría el transporte vesicular? ¿Y cómo frenaría o alteraría el transporte de un tipo de

vesículas específicas?

- 22- ¿Cómo seguiría la endocitosis de transferrina en una célula en cultivo? ¿Cómo vería si la endocitosis está afectada por una proteína de transporte en particular?
- 23- ¿Cómo alteraría la fusión de endosomas? ¿Y la maduración de endosomas?

Biología Molecular y Celular

Trabajo Práctico de Laboratorio N° 6

Ciclo celular

OBJETIVOS:

- Identificar las células meristemáticas de la raíz de la cebolla en distintas fases del ciclo celular.
- Determinar la duración del período S+G₂ en células meristemáticas sincronizadas con hidroxiquina.
- Observar el efecto de la cafeína en la división del citoplasma (citocinesis) de las mismas células antes mencionadas.

INTRODUCCIÓN

La raíz presenta una estructura axial de forma cilíndrica con un extremo distal ahusado. Desde el inicio del crecimiento a lo largo del eje longitudinal, presenta zonas con características morfológicas y funcionales propias. Se distinguen cuatro zonas: la cofia, el meristema, la zona de elongación y la zona madura. Los meristemas están compuestos por células no diferenciadas que se dividen activamente, también llamadas células totipotentes por su habilidad de dar lugar a todos los tejidos vegetales. Típicamente, las células meristemáticas son pequeñas, poliédricas, más o menos equidimensionales (dimensiones parecidas en todas las direcciones). En ellas, el citoplasma ocupa la mayor parte de volumen celular ya que las vacuolas son muy pequeñas. No contienen cloroplastos ni ningún otro plástido diferenciado, la pared celular de las células meristemáticas es delgada y carece de pared secundaria. El meristema se ubica por encima de la porción proximal de la cofia, es un tejido que se auto perpetúa y mantiene el carácter proliferativo indefinidamente generando el crecimiento de la raíz.

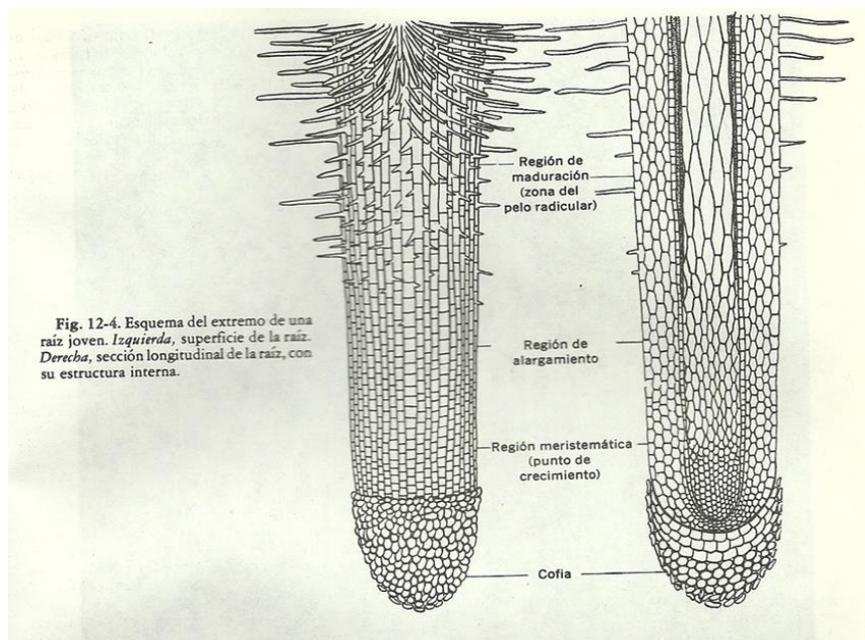


Figura 1: Esquema del extremo de una raíz joven.

Tratamiento de las raíces previo al Trabajo Práctico

Sincronizado de células meristemáticas: raíces de cebolla aún unidas al bulbo fueron inmersas en:

- 1- 0,75 mM hidroxurea en agua por 13 hs (detiene las células en G1/S).
- 2- Luego se pasaron a agua a 25°C (para que las células meristemáticas continúen el ciclo celular S, G2, M).
- 3- La obtención de muestras se realizó durante esta incubación desde el tiempo 0 hasta 16 horas cada 2 horas identificándose como 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16. Una vez extraídas del agua al tiempo indicado fueron fijadas.

La hidroxurea inhibe las enzimas que convierten los nucleótidos en desoxinucleótidos, dejando la célula depleta de los mismos. Al no poder comenzar la replicación del ADN todas las células meristemáticas, se detienen al final de G1. Al remover la hidroxurea (tiempo 0), las células vuelven a contar con los desoxinucleótidos e inmediatamente ingresan y completan S, pasan por G2 e ingresan a M.

Efecto de cafeína en la citocinesis de células meristemáticas

Tratadas: las raíces de cebolla aún unidas al bulbo fueron inmersas por una hora, en una solución conteniendo 0,1% de cafeína y luego se fijaron.

Control: raíces de cebolla aún unidas al bulbo fueron inmersas en agua.

Fundamento del uso de cafeína: cuando las células vegetales se dividen, realizan la división del citoplasma (citocinesis) en forma particular. En el lugar donde se va a producir la citocinesis comienza a depositarse material de la pared celular y a continuación migran vesículas del aparato de Golgi para formar la nueva membrana plasmática. De esa manera se observa la progresiva división del citoplasma en dos. La cafeína inhibe la migración de las vesículas a la zona de citocinesis, las células en división no pueden dividir su citoplasma y quedan con dos núcleos.

En el trabajo Práctico: preparación y tinción de células meristemáticas para su observación al microscopio óptico.

- 1- Coloración de las células meristemáticas de la raíz: con una pinza, colocar una raíz fijada en un tubo con 20 µl de orceína e incubar 2 min a 60°C.
- 2- Aplastado de las raíces: se deposita la raíz sobre porta objetos y se separa los primeros 3 milímetros con una hoja de afeitar (zona meristemática), el resto de la raíz se desecha. Se deposita una gota de ácido acético al 45% y un cubreobjetos sobre el meristema y con la punta de un lápiz se presiona hasta que se logre una distribución de una sola capa de células. Con una servilleta de papel se presiona con el pulgar sobre el cubreobjetos y se observa la preparación al microscopio.

Observaciones

Observar al microscopio las preparaciones

Con el lente de 10x identificar la forma de las células, el núcleo y el citoplasma.

Células meristemáticas (células con núcleo claro que ocupa el 2/3 del citoplasma) en:

1. Interfase: dilucidar el tamaño del núcleo en el estado G1 o G2
2. Mitosis: identificar

- a. Profase, metafase, anafase y telofase
 - b. Cromosomas bivalentes y univalentes
3. Citocinesis (división del citoplasma)

1- Determinación de la duración S+G₂

Determinar el índice mitótico en células meristemáticas: número de células meristemáticas en división (profase, metafase, anafase y telofase) cada 100 células meristemáticas.

Interpretar los resultados comparando los índices para cada tiempo de incubación.

2- Efecto de la cafeína en la citocinesis de células meristemáticas:

Preparado de raíces controles: observar las características de las células meristemáticas en citocinesis.

Preparado de raíces tratadas con cafeína: observar si hay células con dos núcleos y en qué estado de mitosis se encuentran.

Biología Molecular y Celular

Trabajo práctico de Aula N° 2

Bioinformática

OBJETIVOS

- Comprender los conceptos teóricos y prácticos que son área de estudio de la bioinformática.
- Aprender el manejo de PubMed para búsqueda de artículos científicos.
- Aprender a manejar bases de datos disponibles on line para determinar homología de secuencias, comparación de secuencias y diseño de primers.

INTRODUCCIÓN

La bioinformática es la aplicación de la tecnología computacional a la gestión y análisis de datos biológicos. Esta disciplina requiere el uso y/o el desarrollo de diferentes técnicas entre las que se incluyen informática, matemática aplicada, estadística, química y bioquímica.

Es una disciplina muy utilizada actualmente para resolver problemas experimentales en las ciencias biológicas, y tiene utilidad para muchas especialidades desde la taxonomía, pasando por la fisiología hasta la biología molecular.

El uso de la bioinformática en el área de la Biología Molecular ha permitido simplificar los métodos de clonado y secuenciación del ADN generando una enorme cantidad de datos de secuencias de nucleótidos. Este crecimiento explosivo en la cantidad de información biológica hizo necesario el uso de computadoras y el desarrollo de nuevos programas para poder almacenar, clasificar y acceder a los datos almacenados. Además, permite realizar el análisis de expresión de miles de genes en un solo experimento. Mientras que antes un científico investigaba la expresión de un gen en particular implicado en una determinada enfermedad y actualmente puede estudiarse la expresión de varios genes simultáneamente.

Las aplicaciones de las técnicas bioinformáticas son múltiples, pero se pueden citar algunos ejemplos:

- Comparación y alineamiento de secuencias de ADN y proteínas, para determinar homología y relaciones de parentesco entre especies (Taxonomía-Sistemática).
- En base a las secuencias de genes presentes en las bases de datos se pueden hacer predicciones sobre la secuencia, estructura y propiedades de las proteínas codificadas por los mismos de genes (Biología Molecular).
- Análisis de genomas.
- Interacciones proteína-proteína teniendo en cuenta las animaciones 3D generadas a partir de las secuencias de aminoácidos presentes en las bases de datos.

ACTIVIDADES PRÁCTICAS

En esta clase presentaremos programas de utilidad en Internet para el análisis de secuencias y búsquedas de información.

PARA BÚSQUEDA DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS

→ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

PARA COMPARACIÓN DE DOS SECUENCIAS

→ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

DISEÑO DE PRIMERS PARA SER UTILIZADOS EN PCR Y/O RT-PCR

→ <http://insilico.ehu.es/>

BUSQUEDA DE PUBLICACIONES CIENTIFICAS

→ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

1. BÚSQUEDA DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS

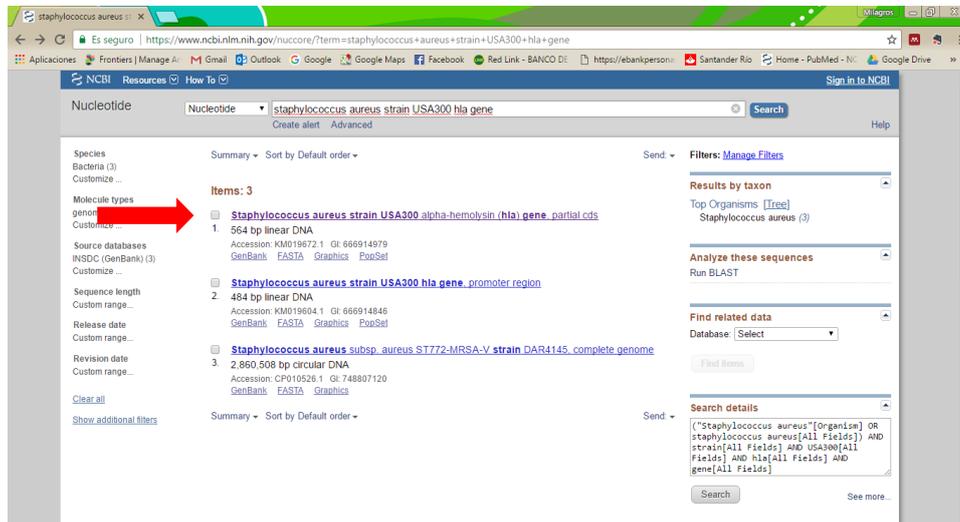
En esta primera actividad, vamos a buscar la secuencia de ADN que codifica para la proteína alfa hemolisina (Hla) de *Staphylococcus aureus* en la base de datos NCBI y veremos si el programa encuentra alguna secuencia homóloga.

El National Center for Biotechnology Information (**NCBI**) es parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos (National Library of Medicine), una rama de los Institutos Nacionales de Salud (National Institutes of Health, **NIH**, Bethesda, Maryland, USA). El NIH Almacena y actualiza la información referente a secuencias genómicas en **GenBank**, un índice de artículos científicos referentes a biomedicina, biotecnología, bioquímica, genética y genómica en **PubMed**, una recopilación de enfermedades genéticas humanas en OMIM, además de otros datos biotecnológicos de relevancia en diversas bases de datos.

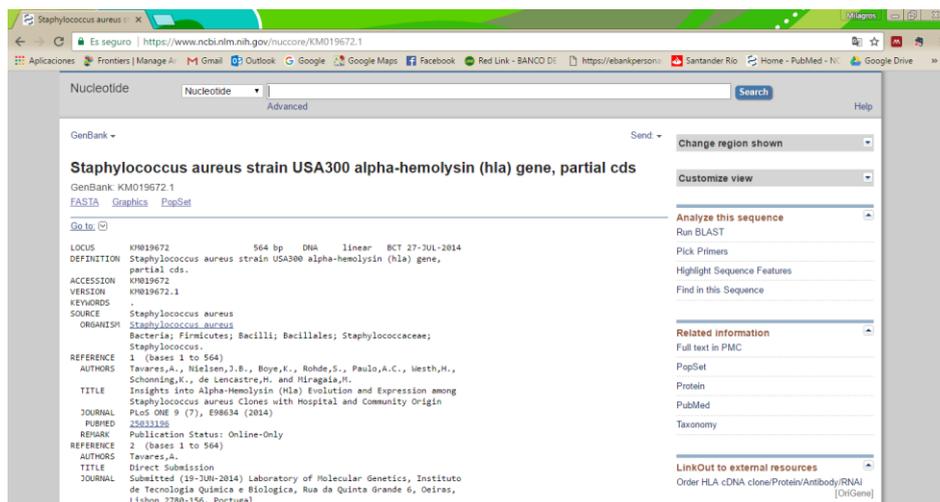
El NCBI ofrece algunas herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN, ARN y proteínas, siendo **BLAST** una de las más usadas. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (denominada query) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos. El algoritmo encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema. Es importante mencionar que BLAST usa un algoritmo heurístico por lo que no nos puede garantizar que ha encontrado la solución correcta. Sin embargo, BLAST es capaz de calcular la significación de sus resultados, por lo que nos provee de un parámetro para juzgar los resultados que se obtienen.

Ingresa a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

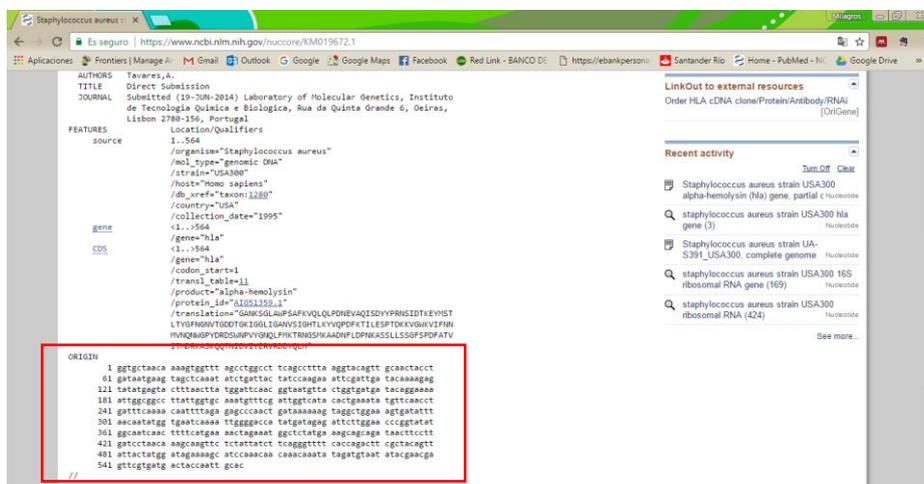
Elige la opción "Nucleotide" y en el buscador ingresa "Staphylococcus aureus strain USA300 Hla gene".



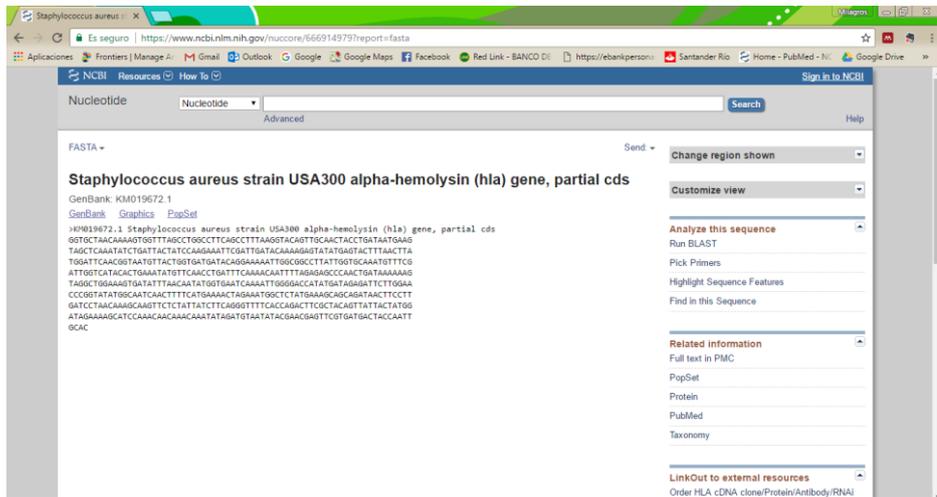
Hacer click sobre el primer archivo.



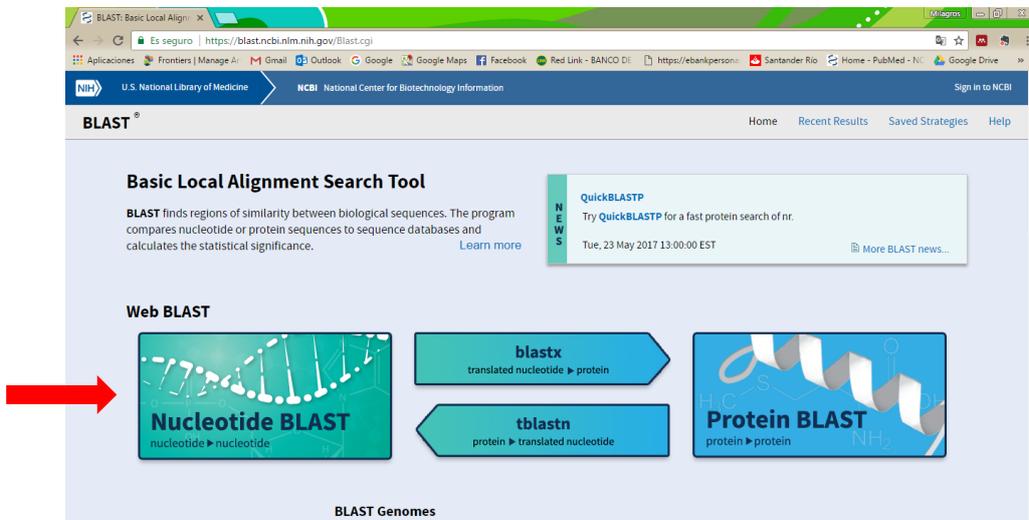
En la pantalla se observan todos los datos del gen que codifica para la proteína Alfa hemolisina (Hla) de Staphylococcus aureus



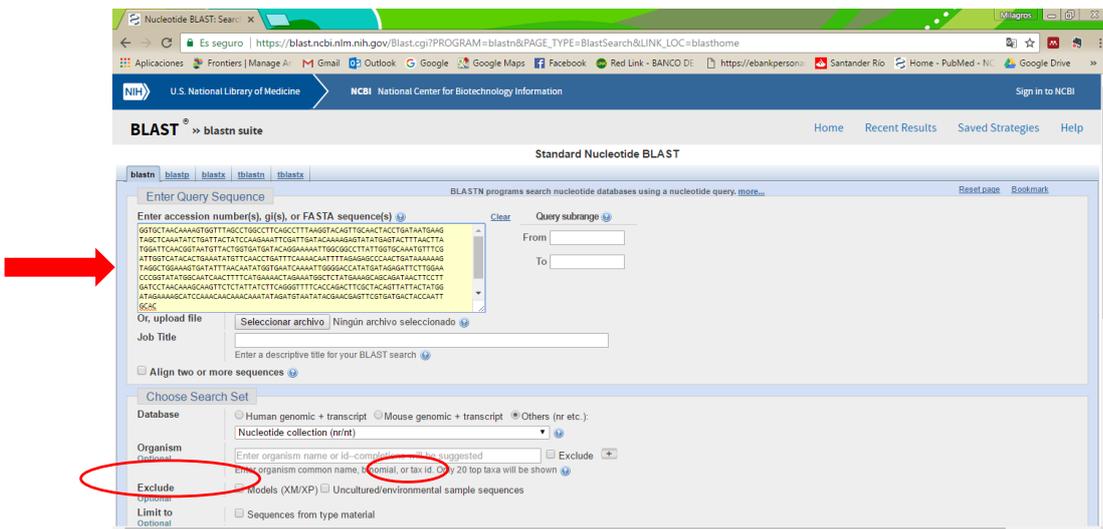
Se observa la secuencia correspondiente al gen Hla pero para poder trabajar con secuencias en todos los programas se debe usar el formato FASTA, para ello arriba en a la derecha se encuentra el link para convertir la secuencia en secuencia FASTA. Hacer click en FASTA.

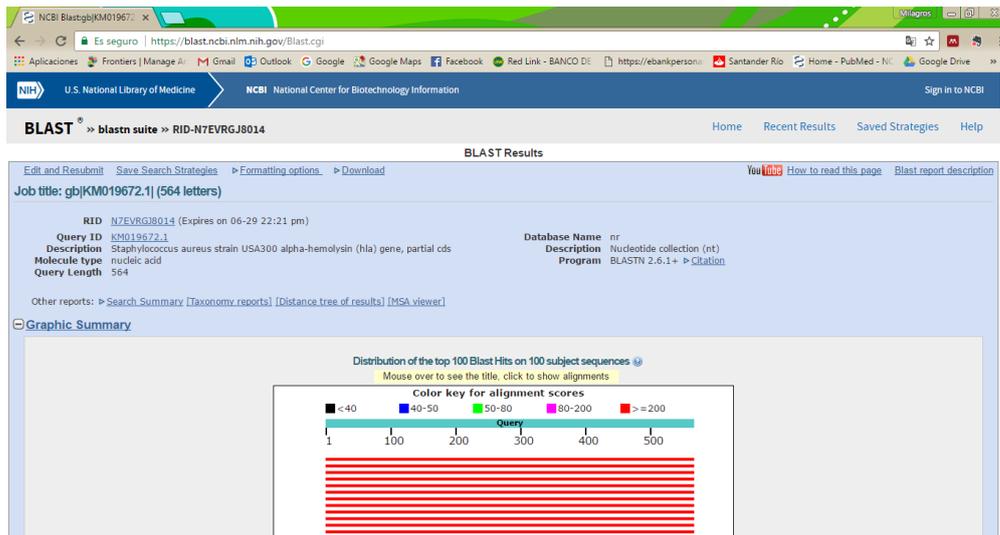


Luego vamos a buscar utilizando el algoritmo BLAST si se encuentra alguna secuencia con similitud. Para ello debemos copiar la secuencia e ingresar en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> elegir la opción “nucleotide BLAST” y pegar la secuencia query.



A continuación, veremos si el programa encuentra alguna similitud entre nuestra secuencia y los datos contenidos en BLAST.



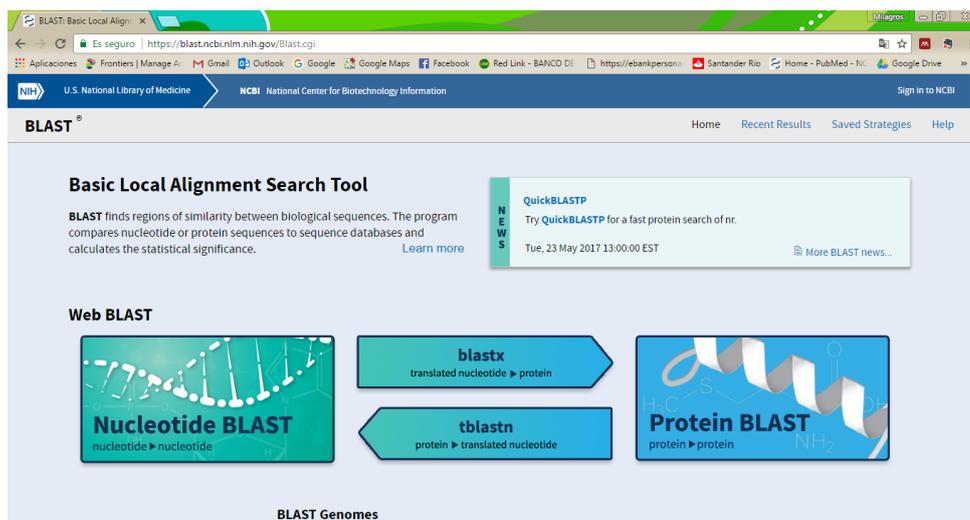


2. COMPARACIÓN DE DOS SECUENCIAS

Analizaremos las similitudes de dos proteínas secretadas por *Staphylococcus aureus*: alfa hemolisina (Hla) y beta hemolisina (Hlb). Para ello primero debemos buscar la secuencia de aminoácidos que componen la proteína. Se realiza de maneramuy similar a lo anterior:

Ingresar a <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Elegir la opción “Protein” y en el buscador ingresa “*Staphylococcus aureus* strain USA300 Hla gene”. En otra pestaña realizar el mismo proceso pero ingresar en el buscador “*Staphylococcus aureus* beta-hemolysin”



Ingresar en el link y copiar la secuencia en formato FASTA de ambas proteínas para copiarlas en el programa BLAST

Protein search results for **staphylococcus aureus strain usa300 beta-hemolysin**. The search returned 3 items:

1. **truncated beta-hemolysin [Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300_FPR375]**
65 aa protein
Accession: ABD20946.1 GI: 87126432
GenPept | Identical Proteins | FASTA | Graphics
2. **truncated beta-hemolysin [Staphylococcus aureus subsp. aureus USA300_FPR375]**
274 aa protein
Accession: ABD20771.1 GI: 87126257
GenPept | Identical Proteins | FASTA | Graphics
3. **RecName: Full=HTH-type transcriptional regulator SarZ; AltName: Full=Staphylococcal accessory regulator Z**
148 aa protein
Accession: Q2FEB2.1 GI: 123722352
GenPept | Identical Proteins | FASTA | Graphics

On the right side, there is a section for "Analyze these sequences" with options like "Run BLAST", "Align sequences with COBLAT", and "Identify Conserved Domains with CD-Search". Below that is a "Search details" box containing the search query: `("Staphylococcus aureus"[Organism] OR staphylococcus aureus[all fields]) AND strain[all fields] AND usa300[all fields] AND beta-hemolysin[all fields]`.

The BLAST interface shows the "Align Sequences Protein BLAST" section. It has two main input areas:

- Enter Query Sequence:** A text box for the query sequence. A red arrow points to this area with the text "Pegar secuencia de proteina Hla".
- Enter Subject Sequences:** A text box for subject sequences. A red arrow points to this area with the text "Pegar secuencia de proteina Hlb".

Other options include "Or, upload file" (with a "Seleccionar archivo" button), "Job Title", and "Program Selection" (set to "blastp (protein-protein BLAST)").

BLAST Results for "Protein Sequence (188 letters)". The results show 2 sequences. A "Graphic Summary" section displays a bar chart titled "Distribution of the top 3 Blast Hits on 1 subject sequences".

The bar chart shows alignment scores across the query length (1 to 180). A color key for alignment scores is provided:

- <40: Black
- 40-50: Blue
- 50-80: Green
- 90-200: Yellow
- >=200: Red

The chart shows a significant alignment (red) between approximately position 100 and 180 of the query and the subject sequence.

3. DISEÑO DE PRIMERS

En este práctico, aprenderemos a cómo diseñar los oligonucleótidos para realizar una reacción de PCR para detectar el gen de la enzima Superóxido Dismutasa de Niquel (SodN) en la cepa *Streptomyces coelicolor* A3.

1. Búsqueda en base de datos de secuencias de la B-actina.

a. Abrir un navegador de internet

b. En la barra de direcciones pegar: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

c. En la pestaña All databases seleccionar Nucleotide

d. En la pestaña Search escribir Ni-containing superoxide dismutase *Streptomyces coelicolor* A3. Presionar Search.

e. Elegir la 4ta opción.

e. Copiar la secuencia en formato FASTA

Nucleotide search results for "Ni-containing superoxide dismutase *Streptomyces coelicolor* A3". The search results show 5 items. Item 4 is selected, which is "Streptomyces coelicolor A3(2) penicillin binding protein (atrA), permease (atrB), ATP-binding protein (atrC), methyltransferase (meI2), signal peptidase, Ni-containing superoxide dismutase (sodN), puromycin N-acetyltransferase (pat), and geranyl transferase (gtr) genes, complete cds". A red arrow points to this item.

Protein sequence and CDS for the selected item. The protein sequence is: MTTNDDTTTATAGTATTTATAGADQAIQRSDRQEQEYIPDR EERFRILHLDVWEALVGPAPRVLDCAGTGTITARLDRPDATSTOVDPALLAIAE GTFAGDGRVSVVAADLQDPNPAKLPYDAYDAVLTATLHIFHAEPLADLVRVAELV RGGVYVHWDVTEATPSTLAEAGHSDAKGQALDQALDQALAEQVLPPT HRPPLRLRRARDGIPSAHARVLRKFGGEARPVKCSPTDILLAVK. The CDS section shows the complementary DNA sequence: 5'-ATGTTNDDTTTATAGTATTTATAGADQAIQRSDRQEQEYIPDR EERFRILHLDVWEALVGPAPRVLDCAGTGTITARLDRPDATSTOVDPALLAIAE GTFAGDGRVSVVAADLQDPNPAKLPYDAYDAVLTATLHIFHAEPLADLVRVAELV RGGVYVHWDVTEATPSTLAEAGHSDAKGQALDQALDQALAEQVLPPT HRPPLRLRRARDGIPSAHARVLRKFGGEARPVKCSPTDILLAVK-3'. The gene section shows the gene name 'sodN' and the accession number AF104994.1.

```

3901 tggattacc cgtatgct gtcacacc gaggaccgt cgttgggca ggtctctg
3902 acctggtg agctgctg tgaacttc ggcccaacc agtccggcc cggccgccc
4001 tccagaccg acgtgagcg gttccctg gtcggggg ggttcgccc ggtcttcgg
4002 gggcagagc gggcagcga gacctctgc gtagcctg gtagcact gttcttgag
4141 tttccgctg ccccgagat cttccggcc gaccacgaa cggagagcc cagctccgt
4201 tggcaccg acctgagg cacccttc aagcagag cggattccg gacraatcg
4202 gggtaggag tggcttcca cttccagcg tagagctg cggtaggc tptatagc
4321 cggccctg cggcaagcc taactggaca cttaccacaa cgtctcccg cgtactgct
4381 cggaccgtg gcccaccg gcaagtag cggctaccg cgtctgaa cgtctggag
4441 gggcagct gggcagcc gcttagcg cggcagcc cggagagcc agggagcgc
4501 gggagctg accgcccg gggagcgt accgagccg gaccggccc agggagctt
4561 cttggagac caccctgag tggactgt cccgcccg gaaagcttg tcccagaca
4621 cccaccgag gcccagct gtttagcg cctgtgaa caggagag tcttgtaga
4681 agggatcgc cagcagcag agtacccg gccggccc gggcccag tgcagagca
4741 gcaatcac gtagtagc gtaggacca tagagccc ggtaccct ggcagcaga
4801 aggcagcc cctctggc gttgcttc ctgagcag tgtcggca tcaatcgca
4861 cctccagct cttcttcca caagcttag tccacccc gattttgc caagagcgc
4921 ggggaccc cgaatcag gttccccc ggttaatgc cccctgga agcagatcc
4981 gaggagaa cctctatg tttccgct gttgcccc aagtcagg tggcggcc
5041 tggatgt ctttagag tatagacc tptcagcc gttatgag agatgtag
5101 gggcctg caggagaa tggcggaa cagagccc cactttag cggcggcc
5161 gattatag gttcagcg cggactgc gggacccc gttctgct ttttagaga
5221 ttatttag cctcagct tggagatg cccagatc cagcttag ttatagaga
5281 cttgagcc cttgcccg ccaagcttc gaaagccc ggcagccc agaaacct
5341 ttacttca cccatgtt ccaattat ttttagag gaaagccc tggagctc
5401 agctccag gggcagat cagtgcca tggagccc caggagccc cgaagccc
5461 ggcgcttc tggcagcc ccttggct gttctgct agggattc gttgacct
5521 tccggaggt gctcagct cccggcgc gctggctt cggagccc gattcttc
5581 cggagccc cctgacct aggttgcg ggcgcttc cagctacc cagctacc
5641 agccagcg tcttggcg cggagacc gtttgact gcttccga cagagacc
5701 gctagctt gcttccat acccaggt tagagccc ggcagctg cgttgggt
5761 gtttagtg caccagag cgttgcga agcttgcg cagctccc agatgag
5821 agactcga cccgagcg aeatggca tgcagctc gacaccag ggttagct
5881 tggagcag tctgtacc tctgacca gttgcggc cagccgat cggcaca
5941 gtagagtc gaggcttg tcttggcc tggctccc gaccctcg accagctg
6001 tggatgat ctagcttc ggttggcc actctgag cttgagag gggagatt
6061 cggcaggt gcataggg ctgtgagc cctcttng accagctg tagctgoc
6121 gcccctgc gctgtgct accgctgt tggagctt gtcagctcc agcagagcc
6181 agcagatt gggagctc tccagatt cagcttag gactagag aactctgt
6241 cggagacc gacctgac gacgctcg cttccggc cccatgag cctcagtc

```

f. Copiar la secuencia desde 4997 a 5392 y colocarla en un archivo

g. Ingresar a <http://insilico.ehu.es/>

In silico simulation of molecular biology experiments

Experiments against prokaryotic genomes

- Microsatellite Repeats
- Find ORF by name
- Restriction digest and PFGE
- Sort sequence locator
- Experiments against user's sequences
- Main
- Online exercises
- Design of PCR and PCR-RFLP experiments
- Counting Chamber
- DNA fingerprinting
- cDNA-RFLP

Prokaryotic genomes: data retrieval

Strain	G+C	Length	ORFs	Graphs and data
Gordonia polyisoprenivorans VH2	67	566905	4943	

Primer3: design of detection primers

Length of primers: Minimum 15, Optimum 18, Maximum 21

Tm of primers: Minimum 57 °C, Optimum 60 °C, Maximum 63 °C

Length of amplicon: First option 150-250

Additional default options: 120-250, 100-300, 301-400, 401-500, 501-600, 601-700, 701-850, 851-1000

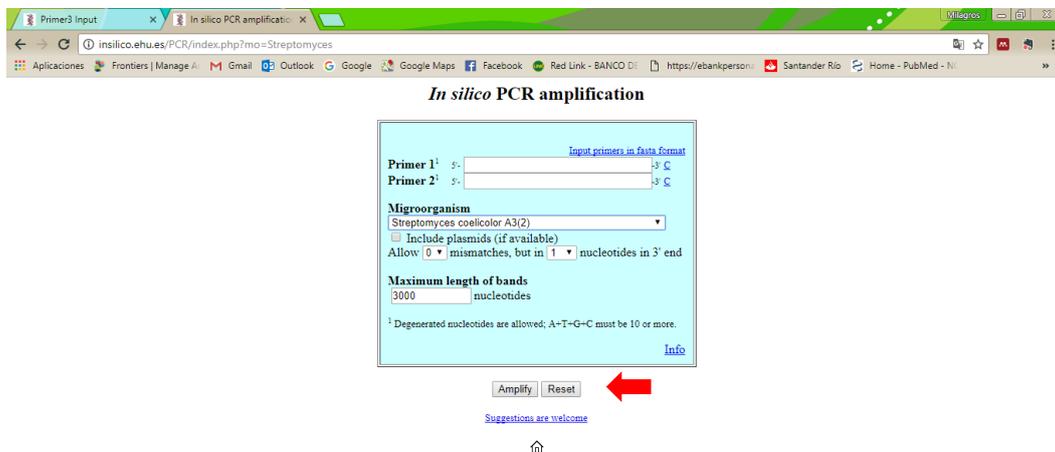
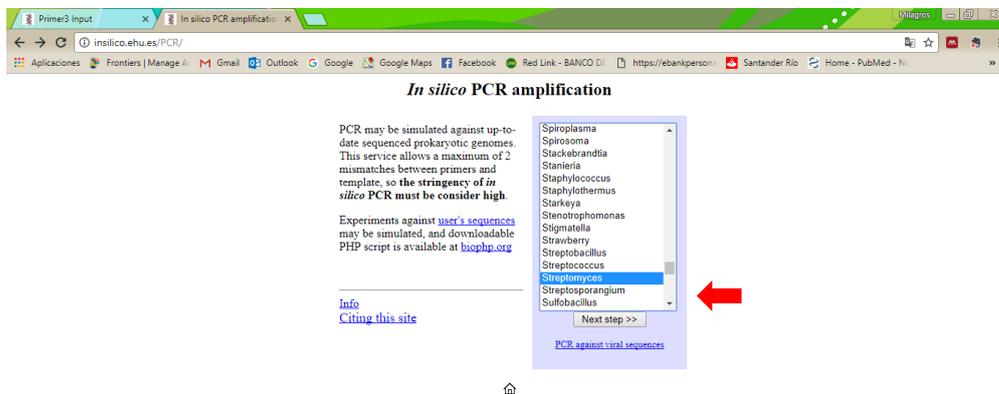
Pick Primers

NOTE: This form has been simplified from the original primer3 form.

Evaluar las características de los pares de primers generados por el programa. Analizar cuál sería el primer más adecuado.

Para saber si los oligos diseñados permiten amplificar la secuencia de interés, tienes que realizar una PCR in silico (virtual, utilizando herramientas bioinformáticas) utilizando el genoma disponible del organismo similar al modelo que tienes. Para ello, debes ingresar en <http://insilico.ehu.es/PCR/>

De la lista de genomas que se te despliega debes elegir “Streptomyces” y luego ingresas a una página donde debes pegar la secuencia de los primers que diseñaste anteriormente.



Luego de apretar el botón “Amplify” te aparecerá una nueva ventana, contesta las siguientes preguntas:

- a- ¿Cuántas bandas se amplifican?
- b- ¿Qué tamaño tienen?
- c- Si haces un BLAST de esas secuencias, ¿a qué genes corresponden?

4. BUSQUEDA DE PUBLICACIONES CIENTIFICAS

Ingresar a <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

PubMed es un motor de búsqueda de libre acceso a la base de datos MEDLINE de citas y resúmenes de artículos de investigación biomédica. Ofrecido por la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos como parte de Entrez. MEDLINE tiene alrededor de 4800 revistas publicadas en Estados Unidos y en más de 70 países de todo el mundo desde 1966 hasta la actualidad.

Home - PubMed - NCBI x

Es seguro | <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Aplicaciones Frontiers | Manage A Gmail Outlook Google Google Maps Facebook Red Link - BANCO DI <https://ebankperson...> Santander Rio Home - PubMed - N

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

PubMed.gov US National Library of Medicine National Institutes of Health PubMed Search Advanced Help



PubMed

PubMed comprises more than 27 million citations for biomedical literature from MEDLINE, life science journals, and online books. Citations may include links to full-text content from PubMed Central and publisher web sites.

Using PubMed	PubMed Tools	More Resources
PubMed Quick Start Guide	PubMed Mobile	MeSH Database
Full Text Articles	Single Citation Matcher	Journals in NCBI Databases
PubMed FAQs	Batch Citation Matcher	Clinical Trials
PubMed Tutorials	Clinical Queries	E-Utilities (API)
New and Noteworthy	Topic-Specific Queries	LinkOut

Latest Literature	Trending Articles	PubMed Commons
New articles from highly accessed journals	PubMed records with recent increases in activity	Featured comments
Blood (3)	Nuts and Dried Fruits: An Update of Their Beneficial Effects on Type 2 Diabetes. Nutrients. 2017.	Selectivity check? Author S Casola replies to @jwoodgett on contribution of GSK3-alpha in targeting GSK3-beta. bit.ly/2trA8Ah Jun 30
Circulation (2)	Health, Wealth, and the U.S. Senate. MPLA. 2017.	
Cochrane Database Syst Rev (8)		

Biología Molecular y Celular

Trabajo Práctico de Laboratorio N° 7

Purificación de proteínas recombinantes

OBJETIVOS

- En este experimento los estudiantes explorarán el proceso biológico y bioquímico de la purificación de una proteína recombinante expresada heterológamente en bacterias *E coli*.
- Durante la actividad los estudiantes tendrán la posibilidad de conocer distintos tipos de purificación de proteínas.
- Al finalizar la actividad, los estudiantes habrán realizado una de las purificaciones más comunes en un laboratorio de biología celular y molecular, y de amplio uso en la industria, como es la purificación de proteínas en columnas de afinidad.

INTRODUCCIÓN

La purificación de proteínas es una práctica muy común en la industria y en la investigación. Lo que se debe tener en cuenta siempre al momento de planificar la purificación, son las propiedades y características físico-químicas de la proteína a purificar. Luego, hay que considerar diversos factores que se explican brevemente:

1. Origen de la proteína

La proteína puede ser nativa, es decir, propia del organismo o célula, o sobre-expresada, donde genéticamente se ha manipulado la célula u organismo para que sintetice una proteína exógena.

También dependerá del tipo de célula utilizada el protocolo de lisis necesario para la ruptura celular. Las bacterias, las células de mamífero, las células vegetales, cada tipo celular tendrá una lisis que se ajuste al tipo de membrana y la existencia de pared celular.

2. Localización de la proteína

Para su purificación, podemos distinguir tres grandes grupos: citosólica, de membrana o secretada.

Si la proteína es **citósólica**, indica que es soluble. Por lo tanto, debemos lisar la célula y nuestra proteína de interés estará en solución, junto con otras proteínas solubles. Si la proteína es de **secreción**, obtendremos nuestra proteína soluble directamente del medio de cultivo, sin necesidad de romper la célula. Son el tipo de proteína más simple de purificar. Finalmente, si nuestra proteína es de **membrana**, debemos considerar que, en primer lugar, hay que disgregar la membrana en la que ésta se encuentra. En segundo lugar, tiene una solubilidad muy baja, debido a la/s región/es de transmembrana que posee. Es el tipo de proteínas más complejo de purificar, y generalmente requiere la desnaturalización y renaturalización de la misma.

3. Uso de la proteína

Dependiendo del uso de la proteína purificada, será importante el tipo y grado de purificación de la misma.

Algunos usos de proteínas purificadas son:

Estudio de la misma: el grado de pureza dependerá del tipo de ensayo posterior a realizar. Siempre se deben eliminar posibles interferentes. Ejemplo: ensayos de cristalografía para determinar su estructura requieren alto grado de pureza, para ensayos de interacciones con otras proteínas, el grado de pureza puede ser menor.

Usos industriales: generalmente se requieren proteínas con actividad enzimática. Mientras la proteína tenga actividad, el grado de pureza es variable. Se necesita maximizar su actividad disminuyendo costos de purificación. Dependerá además si la propia proteína será utilizada o si se utilizará su producto enzimático

Usos clínicos: cuando la proteína será inoculada en organismos vivos, por ejemplo, en terapias enzimáticas, se necesitan grados de pureza extremadamente altos, para evitar cualquier reacción adversa.

4. Características de la proteína

Solubilidad: para optimizar el medio de purificación (acuoso, con solventes apolares, etc.)

Estabilidad: para realizar ajustes de temperatura acordes a la misma.

Punto isoeléctrico: es el valor del pH en el cual la proteína tiene carga neta cero. Se recomienda trabajar en un $\text{pH} = \text{pI} \pm 1$

Afinidad: para utilizar moléculas tales como sustratos de la proteína, otras proteínas que interactúen con ella, anticuerpos, para aislarla y purificarla.

Carga: se puede utilizar la carga de la proteína para retenerla selectivamente

Tamaño: existen diversas técnicas que nos permiten purificaciones por el tamaño de la proteína

La separación de las proteínas se realizará teniendo en cuenta sus características físico-químicas.

Las técnicas se pueden agrupar en:

Peso molecular: cromatografía de filtración en geles, diálisis, ultracentrifugación, electroforesis

Afinidad: cromatografía de afinidad por el sustrato, anticuerpos específicos

Carga: cromatografía de intercambio iónico, electroforesis, isoelectroenfocado

Solubilidad: extracción por solventes

Polaridad: cromatografía de adsorción, cromatografía en papel, cromatografía en fase reversa.

En nuestro caso, haremos una purificación de proteínas recombinantes, expresadas heterológicamente en bacterias *E. coli*, donde nuestra proteína de interés es soluble, unida a GST, una proteína de fusión que aumenta su estabilidad y solubilidad, además de ser útil para su purificación. A continuación se explica el procedimiento completo, pero en el laboratorio haremos solamente la purificación proteica.

Materiales

Cultivo bacteriano	PIC-bacteria 1000X
Eppendorf	DTT 1M
Jeringas de 5ml	Lisozima
Hielo	Tips blancos, amarillos y azules
Centrífuga	Pipetas automáticas
Algodón	PBS
Soporte universal	Tubos Falcon 15ml

A. CULTIVO E INDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Preparado previamente por los docentes:

Día 1

- Inocular una simple colonia a partir de un cultivo sólido en 10ml de LB/Amp (50µg/ml), Incubar toda la noche (ON) a 37°C.

Día 2

- Agregar 90ml de LB/Amp al cultivo ON. Incubar 1h 30 min a 37°C (OD600≈ 0,9)
- Agregar IPTG, hasta una concentración final de 1mM. Incubar 4h a 37°C
- Centrifugar 15 min a 6000g a 4°C para coleccionar las bacterias. Descartar el sobrenadante
- Resuspender el pellet en 10 ml de PBS frio
- Centrifugar 15 min a 6000g a 4°C
- Congelar el pellet en N₂ líquido y guardar a -80°C.

Buffers:

Buffer de Lavado

20mM Hepes pH= 7,5

2mM MgCl₂

150mM NaCl

Buffer de Elución

50mM Hepes pH= 7,5

1mM MgCl₂

150mM NaCl

15mM GSH (agregar antes de usar)

B. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Día 3

- Descongelar el pellet en hielo
- Agregar 5ml de PBS frio
- Agregar 5µL de PIC bacteria 1000X
 - 5µL DTT 1M (final 1mM)
 - 50µL Lisozima 100mg/ml (final 1mg/ml)
- Incubar 20 min a 4°C
- Sonicación (opcional): 1min al 30% (0,5 x 0,5).
- Centrifugar 20 min a 4000g a 4°C. Rescatar el SN

Preparación de las GSH-beads

Colocar 1ml en un tubo Falcon 15ml

2 lavados con 5ml de PBS frio

Centrifugar 5 min a 500 RPM a 4°C

- Agregar el SN a las beads
- Incubar 1h a 4°C con agitación
- Centrifugar 5 min a 500 RPM a 4°C

Lavado

- Lavar 2 veces con 5ml de Buffer de Lavado frío

Elución

- Eluir con 15mM de GSH/Buffer de Elución frío
- Colectar 5 fracciones de 500µL
- Congelar en N2 líquido, guardar a -80°C.

PREGUNTAS

Para el aprovechamiento del trabajo experimental es imprescindible saber exactamente qué se está haciendo en cada momento y por qué. Recuerde que la experiencia de laboratorio es intransferible y no la encontrará en ningún libro; por lo tanto, las oportunidades desaprovechadas **durante** el trabajo experimental en el laboratorio difícilmente puedan recuperarse con posterioridad. Es por ello que sugerimos resolver el siguiente cuestionario **antes** de venir al trabajo experimental. Por favor, consulte y despeje cualquier duda al respecto con los docentes.

- 1) ¿Qué tipos de promotores conoce?
- 2) ¿Qué tipos de célula huésped conoce para la sobreexpresión de proteínas? Mencione ventajas y desventajas de cada uno
- 3) ¿Qué tipo de funciones cumplen las proteínas?
- 4) ¿Cómo caracterizaría la pureza de la proteína obtenida? ¿Cómo la cuantificaría?
- 5) ¿Para qué se realiza cada paso en la purificación?
- 6) ¿Qué aplicaciones conoce para proteínas recombinantes?

Biología Molecular y Celular

Trabajo práctico de Laboratorio N° 8

Detección de proteínas por Western Blot

OBJETIVOS

- Comprender el fundamento de la separación de proteínas mediante una electroforesis.
- Aprender los pasos de la técnica de western blot y su utilidad para la detección de proteínas.
- Conocer la utilidad de la interacción antígeno-anticuerpo para la detección de diversas proteínas.

INTRODUCCIÓN

A. Separación de proteínas: ELECTROFORESIS

La técnica de electroforesis en gel es un método para separar, identificar y purificar DNA, RNA o proteínas. Entre las matrices más utilizadas se encuentra la de agarosa (para ácidos nucleicos) y la de poliacrilamida (para proteínas y ácidos nucleicos pequeños). La localización de la biomolécula en el gel puede ser determinada mediante la utilización de distintos colorantes que tienen afinidad específica por la biomolécula a resolver.

El fenómeno denominado electroforesis sucede cuando una molécula con una carga neta en solución se desplaza por acción de un campo eléctrico; de esta manera la molécula migra hacia uno u otro electrodo según su carga: los aniones (-) irán hacia el ánodo (+) y los cationes (+) hacia el cátodo (-). En estas condiciones la velocidad de migración a través del campo eléctrico dependerá de: carga neta, tamaño y forma de la molécula, fuerza del campo eléctrico, fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio

Las separaciones electroforéticas generalmente se realizan sobre matrices o geles que sirven de tamices moleculares que potencian la separación. Las moléculas más pequeñas que los poros se desplazan fácilmente a través de él, mientras que las de mayor tamaño quedan retenidas y las intermedias se desplazan con distinto grado de dificultad dependiendo de su tamaño.

Los geles de poliacrilamida son utilizados para separar la mayoría de las proteínas o pequeños oligonucleótidos. En presencia de radicales libres, que son proporcionados por el persulfato de amonio (APS) y estabilizados por el TEMED, se genera una reacción en cadena que es iniciada con monómeros de acrilamida que polimeriza en largas cadenas que son entrecruzadas con la bis-acrilamida para formar la matriz del gel. Para la electroforesis en gel de poliacrilamida de muestras proteicas se puede utilizar un sistema de buffers continuo o discontinuo. El discontinuo está formado por dos geles distintos. En la parte de arriba se coloca un **gel separador** con un tamaño de poro mayor que sirve para concentrar las muestras (en una banda) antes de que ingresen al **gel concentrador**. El sistema discontinuo otorga una mayor resolución ya que las proteínas ingresan como una banda discreta al gel de separación. La polimerización de los geles se realiza entre dos vidrios verticales, que funcionan como moldes, para dar un gel de un espesor definido. Inmediatamente después de preparar la mezcla de acrilamida/bis acrilamida, buffer, APS y

TEMED; se coloca entre los vidrios y el borde superior del gel se cubre con agua y para evitar el contacto con el oxígeno que inhibe la polimerización.

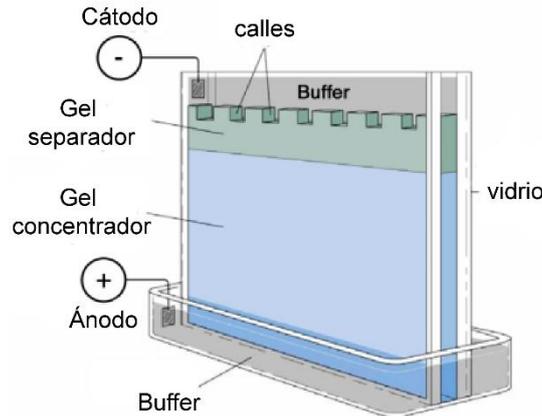


Figura 1: Esquema de una cuba de electroforesis y un gel de poliacrilamida.

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

La mayoría de las electroforesis analíticas de proteínas se llevan a cabo bajo condiciones que aseguren la disociación de las proteínas en sus subunidades individuales y que minimicen la agregación, para ello se utiliza la combinación de un detergente aniónico como el SDS (dodecilsulfato de sodio), un agente reductor (β -mercaptoetanol o DTT) y calor para disociar las proteínas. Los polipéptidos desnaturalizados unidos al SDS obtienen una **carga neta negativa**. El tratamiento conjunto de SDS (rompe uniones no covalentes) más el agente reductor (rompe puentes disulfuro) eliminan los efectos de las diferentes conformaciones de las proteínas tal que la longitud de la cadena, que refleja la masa, es la única que determina la velocidad de migración en este sistema. Las proteínas de menor tamaño se resuelven en la parte inferior del gel, y las de mayor tamaño van quedando retrasadas al atravesar la malla del gel, observándose en la parte superior. Ya que el desplazamiento de las cadenas polipeptídicas está correlacionado con su masa, es posible estimar el peso molecular de una proteína comparándola con la distancia de migración de un patrón de proteínas de peso molecular conocido (Markers).

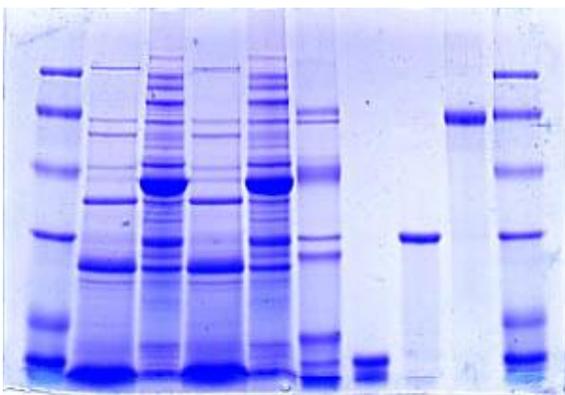


Figura 2: Ejemplo de una electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida. En la primera y última calles se corrió un patrón de peso molecular.

B. Detección de proteínas por Western Blot.

La transferencia de proteínas o blotting consiste en la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas, seguido de la detección empleando sistemas especialmente diseñados para la tinción de las membranas. El método para proteínas más potente es el denominado western blot en el que las proteínas son separadas en primer lugar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y posteriormente se transfieren a una membrana, mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel. Una vez completada esta operación las proteínas de interés son reveladas por el agregado de un anticuerpo específico.

El electroblotting es el método donde las proteínas son transferidas desde el gel a la membrana mediante un campo eléctrico. El procedimiento se inicia apilando sucesivamente sobre una esponja plana, papel de filtro empapado en buffer de transferencia, el gel, la membrana en contacto directo con el gel, más papel de filtro y finalmente otra esponja plana. Este conjunto se recoge entre dos capas de plástico perforado (cassette) y se introduce en una cuba en la que se encuentra una solución salina (buffer de transferencia) y dos electrodos planos (diseñados para conseguir un campo uniforme en toda la superficie del gel). Se dispone de forma que el gel quede hacia el ánodo (-) y la membrana hacia el cátodo (+) (Figura 3). La carga neta de las proteínas en el caso de los geles de SDS-PAGE es negativa debida a la carga del SDS. La electroforesis se realiza a 100 V de 1 a 4 horas. La velocidad de transferencia es inversamente proporcional al tamaño de la proteína. El proceso provoca un fuerte calentamiento de la solución por lo que se recomienda refrigerar el sistema y recircular el buffer (se agrega un agitador magnético y un refrigerante congelado en la cuba). Una vez realizada la transferencia se debe chequear la transferencia de las proteínas.

Gel	Buffer de transferencia	Membrana
SDS-PAGE	25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% v/v metanol, pH 8.3	Nitrocelulosa Papel de intercambio iónico PVDF

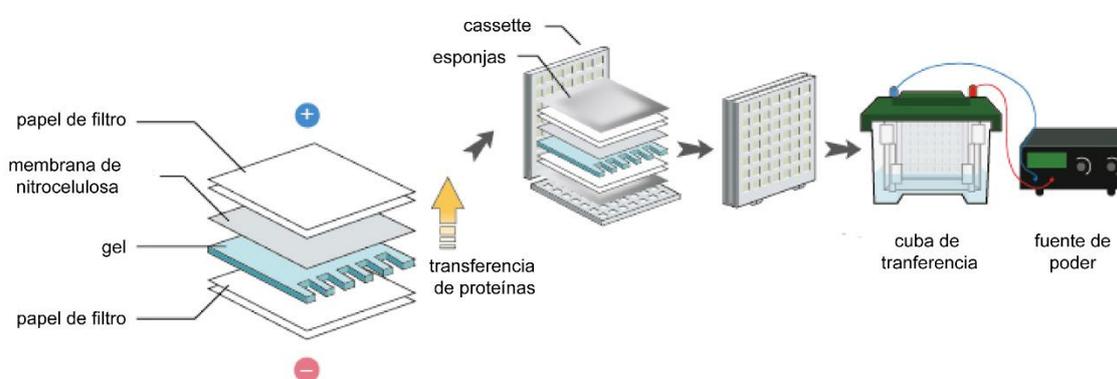


Figura 3: Esquema del armado del sistema de transferencia.

1. Detección inespecífica de proteínas totales sobre la membrana

Habitualmente se emplean técnicas de tinción de proteínas sobre las membranas como control de la transferencia. En este caso, se tiñen la totalidad de las proteínas presentes, de manera inespecífica.

Los colorantes que permiten teñir las proteínas en los geles de poliacrilamida no son utilizables en las membranas pues se unen irreversiblemente a éstas. Para teñir las proteínas en las membranas se emplean: Rojo Ponceau, Tinta china o Negro Amido. El Rojo Ponceau es el más empleado y se prepara en forma de solución acuosa. La tinción es rápida pero no es permanente y puede desaparecer en el procesamiento posterior. Como la tinción desaparece es compatible con casi todos los procedimientos de detección con anticuerpos.

2. Bloqueo de la membrana

La membrana posee gran afinidad por las proteínas, lo que es una ventaja al momento de transferir las proteínas de interés en el protocolo de Western blot. Sin embargo, los pasos posteriores de detección involucran la incubación de la misma con anticuerpos que deberían unirse específicamente con las proteínas a detectar. Una etapa común a todos los procedimientos de inmunodetección es el bloqueo, para evitar que los anticuerpos se peguen inespecíficamente a la membrana, con el riesgo asociado de tener un elevado background o falsos positivos.

El bloqueo implica la saturación de la membrana con proteínas no específicas. Se han descrito numerosas soluciones bloqueantes que han resultado efectivas. Las dos soluciones de bloqueo que son compatibles con casi cualquier sistema de detección son las soluciones de leche descremada y las soluciones de albúmina sérica bovina (BSA). También se recomienda el bloqueo en Tween-20 (detergente no iónico) si hay demasiado background. Sin embargo, es conveniente usar con cuidado los detergentes no iónicos ya que pueden solubilizar las proteínas transferidas a la membrana.

Soluciones de bloqueo comúnmente empleadas:

Agente bloqueante	Características
Leche en polvo	5% de leche descremada en PBS /TBS. Muy económico. Con poco 'background'. Se deteriora con rapidez. Es posible que tape algunos antígenos.
Leche / Tween-20	Económico. 5% de leche descremada en PBS/TBS – 0.1% Tween-20. Con poco 'background'. Se deteriora con rapidez. Es posible que tape algunos antígenos.
Tween-20	0.1% Tween-20, 0.02% azida sódico en PBS/TBS. Económico. Permite la tinción después de la inmunodetección. Puede quedar un 'background' residual.
BSA	3% BSA, 0,02% azida sódico en PBS. Bueno. Relativamente económico.

El bloqueo puede llevarse a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente, o bien se puede detener el Western blot en este paso, bloqueando la membrana toda la noche a 4°C. Es útil en este paso contar con un agitador para asegurar el íntimo contacto del agente bloqueante con todos los posibles puntos de la membrana.

3. Detección específica de proteínas sobre la membrana (REVELADO)

En la técnica de western blot se emplea comúnmente el sistema de inmunodetección indirecta. En este método se emplea un anticuerpo para localizar la proteína de interés (**anticuerpo primario**) y un segundo anticuerpo que detecta el anticuerpo primario (**anticuerpo secundario**). El anticuerpo secundario posee una marca capaz de producir una señal detectable.

El anticuerpo primario es un anticuerpo dirigido contra la proteína de interés. Si se trabaja con muestras de origen humano se necesita un anticuerpo que sea capaz de reconocer proteínas humanas. De este modo se generan anticuerpos monoclonales en ratones, capaces de reconocer proteínas humanas. Según la especie donde haya sido producido el anticuerpo primario, será la elección el anticuerpo secundario que utilizaremos (por ejemplo, si el anticuerpo primario es generado en ratones, tendremos que utilizar un anticuerpo secundario “anti-ratón” que puede ser producido inoculando un conejo).

En primer lugar, la membrana debe ser incubada con el anticuerpo primario. Este anticuerpo suele diluirse en la solución de bloqueo para así evitar el pegado inespecífico. El contacto de la membrana con el anticuerpo puede ser de 1 hora a temperatura ambiente, o bien toda la noche a 4°C. Luego del tiempo de exposición de la membrana al anticuerpo primario se procede al lavado de dicha membrana. Se utilizan 3 lavados de 10 minutos con solución buffer de lavado (PBS/TBS-Twen 0.1%). Luego del lavado, la membrana se incuba con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente y se realizan nuevamente 3 lavados de 10 minutos con el objeto de eliminar todo el anticuerpo secundario no unido.

Elección del sistema de revelado

El sistema de revelado empleado comúnmente en western blot está asociado a enzimas, que catalizan una reacción en la que se forma un precipitado coloreado, o en la que se emite luz. Las dos enzimas más empleadas para marcar los anticuerpos son la peroxidasa de rábano y la fosfatasa alcalina.

La utilización de sustratos colorimétricos se basa en la formación de un producto coloreado insoluble que precipita sobre la membrana en el lugar de acción de la enzima. Este tipo de reacciones es irreversible ya que una vez formado el precipitado no puede reutilizarse la membrana.

La reacción quimioluminiscente ocurre cuando la energía de una reacción química se emite en forma de luz. El sustrato quimioluminiscente más utilizado es el luminol. La reacción de oxidación de este sustrato es catalizada por la peroxidasa de rábano (HRP) en presencia de peróxido de hidrógeno. Inmediatamente después de su oxidación, el luminol se encuentra en un estado excitado del que pasa a la situación basal, reducida, más estable, emitiendo luz. Si esta reacción se produce sobre una membrana, y ésta se pone en contacto con una película de autorradiografía, queda marcada la banda sobre la placa radiográfica.

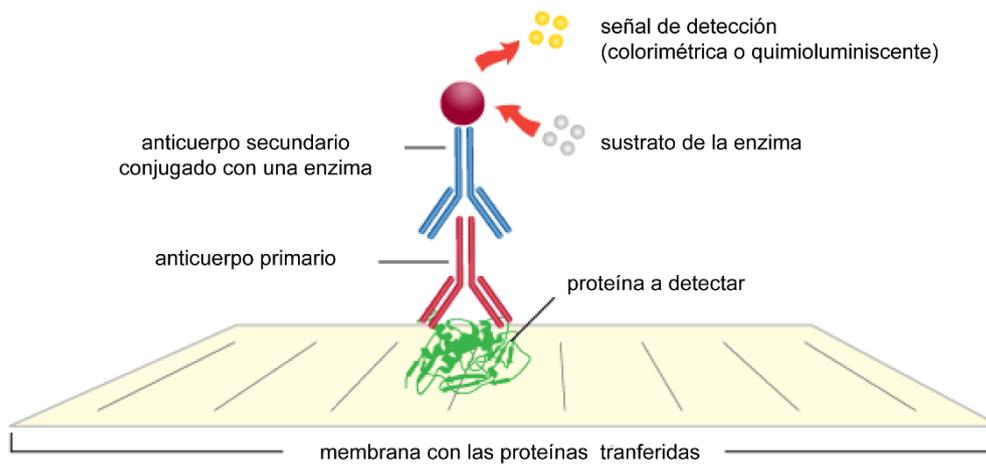


Figura 4: Sistema de detección antígeno-anticuerpo y sistema de revelado enzima-sustrato en el que se basa la técnica de Western Blot.

PROTOCOLO DE REALIZACIÓN DEL WESTERN BLOT

EQUIPAMIENTO

- Fuente de poder
- Cuba para electroforesis vertical
- Cuba para transferencia
- Sistema de armado de *sándwich* para transferencia
- Membranas de nitrocelulosa
- Papeles absorbentes
- Probetas para medir los volúmenes de las soluciones
- Balanza analítica
- Micropipetas automáticas
- Tips* azules y amarillos.

Reactivos

- > Solución de acrilamida 36,5% (p/v) y metilenbisacrilamida 1% (p/v). (Mantener la solución en frío y protegida de la luz) 30%.
- > Persulfato de amonio (APS) 10% (p/v).
- > Buffer del GEL SEPARADOR: Tris-HCl 1,5 M, pH 8.8 y SDS 0,4%
- > Buffer del GEL CONCENTRADOR: Tris-HCl 0,5 M pH 6.8 y SDS 0,2 %
- > Buffer de MUESTRA 5 X: Tris-HCl 0,6 M pH 6.8, SDS 6% (p/v); glicerol 30% (v/v); 2-mercaptoetanol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,01% (p/v).
- > SDS 10% (p/v).
- > N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED)
- > Buffer de CORRIDA ELECTROFORÉTICA: Tris 0,025 M; glicina 192 mM, pH 8,3; SDS 0,1% (p/v).
- > Buffer de TRANSFERENCIA: Tris 0,025 M; glicina 192 mM, pH 8,3; SDS 0,1% (p/v); metanol 20%.

- > Solución de ROJO PONCEAU: Rojo Ponceau 0.1% (p/v), ácido acético 5%(v/v)
- > Anticuerpo primario anti-GST de conejo
- > Anticuerpo secundario “anti-conejo” de cabra conjugado con peroxidasa.
- > Sistema de detección y revelado: luminol y peróxido de hidrógeno.
- > Buffer de LAVADO (TBS-Tween): 3gr Tris, NaCl 8 gr, KCl 0,2 gr csp 1 L. Para 1 L: 1000 ml de TBS 1x + 1ml Tween20.

A. Preparación del gel

1. Ensamblar los vidrios de acuerdo con las instrucciones del equipo y marcar el límite superior del gel separador (aproximadamente 1 cm después de los dientes del peine).
2. Preparar 13 ml del gel separador (10%) mezclando las soluciones de acuerdo a la tabla. Recordar agregar el APS y el TEMED exactamente antes de verter el gel entre los vidrios (son los catalizadores de la reacción de polimerización). Colocarlo inmediatamente entre los vidrios con pipeta Pasteur y dejar polimerizar a temperatura ambiente.

Solución	Volumen para 8%
Buffer del gel separador	1,25 ml
SDS 20%	0,1 ml
Solución acrilamida – bisacrilamida 30%	1,33 ml
Agua	2,234 ml
APS 10%	80 µl
TEMED	6 µl

3. Añadir una capa de 2 - 3 mm de etanol 95% o agua destilada sobre la superficie del gel en polimerización.
4. Retirar el etanol ó agua depositados sobre la superficie del gel separador.
5. Preparar 2,5 ml del gel concentrador (4%).

Solución	Volumen para 4%
Buffer del gel concentrador	0,625 ml
SDS 20%	0,025 ml
Solución acrilamida-bisacrilamida 30%	0,333 ml
Agua	1,472 ml
APS 10%	40 ml
TEMED	5 µl

6. Verter el gel concentrador e introducir el peine para formar los pocillos y dejar polimerizar.

B. Preparación de la muestra

7. Mezclar 1 volumen de la muestra de proteínas con 1/5 de volumen de Buffer de muestra.
8. Desnaturalizar las proteínas a 100°C durante 3 minutos.
9. Colocar las muestras en hielo hasta su utilización.

C. Siembra y corrida electroforética

10. Llenar la cuba con el buffer de electroforesis, asegurando cubrir todo el gel, antes de cargar la muestra.
11. Usando una micropipeta automática sembrar en los pocillos del gel las muestras, sin exceder el límite de volumen del pocillo (no más de 30 a 35 µl aproximadamente).
12. Realizar la corrida electroforética a 20 mA. La electroforesis se detiene cuando el frente de corrida alcanza la parte inferior del gel separador.
13. Sacar el gel entre los vidrios y proceder con la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa.

D. Transferencia

14. Sumergir los papeles de filtro y las esponjas en buffer de transferencia durante 5 minutos. Sumergir el gel luego de la migración en el mismo buffer.
15. Cortar la membrana de nitrocelulosa a la medida del gel (no tocar la membrana con las manos, usar guantes) y colocarla en el buffer de transferencia encima de uno de los papeles de filtro.
16. Colocar el gel encima del otro papel de filtro sumergido en el buffer de transferencia.
17. Formar el "sándwich". Organizarlo del siguiente modo: una parte del sistema de formación del sándwich se ubica hacia el cátodo (polo negativo, en general de color negro), a partir de éste colocar 1 esponja, un papel de filtro, el gel, la membrana, el otro papel de filtro y finalmente la otra esponja.
Importante: al armar el sándwich el gel debe quedar sobre la tapa negra y la membrana sobre la tapa blanca o transparente.
18. Cerrar el sistema de "sándwich" y colocarlo en la cuba de transferencia. Recordar que las proteínas migrarán hacia el ánodo por lo que el sándwich debe ser ubicado con la tapa negra hacia el electrodo negro (cátodo) y la tapa blanca o transparente hacia el electrodo rojo (ánodo).
19. Aplicar el campo eléctrico durante 1 hora a 100 V.

20. Al terminar la hora, abrir el “sándwich” y retirar la membrana (tener especial cuidado de no tocar la membrana con la mano porque contiene las proteínas transferidas).

21. Colocar la membrana en un recipiente y lavarla con el buffer de lavado 10 minutos en agitación.

E. Tinción de la membrana

22. Colocar la solución de Rojo Ponceau sobre la membrana e incubar durante 5 minutos en agitación.

23. Retirar la solución de Rojo Ponceau y lavar la membrana con aguados veces.

24. Observar las bandas de las proteínas transferidas a la membrana.

En el TP se realizarán todos los pasos hasta la visualización de proteínas transferidas a la membrana mediante la coloración con Ponceau. Los pasos siguientes no serán realizados por cuestión de tiempo, pero si detallan a continuación para describir el desarrollo completo del western blot, hasta el revelado específico de la proteína Ral-GST en la membrana.

F. Bloqueo de la membrana

25. Preparar leche descremada al 5% en TBST.

26. Colocar la solución de leche y la membrana en un recipiente durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. En este paso se puede suspender el western blot, permitiendo el bloqueo de la membrana durante toda la noche a 4°C.

G. Anticuerpo primario

27. Preparar la dilución del anticuerpo primario (1:5000): colocar 1 µl de anticuerpo de conejo anti-GST en 5 ml de TBS.

28. Colocar sobre la membrana la dilución de anticuerpo primario e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante.

H. Lavados

29. Luego de permitir la interacción antígeno-anticuerpo primario, retirar la solución del anticuerpo y lavar la membrana 3 veces con buffer de lavado durante 10 minutos cada una con agitación.

I. Anticuerpo secundario

30. Preparar la dilución del anticuerpo secundario (1:5000): colocar 1 µl de anticuerpo de cabra anti-conejo acoplado a HRP en 5 ml de TBS.

31. Colocar sobre la membrana la dilución de anticuerpo secundario e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante.

32. Retirar la solución del anticuerpo y lavar la membrana 3 veces con buffer de lavado durante 10 minutos cada una con agitación.

J. Detección y revelado

36. Revelar mediante el agregado del reactivo quimioluminiscente que contiene luminol y peróxido de hidrógeno, el cual al exponer la membrana sobre una placa radiográfica permitirá la detección de la banda proteica.

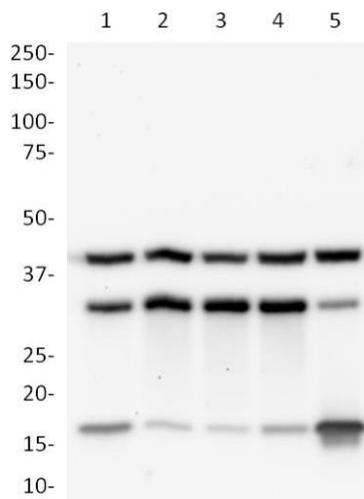


Figura 5: Ejemplo de una membrana revelada con el sistema luminol-peróxido de hidrógeno.

Biología Molecular y Celular

Trabajo práctico de Laboratorio N° 9

Diagnóstico molecular de *Mycoplasma genitalium*

OBJETIVOS

- Comprender el fundamento teórico de la técnica de PCR.
- Conocer la aplicación de la técnica en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.
- Determinar la presencia de la bacteria *Mycoplasma genitalium* en muestras humanas.
- Aprender a interpretar los resultados obtenidos a partir de la reacción de amplificación.

INTRODUCCIÓN

Los métodos de amplificación y detección de ácidos nucleicos son útiles para el diagnóstico y manejo de una variedad de enfermedades. De estas metodologías la más ampliamente utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante esta técnica es posible amplificar cantidades diminutas de ácidos nucleicos y generar millones de copias idénticas de la secuencia del ADN o ARN blanco en cuestión de horas. Esto permite tener una alta sensibilidad y una gran especificidad.

Recientemente el desarrollo de la PCR ha tenido un impacto significativo en el diagnóstico y manejo de muchas enfermedades infecciosas. Los ensayos de PCR pueden detectar directamente en los especímenes clínicos, de forma rápida y precisa, la presencia de microorganismos patógenos de lento crecimiento, tales como *Chlamydia*, micoplasmas, micobacterias, etc., o que no pueden ser cultivados tales como el virus del herpes, hepatitis, papilomavirus y citomegalovirus. También se han desarrollado ensayos para la medición de la carga viral, los cuales han sido de gran utilidad para un mejor pronóstico de vida de los pacientes con infecciones por VIH o hepatitis C. Por lo tanto, esta técnica constituye una poderosa herramienta para el diagnóstico rápido y preciso de una serie de enfermedades infecciosas.

Fundamento

La técnica de PCR permite, mediante la utilización de una ADN polimerasa, la amplificación de regiones específicas de ADN de simple cadena que actúa como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria. Estas hebras moldes se obtienen cuando el ADN a amplificar se calienta a la temperatura de desnaturalización (94°C), produciéndose la separación de la doble hebra de ADN. Para comenzar con la síntesis de la cadena complementaria se requiere de la presencia de cebadores o primers, que son secuencias cortas de nucleótidos sintéticos (oligonucleótidos), los cuales hibridan de forma específica con las dos hebras complementarias de ADN. Los cebadores se diseñan de tal manera que hibriden en los extremos opuestos de cada hebra de la región de interés. Una vez hibridados los primers, una ADN polimerasa termoestable produce la extensión de ambas cadenas complementarias. Concluido el primer ciclo de amplificación, la mezcla de reacción se calienta nuevamente para separar la cadena original de la

nueva, las cuales quedan disponibles para nuevos ciclos de hibridación del primer, síntesis de ADN, separación de las cadenas, y así sucesivamente.

Es decir que básicamente, la amplificación de la secuencia de interés se consigue al realizar una serie de ciclos repetitivos que consisten en:

1. Desnaturalización del ADN molde.
2. Hibridación de los primers con el molde.
3. Síntesis del ADN complementario mediante la acción de la enzima ADN polimerasa termoestable.

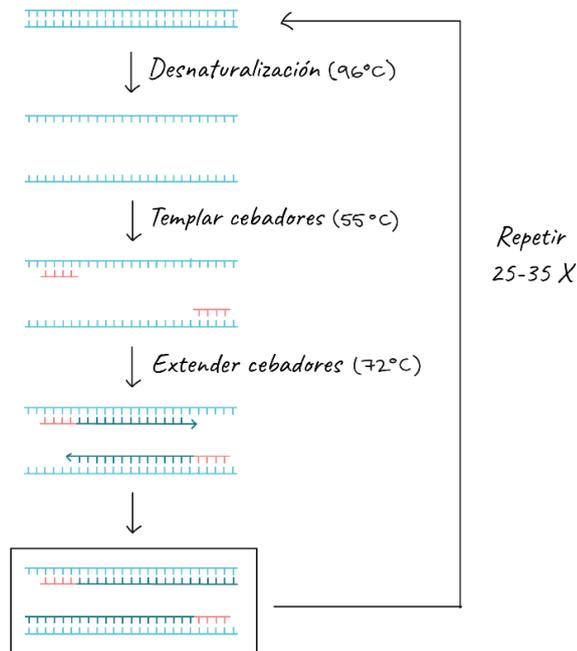


Figura 1: Pasos de la reacción de amplificación por PCR.

El resultado de una reacción de PCR es que al final de n ciclos, la reacción contiene un máximo teórico de 2^n moléculas de ADN de doble cadena que son copias de la secuencia de ADN comprendida entre los primers específicos. Si se realizan 20-30 ciclos del proceso de PCR, se pueden obtener varios millones de copias de la secuencia de interés, flanqueada por los primers utilizados en la amplificación.

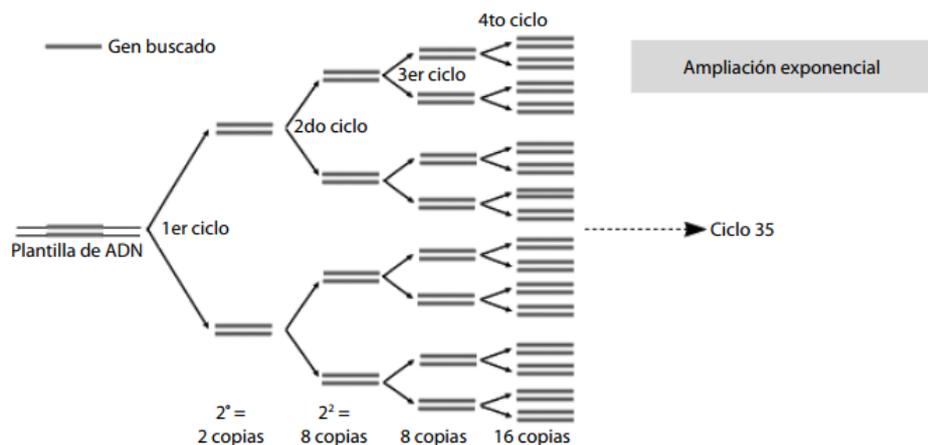


Figura 2: Amplificación exponencial del ADN durante la reacción de PCR.

Ventajas y usos

- Se dispone, en forma rápida y eficaz, de cantidades suficientes de una determinada secuencia de DNA para su posterior estudio molecular.
- Diagnóstico de patologías genéticas o adquiridas
- Investigación sobre los defectos moleculares todavía no definidos
- Aplicación a la medicina forense y legal
- Detección de patógenos responsables de enfermedades infecciosas

En el Trabajo Práctico utilizaremos la técnica de PCR como método diagnóstico de un microorganismo patógeno de transmisión sexual. *Mycoplasma genitalium* es una bacteria de transmisión sexual que causa uretritis en hombres y múltiples síndromes inflamatorios del tracto reproductor en la mujer. El diagnóstico de esta infección mediante métodos bacteriológicos convencionales resulta laborioso y poco práctico, ya que demora hasta 90 días en crecer en medios de cultivo específicos debido a su limitado metabolismo. Por este motivo, el método de elección en la clínica para la detección de este patógeno es la PCR, ya que constituye una herramienta sensible, rápida y específica.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A- AMPLIFICACIÓN POR PCR DE MUESTRAS DE ADN

La muestra a amplificar corresponde a ADN total extraído a partir de muestras de secreciones cervicales recolectadas mediante raspado vaginal de mujeres en edad reproductiva.

M. genitalium será detectado mediante amplificación por PCR de un fragmento de 281 pb correspondiente al gen que codifica para la adhesina bacteriana MgPa con el juego de primers específicos:

MgPa-1: 5'-AGT TGA TGA AAC CTT AAC CCC TTG G-3'

MgPa-3: 5'-CCG TTG AGG GGT TTT CCA TTT TTG C-3'

Los pasos son los siguientes (utilizar guantes para todas las operaciones: la piel contiene DNAsas y RNAsas que degradan la reacción):

1. Preparación de la mezcla de reacción de PCR:

Agregar en un tubo de PCR de 0,5 ml los siguientes reactivos:

Reactivos	µl
H ₂ O	24.6 µl
Buffer 10X	5 µl
Cl ₂ Mg 50 mM	5 µl
dNTPs	5 µl
Primer MgPa-1	2.5 µl

Primer MgPa-3	2.5 μ l
DNA	5 μ l
Taq	0.4 μ l
Volumen final	50 μl

Nota:

- Los 5 μ l de ADN genómico del paciente corresponden a unos 200 ng de ADN.
- Mezclar bien y asegurarse que todo el material quede en el fondo del tubo.
- Agregar sobre la mezcla (sin tocarla) 20 μ l de aceite mineral (vaselina líquida) en caso de no poseer hot lid el termociclador.

La mezcla final contendrá

- dATP 125 μ M, dTTP 125 μ M, dCTP 125 μ M, dGTP 125 μ M (los dNTP son nucleótidos activados que se usan para construir las hebras de ADN)
- Primer 5' 1 μ M (define el extremo 5' del sector de ADN a amplificar)
- Primer 3' 1 μ M (define el extremo 3' del sector de ADN a amplificar)
- Taq polimerasa 1 unidad (extiende la hebra de ADN naciente)
- Cl_2Mg 5 mM (actúa como cofactor de la enzima Taq polimerasa)
- ADN genómico 200 ng (es el molde donde van a hibridar los primers)
- Buffer (Tris 200 mM pH 8.4, KCl 500 mM), (otorga las condiciones de pH e iones necesarias para la reacción)

2. Programación del termociclador:

El termociclador será programado de la siguiente manera:

- > Iniciación 94 °C durante 3 min (desnaturalización del ADN inicial)
- > 35 ciclos de 94 °C durante 1 min (desnaturalización del ADN para iniciar cada ciclo)
60 °C 1 min (temperatura de hibridación de los primers con el ADN)
72 °C 1 min (temperatura óptima para que la Taq polimerasa extienda las cadenas)
- > Finalización 72 °C durante 5 min (brinda el tiempo necesario para que se completen todas las cadenas que se están sintetizando)

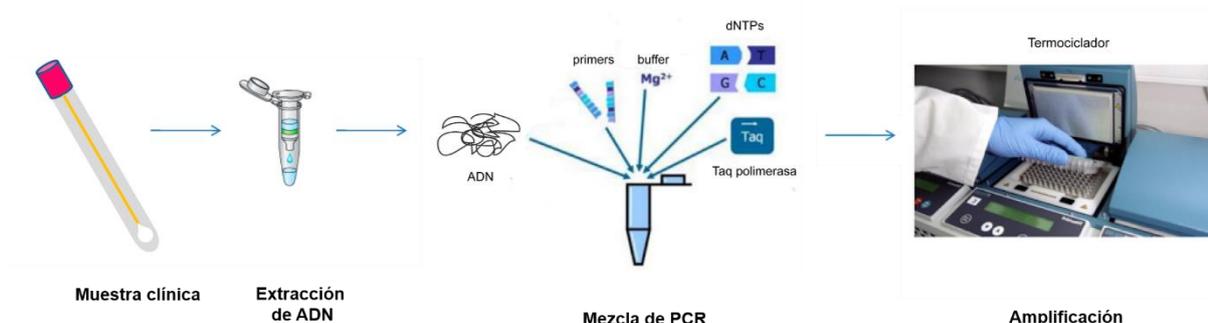


Figura 3: Pasos de la reacción de amplificación por PCR.

B- ANALISIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DEL PRODUCTO DE PCR AMPLIFICADO

Se correrá una electroforesis en gel de agarosa al 1% en Buffer TAE a 100 Volts hasta que el frente de corrida alcance 2/3 del gel. Serán sembrados 5 µl de cada una de las muestras. Antes de sembrar, las muestras deben ser mezcladas con Loading buffer 6X (0.25% azul de bromofenol en glicerol al 30%). Luego de terminada la corrida, el gel se teñirá con SYBR Safe para su posterior análisis en el transiluminador.

Resultados esperados: se espera detectar la presencia de una banda amplificada de 281 pb en las muestras que resulten positivas para la infección con *M. genitalium*.