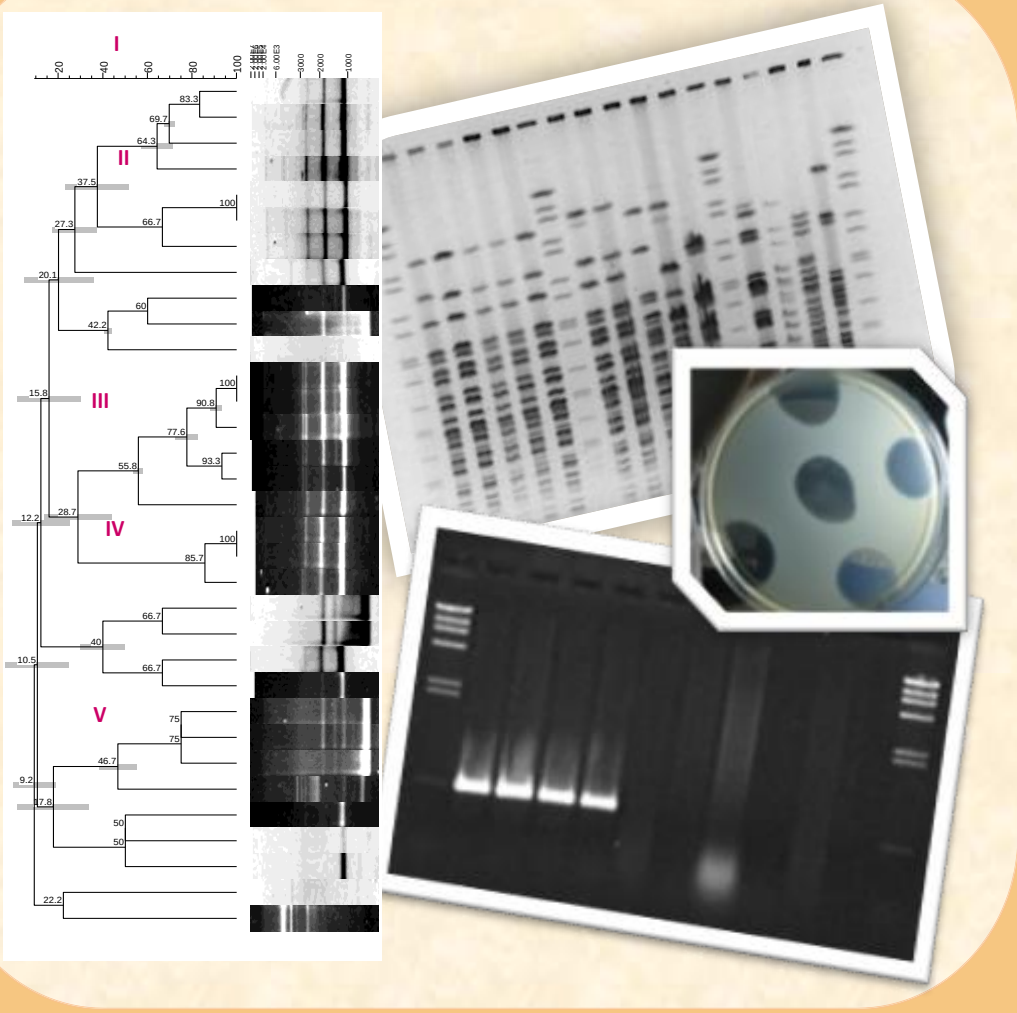
# MANUAL DE BIOLOGÍA MOLECULAR

## PROCEDIMIENTOS BÁSICOS




*Este manual presenta protocolos básicos de laboratorio, permitiendo introducir al estudiante a las numerosas herramientas moleculares existentes hoy en día, y a los impactantes alcances de esta ciencia en el mundo científico. "Es cierto que muchas veces los grandes descubrimientos se han realizado sin buscarlos directamente, pero el espíritu no preparado es incapaz de detectar esa sorpresa de la naturaleza": Luis Franco Vera.*

**Universidad de Nariño**
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**
**Departamento de Biología**

# MANUAL DE BIOLOGÍA MOLECULAR
## PROCEDIMIENTOS BÁSICOS

**Edith Mariela Burbano Rosero**
Bióloga con Énfasis en Microbiología Industria l- Universidad de Nariño
Magistra en Microbiología Industrial-Pontificia - Universidad Javeriana
Doctora en Ciencias, *Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo*-Brasil
Docente Investigadora Grupo de Biotecnología Microbiana - Universidad de Nariño
Docente Investigadora Grupo de Biología Matemática y Matemática Aplicada - Universidad de Nariño

**Bianca Caetano de Almeida**
*Graduação em Ciências Com Habilitação Em Biologia - Universidade Metodista de Piracicaba, UNIMEP, Brasil.*
Doctora en Ciencias, *Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo*-Brasil
Pós-Doctorado, *Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo*-Brasil

**Iván Darío Otero Ramírez**
Biólogo - Universidad de Nariño
Estudiante de Maestría en Microbiología Agroindustrial – Universidad Católica de Manizales
Investigador Grupo de Biotecnología Microbiana - Universidad de Nariño.

**Sandra Lorena Álvarez**
Bióloga - Universidad de Nariño
Magister en Ciencias Agrarias - Universidad de Nariño
Docente Investigadora Grupo Genética y Evolución de Organismos Tropicales – GENPAT
Docente Investigadora Grupo Ecología Evolutiva

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO**
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**
**2017**

Manual de Biología Molecular: Procedimientos Básicos / Edith Mariela Burbano Rosero... [et al.].- Pasto: Editorial Universitaria – Universidad de Nariño, 2017.

85pág. : il.

Contenido: Seguridad, disposición de residuos sólidos y reconocimiento del laboratorio de biología molecular; Extracción de ácidos nucleicos; Verificación y cuantificación de ácidos nucleicos; Reacción en cadena de la polimerasa; Marcadores Moleculares.

Incluye referencias bibliográficas, gráficas
ISBN: 978-958-8958-31-6

1. Estructura molecular. 2. Biología Molecular 3. Biología Molecular procedimientos básicos I. Caetano de Almeida, Bianca II. Otero Ramírez, Iván Darío III. Álvarez, Sandra Lorena

574.8 M294 – SCDD –Ed.20 Biblioteca Alberto Quijano Guerrero

# MANUAL DE BIOLOGÍA MOLECULAR
# PROCEDIMIENTOS BÁSICOS

**Edith Mariela Burbano Rosero, Bianca Caetano de Almeida, Iván Darío Otero Ramírez, Sandra Lorena Álvarez.**

Derechos reservados ©2017.

Prohibida la reproducción total o parcial de este material, sin autorización por escrito de la Universidad de Nariño.

ISBN: 978-958-8958-31-6

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad la biología molecular se considera como una ciencia fundamental, dinámica, interdisciplinaria e internacional, con un gran impacto sobre la sociedad y en continuo crecimiento. Es una de las ciencias más utilizadas en el campo de la investigación y uno de los pilares activos más promisorios para el desarrollo del conocimiento.

Debido a su relevancia, es necesario que profesionales con perfiles relacionados a las ciencias biológicas, biomédicas, agropecuarias y afines, conozcan y manejen los conceptos básicos de algunas de sus herramientas encaminadas a la innovación de nuevas formas de diagnóstico, prevención, tratamiento, biorremediación y desarrollo tecnológico aplicado al mejoramiento de la calidad de vida y el desarrollo sostenible de los ecosistemas.

En este contexto, el manual pretende brindarles a los estudiantes los fundamentos para comprender y entender desde una dinámica práctica, los procesos vitales de los seres vivos en función de las características de su estructura molecular.

Adicionalmente, otro aspecto sobresaliente a ser considerado con la aplicación de este manual en las prácticas académicas, es el desarrollo de competencias científicas, enfocadas a la adquisición de habilidades cognitivas básicas (observación, descripción, comparación, toma de datos, revisión bibliográfica, etc.), habilidades procedimentales (capacidad para seguir un procedimiento, toma de muestras, recolección de datos, apropiación tecnológica para el desarrollo de problemas), habilidades metacognitivas, y habilidades investigativas, todas ellas de suma importancia en la formación científica de nuestros profesionales.

Este módulo está dirigido a todos los estudiantes que en sus programas de pregrado contemplan un componente biológico, que desean adquirir y poner en práctica algunas de las técnicas más sencillas y de amplio uso en la biología molecular, protocolos que han sido acoplados y ajustados y que pueden ser implementados en los laboratorios de docencia universitaria.

Con la finalidad de lograr una lectura dinámica, el documento ha sido organizado en varios ítems: Introducción básica, objetivos, materiales, procedimiento a r|ealizarse, cuestionario y referencias bibliográficas. Complementariamente, la parte final de cada práctica contempla la preparación de las soluciones correspondientes.

Esperamos con esta primera parte enfocada a ADN, apasionarlos por una de las ciencias más fascinantes y multidisciplinarias, desde la cual se pueden resolver infinidad de problemas y alcanzar desafíos científicos y tecnológicos.

Los autores

**PROTOCOLOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**CONTENIDO** **Página**


**CAPITULO I**
**SEGURIDAD, DISPOSICIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS Y RECONOCIMIENTO DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR.**

**1.1 SEGURIDAD EN EL LABORATORIO** **5**
**1.2 DISPOSICIÓN DE RESIDUOS** **5**
1.2.1 Disposición de residuos peligrosos **6**
1.2.1.1 Residuos biológicos **7**
1.2.1.2 Residuos orgánicos **7**
1.2.1.3 Bromuro de etidio **7**
**1.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL-MANEJO DE LA MICROPIPETA** **11**

**CAPITULO II**
**EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

**2.1. EXTRACCIÓN DE ADN** **15**
**2.1.1 Protocolo para extracción de ADN genómico bacteriano por el método de CTAB escala mínima** **17**
**2.1.2 Protocolo para extracción de ADN genómico de levadura** **21**
**2.1.3 Protocolo Miniprep para extracción de ácidos nucleicos de fagos (colifagos)** **24**
**2.1.4 Protocolo para extracción de ADN plasmídico** **27**
**2.1.5 Protocolo para extracción de ADN de sangre periférica** **30**
**2.1.6 Protocolo para extracción de ADN de tejido fresco** **33**
**2.2. EXTRACCIÓN DE ARN** **36**
**2.2.1 Protocolo para extracción de ARN de tejido fresco** **36**
**2.2.2 Protocolo para extracción de ARN de células (1.5 x $10^7$ células)** **37**

**CAPITULO III**
**VERIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

**3.1 ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS** **40**
**3.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN POR ESPECTROFOTOMETRÍA** **46**
**3.3 DETERMINACIÓN DE TAMAÑO MOLECULAR USANDO EL PROGRAMA PHOTO CAPTW** **50**

**CAPITULO IV**
**REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

**4.1 REACCIÓN DE PCR** **52**

**CAPITULO V**
**MARCADORES MOLECULARES**

**5.1 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA E IDENTIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS** **58**
**5.2 PROTOCOLO DE DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (RFLP)** **66**
**5.3 POLIMORFISMOS GENERADOS POR BOX-PCR** **71**
**5.4 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ADN USANDO LOS PROGRAMAS BIOEDIT RDP II Y MEGA** **76**

# CAPITULO I
# SEGURIDAD, DISPOSICIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS Y RECONOCIMIENTO DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

## 1.1 SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

El correcto manejo y eliminación de material descartable y de residuos patogénicos se debe realizar según las normas legales vigentes y de acuerdo al manual de procedimientos de seguridad e higiene establecido en los laboratorios de biología molecular. Estas normas de seguridad son equivalentes a las que rigen a los laboratorios clínicos en lo que se refiere a manejo y descontaminación, así como también a los cuidados orientados a preservar la integridad de los operadores y el medio ambiente.

Para efectos de evitar contaminaciones con material genético que alterarían los resultados obtenidos con una determinada metodología, se pauta una circulación unidireccional para el procesamiento, evitando los fenómenos de transferencia y contaminación cruzada.

Durante el trabajo experimental en Biología molecular se utilizan reactivos potencialmente peligrosos y equipos de mucho cuidado; así mismo, se debe garantizar el bienestar de los usuarios del laboratorio, por ello es necesario adoptar las normas de bioseguridad que se describen a continuación:

1. Para trabajo en laboratorio se deben utilizar prendas de vestir adecuadas, preferiblemente que permitan aislar el 100 % de nuestro cuerpo y así evitar accidentes por derramamiento de reactivos o el uso inadecuado del material del laboratorio.
2. Los anillos, manillas y demás accesorios que interfieran con el trabajo en laboratorio deben retirarse antes de iniciar el procedimiento.
3. Debe usarse zapatos adecuados, completamente cerrados y con suela antideslizante.
4. Las personas con cabello largo deben recogerlo; preferiblemente se debe usar gorro descartable.
5. Las batas de laboratorio deben ser de manga larga y deben abotonarse completamente para la protección contra contaminación o accidentes por la manipulación inadecuada de reactivos. Así mismo, la bata debe quitarse al salir del laboratorio para evitar transferencia de contaminantes en las áreas normalmente limpias o la introducción de contaminantes desde otras áreas al espacio asignado para biología molecular.
6. Se debe realizar un lavado de manos al comenzar y al finalizar los procedimientos, antes de dejar el laboratorio y en cualquier momento después de la manipulación de materiales sospechosos de contaminación.
7. Se recomienda el uso de gafas y máscaras de protección para evitar el impacto de objetos, sustancias perjudiciales y luz ultravioleta.
8. Las sustancias deben ser pipeteadas con micropipeta, peras, pipeteadores; nunca debe hacerse con la boca.
9. El uso de guantes es exclusivo para la manipulación del material y reactivos utilizados en el procedimiento; se debe evitar abrir puertas, contestar celulares, tocar teclados de computadores o tablets, tocarse la cara y salir del laboratorio con los guantes puestos.
10. Las mujeres en estado de embarazo deben informar de su situación a la persona que esté dirigiendo el laboratorio, puesto que deberán evitar exponerse a vibraciones, radiaciones, reactivos peligrosos y la manipulación inadecuada del material biológico que se dispone para la realización del procedimiento.
11. Las áreas de trabajo deberán ser desinfectadas antes y después de ejecutar el trabajo en laboratorio; así mismo, al finalizar la práctica se dejará organizado el sitio de trabajo.
12. La manipulación de reactivos, materiales y equipos durante el desarrollo del procedimiento deberá realizarse de manera correcta bajo la asesoría y supervisión del profesional a cargo y en ningún caso se debe manipular algo si no se está seguro de su funcionamiento.

13. Para la manipulación de patógenos se debe estipular el uso obligatorio de una cabina de flujo laminar vertical tipo II, la cual será desinfectada haciendo uso de alcohol 70 % con posterior exposición de 15 minutos con luz ultravioleta; después de su uso se debe proceder de la misma manera, se debe tratar con alcohol 70 % y nuevamente quince minutos con U.V. Cada proceso de utilización de luz ultravioleta debe registrarse en el documento de uso de la cabina, el cual debe estar en lugar visible totalizando hasta ese momento el tiempo de actividad de las lámparas, es recomendable que después de 200 horas de uso, se sustituyan por unas nuevas.
14. Se debe usar campana de extracción cuando exista posible manipulación de reactivos peligrosos o solventes orgánicos.
15. Es prohibido comer, beber, fumar, almacenar alimentos y usar cosméticos en el laboratorio.
16. En general se debe mantener un comportamiento adecuado dentro del laboratorio y cualquier anomalía, debe informarse a la persona responsable de la práctica.

## 1.2 DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

### 1.2.1 Disposición de residuos peligrosos

Un residuo peligroso es aquel desecho que por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables, infecciosas o radiactivas puede causar riesgos, daños o efectos no deseados, directos o indirectos, a la salud humana y el ambiente. Así mismo, se considerará residuo peligroso a los empaques, envases y embalajes que estuvieron en contacto con ellos (Congreso de la República. Ley 1252 de noviembre de 2008. Artículo 3).

La Resolución 1362 del 2 de agosto de 2007 expedida por el antes denominado, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, hoy Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, reglamentó el registro de Generadores de Residuos o Desechos Peligrosos [GRDP] con base en lo estipulado en el artículo 27 del decreto 4741 del 30 de diciembre de 2005, de acuerdo con los estándares para el acopio de datos, procesamiento, transmisión y difusión de la información que estableció el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales [IDEAM] para tal fin (Resolución 043 de 2007). Por su parte, una vez el IDEAM recibe en el Sistema de Información Ambiental la información transmitida por parte de las autoridades ambientales, debe poner a disposición del público en su página Web las salidas de información nacionales consolidadas referentes a las cantidades anuales de residuos o desechos peligrosos generados por actividad productiva, por corriente o tipo de residuos, por tipo de residuos almacenados, aprovechados, tratados y dispuestos y demás indicadores que considere de interés.

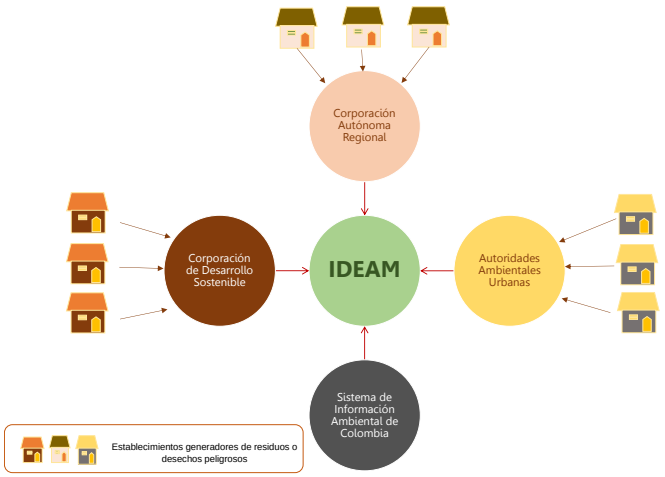



**Figura 1**. Flujo de información sobre generación y manejo de residuos peligrosos en Colombia-Registro de generadores de residuos o desechos peligrosos. Fuente: Modificado por los autores de

IDEAM, Informe Nacional sobre Generación y Manejo de Residuos o Desechos Peligrosos en Colombia, año 2011. Bogotá, D. C., 2012.

Como se observa en la Figura 1, el proceso de captura de información inicia con una auto-declaración vía Web realizada por parte de los GRDP a través del Registro de Generadores de Residuos o Desechos Peligrosos, en la que reportan los tipos y cantidades de residuos peligrosos generados en sus establecimientos, y el manejo que dieron a cada una de éstos, posterior a su generación.

En la Figura 2 se presenta el proceso adelantado para la inscripción, diligenciamiento y actualización de la información en el [GRDP], así como las actividades adelantadas tanto por las autoridades ambientales del país, a nivel regional y nacional, respectivamente.

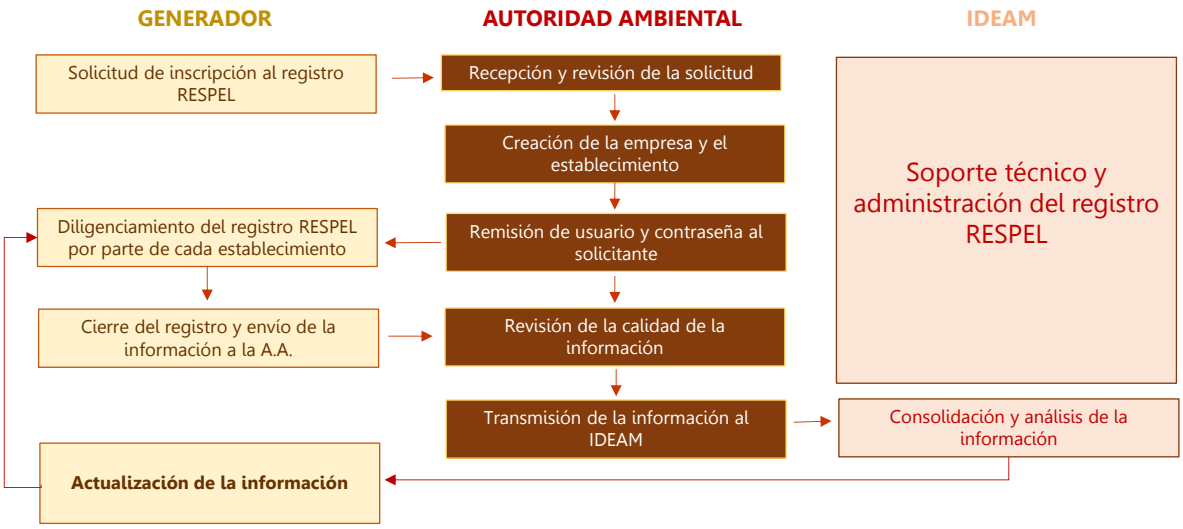



**Figura 2**. Procedimiento para el registro de generadores de residuos o desechos peligrosos. IDEAM, Informe Nacional sobre Generación y Manejo de Residuos o Desechos Peligrosos en Colombia, año 2011. Bogotá, D. C., 2012. Fuente: Modificado por los autores.

**1.2.1.1 Residuos biológicos.** La definición de residuos biológicos peligrosos es cualquier material que esté o haya estado en contacto con animales o productos de origen animal. Esto incluye todos los residuos asociados a las características microbiológicas (bacterias y virus) y cualquier elemento que ha estado en contacto con las enzimas y ADN recombinante. Por lo tanto, la mayoría de las puntas y los tubos utilizados en procedimientos de biología molecular son peligrosos; por consiguiente, todos los materiales líquidos y sólidos contaminados o infectados deben ser esterilizados en autoclave durante 40 minutos antes de su disposición final o reutilización.

**1.2.1.2 Residuos orgánicos.** Los residuos orgánicos como el fenol, cloroformo y alcohol isoamílico no deben ser descartados en los lavamanos; se deben almacenar en recipientes reforzados y entregados al servicio de recolección especializada.

**1.2.1.3 Bromuro de etidio.** El bromuro de etidio es un agente intercalante comúnmente empleado para teñir ácidos nucleicos en diversas técnicas moleculares y citogenéticas; es un mutágeno conocido y posiblemente también actúe como carcinógeno y teratógeno. A altas concentraciones el bromuro de etidio es irritante para los ojos, la piel las membranas mucosas y las vías aéreas superiores. La manipulación de todo material contaminado con este reactivo debe realizarse con guantes de nitrilo, ya que los guantes de latex son más susceptibles a ser permeados. Los laboratorios de biología molecular tradicionalmente emplean tanto soluciones concentradas de bromuro de etidio (solución stock 10 mg/mL), así como soluciones diluidas (buffers de

electroforesis a 0.5 ug/mL). Los geles de agarosa, toallas de papel y guantes contaminados, al igual que el carbón activado empleados para descontaminar los buffers deben ser colocados en bolsas de residuos tóxicos al término de su uso.



- En realidad, este procedimiento únicamente elimina el bromuro de etidio presente en el buffer. El carbón activado retiene el bromuro de etidio en estado tóxico, por lo cual es necesario eliminarlo apropiadamente para evitar la liberación de este agente al medio ambiente.

**Condiciones previas a tenerse en cuenta en la manipulación de bromuro**

- Mantener el envase del reactivo cerrado y en refrigeración (entre 2 °C y 8 °C).
- La manipulación de este reactivo debe hacerse en un área acondicionada para este fin (paredes y pisos lisos, lavatorios de acero cromado, mesas de trabajo fijos preferentemente de material inerte y resistente a la corrosión, bolsas amarillas para desecho de residuos especiales, recipientes rígidos para descartar residuos punzocortantes, sistema de descontaminación de bromuro de etidio, espátulas de plástico, papel toalla en dispensadores de plástico, entre otros).
- Manipular el reactivo dentro de una campana extractora de gases químicos, considerando las recomendaciones de la ficha de seguridad y las medidas de bioseguridad correspondientes (respirador para vapores químicos, gafas de seguridad, guantes de caucho de nitrilo, bata de laboratorio manga larga).
- El material usado en el área de trabajo con bromuro de etidio no debe salir del área sin haber recibido tratamiento previo.

**Tratamiento de la solución de trabajo conteniendo bromuro de etidio**

- Armar el sistema de descontaminación de bromuro de etidio, que consiste en un embudo de plástico de aproximadamente 30 cm de diámetro cuyo interior contiene dos capas de papel filtro simple seguido de una doble capa de gasa.
- Conectar el embudo a un recipiente de plástico para almacenar la solución filtrada.
- Sobre este revestimiento colocar el carbón activado (se recomienda 100 mg de carbón activado por cada 100 mL de solución).
- Agregar la solución de trabajo conteniendo el bromuro de etidio en el sistema de descontaminación. **Nota: Utilizar el mismo carbón activado hasta verificar que pierda la capacidad de inactivar al bromuro de etidio.**

**Evaluación de la capacidad de inactivación del carbón activado**

- Tomar un volumen de 5 µL de la solución filtrada y mezclar con 5 µL de ADN > 100 ng/µL.
- Evaluar la fluorescencia de la mezcla sobre un transiluminador.
- Usar un control de fluorescencia consistente en 5 µL de ADN > 100 ng/µL mezclado con 5 µL de solución de trabajo de bromuro de etidio sin inactivar.
- La presencia de fluorescencia en la solución filtrada indica que el carbón activado no está inactivando al bromuro de etidio y deber ser cambiado por uno nuevo.

**Limpieza del área de trabajo**

- Usar en todo momento equipos de protección personal (bata de laboratorio manga larga, gafas, guantes gruesos, mascarilla y botas).
- Lavar cinco veces las superficies con paños humedecidos con solución de descontaminación.
- Utilizar un paño diferente cada vez que se realice el lavado.
- Remojar por aproximadamente una hora cada uno de los paños utilizados durante el paso anterior, en un recipiente conteniendo solución de descontaminación (Anexo A).
- Neutralizar la solución de descontaminación con bicarbonato de sodio, verificar que el pH esté entre 5 y 9.

- Verificar la presencia de bromuro de etidio en los paños y en las superficies utilizando una lámpara de luz ultravioleta.

### Eliminación de los residuos

- Eliminar la solución filtrada de bromuro de etidio por el desagüe.
- El carbón activado utilizado para el filtrado debe ser segregado como residuo peligroso para su incineración en bolsas amarillas para desechos de residuos especiales.
- Eliminar todo el material contaminado con bromuro de etidio (guantes, geles de agarosa, geles de poliacrilamida, papel filtro, puntas de plástico, etc.) en los recipientes y bolsas acondicionadas según PRT-CNSP005 para manejo, transporte y eliminación de residuos.
- Eliminar la solución de descontaminación neutralizada por el desagüe y los paños utilizados en los recipientes y bolsas acondicionadas según manejo, transporte y eliminación de residuos.

### Consideraciones finales

- Al finalizar el trabajo lavarse la cara y las manos con abundante agua.
- En caso de accidentes seguir las pautas para primeros auxilios descritos en las fichas de seguridad del reactivo.
- Las soluciones solubles en agua no peligrosas pueden ser descartadas directamente en el lavamanos.

## Anexo A. Preparación de la solución de descontaminación

- **Reactivos**: Nitrito de sodio ($NaNO_2$). Ácido hipofosforoso ($H_3PO_2$).
- **Procedimiento**: Disolver en un frasco de vidrio 4,2 g de $NaNO_2$ en 20 mL de $H_3PO_2$ a 50 % y aforar a 300 mL con agua destilada. Verificar el pH el cual debe ser de 1,8. El volumen a preparar depende del tamaño de la superficie a descontaminar.




## Cuestionario

1. ¿Qué riesgos se pueden presentar al desarrollar un procedimiento en el laboratorio?
2. ¿Cuáles son las sustancias químicas de interés relacionadas con la generación de residuos o desechos peligrosos en Colombia?
3. ¿Cuál es el aprovechamiento o valorización de residuos peligrosos en Colombia?
4. ¿Cuál es el procedimiento que realiza tu institución para la disposición final de los residuos obtenidos de los diferentes procedimientos de laboratorio?
5. ¿Consulta cuáles empresas de recolección de residuos existen en tu ciudad y en el país y que tipo de residuos recolectan?

## Referencias bibliográficas


- Benavidez, L. (2015). Guía para la definición y clasificación de residuos peligrosos. CEPIS. www.cepis.ops-oms.org/eswww/fulltext/gtz/defclarp/guiares.html.
- Centro Nacional de Salud Pública. (2006). Manejo, tratamiento y eliminación del bromuro de etidio. ITTC_CNSP_068. Edición Número 1. Pág. 1-2.
- Guía para el Manejo de Residuos Químicos. (2005). Universidad Pedagógica Nacional.
  Departamento de Química, Bogotá. Documento inédito.
- Pinzón, F., Hoyos, M., Ramírez, J., IDEAM-Subdirección De Estudios Ambientales. (2012). Informe Nacional sobre Generación y Manejo de Residuos o desechos peligrosos en Colombia. Bogotá, D.C. 62 pág. ISBN: 978-958-8067-59-9.
- Plan de gestión integral de residuos peligrosos. (2007). Universidad Nacional de Colombia.

- Puerta, C. y Urueña, C. (2005). Prácticas de Biología Molecular. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Colección Biblioteca del Profesional. 100p.
- República de Colombia. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Decreto 4741 de 2005. Por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y el manejo de los residuos o desechos peligrosos generados en el marco de la gestión integral.

## 1.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL-MANEJO DE LA MICROPIPETA

Para garantizar los resultados esperados en los procedimientos de biología molecular se necesita cantidades exactas de reactivos, y por ello una de las prácticas introductorias es el uso y manejo de la micropipeta. Este instrumento sensible nos permite transferir volumenes pequeños de líquidos; los rangos de trabajo más frecuente son: (0.1-1 µL, 0.5-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 1000-5000 µL, entre otros); esto depende del tipo de micropipeta y muchas veces de la casa comercial (Figura 3).



**SIEMPRE** utilice las micropipetas únicamente en el rango de volumenes para el que ha sido fabricada; colocar volumenes por encima o debajo de éste, la descalibrará.
De igual manera, se debe evitar que la muestra cargada en la punta de la micropipeta, entre en contacto con el filtro que se encuentra en el cono de acoplamiento; es por ello que durante su manejo, se debe mantener la micropipeta lo más vertical posible.
Finalmente, cuando se termine de usarla, asegurarse de dejarla en su máximo volumen, según corresponda al rango propio de la micropipeta.

**IMPORTANTE:** Para garantizar un correcto trabajo de medición de volumenes, es necesario seleccionar la micropipeta adecuada; el operario debe revisar que el volumen exhibido en la ventana corresponda al realmente requerido.

### Objetivos

- Capacitar al estudiante en el correcto uso de la micropipeta.
- Identificar las partes de las micropipetas como elementos indispensables para trabajar en biología molecular.

### Materiales

- Micropipetas y puntas de diversos volumenes
- Cajas de petri o barquillos para pesaje
- Balanza analítica
- Agua
- Glicerol
- Frascos de descarte
- Libreta de notas
- Esfero
- Calculadora
- Jabón antibacterial
- Papel toalla

### Procedimiento

1. **Identificación de las partes de la micropipeta**
   a. Identificar las partes de la micropipeta ayudándose de los detalles de la figura 3.
   b. Observar las diferencias entre la micropipeta a usar y la mostrada en la figura.

2. **Llenado de la pipeta**
   a. Colocar una punta según corresponda (Figura 4-1,2)
   b. Colocar el pulgar sobre el mando o émbolo de pipeteado.
   c. Explorar los puntos de resistencia; para esto, oprimir el émbolo hasta el primer punto de resistencia "alto" o "tope" (Figura 4 posición B). Si continúa presionando encontrará el

punto donde el émbolo ya no se mueve hacia abajo; este corresponde al segundo punto de resistencia "alto" o "tope" (Figura 4 posición C).

**d.** Toma de muestra: oprimir el émbolo hasta el primer tope y colocar la punta dentro del líquido hasta una profundidad menor a 1 mm. De una manera lenta y controlada, disminuya la presión del émbolo para permitir que se desplace hacia arriba. No suelte el émbolo abruptamente, al permitirlo causará que el líquido pueda salpicar dentro de la punta produciendo volumenes inexactos y generando contaminación de la micropipeta. Una vez el émbolo se haya desplazado hasta arriba mantenga la micropipeta en el líquido durante un segundo, esto evita que se aspire aire en la parte final.

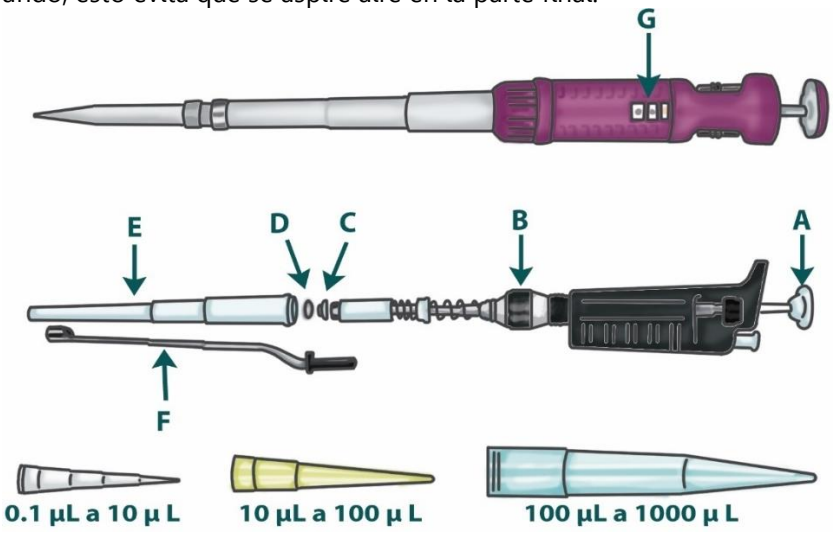



**Figura 3**. Partes de la micropipeta de trabajo en laboratorio de biología molecular. Se muestran las partes, así como las puntas para la medición de diferentes volumenes. A.- Botón de control, B.- Tuerca de conexión, C.- Junta de teflón, D.- Anillo de goma (O-ring), E.- Caña, F.- Expulsor de la punta. G. Ventana. Fuente: Diseñado por los autores.

### 3. Expulsión de la muestra

**a.** Llevar la micropipeta al tubo de disposición final (polipropileno de 1.5 mL) (Figura 4).

**b.** Se apoya la punta en la pared inferior del tubo.

**c.** Oprimir el émbolo hasta el primer tope y luego hasta el segundo tope. Haga este procedimiento a una velocidad moderada, hacerlo muy rápido ocasionará que queden gotas de muestra en la punta. Si observa cuidadosamente, entonces notará que al oprimir hasta el segundo alto se expele todo el líquido de la punta.

**d.** Cuando se utilice la micropipeta en soluciones de alta viscosidad se debe tener mayor cuidado, ya que se es más susceptible a transferir volumenes inexactos.

### 4. Verificación de calibración de la Micropipeta

Comprobar la calibración de la micropipeta es un procedimiento simple que puede ahorrar tiempo considerable, trabajo y reactivos. En esta práctica aprenderá a usar la micropipeta de tamaños diversos, medir su exactitud, precisión y calibración.

Para cada micropipeta se debe revisar el porcentaje de exactitud (E%) y el coeficiente de variación (CV%) en todo el rango usando al menos dos volumenes diferentes, por ejemplo: para la micropipeta P1000 revisar los volumenes de 300 µL y 1000 µL. Para P200 revisar los volumenes de 60 y 200 µL. Para P10 revisar 3 y 10 µL.

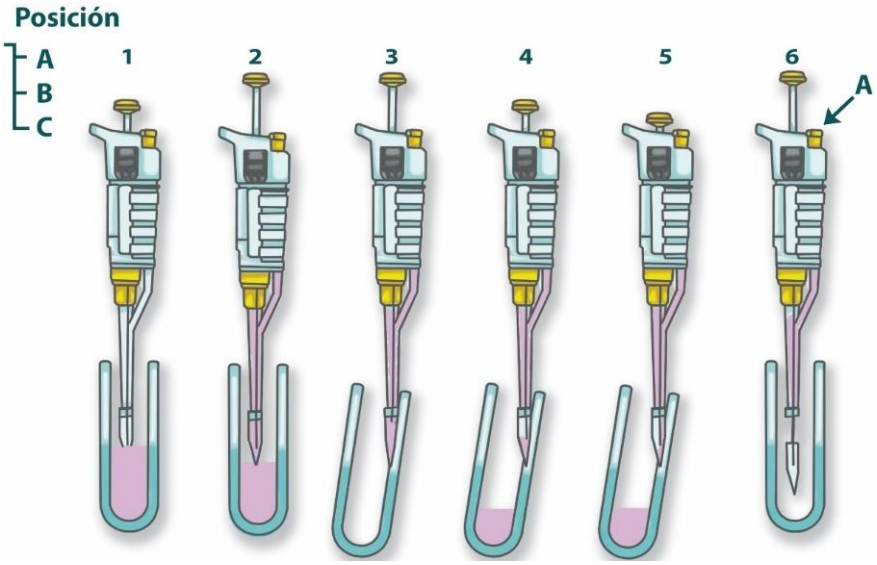



**Figura 4**. Instrucciones para el manejo de una Micropipeta. Se muestran las etapas del uso adecuado de la micropipeta. Fuente: Diseñado por los autores.

**Pasos a seguir**:

- **a.** Seleccionar la micropipeta y las puntas adecuadas.
- **b.** Colocar la tapa de la caja de petri en la balanza y tarar a cero.
- **c.** Tomar el volumen de agua destilada con la micropipeta y dispénselo en la tapa de la caja de petri. Registre el peso del agua. La densidad del agua es 1 g/mL a 25 °C, por lo tanto, un volumen de 1 mL corresponde aproximadamente a una masa de 1 g, 300 µL a 0.3 g, 200 µL a 0.2 g, 60 µL a 0.06 g, 10 µL a 0.01 g y 3 µL a 0.003 g.
- **d.** Repita el procedimiento cinco veces para cada volumen.
- **e.** Repetir el procedimiento, pero usar glicerol. La densidad del glicerol es de 1,2656 g/mL a 25 °C.
- **f.** Calcular la masa esperada para cada volumen.

**5. Cálculo de la exactitud (E%) y del coeficiente de variación (CV%)**

**Valor medio**
**X = Σ Xi /n**
Donde: Xi= pesadas, n= número de pesadas

**Volumen medio**
**V=X.Z**
Donde: X= valor medio, Z= factor z (1/densidad)

**Valor del control a 21.5 ° C** (**Z = 1.0032**)

**Exactitud (E%)**= ((**V-Vnominal) / Vnominal**) ***100**)

**Desviación estándar**
$S = Z. \sqrt{((\Sigma (Xi - X)^2 / (n - 1))}$

**Coeficiente de Variación**
**CV= (S*100) / V**

**Tabla 1**. Límites de tolerancia para micropipeta

| Volumen (µL) | E% nominal | CV % nominal |
|---|---|---|
| **5-10** | 1 | 0.8 |
| **20-50** | 0.7 | 0.4 |
| **100-1000** | 0.5 | 0.2 |




## Cuestionario

1. ¿Qué volumenes puedes operar con las micropipetas disponibles en la práctica?
2. ¿Qué cuidados debes tener cuando manipulas la micropipeta?
3. ¿Qué precauciones debes tomar para evitar la descalibración de la micropipeta?

## Referencias bibliográficas


- Franco, A., González-Campo, C., Muñoz, C. (2014). Guía para el manejo de micropipetas manuales. Oficina de Planeación y Desarrollo Institucional. Área de Calidad y Mejoramiento. Universidad del Valle.
- Organización Panamericana de la Salud. (2005). Manual de mantenimiento para equipo de laboratorio. Tecnología y Prestación de Servicios de Salud (THS). Medicamentos Esenciales, Vacunas y Tecnologías en Salud (EV). Washington, D.C. ISBN 92 75 32590 1.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Zárate, P., Jiménez, C., Badillo, J., Garibay, C., Oliver, M. (2009). Manual del laboratorio de Biotecnología Molecular. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Departamento de Bioprocesos. Academia de Biotecnología. México, D.F.

# CAPITULO II
# EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

## 2.1 EXTRACCIÓN DE ADN

(Modificado de Puerta, C. y Urueña, C. 2005)

Los protocolos de extracción de ácidos nucleicos permiten separar esta biomolécula de otros compuestos provenientes de la célula o del ambiente del cual se tomaron las muestras.
Es de recalcar que dependiendo del tipo de muestra que requiera ser tratada para la extracción de ADN, se deben ajustar o modificar los protocolos, de tal forma de lograr buena calidad y cantidad del respectivo ácido nucleico.
Un procedimiento básico para la extracción de ADN se puede dividir en 5 pasos, algunos de los cuales se realizan simultáneamente dependiendo del protocolo a usar.

**1. Ruptura de las células**
Los métodos de lisis más utilizados emplean:

a. Detergentes: se utilizan básicamente para extraer ADN de parásitos, células en cultivo y tejido, siendo el dodecil sulfato de sodio (SDS), Nonidet-P40 (NP40) y sarkosil unos de los más usados para la ruptura de la membrana celular.

b. Enzimas: se utilizan especialmente para la extracción de ADN bacteriano total o plasmídico, siendo la lisozima la enzima de elección. La lisozima actúa desestabilizando la pared celular de las bacterias rompiendo las uniones glucosídicas entre los polisacáridos N-acetilglucosamina (NAG) y el ácido N-acetilmurámico (NAM).

c. Agentes desnaturantes: se utilizan para extraer ADN de diferentes tipos celulares y tejidos, siendo el cloruro de guanidina uno de los más empleados.

**2. Eliminación de proteínas**
Se lleva a cabo mediante el uso de enzimas proteolíticas tales como la proteinasa K. Algunos protocolos de extracción realizan la lisis con detergentes como el SDS en presencia de la proteinasa K en un solo paso. Adicionalmente, la digestión se acompaña del uso de la sal disódica del ácido etilén-diamino-tetra-acético (EDTA) para inhibir la acción de las DNAsas.

Alternativamente, para organismos ricos en glicoproteínas como las micobacterias y tripanosomas, entre otros, después de la digestión se realiza un tratamiento con el detergente catiónico bromuro de hexadecil-trimetil-amonio (CTAB) en presencia de NaCl 0.7 M, con el fin de eliminar las glicoproteínas y obtener un ADN más puro.

**3. Eliminación de ARN**
Se realiza mediante digestión de ARN con RNAsas como la ribonucleasa A de páncreas bovino. Este paso en algunos protocolos se lleva a cabo en la etapa final de la extracción del ADN.

**4. Desproteinización**
La desproteinización se lleva a cabo con solventes orgánicos tales como el fenol y el cloroformo, los cuales tienen la propiedad de desnaturalizar las proteínas. El fenol debe ser bi-destilado, equilibrado y protegido contra la oxidación mediante la adición de 8-hidroxiquinolina. Por su parte, al cloroformo se le adiciona alcohol isoamílico en proporción 24:1 volumen a volumen (v: v) con el fin de prevenir la producción de espuma y facilitar la separación de las fases acuosas y orgánicas. Estos solventes se utilizan en una relación 1:1 (v: v) de la muestra que se pretende limpiar, quedando las proteínas desnaturalizadas en la interfase y el ADN en la fase acuosa. Generalmente, se recomienda realizar una extracción con fenol, seguida de una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y finalmente, una última extracción con cloroformo-alcohol isoamílico para limpiar toda traza de fenol.

**5. Concentración del ADN**

Se logra mediante precipitación con etanol en presencia de cationes monovalentes a concentraciones de 0.1 a 0.5 M. El etanol en la presencia de estos cationes induce un cambio estructural en el ADN que causa la agregación y precipitación del mismo. Adicionalmente, con este tratamiento se remueven los residuos de fenol y cloroformo, del paso anterior. Entre las sales más utilizadas se encuentran el acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio y cloruro de litio.

## Objetivos

### Objetivo General

- Extraer ácidos nucleicos de diferentes muestras por métodos físico-químicos.

### Objetivos específicos

- Conocer la metodología básica para la extracción de ácidos nucleicos.
- Adquirir destreza en la manipulación de diversas muestras biológicas para la extracción de ácidos nucleicos.
- Determinar la integridad de los ácidos nucleicos por electroforesis en gel de agarosa.

## Referencias bibliográficas


- Aras S., Duran, A., Yenilmez, G. (2003). Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some Hesperis L. specimens. Plant Molecular Biology. 21: 461 – 461.
- Avise, J. (2004). Molecular markers, natural history and evolution. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, EE.UU.
- Dundass, N., Leos, N., Mitui, P., Revell, B., Rogers, B. (2008). Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. Journal of Molecular diagnostics. 10: 311-316.
- Fraga, J., Rodríguez, O., Fuentes, M., Castex, A., Fernández-Calienes, A. (2004). Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. Rev. Cubana de Med. Tropl. 56: 208-13.
- Hudson, M. (2008). Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology. Molecular Ecology Resources. 8:3–17.
- Puerta, C. y Urueña, C. (2005). Prácticas de Biología Molecular. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Colección Biblioteca del Profesional. 100p.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ª ed. Ed Cold Spring Harbor Laboratories. Nueva York. USA. 2001. 2344 págs.

### 2.1.1 Protocolo para extracción de ADN genómico bacteriano por el método de CTAB Escala mínima

Los métodos de laboratorio tradicionales para identificar bacterias incluyen las pruebas de diferenciación por tinciones como la tinción de Gram, el crecimiento en cultivos enriquecidos o diferenciales y el uso de kits de pruebas bioquímicas (Xua *et al.,* 2004). No obstante, actualmente se dispone de una serie de técnicas que permiten la caracterización e identificación de especies utilizando marcadores moleculares como, por ejemplo, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), FISH (*Fluorescente In Situ Hybridization*), RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA-PCR*), *Microarrays*, y la secuenciación de genes ribosomales (16S rRNA) entre otros (Baruzzi *et al.,* 2006; Trevors *et al.,* 2004). Un paso fundamental para continuar con la aplicación de cualquiera de estas técnicas es la obtención de un ADN bacteriano de buena calidad. El método de CTAB, es uno de los mejores para obtener un DNA en calidad y cantidad apto para una gran variedad de marcadores moleculares, incluyendo los anteriormente mencionados.

#### Objetivos

**Objetivo General**

- Conocer el fundamento de la metodología basada en el uso de CTAB para la extracción de ADN bacteriano.

**Objetivos específicos**

- Extraer ADN bacteriano de buena calidad por el método de CTAB escala mínima.
- Adquirir destreza en la manipulación de equipos y reactivos en las prácticas de laboratorio.

#### Materiales

- Incubadora
- pHmetro
- Centrífuga
- Vortex
- Micropipetas de diversos volumenes
- Balanza analítica
- Plancha de calentamiento
- Estufa de secado o desecador
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Hielo picado o cajitas refrigerantes
- Baño serológico a 37 °C
- Baño serológico a 65 °C
- Fotodocumentador o transiluminador
- Puntas nuevas y estériles de diferentes volumenes
- Tubos eppendorf (3 por grupo)
- Tubo falcon de 15 mL (1 por grupo)
- Medios de cultivo: 1 tubo por grupo con 10 mL de caldo TSB o LB
- Reactivos: (SDS 10 %, NaCl 5 M, CTAB, cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, alcohol isopropílico 99 %, etanol 70 %, tampón TE 1X, tampón TAE 1X, agarosa)
- Enzimas: (Proteinasa K 20 mg/mL, RNAsa 20 mg/mL)
- Agua grado molecular
- Máscara y gorro de protección
- Guantes de nitrilo libres de talco
- Frascos de descarte para material contaminado
- Libreta de notas
- Lápiz marcador (de preferencia *sharpie)*
- Flotadores para incubación en baño serológico
- Jabón antibacterial

- Papel toalla
- Desinfectante para área de trabajo

**Procedimiento**

1. Obtener un cultivo bacteriano en 10 mL de caldo tripticasa de soya (TSB) o Luria Bertani (LB) (Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) e incubar por 18 horas a 35°C.
2. Transferir el contenido a un tubo falcon de 15 mL y centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm.
3. Descartar el sobrenadante y resuspender la biomasa en 567 µL de solución tampón TE.
4. Adicionar 30 µL de SDS a 10% y 9 µL de proteinasa K a una concentración de 20 mg/mL preparada en agua milli-Q. Homogenizar con cuidado e incubar por 1h a 37 °C en baño maría.
5. Adicionar 100 µL de NaCl 5 M, agitar en vortex y adicionar 80 µL de CTAB precalentado a 65°C. Agitar nuevamente e incubar en baño maría por 20 minutos a 65 °C.
6. Retirar del baño maría y dejar enfriar a temperatura ambiente.
7. Adicionar igual volumen (~700 µL) de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y homogeneizar completamente en vortex aproximadamente durante 10 segundos.
8. Centrifugar por 25 minutos a 10.000 rpm y a temperatura ambiente (24 °C).
9. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
10. Adicionar 0.5 µL de RNAsa A preparada a una concentración de 20 mg/mL e incubar por 1 hora a 37°C.
11. Adicionar igual volumen (~600 µL) de cloroformo y homogenizar completamente en vortex.
12. Centrifugar por 15 minutos a 10.000 rpm (24 °C).
13. Transferir la fase acuosa (superior) a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
14. Adicionar 0.6 volumenes (~300 µL) de alcohol isopropílico frio.
15. Precipitar el ADN agitando el tubo lentamente y por inversión.
16. Centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm a 24 °C y descartar el sobrenadante.
17. Adicionar 200 µL de etanol 70 % frio, centrifugar por 5 minutos a 10.000 rpm a 24 °C y nuevamente descartar el sobrenadante.
18. Secar los tubos al vacío por 12 horas.
19. Resuspender el ADN en 50 µL de la solución tampón TE (Anexo B) o agua grado molecular estéril.
20. Esperar 10 minutos y chequear la calidad y concentración del ADN (Ver capítulo 3) (Figura 5).
21. Conservar en nevera a 4°C.

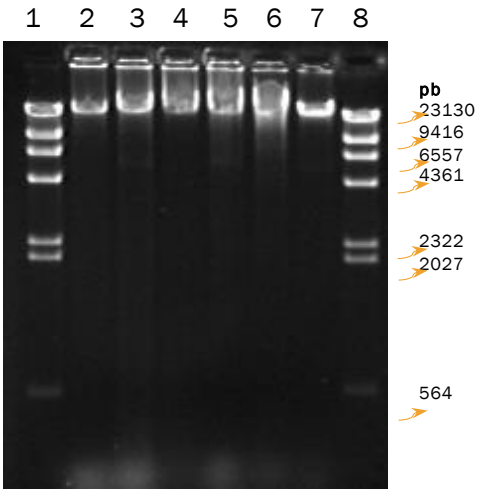



**Figura 5**. Electroforesis en gel de agarosa a 1% de ADN genómico de bacterias, tratado con bromuro de etidio. Carriles 2-7: ADN de *Vibrio cholerae*, carriles 1 y 8: Marcador de tamaño molecular λ ADN/HidIII (Promega). Fuente: Los autores.

## Observaciones

- La temperatura debe ser mantenida en 24 °C para centrifugación, pues el CTAB se liga con proteínas a temperaturas hasta de 15 °C. Si la temperatura baja de este valor, el CTAB se ligará con el ADN.
- Al remover la capa acuosa después de la centrifugación se debe evitar remover la película blanca, debido a que está en contacto con el alcohol y eso imposibilita el uso del ADN para análisis.
- En caso de no visualizar la madeja de ADN, incubar 24 horas a -20 °C y centrifugar por una hora a 4 °C y 10.000 rpm.
- El protocolo en su totalidad necesita de elementos de protección como guantes, bata de laboratorio y máscara para los solventes orgánicos. El sobrenadante procedente de los cultivos y los lavados deben ser descartados en una solución concentrada de hipoclorito de sodio (100 ppm).

## Anexo B. Preparación de soluciones protocolo CTAB escala mínima

**A. Solución SDS 10 % (Dodecil Sulfato de Sodio)**
Disolver 10 g de SDS en un poco de agua destilada estéril y aforar hasta 100 mL. Calentar a 60 °C para disolver completamente.

**B. Solución de NaCl 5M**
Disolver 292.2 g de NaCl en 1000 mL de agua destilada. Alicuotar en volumenes no mayores a 100 mL y autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

**C. Solución CTAB 10 % (Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio)**
Disolver 10 g de CTAB en NaCl 0.7 M y aforar a 100 mL. Calentar a 65 °C para solubilizar completamente y alicuotar en tubos falcon.

**D. Tampón TE (Tris-EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 1 mM EDTA, pH 8.0)**
Adicionar 10 mL de la solución stock de Tris-HCl 1M, pH 8.0 y 2 mL de solución de EDTA 0.5 M, pH 8.0 y completar a un volumen de 1000 mL con agua destilada estéril.

**E. Solución stock de Tris-HCl 1M, pH 8.0**
Pesar 121.1 g de Tris-base, disolver en 800 mL de agua destilada estéril. El pH se ajusta a 8.0 con adición de 42 mL de ácido clorhídrico concentrado y el volumen se completa a 1000 mL con agua destilada estéril.

**F. Solución stock de EDTA 0.5M, pH 8.0**
Disolver 186.1 g de sal sódica de EDTA en 800 mL de agua destilada, homogenizar utilizando un agitador magnético. El pH se ajusta a 8.0 con NaOH 10 N y el volumen se completa a 1000 mL con agua destilada. Finalmente, autoclavar a 121 °C por 15 minutos.




## Cuestionario

1. ¿Qué sucede con una muestra de ácido nucleico que no fue secada apropiadamente antes de la resuspensión?
2. ¿Si la calidad del ADN de una determinada muestra no es la más adecuada para las técnicas moleculares, cuáles fueron probablemente los errores cometidos en su extracción?
3. ¿Qué alternativas metodológicas podría realizar usted si no se observó una madeja de ADN después de la fase de precipitación con alcohol?

4. ¿Qué metodologías existen en el mercado para la extracción de ácidos nucleicos?

## Referencias Bibliográficas


- Baruzzi, S., Matarante, A., Caputo, L., Morea, M. (2006). Molecular and physiological characterization of natural microbial communities isolated from a traditional Southern Italian processed. Meat Science. 72. p. 261–269.
- Burbano-Rosero, E. M. (2009). Frequência e diversidade de colifagos somáticos isolados de amostras de água do mar, plâncton e bivalves da Baixada Santista, Canal de São Sebastião e Ubatuba [en línea]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. Tesis Doctoral en Microbiología. [citado 2012-02-29]. Disponible en Internet: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-23102009-153715/>.
- Rivera, I., Chun, J., Huq, A., Sack, B., Colwell, R. R. (2003). Method for ADN extraction and application of multiplex PCR to detect toxigenic V. cholerae O 1 and O139 in aquatic ecosystems. Environ. Microbiol, v. 5, p. 599-603.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Trevors, J., Kirk, J., Beaudette, L., Miranda Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J., Lee, H., Jack T. (2004). Review. Methods of studying soil microbial diversity. J. of Microbiol. Methods. 58.p.p. 169– 188.
- Xua J., Smytha C., Buchanana, J., Dolana, A., Rooneya, P., Millara, C., Goldsmitha, C., Elbornb, C., Moorea, J. (2004). Employment of 16S rDNA gene sequencing techniques to identify culturable environmental eubacteria in a tertiary referral hospital. Public Health Laboratory. Department of Bacteriology, Belfast City Hospital, Northern Ireland.

### 2.1.2 Protocolo para extracción de ADN genómico de levaduras

(Modificación del protocolo de Guetti, 2009)

La levadura es la primera célula eucariota en la que se han focalizado un sinnúmero de estudios moleculares, debido a que es de fácil uso industrial: es barata, cultivarla es sencillo y se duplica cada 90 minutos en condiciones nutritivas favorables (Orberá, 2004). Además, es un organismo fácil de modificar genéticamente, lo que permite realizar experimentos en varios días o semanas. Sin embargo, la pared de doble contorno de las levaduras dificulta la extracción de ADN y hace que la misma sea una tarea laboriosa. Por ello se han modificado y desarrollado nuevas técnicas de extracción, tendientes principalmente a la obtención de un DNA de buena calidad y cantidad, necesario para la ejecución de varias metodologías moleculares, de amplia importancia en la actualidad.

## OBJETIVOS

**Objetivo General**

- Conocer la metodología básica para la extracción de ADN de levaduras.

**Objetivos específicos**

- Extraer ADN de microorganismos levaduriformes por métodos físico-químicos.
- Adquirir destreza en la manipulación de equipos y reactivos para la extracción de ADN de levaduras.

## Materiales

- Incubadora
- pHmetro
- Centrifuga
- Vortex
- Micropipetas de diversos volumenes
- Balanza analítica
- Plancha de calentamiento
- Estufa de secado o desecador
- Hielo picado o cajitas refrigerantes
- Baño serológico a 37 °C
- Baño serológico a 65 °C
- Fotodocumentador o transiluminador
- Puntas nuevas y estériles de diferentes volumenes
- Tubos eppendorf (3 por grupo)
- Tubo falcon de 15 mL (1 por grupo)
- Medios de cultivo: 1 tubo por grupo con 10 mL de caldo YPD
- Reactivos: (SDS 10 %, Acetato de sódio 3M, fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1, cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, alcohol isopropílico 99 %, etanol 70 %, tampón SET, agarosa)
- Enzimas: (Lisozima 10 mg/mL, RNAsa 10 mg/mL, proteinasa K 10 mg/mL)
- Agua grado molecular
- Máscara y gorro de protección
- Guantes de nitrilo
- Frascos de descarte
- Libreta de notas
- Lápiz marcador (de preferencia *sharpie*)
- Flotadores para incubación en baño serológico
- Jabón antibacterial
- Papel toalla
- Desinfectante para limpieza de mesones

**Procedimiento:**

1. Cultivar 10 mL de levadura en medio YPD "*Yeast Peptone dextrose*" (glucosa 2 %, extracto de levadura 1 %, peptona 2 %) por 18 horas a 37 °C.
2. Centrifugar a 10.000 rpm por 5 minutos, lavar las muestras con agua ultrapura y transferir a un tubo falcon de 15 mL.
3. Colocar 1.0 mL de tampón SET (Tris 20 mM, EDTA 25 mM, NaCl 75 mM, pH 8.0).
4. Las levaduras deben ser lisadas y homogenizadas con 1.0 mL de lisozima a una concentración de 10.0 mg/mL (la lisozima debe disolverse en tampón SET).
5. Incubar en baño maría a 37 °C durante 2 horas.
6. Adicionar 5 µL de RNAsa a 10.0 mg/mL e incubar a 37 °C por 1 hora.
7. Adicionar 300 µL de SDS 10 %.
8. Adicionar 50 µL de proteinasa K a 10 mg/mL.
9. Incubar en baño maría a 37 °C por 1 hora.
10. Adicionar 150 µL de acetato de sodio 3M y mantener en hielo durante 10 minutos.
11. Adicionar una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (~500 µL), en la proporción 25:24:1.
12. Mezclar por inversión cerca de cincuenta veces y centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
13. Transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 µL.
14. Adicionar 500 µL de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), mezclar por inversión cerca de cincuenta veces y centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
15. Transferir nuevamente el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y adicionar igual volumen de alcohol isopropílico frio.
16. Invertir el tubo cuatro veces y dejar por tres horas a -20 °C.
17. Centrifugar a temperatura ambiente durante 30 minutos a 10.000 rpm y descartar el sobrenadante.
18. Adicionar etanol al 70 % y centrifugar temperatura ambiente a 10.000 rpm durante 15 minutos.
19. Descartar el sobrenadante y dejar secar el tubo al vacío o a temperatura ambiente por 12 horas.
20. Resuspender el ADN en 50 µL de tampón TE 1X (Tris 0,01M, EDTA 1mM, pH 7,5).
21. Verificar la concentración y calidad del ADN obtenido en gel de agarosa a 1 %, utilizar las condiciones de corrida 80 voltios durante 1 hora (Figura 6).

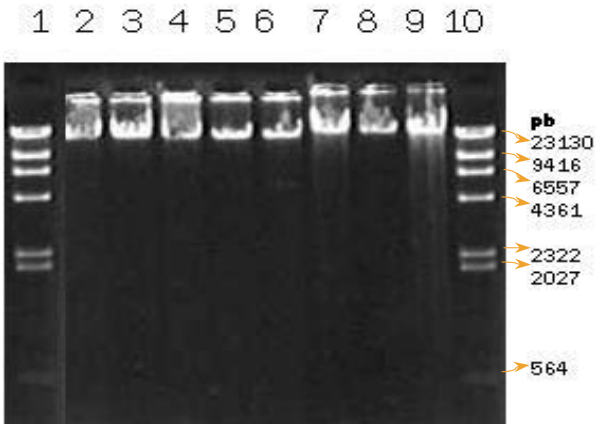



**Figura 6**. Electroforesis en gel de agarosa a 1 % de ADN genómico de levaduras, tratado con bromuro de etidio. Carriles 2-9: ADN de *Trichosporon sp.*; carriles 1 y 10: Marcador de tamaño molecular λ ADN/*Hind* III (Promega). Fuente: Guetti, 2009.

## Anexo C. Preparación para extracción de ADN genómico de levaduras

**A. Tampón SET** (Tris 20 mM, EDTA 25 mM, NaCl 75 mM, pH 8.0). Partir de las soluciones stock y ajustar el volumen a 100 mL con agua ultrapura.

**B. Solución de NaCl 5M**
Disolver 292.2 g de NaCl y aforar a 1000 mL con destilada estéril. Alicuotar en volumenes no mayores a 100 mL y autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

**C. Solución CTAB 10 % (Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio)**
Disolver 10 g de CTAB en NaCl 0.7 M y aforar a 100 mL con la misma solución NaCl 0.7 M. Calentar a 65 °C para solubilizar completamente y alicuotar en tubos falcon de 15 mL estériles.

**D. Tampón TE (Tris-EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 1 mM EDTA, pH 8.0)**
Mezclar 10 mL de la solución stock de Tris-HCl 1M, pH 8.0 y 2 mL de solución de EDTA 0.5 M, pH 8.0 y completar a un volumen de 1000 mL con agua destilada estéril.

**E. Solución stock de Tris-HCl 1M, pH 8.0**
Pesar 121.1 g de Tris-base, disolver en 800 mL de agua destilada estéril. El pH se ajusta a 8.0 con adición de aproximadamente 42 mL de ácido clorhídrico concentrado y el volumen se completa a 1000 mL con agua destilada estéril.

**F. Solución stock de EDTA 0.5M, pH 8.0**
Disolver 186.1 g de sal sódico de EDTA en 800 mL de agua destilada, homogenizar utilizando un agitador magnético. El pH se ajusta a 8.0 con NaOH 10 N y el volumen se completa a 1000 mL con agua destilada. Finalmente, autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

## Referencias Bibliográficas


- Guetti, G. (2009). Characterization of *Trichosporon spp*. Isolated from three coastal regions of São Paulo State, Brazil. Doctoral thesis. Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidade de São Paulo, Brasil.
- Orberá, R., T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev. Iberoam. Micol. 21, p. 15 – 19.
- Puerta, C., Urueña, C. (2005). Prácticas de Biología Molecular. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Colección Biblioteca del Profesional. 100p.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Trevors, J., Kirk, J., Beaudette, L., Miranda Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J., Lee, H., Jack T. (2004). Review. Methods of studying soil microbial diversity. J. of Microbiol. Methods. 58.p.p. 169– 188.

### 2.1.3 Protocolo Miniprep para extracción de ácidos nucleicos de fagos (colifagos)

Modificación de la técnica de Lockett (1990)

Los colifagos son bacteriófagos (comúnmente conocidos como fagos) que utilizan como célula hospedera a *Escherichia coli* y otras especies emparentadas con ellas; se dividen en dos grupos principales: colifagos somáticos y colifagos ARN F-específicos, los cuales se diferencian por la vía de infección. Los colifagos de ARN F-específicos inician la infección uniéndose a las fimbrias de fertilidad (fimbrias F- o sexuales) de la célula hospedera; mientras que los colifagos somáticos inician la infección uniéndose a receptores ubicados permanentemente en la pared celular de los hospederos; suelen replicarse en el aparato digestivo de los animales de sangre caliente, pero también pueden hacerlo en medios acuáticos, es así como los colifagos al igual que su principal hospedero *E. coli* se han convertido en indicadores de contaminación antropogénica del agua (Grabow-Wok, 2001). En esta práctica, para la extracción de ADN de colifagos se usará la metodología propuesta por Lockett (1990) y modificada por Burbano (2009).

#### Objetivos

**Objetivo General**

- Conocer la metodología básica para la extracción de ácidos nucleicos de fagos (colifagos).

**Objetivos específicos**

- Obtener ácidos nucleicos de colifagos de buena calidad.
- Adquirir destreza en la manipulación de equipos y reactivos en las prácticas de laboratorio.

#### Materiales

- Incubadora
- pHmetro
- Centrífuga
- Vortex
- Micropipetas de diversos volumenes
- Balanza analítica
- Plancha de calentamiento
- Estufa de secado o desecador
- Hielo picado o cajitas refrigerantes
- Baño serológico a 37 °C
- Baño serológico a 65 °C
- Cámara de electroforesis y fuente de poder
- Fotodocumentador o transiluminador
- Puntas nuevas y estériles de diferentes volumenes
- Tubos eppendorf de 1.5 mL (3 por grupo)
- Tubo falcon de 15 mL (1 por grupo)
- Medios de cultivo: 1 tubo por grupo con 10 mL de caldo tripticasa de soya, suplementado con $MgSO_4$, $7H_2O$ 1.2 mM y $CaCl_2$ 5 mM.
- Reactivos: (solución filtrada de $ZnCl_2$ 2 M., acetato de potasio 3 M pH 4.0, alcohol isopropílico 99 %, agarosa, , etanol 70 %, tampón TES)
- Enzimas: (RNAsa 20 mg/mL, DNAsa 1 U/uL)
- Agua grado molecular
- Máscara y gorro de protección
- Guantes de nitrilo
- Frascos de descarte
- Libreta de notas
- Lápiz marcador (de preferencia *sharpie*)
- Flotadores para incubación en baño serológico
- Jabón antibacterial y desinfectante para el área de trabajo

- Papel toalla

**Procedimiento**

1. Transferir el inóculo del fago a un tubo de cultivo en crecimiento exponencial de la bacteria *E. coli* en caldo tripticasa de soya, suplementado con $MgSO_4$, $7H_2O$ 1.2mM y $CaCl_2$5 mM.
2. Incubar por 12 a 18 horas a 37 °C, hasta conseguir un título aproximado de $10^6$ a $10^8$ UFP/mL.
3. Tomar 1 mL de la suspensión de fagos y adicionar 5 µL de RNAsa a una concentración de 20 mg/mL y 5 µL de DNAsa a una concentración de 1 U/µL, homogenizar la suspensión.
4. Incubar a 37 °C por 30 minutos en baño maría.
5. Adicionar 20 µL de una solución filtrada de $ZnCl_2$ 2 M.
6. Centrifugar la solución a 8000 rpm por 5 minutos y 20 °C.
7. Descartar la fase acuosa y resuspender el pellet en 500 µL de tampón TES (0.1 M de Tris-HCl pH=8.0, 0.1 M de EDTA y 0.3 % de SDS).
8. Incubar la solución por 15 minutos a 65 °C y adicionar 60 µL de acetato de potasio 3M pH 4.0
9. Homogenizar la mezcla con vortex e incubar en hielo por 15 minutos.
10. Centrifugar la solución por 1 minuto a 8000 rpm, transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga nuevo y estéril.
11. Precipitar el ácido nucleico mediante adición de igual volumen de alcohol isopropílico.
12. Lavar el ácido nucleico con 200 µL de alcohol etílico 70 % y dejar secar por 15 minutos a 47 °C.
13. Resuspender el ácido nucleico en 50 µL de tampón TE (Tris-EDTA, pH 8,0) y almacenarlo a 4 °C protegido de la luz (usar papel aluminio).

**Para determinar el tipo de ácido nucleico debe seguirse el siguiente protocolo:**

- Colocar en dos tubos de microcentrífuga muestras de ácido nucleico conteniendo 200 ng en cada uno.
- Un tubo debe ser tratado con 1U de RNAsa y otro tubo con una 1U de DNAsa.
- Incubar las muestras por un periodo de 30 minutos a 37 °C.
- Inactivar la enzima por calor a 65 °C durante 5 minutos.
- Observar las muestras en un gel de agarosa a 1 %, utilizar el marcador de tamaño molecular λ ADN/*Hind* III.

Si el fago contiene ADN, entonces el ácido nucleico debe degradarse cuando es tratado con DNAsa.

Si el fago contiene ARN, entonces este ácido nucleico debe degradarse cuando es tratado con RNAsa.

## Anexo D. Preparación de soluciones para extracción de ADN de colifagos

**A. Solución de Acetato de potasio 3M pH 4.8**

Para preparar 10 mL de esta solución, pesar 2.9442 de acetato de potasio y disolverlo en 5 mL de agua ultrapura, luego ajustar el pH a 4.8, finalmente aforar con agua ultrapura a 10 mL.

**B. Solución de $ZnCl_2$ 2M**

Para preparar 15 mL de la solución, pesar 4.0884 g de $ZnCl_2$, aforar a 15 mL con agua ultrapura, y filtrar a través de membrana de 0.22 µm. Guardar bajo refigeración en tubo falcon cubierto con papel aluminio por menos de 3 días (por más tiempo se pueden formar precipitados), por ello es necesario preparar volumenes pequeños para pronto uso.

## Referencias Bibliográficas


- Abeles, S. & Pride, D. (2014). Moleculares bases and role of viruses in the human microbiome. In E. Martens, J. Sonnenburg & D. Relman (Eds), Insights into molecular mechanisms of microbiota (pp, 3892-3906).
- Burbano-Rosero, E. M., Ueda-Ito, M., Kisielius, J. J., Nagasse-Sugahara, T. K., Almeida, B. C., Souza, C. P. Ou Souza-Sales, C.P., Markman, C., Martins, G. G., Albertini, L., Rivera, I. N. G. (2011). Diversity of Somatic Coliphages in Coastal Regions with Different Levels of Anthropogenic Activity in Sao Paulo State, Brazil. *Appl. and Environ. Microbiol.* (Print), v. 77, p. 4208-4216.
- Burbano-Rosero, E.M. (2009). Frequency and diversity of somatic coliphages isolated from seawater, plankton and bivalves samples from Baixada Santista, Canal de São Sebastião e Ubatuba. Doctoral thesis. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de Sao Paulo, Brasil.
- Grabow Wok, G. (2001). Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. Water SA., 27:251-268.
- Lockett, T. (1990). A bacteriophage λ DNA purification procedure suitable for the analysis of DNA from either large or multiple small lysates. Anal. Biochem. v.185 (2): 230-234.

### 2.1.4 Protocolo para extracción de ADN plasmídico

(Modificación del protocolo de Birnboim & Doly, 1979)

Los plásmidos son moléculas pequeñas de ADN circular capaces de replicarse de forma autónoma, independientemente del cromosoma. Son muy comunes en bacterias y algunos de ellos, los más pequeños, existen en las células bacterianas en un número elevado (hasta 100 copias por célula).
Los plásmidos son una herramienta fundamental en Biología molecular e Ingeniería genética ya que se pueden usar como vectores para introducir en ellos fragmento de ADN de interés de hasta 10 Kb y de esta manera amplificarlo de forma natural dentro de la bacteria en la que el plásmido se replica (Clonación fragmento de ADN). Existen muchos plásmidos disponibles para usar con este fin y la mayoría contiene al menos los siguientes elementos:

- Un origen de replicación autónomo para *E. coli* (ej. ColE1) que permite la replicación autónoma en esta bacteria.
- Un gen que confiere a la bacteria portadora del plásmido resistencia a algún antibiótico, generalmente ampicilina.
- Un sitio de clonación múltiple en el que se encuentra dianas únicas para varias enzimas de restricción, facilitando la introducción del ADN a clonar.

Un método que permite visualizar ADN plasmídico o fragmentos del mismo es la electroforesis en gel de agarosa, en la cual se separan en función de su tamaño y carga eléctrica. La obtención de altas cantidades de ADN plasmídico puro, es fundamental para utilizarlo como vector en aplicaciones posteriores.

#### Objetivos

**Objetivo General**

- Conocer la metodología básica para extracción de ADN plasmídico de bacterias.

**Objetivos específicos**

- Obtener ADN plasmídico de *E. coli* usando un protocolo de fácil ejecución en laboratorio.
- Determinar la integridad del ADN plasmídico por electroforesis en gel de agarosa.

#### Materiales

- Incubadora
- pHmetro
- Centrífuga
- Vortex
- Micropipetas de diversos volumenes
- Balanza analítica
- Plancha de calentamiento
- Estufa de secado o desecador
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Hielo picado o cajitas refrigerantes
- Baño serológico a 65 °C
- Fotodocumentador o transiluminador
- Puntas nuevas y estériles de diferentes volumenes
- Tubos eppendorf (3 por grupo)
- Tubo falcon de 15 mL (1 por grupo)
- Medios de cultivo: 1 tubo por grupo con 3 mL de caldo LB, solución salina estéril 0.85 %

- Reactivos: (Solución I, Solución II, Solución III, Solución IV, etanol 70 %, tampón TE II, tampón TAE 1X, agarosa)
- Enzimas: (Proteinasa K 20 mg/mL, RNAsa 20 mg/mL)
- Agua ultrapura
- Máscara y gorro de protección
- Guantes de nitrilo
- Frascos de descarte
- Libreta de notas
- Lápiz marcador (de preferencia *sharpie*)
- Flotadores para incubación en baño serológico
- Jabón antibacterial
- Papel toalla
- Desinfectante para el área de trabajo

**Procedimiento**

1. Inocular *E. coli* en un tubo con 3 mL de caldo Luria Bertani y mantenerlo en incubación por 18 horas a 35 °C.
2. Centrifugar los tubos a 5000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet con 1 mL de solución salina estéril al 0.85 %.
4. Transferir a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Resuspender la biomasa obtenida mediante la adición de 100 µL de solución I.
6. Incubar en baño de hielo durante 30 minutos.
7. Adicionar 200 µL de solución II y homogenizar por inversión, 6 a 8 veces.
8. Incubar en baño de hielo durante 5 minutos.
9. Adicionar 150 µL de solución III, homogenizar por inversión entre 12 a 15 veces hasta observar la formación de un precipitado blanco y floculante.
10. Incubar en baño de hielo por 1 hora y 30 minutos.
11. Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C; transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
12. Adicionar 1 mL de etanol al 70 % frío y homogenizar por inversión.
13. Mantener en hielo por 1 hora y 30 minutos.
14. Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C y descartar el sobrenadante.
15. Resuspender el pellet en 100 µL de solución IV y agitar.
16. Adicionar 250 µL de etanol al 70 % frío.
17. Homogenizar los tubos por inversión e incubar por 18 horas.
18. Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C y descartar el sobrenadante.
19. Tratar el pellet obtenido con 1 mL de etanol al 70 % y centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
20. Descartar el sobrenadante y secar el sedimento al vacío durante 12 horas.
21. Rehidratar el sedimento (dónde se encontrará el plásmido) en 15 µL de tampón TEII. Es recomendable adicionar el tampón lentamente por las paredes del tubo.
22. Mantener a -20 °C.
23. Chequear el producto obtenido mediante electroforesis en un gel de agarosa a 1.2 % (condiciones de corrida 80 V por 4 horas).
24. Usar 5 µL de marcador 1Kb como marcador de tamaño molecular.

## Observación



***Después de la corrida electroforética fotografiar las bandas teñidas por el bromuro de etidio y evidenciadas bajo luz ultravioleta. Los perfiles obtenidos (después del análisis) deben ser comparados para la determinación de un patrón común y analizados en cuanto a la correlación con la producción de factores de virulencia.***

## Anexo C. Preparación de soluciones para extracción de ADN plasmídico

**Solución I (solución de lisis)**

| | |
|---|---|
| Lisozima | 4 mg |
| Glucosa 2 % en refrigeración | 0.1 mL |
| EDTA 10 mM | 0.02 mL |
| Tris-HCl (pH=8,0) 25 mM | 0.025 mL |

Completar 1 mL con agua ultrapura grado molecular.

**Solución II**

| | |
|---|---|
| NaOH | 0.2 N |
| SDS | 10 % |

**Solución III**

Solución de acetato de sodio 3M pH=4.8
Ajustar el pH con ácido acético glacial.

**Solución IV**

| | |
|---|---|
| Acetato de sodio | 100 mM |
| Tris-HCl (pH=8.0) | 50 mM |

**Solución salina 0.85%**

Pesar 0.85 g de NaCl, disolver en agua destilada y aforar a 100 mL. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

## Referencias bibliográficas


- Birnboim, H.& Doly, J. (1979). Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid. DNA. Nucl. Acid. Res. 7:1513-23.
- Birren, B. Ed. (1999). Genome Analysis. A Laboratory Manual Series, 4 Volumes. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Brown, T. A. (2006). Gene cloning and DNA analysis: an introduction. Oxford, UK. Malden, MA, Blackwell Pub.Impreso.
- Davis, L., Dibner, M., Battey, J. (1986). Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier.
- Sambrook, J., Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

### 2.1.5 Protocolo para extracción de ADN de sangre periférica

Para obtener ADN a partir de leucocitos totales obtenidos de sangre periférica (o de células en cultivo y/o tejidos animales) se usa generalmente una técnica de cuatro pasos secuenciales: El primer paso consiste en la lisis de las células y de sus núcleos, seguida de la separación del ADN. Para ello las proteínas celulares son removidas por un paso de precipitación salina, y finalmente el ADN genómico es concentrado por precipitación con alcohol. El ADN purificado por medio de este proceso, está listo para ser utilizado en diferentes aplicaciones, entre las cuales se involucran: amplificaciones (PCR), digestión con endonucleasas de restricción, *Southern blot y Dot blot.*

#### Objetivos

**Objetivo General**

- Conocer la metodología básica para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre.

**Objetivos específicos**

- Determinar en la metodología propuesta las etapas críticas de mayor cuidado para lograr una buena extracción de ADN de muestras de sangre periférica.
- Adquirir destreza en la manipulación de equipos y reactivos para la extracción de ADN en sangre.

#### Materiales

- Incubadora
- pHmetro
- Centrífuga
- Vortex
- Micropipetas de diversos volumenes
- Balanza analítica
- Plancha de calentamiento
- Estufa de secado o desecador
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Hielo picado o cajitas refrigerantes
- Baño serológico a 37 °C
- Baño serológico a 65 °C
- Fotodocumentador o transiluminador
- Puntas nuevas y estériles de diferentes volumenes
- Tubos eppendorf (1 por grupo)
- Tubo falcon de 50 mL (1 por grupo)
- Tubo falcon de 15 mL (2 por grupo)
- Tubo con EDTA preparado comercialmente
- Reactivos: (Buffer de lisis 1X, SDS 10 %, NaCl 6M, etanol 96 %, etanol 70 %, tampón TE 1X, tampón TBE, agarosa)
- Enzimas: (Proteinasa K 20 mg/mL)
- Agua grado molecular
- Máscara y gorro de protección
- Guantes de nitrilo
- Frascos de descarte
- Libreta de notas
- Lápiz marcador (de preferencia *sharpie*)
- Flotadores para incubación en baño serológico
- Jabón antibacterial
- Papel toalla
- Desinfectante para el área de trabajo

**Procedimiento**

1. Colectar 10 mL de sangre en tubo con EDTA (comercialmente ya preparados).
2. Homogenizar la sangre y colocar en un tubo falcon de 50 mL.
3. Completar el tubo falcon hasta 50 mL con buffer *de* lisis 1X, agitar en vortex dutante 5 segundos y llevar a baño de hielo por 30 minutos.
4. Retirar del baño de hielo, agitar nuevamente y centrifugar por 15 minutos a 1800 rpm a temperatura ambiente.
5. Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento con 10 mL de Buffer de lisis 1X.
6. Centrifugar por 5 minutos a 1800 rpm en temperatura ambiente.
7. Descartar el sobrenadante y adicionar 3 mL de buffer de nucleolisis 1X. Agitar el tubo con vortex para resuspender el sedimento.
8. Adicionar 50 µL de proteinasa K (20 mg/mL) y 300 µL de SDS 10 %. Mezclar levemente varias veces el tubo.
9. Llevar el tubo al baño maría a 37 °C durante toda la noche.
10. Retirar el tubo del baño maría y adicionar 1 mL de NaCl 6M, agitar con vortex hasta que la mezcla quede con aspecto lechoso.
11. Centrifugar por 20 minutos a 2500 rpm a temperatura ambiente.
12. Transferir el sobrenadante a otro tubo falcon, teniendo cuidado de no desprender el sedimento y centrifugar por 15 minutos a 2500 rpm a temperatura ambiente.
13. Transferir el sobrenadante para otro tubo falcon que contiene etanol absoluto frio y homogenizar con cuidado para permitir la precipitación del ADN.
14. Tapar el tubo con papel parafina e invertir el tubo varias veces hasta observar el ADN.
15. Enrollar el ADN formado haciendo uso de un capilar o bastón de vidrio y colocar la madeja dentro de un microtubo con 100 µL de etanol a 70 % frio.
16. Secar al vacío y adicionar buffer TE, de acuerdo a la cantidad de ADN extraído (Entre 400 µL a 600 µL). Tapar los tubos con papel parafina.
17. Llevar los microtubos a baño maría a 65 °C por 30 minutos para degradación de DNAsas. Retirar del baño maría y dejar por una noche a temperatura ambiente.
18. Almacenar en nevera a 4 °C.
19. Cuantificar el ADN y verificar su calidad en un gel de agarosa a 2 % (corrida electroforética 80 voltios, 1 hora) (ver capítulo 3).

## Anexo E. Preparación de soluciones para extracción de ADN de sangre periférica

**Buffer de lisis de sangre 10X pH 7,4**

| | |
|---|---|
| $KHCO_3$ (Bicarbonato de potasio) | 5.0005 g |
| $NH_4Cl$ (Cloruro de amonio) | 41.455 g |
| EDTA | 1.8612 g |

Aforar a 500 mL con agua ultrapura grado molecular
Verificar el pH 7.4 antes de colocar el EDTA. Autoclavar por 30 minutos a 121 °C.
Para obtener el buffer 1X, se realiza una dilución 1:10.

**Agarosa 2 %**

| | |
|---|---|
| Agarosa | 2 g |
| Aforar con TBE 1X a | 100 mL |

**Buffer *de* nucleolisis 10X**

| | |
|---|---|
| Tris-HCl 1M pH 8.0 | 50 mL |
| EDTA 0.2 M pH 8.2 | 50 mL |
| NaCl 4 M | 116.9 mL |
| Aforar con agua destilada | 500 mL |

Autoclavar por 30 minutos a 121 °C.
Para obtener el buffer 1X, se realiza una dilución 1:10, se diluye en agua destilada estéril.

| **NaCl 6M** | |
|---|---|
| NaCl | 17.53 g |
| Aforar con agua ultrapura a | 50 mL |
| | |
| **SDS 10%** | |
| SDS | 10 g |
| Aforar con agua ultrapura a | 100 mL |

| **TE (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mm)** | |
|---|---|
| Tris 1M pH 7.5 | 1 mL |
| EDTA 0.5 M pH 7.4 | 20 µL |
| EDTA 0.2 M pH 7.4 | 50 µL |
| Aforar con agua ultrapura a | 100 mL |

| **TBE 10X** | |
|---|---|
| Tris | 54.0 g |
| Ácido bórico | 27.5 g |
| EDTA 0.5 M pH 8.0 | 20 mL |
| Aforar con agua ultrapura a | 500 mL |

## Referencias bibliográficas


- Bahl, A. & Pfenninger, M., (2008). A rapid method of DNA isolation using laundry detergent. Nucleic. Acids. Res. 24 (8), 1587.
- Drabek, J. and Petrek, M., (2002). A sugar, laundry detergent, and salt method for extraction of deoxyribonucleic acid from blood. Biomed Pap Med Fac. Univ. Palacky. Olomouc Czech Repub 146 (2), 37.
- Nasiri, H., Forouzandeh, M., Rasaee, M. J., and Rahbarizadeh, F., (2005). Modified salting out method: high yield, high quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. J. Clin. Lab. Anal. 19(6), 229.
- Sambrook J & Russell D. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

### 2.1.6 Protocolo para extracción de ADN de tejido epitelial fresco

La colecta y el manejo adecuado de la muestra es indispensable para la extracción de ADN íntegro y sin contaminantes, éstos pueden afectar la acción de las enzimas durante la reacción de PCR u otro tipo de marcador molecular a usar. Cada tejido tiene sus consideraciones propias y siempre es necesario conocer las recomendaciones por parte de los especialistas.
Antes de iniciar la homogeneización es necesario contar con información sobre la cantidad apropiada de tejido que debe utilizarse, pues una disgregación rápida y completa es esencial para asegurar la obtención de ADN y evitar su degradación. Si se excede la cantidad recomendada se puede sobresaturar el sistema, con lo que se afecta el rendimiento y aumenta las impurezas del extracto, de manera que es aconsejable realizar experimentos preliminares con distintas cantidades de material inicial para determinar cuál es la cantidad apropiada, en particular en los sistemas de extracción tradicionales. Abajo se relacionan algunas recomendaciones para el tratamiento de la muestra de tejido animal antes del proceso de extracción.




Durante el proceso de lisis las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen. Se utilizan soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN. Muchas soluciones de lisis contienen también EDTA, que forma un complejo con los iones de $Mg^{2}+$ e impide el funcionamiento de las DNasas. Los componentes celulares no solubles como el material fibroso y proteínas que permanecen en solución se separan del ADN por centrifugación. Tanto la homogeneización como la lisis celular son similares en los protocolos tradicionales y comerciales.

### Objetivos

**Objetivo General**

- Conocer la metodología básica para la extracción de ADN a partir de muestras de tejido epitelial animal.

**Objetivos específicos**

- Obtener ADN de calidad a partir de muestras de tejido epitelial.
- Adquirir destreza en la manipulación de equipos y reactivos para la extracción de ADN de tejido animal.

## Materiales

- Incubadora
- pHmetro
- Centrífuga
- Vortex
- Micropipetas de diversos volumenes
- Balanza analítica
- Plancha de calentamiento
- Estufa de secado o desecador
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Hielo picado o cajitas refrigerantes
- Baño serológico a 37 °C
- Baño serológico a 55-65 °C
- Fotodocumentador o transiluminador
- Puntas nuevas y estériles de diferentes volumenes
- Tubos eppendorf (3 por grupo)
- Reactivos: (tampón salino, SDS 20 %, NaCl 6M, isopropanol, etanol 70 %, tampón TE 1X, tampón TBE, agarosa)
- Enzimas: (Proteinasa K 20 mg/mL)
- Agua grado molecular
- Máscara y gorro de protección
- Guantes de nitrilo
- Frascos de descarte
- Libreta de notas
- Lápiz marcador (de preferencia *sharpie*)
- Flotadores para incubación en baño serológico
- Jabón antibacterial
- Papel toalla
- Desinfectante para el área de trabajo

## Procedimiento

1. Triturar 50-100 mg de tejido animal.
2. Adicionar 400 µL de tampón salino (0.4 M de NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 0,2 % mM de EDTA pH 8.0).
3. Adicionar 40 µL de SDS 20 % y 8 µL de proteinasa K (20 mg/mL) llevar a baño maría a 55-65 °C por aproximadamente 4 horas, homogenizar la muestra cada 30 minutos.
4. Retirar del baño maría y adicionar 300 µL de NaCl 6 M, homogenizar en vortex por 30 segundos y centrifugar durante 30 minutos a 10000 rpm.
5. Posterior a la centrifugación aparecerán dos fases, quedando en el sedimento los restos del tejido y en el sobrenadante el ADN.
6. Retirar el sobrenadante con cuidado y adicionar 400 µL de isopropanol (aproximadamente la misma cantidad del sobrenadante).
7. Incubar por 1 hora a -20 °C y posteriormente centrifugar por 20 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente, retirar el sobrenadante y adicionar 300 µL de etanol 70 %, homogenizar y centrifugar por 5 minutos a 10000 rpm.
8. Descartar el etanol y secar el sedimento.
9. Adicionar de 100 µL a 300 µL de TE, resuspender completamente con cuidado. Almacenar en nevera a 4 °C hasta la verificación electroforética (gel de agarosa 1%, buffer TBE, 80 V por 2 horas).

## Anexo F. Preparación de soluciones para extracción de ADN de tejido epitelial animal

**NaCl 6M**

| | |
|---|---|
| NaCl | 17.53 g |
| Aforar con agua ultrapura a 50 ml | |

**SDS 20%**

| | |
|---|---|
| SDS | 20 g |
| Aforar con agua ultrapura a 100 mL | |

**TE (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mm)**

| | |
|---|---|
| Tris 1M pH 7.5 | 1.0 mL |
| EDTA 0.5 M pH 7.4 | 20 µL |
| EDTA 0.2 M pH 7.4 | 50 µL |
| Aforar con agua ultrapura a 100 mL | |

**TBE 10X**

| | |
|---|---|
| Tris | 54.0 g |
| Ácido bórico | 27.5 g |
| EDTA 0.5 M pH 8.0 | 20 mL |
| Aforar con agua ultrapura hasta 500 ml | |

## Referencias bibliográficas


- Alejos-Velásquez, L., Aragón-Martínez, M., Cornejo-Romero, A. (2012). Extracción y purificación de ADN. Unidad de Biotecnología y Prototipos. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Dundass N., Leos, M., Mitui, P., Revell., B., Rogers, B. (2008). Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *Journal of Molecular Diagnostics*. 10: 311-316.
- Hudson, M. (2008). Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology. *Molecular Ecology Resources* 8:3–17.
- Sambrook J, Russell Dw. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tang, Y., Sefers, H., Li, Kohn, J., Procop, G. (2005). Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* 43: 4830-4833.

## 2.2 EXTRACCIÓN DE ARN

A la hora de trabajar con ARN, deben tomarse las máximas precauciones para evitar contaminaciones con RNAsas y la degradación del ARN. Es importante trabajar en un ambiente libre de RNAsas y tratar todo el material antes y después de uso, para su correspondiente eliminación. Deben usarse guantes de nitrilo en de todo el proceso.
De igual manera se debe intentar trabajar lo más rápido posible, con el fin de evitar la degradación del ARN extraído durante la manipulación.
Con el fin de obtener los mejores rendimientos, deben usarse muestras frescas como material de partida. Si es necesario acumularlas, estas se deben congelar en nitrógeno líquido y almacenarlas a -70 °C. Es de aclarar que una vez que las muestras han sido homogenizadas en el tampón de Lisis, pueden ser almacenadas a -70 °C sin necesidad de congelación en nitrógeno líquido.
El almacenamiento del ARN a -70 °C evita su degradación. Si se desea acumular tejido de una forma eficáz previo a su extracción, se recomienda usar RNA later (ambión #7020). Este es un producto que permite el almacenamiento de muestras a 4 °C por una semana o un mes a -20 °C. Seguir instrucciones indicadas por el fabricante.

### 2.2.1 Protocolo para extracción de ARN de tejido fresco

Recomendación inicial: **Utilizar guantes durante todo el proceso**, todo el material a utilizarse debe estar estéril y libre de RNAsas. Los mesones y la cabina de flujo laminar deben ser tratadas con etanol al 70 %, agua oxigenada 10 V y DEPC 0.1 % (Dietil pyrocarbonato).

#### Objetivos

**Objetivo General**

- Conocer la metodología básica para obtener ARN a partir de tejido fresco.

**Objetivos específicos**

- Extraer ARN de buena calidad a partir de muestras de tejido fresco.
- Adquirir destreza en la manipulación de equipos y reactivos para la extracción de ARN a partir de tejido fresco.

#### Materiales

- Incubadora
- pHmetro
- Centrífuga
- Vortex
- Micropipetas de diversos volumenes
- Balanza analítica
- Plancha de calentamiento
- Estufa de secado o desecador
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Hielo picado o cajitas refrigerantes
- Bala de nitrógeno líquido
- Fotodocumentador o transiluminador
- Puntas nuevas y estériles de diferentes volumenes
- Tubos eppendorf de 2 mL (3 por grupo)
- Reactivos: (trizol, cloroformo, isopropanol, etanol 75 %, tampón TE 1X, tampón TBE)
- Agua grado molecular
- Máscara y gorro de protección
- Guantes de nitrilo
- Frascos de descarte

- Libreta de notas
- Lápiz marcador (de preferencia *sharpie*)
- Flotadores para incubación en baño serológico
- Jabón antibacterial
- Papel toalla

**Procedimiento-Técnica Trizol**

1. Macerar el tejido en baño de nitrógeno líquido
2. Pasar el tejido macerado a un microtubo de 2 mL, adicionar 200 µL de Trizol, homogenizar con micropipeta e ir adicionando trizol hasta completar 1000 µL.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
4. Adicionar 200 µL de cloroformo y agitar con vortex.
5. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Esta etapa permitirá la separación en tres fases: transparente (ARN), blanca (proteínas), y rosada (ADN).
7. Transferir la fase transparente a otro microtubo que contiene 500 µL de alcohol isopropílico frio, invertir manualmente con cuidado e incubar por 30 minutos en freezer a -20 °C.
8. Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C.
9. Retirar el sobrenadante y adicionar 500 µL de alcohol al 75 %, invertir manualmente.
10. Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C.
11. Secar el sedimento a temperatura ambiente.
12. Adicionar 50 µL de agua ultrapura libre de RNAsas.
13. Verificar el RNA extraído en gel de agarosa a 1 %, como condiciones de corrida electroforética puede usarse 80 voltios por 1 hora. Cuantificar por espectrofotometría y verificar su calidad mediante la relación de absorbancias 260 nm/280 nm (Ver capítulo 3).

### 2.2.2 Protocolo para extracción de ARN de células ($1.5x10^7$ células)

**Recomendación inicial**: Utilizar guantes de nitrilo libres de talco durante todo el proceso, todo el material debe estar estéril y libre de RNAsas. Los mesones y la cabina de flujo laminar deben ser tratadas con alcohol al 70 %, agua oxigenada 10V y DEPC 0.1 % (Dietil pyrocarbonato).

**Objetivos**

**Objetivo General**

- Conocer la metodología básica para obtener ARN a partir de células.

**Objetivos específicos**

- Extraer ARN de buena calidad verificable en gel de agarosa.
- Adquirir destreza en la manipulación de equipos y reactivos para la extracción de ARN a partir de células.

**Materiales y equipos**

- Incubadora
- pHmetro
- Centrífuga
- Vortex
- Micropipetas de diversos volumenes
- Balanza analítica
- Plancha de calentamiento
- Estufa de secado o desecador
- Cámara de electroforesis

- Fuente de poder
- Hielo picado o cajitas refrigerantes
- Bala de nitrógeno líquido
- Fotodocumentador o transiluminador
- Puntas nuevas y estériles de diferentes volumenes
- Tubo con EDTA (comercialmente ya preparado)
- Tubo falcon de 15 mL
- Tubos eppendorf de 2 mL (3 por grupo)
- Reactivos: (trizol, cloroformo, isopropanol, etanol 75 %, tampón TE 1X, tampón TBE)
- Agua grado molecular
- Máscara y gorro de protección
- Guantes de nitrilo
- Frascos de descarte
- Libreta de notas
- Lápiz marcador (de preferencia *sharpie*)
- Flotadores para incubación en baño serológico
- Jabón antibacterial
- Papel toalla

## Procedimiento-Técnica Trizol

1. Colectar 10 mL de sangre en tubo con EDTA (comercialmente ya preparados).
2. Homogenizar la sangre y colocar en un tubo falcon de 15 mL
3. Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos, lavar las muestras con 3 mL de agua ultrapura y transferir a un tubo falcon de 15 mL.
4. Nuevamente centrifugar a 10.000 rpm por 5 minutos, resuspender en 1 mL de Trizol, homogenizar cuidadosamente con micropipeta y pasar el contenido a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
5. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
6. Adicionar 200 µL de cloroformo y agitar en vortex.
7. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 8000 rpm por 15 minutos a 4 °C.
9. En esta etapa se observarán tres fases: transparente (ARN), blanca (proteínas) y rosada (ADN).
10. Transferir la fase transparente a otro microtubo que contiene 500 µL de alcohol isopropílico frio, invertir manualmente e incubar por 30 minutos en freezer a -20 °C.
11. Centrifugar a 8000 rpm por 15 minutos a 4 °C.
12. Retirar el sobrenadante y adicionar 500 µL de alcohol al 75%, invertir manualmente.
13. Centrifugar a 8000 rpm, por 15 minutos a 4 °C. Descartar el sobrenadante.
14. Secar el sedimento.
15. Adicionar 100 µL de agua pura libre de RNAsas.
16. Cuantificar en gel de agarosa a 1 % teniendo como condiciones de corrida electroforética 80 voltios por 1 hora. Adicionalmente, cuantificar en espectrofotómetro (absorbancia a 260 nm y 280 nm) (Ver capítulo 3).

## Referencias bibliográficas


- Duy, J., Koehler, J. W., Honko, A. N., & Minogue, T. D. (2015). Optimized microRNA purification from TRIzol-treated plasma. BMC Genomics, 16(1), 95. http://doi.org/10.1186/s12864-015-1299-5.
- Greco, M., Sáez, C. A., Brown, M. T., & Bitonti, M. B. (2014). A Simple and Effective Method for High Quality Co-Extraction of Genomic DNA and Total RNA from Low Biomass Ectocarpus siliculosus, the Model Brown Alga. PLoS ONE, 9(5), e96470. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0096470.

- Lever, M. A., Torti, A., Eickenbusch, P., Michaud, A. B., Šantl-Temkiv, T., & Jørgensen, B. B. (2015). A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types. Frontiers in Microbiology, 6, 476. http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00476.
- McCarthy, A., Chiang, E., Schmidt, M. L., & Denef, V. J. (2015). RNA Preservation Agents and Nucleic Acid Extraction Method Bias Perceived Bacterial Community Composition. PLoS ONE, 10(3), e0121659. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0121659.
- Sambrook J, Russell Dw. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Travaglini E. C. (1973). Methods for the extraction and purification of desoribonucleic acid from eukariote cells. En: D. M. Prescott (ed.). *Methods in cell biology*. Academic Press, EE.UU.

# CAPITULO III
# VERIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

## 3.1 ELECTROFORESIS DE ÁCIDO NUCLEICOS

La electroforesis es un término general que se refiere a la técnica de separación o caracterización de moléculas cargadas eléctricamente con base en sus tasas específicas de migración en un campo eléctrico. El proceso es generalmente realizado en una matriz porosa, de modo que las macromoléculas puedan migrar diferencialmente de acuerdo con sus propiedades físicas.

Una matriz usada comúnmente en la separación de moléculas de ADN con tamaños entre 100 pb y 30 Kb es la agarosa, una forma de agar altamente purificado. Esta matriz porosa sirve como base a través de la cual, las moléculas se mueven con velocidades diferentes, inversamente proporcionales a su tamaño. Así, cuando más pequeña es la molécula, mayor será la distancia que ella recorre en un determinado periodo de tiempo.

Los fragmentos de ADN que tiene carga eléctrica negativa, conferida por la ionización de sus grupos fosfato, migran en dirección al polo positivo. Después de la migración electroforética, todas las moléculas de ADN del mismo tamaño quedan agrupadas en una determinada región del gel y son visualizadas como una banda.

El procedimiento puede dividirse en cuatro etapas: preparación del gel, aplicación de las muestras, electroforesis y análisis de los fragmentos separados. La concentración de agarosa en la preparación del gel es seleccionada en función del tamaño de los fragmentos que se desea separar (Tabla 2).

**Tabla 2**. Relación entre la concentración de agarosa y el rango de separación en tamaño molecular del ADN

| Concentración de agarosa en el gel (%) | Eficiencia en el rango de separación de moléculas lineales de ADN (Kb) |
|---|---|
| **0.3** | 5.0 – 60.0 |
| **0.6** | 1.0 – 20.0 |
| **0.7** | 0.8 – 1.0 |
| **0.9** | 0.5 – 7.0 |
| **1.2** | 0.4 – 6.0 |
| **1.5** | 0.2 – 3.0 |
| **2.0** | 0.1 – 2.0 |

Fuente: Puerta y Urueña, 2005.

### Notas introductorias



**La migración del ADN en el gel de agarosa**

La tasa de migración de ADN en un gel de agarosa depende de tres factores principales: de la concentración de agarosa en el gel, del voltaje aplicado y de la configuración de las moléculas de ADN.

Las moléculas de ADN migran en la matriz de agarosa con tasas diferentes, que son inversamente proporcionales al $Log_{10}$ de su tamaño molecular. Así el tamaño molecular de un fragmento de interés puede ser determinado comparándose su movilidad con la movilidad de las moléculas patrón (escalera de tamaño molecular), con tamaños moleculares conocidos.

La concentración de agarosa tiene un papel importante en las separaciones electroforéticas, una vez que ella determina la amplitud de los tamaños de los fragmentos que pueden ser separados en ese proceso. La migración de moléculas de ADN en el gel de agarosa depende del voltaje aplicado, el

cual genera un campo eléctrico con una fuerza que es definida por la longitud del gel y por la diferencia de potencial entre sus extremidades (V/cm). La velocidad de migración de ADN es proporcional al voltaje. Cuanto mayor sea el voltaje, mayor es la velocidad de migración. Sin embargo, con voltajes muy altos las moléculas mayores migran con una velocidad proporcionalmente mayor que las menores. Además, altos voltajes causan más imperfecciones en el gel, como diferencias en la intensidad y espesura de las bandas en las diferentes regiones del gel. Defectos comunes son bandas inclinadas o en forma de *U*. La inclinación de las bandas acostumbra ocurrir en las regiones próximas a los bordes.
El gel solidificado con altas temperaturas se adhiere a los bordes, tornándose más espeso que el centro, Esas diferencias causan defectos en la migración. Por esa razón, voltajes superiores a 125V (5V/cm) no deben ser utilizadas en sistemas de electroforesis en mini gel.
Moléculas de ADN con el mismo tamaño molecular, pero con configuraciones espaciales diferentes, migran a velocidades diferentes en el gel. Así, moléculas circulares superenrolladas (forma I), moléculas circulares pero relajadas por causa de cortes en una cadena (forma II) y moléculas lineales (forma III) presentan migración diferencial.

### Monitoreo de la electroforesis

La primera señal que la corriente eléctrica está pasando por la cámara de electroforesis es la visualización de los productos de la electrólisis del agua, o sea, burbujas de hidrógeno que se forman en el electrodo negativo y el gas oxígeno que surge a partir del electrodo positivo. Minutos después es posible verificar que los colorantes del tampón de aplicación ya están migrando a través del gel, en dirección al polo positivo. La banda que se mueve más rápidamente es la del colorante azul de bromofenol, de color más azulada, la banda que se mueve más lenta es la del xileno-cianol (más verdosa).

### Tratamiento con bromuro de etidio y cuidados de manipulación

El tratamiento con bromuro de etidio es el método más rápido, práctico, sensible y reproducible de detectar ADN en geles de agarosa. Ese agente se intercala entre las bases de los ácidos nucleicos, fluoresce en naranja (590 nm) cuando es iluminado con luz ultravioleta (260 a 360 nm). Sin embargo, como muchas de las sustancias usadas en laboratorio, el bromuro de etidio es un mutagénico potente y por tanto un serio candidato a ser un compuesto carcinogénico. Los protocolos de este curso que manipulan el bromuro de etidio serán realizados por el monitor, auxiliar de laboratorio o el docente responsable, en áreas especialmente reservadas para este procedimiento. El bromuro de etidio puede ser adicionado cuando la agarosa está en el erlenmeyer en proceso de enfriamiento, puede ser adicionado al tampón de electroforesis cuando está corriendo o el gel puede ser tratado posterior a la corrida electroforética en un recipiente separado.

### Manipulación y descontaminación del bromuro de etidio



**Indicaciones de peligro**

**H302: Nocivo en caso de ingestión**
**H330: Mortal en caso de inhalación**
**H341: Se sospecha que provoca defectos genéticos**

- Siempre use guantes de nitrilo libres de talco
- Limite el uso del bromuro de etidio a una región del laboratorio reservada especialmente para ese fin.
- Después de la coloración del gel use un embudo para descartar la solución de bromuro de etidio en un recipiente oscuro para descarte.
- Geles tratados y soluciones usadas deben ser manipuladas de acuerdo con protocolos especiales de descontaminación.

### Visualización de los geles tratados con soluciones intercalantes

La visualización de los geles de agarosa depende de la transiluminación con luz ultravioleta, ya que el bromuro de etidio fluoresce cuando se somete a una luz ultravioleta de longitud de onda entre 260 a 360 nm.



***La luz ultravioleta es perjudicial para la retina, NUNCA observe directamente una lámpara de ultravioleta sin protección para los ojos. Observe los geles usando máscaras de protección o gafas especiales que absorben las longitudes de onda perjudiciales. Reciba previamente inducción sobre el uso, por parte del docente o auxiliar de laboratorio.***

### Fotografía de los geles

Las fotografías obtenidas a partir de los geles de agarosa son muy importantes como registro de experimentos realizados e indispensables para la interpretación posterior de los mismos. A veces las fotografías con grandes períodos de exposición consiguen registrar señales muy débiles o invisibles al ojo humano. Es indispensable tener cuidado con el tiempo de exposición, pues exceso de tiempo puede inhibir la aparición de bandas, especialmente aquellas de menor tamaño molecular.

### Importancia de la integridad de los pozos en los geles de agarosa

Cualquier defecto causado en la forma de los pozos de los geles de agarosa durante el modelaje del gel o durante la aplicación de las muestras, puede ser causa importante de problemas en la electroforesis. Para que exista una buena definición de las bandas después de la migración, es necesario que las moléculas de ADN del mismo tamaño entren en el gel exactamente en el mismo tiempo. Cualquier factor que deforme la cara interna anterior del pozo y que saque esta fase de la posición de perpendicularidad en relación al campo eléctrico va alterar el aspecto de las bandas de ADN formadas. A continuación, se relacionan las principales fuentes de daños causados a los pozos de aplicación y que causan deformaciones en las bandas de ADN:

- Introducir la punta de la micropipeta directamente dentro del carril puede causar deformaciones en las paredes, además del riesgo de perforar el fondo del pozo. Los geles deben siempre estar sumergidos dentro del tampón en el momento de aplicación de las muestras. Centralice la extremidad de la punta en el pozo y baje la punta hasta tocar la superficie del tampón, lentamente expulse la muestra de la punta. Como el tampón de aplicación de las muestras tiene sacarosa o glicerol en su composición, estas sustancias aumentan la densidad de la muestra y hacen que ella se vaya al fondo del pozo.
- Torcer o balancear el peine en la hora de remoción puede deformar los pozos. Sostenga firmemente el peine con las dos manos en el momento de retirarlo.
- Remover los peines antes que la agarosa se haya solidificado completamente también deforma los pozos. No tenga prisa en elaborar un gel, es muy difícil distinguir visualmente un gel casi solidificado de uno solidificado completamente.
- Suciedades o residuos de agarosa en un peine mal lavado también altera la forma de los pozos. Inspeccione cada peine antes de usar y lávelos bien para remover cualquier residuo de agarosa.

## Objetivos

### Objetivo General

- Determinar la calidad del DNA que ha sido obtenido mediante protocolos básicos de extracción.

### Objetivos específicos

- Adquirir destreza en la corrida electroforética de muestras de ADN en geles de agarosa
- Conocer las características que determinan un DNA de buena calidad.

## Materiales

- pHmetro
- Micropipetas de diversos volumenes
- Balanza analítica
- Plancha de calentamiento
- Estufa u horno microondas
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Fotodocumentador o transiluminador
- Gafas de protección para luz ultravioleta
- Reactivos y soluciones: Bromuro de etidio, azul de bromofenol (tampón colorante 6X), buffer TEII, buffer TAE 1X, marcador de λHindIII
- Agua grado molecular
- Agua destilada estéril
- Papel parafilm o caja Therazaki
- Puntas nuevas y estériles de diferentes volumenes
- Tubos eppendorf de 1.5 mL
- 1 erlenmeyer para preparación de agarosa
- Máscara y gorro de protección
- Guantes de nitrilo
- Frascos de descarte
- Libreta de notas
- Lápiz marcador (de preferencia *sharpie*)
- Jabón antibacterial
- Papel toalla

## Procedimiento para la preparación del gel de agarosa

Se debe tener en cuenta que, para preparar una concentración de agarosa determinada, se debe inicialmente pesar el erlenmeyer conteniendo la agarosa disuelta en el tampón (TAE 1X o TBE 1X), después del calentamiento para disolución completa se pesa nuevamente y se completa con el tampón respectivo el volumen perdido por la evaporación. Este procedimiento garantiza la concentración exacta del gel y la homogeneidad de concentración de agarosa entre las corridas.

1. Pesar la agarosa para la concentración de 1 % y adicionar tampón TAE 1X en el volumen deseado.
2. Disolver la agarosa en baño María, estufa o microondas hasta no observar grumos y observar la solución de color transparente.
3. Dejar enfriar hasta que el gel alcance la temperatura aproximada de 50-60 °C, adicionar 5 µL de solución de bromuro de etidio (colocar la agarosa demasiado caliente puede quebrar o fragmentar la cámara de electroforesis)
4. Preparar la bandeja de la cámara de electroforesis colocando el peine deseado, verificando que este nivelada en la superficie del mesón.
5. Llenar la bandeja, evitando la formación de burbujas (dispersar la agarosa lentamente)
6. Dejar solidificar la agarosa (si no se va a utilizar inmediatamente, se puede sumergir en el tampón TAE 1X y guardar en la nevera para evitar resecamiento del gel, por un tiempo máximo de 24-48 horas.

### Preparación de la muestra para electroforesis

1. Sobre papel parafina o una caja pequeña de Therazaki coloque 2 µL de tampón TE II, 1 µL de azul de bromofenol y posteriormente, adicionar 2µL de ADN.
2. Homogenizar las muestras con cuidado y adicionar cada una, en los pozos correspondientes del gel de agarosa que previamente se debe ubicar en la cámara de electroforesis y que debe estar cubierto con tampón TAE 1X.

### Marcador de tamaño molecular

1. En un tubo de microcentrífuga adicionar 2 µL de marcador de tamaño molecular λ*Hind* III, 6 µL de tampón TE II y 2 µL de la solución tampón colorante 6X.
2. Llevar la mezcla a baño María a 65 °C por 10 minutos.
3. Transferir el tubo con la mezcla a hielo por 10 minutos.
4. Adicionar 5 µL del marcador en la primera y 5 µL en la última posición del gel de agarosa.

### Corrida electroforética

1. Posicionar los electrodos en la cámara de electroforesis (Figura 7) de modo que el inicio de la corrida este próximo al electrodo negativo (negro).
2. Encender la fuente de energía y seleccionar el voltaje y tiempo de corrida apropiado.
3. Realizar la corrida electroforética bajo una intensidad de corriente eléctrica apropiada para la muestra en estudio (Máximo 5 V/cm), calcular el valor para la cámara a utilizarse en esta práctica de laboratorio.
4. Después de la corrida apagar la fuente y remover los electrodos.
5. Retirar el gel de agarosa de la cámara de electroforesis, con mucho cuidado y usando siempre guantes de nitrilo libres de talco.
6. Visualizar en un transiluminador o fotodocumentador y tomar la fotografía usando la extensión tiff.
7. Limpiar cuidadosamente toda la superficie que estuvo en contacto con el bromuro de etidio.

### Reactivos para la electroforesis

**TE II**
10 mM Tris-HCl pH 7.5
0.1mM EDTA pH 8.0

**TAE (Tampón Tris-Acetato-EDTA)**
Solución 50 X (stock)

| | |
|---|---|
| Tris Base | 242.0 g |
| Ácido acético glacial | 57.1 mL |
| EDTA-$Na_2$ pH=8.0 | 100 mL |

Completar con agua destilada estéril a 1000 mL

**Solución 1 X (stock)**

| | |
|---|---|
| TAE 50X | 20 mL |

Completar con agua destilada estéril a 1000 mL

**Tampón colorante 6X**

| | |
|---|---|
| Azul de bromofenol | 0.25 % |

### Cuestionario

1. ¿Cuáles son las dos funciones del tampón de aplicación de la electroforesis?
2. ¿Cómo el bromuro de etidio tiñe el ADN? ¿Y cómo es el fundamento con otros colorantes existentes ya en el mercado?

**¿Qué sucedería si:**

3. ¿Si la cámara de electroforesis tuviera agua en lugar de tampón TAE?
4. ¿Si se utilizara agua en lugar de tampón TAE en la preparación del gel de agarosa?

5. ¿Si los electrodos se ponen invertidos?
6. ¿Qué representa una banda en un gel de agarosa?
7. Examine la foto de su gel y describa la calidad de cada uno de los ADN procesados en la electroforesis.

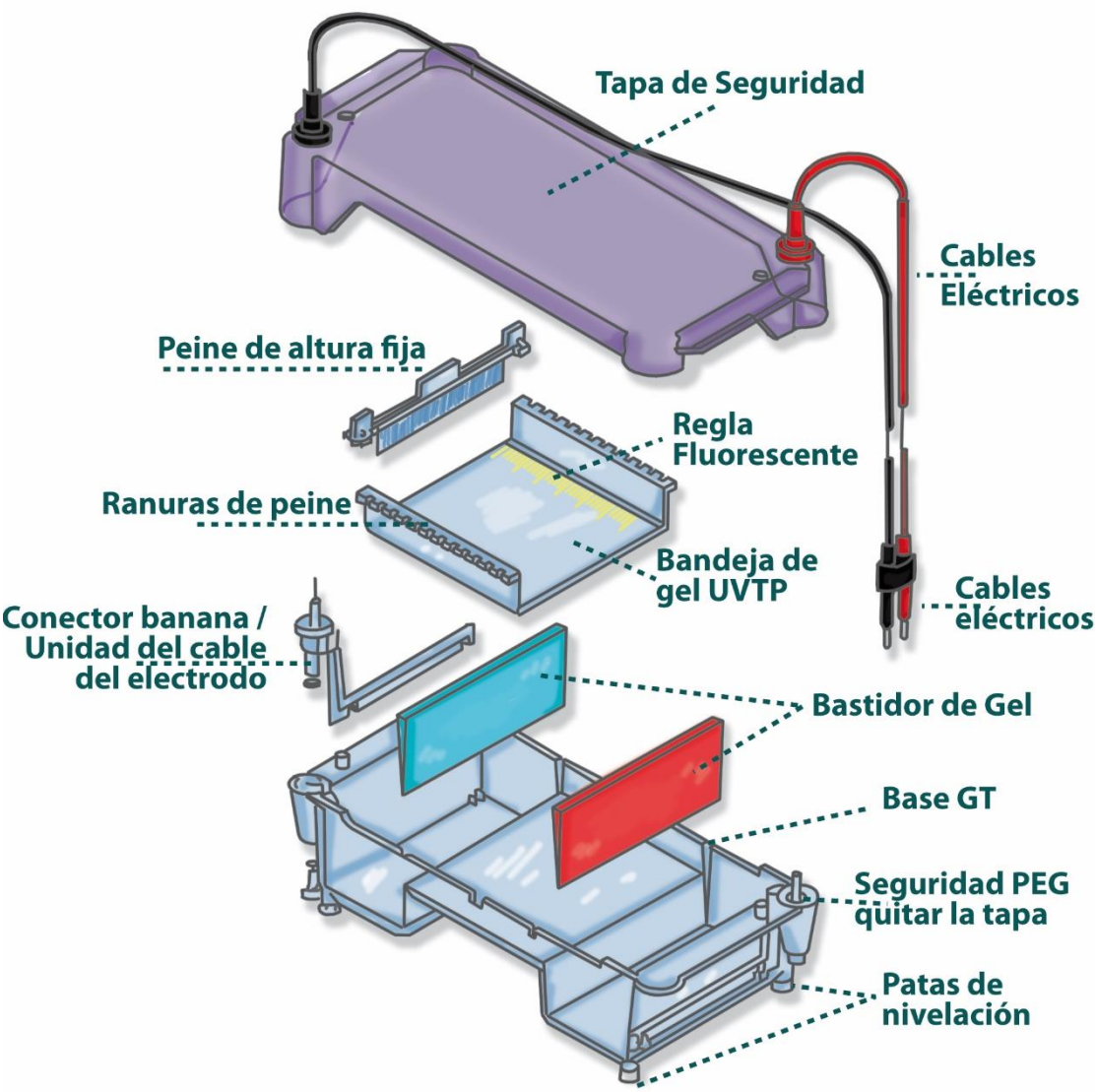



**Figura 7**. Esquema de cómo se ensambla la cámara de electroforesis. Fuente: Los autores.

## Referencias bibliográficas


- Bloom, M., Freyer, G., Micklos, D. (1996). *Laboratory DNA science: Na introduction to recombinant DNA techniques and methods of genombre analysis*. The Benjamin/Cummings Publ. Co. Inc.
- Puerta, C., y Urueña, C. (2005). *Prácticas de Biología Molecular*. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Colección Biblioteca del Profesional. 100p.
- Sambrook, J., Russell, D. (2001). "Chapter 5, protocol 1". Molecular Cloning - A Laboratory Manual 1 (3rd ed.). pp. 5.5–5.6. ISBN 978-0-87969-577-4.
- Sheehan, D. (2009), Physical Biochemistry: Principles and Applications (2nd ed.), Wiley-Blackwell, p. 181, ISBN 978-0470856031.

## 3.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Los ácidos nucleicos absorben la luz ultravioleta en un patrón específico. Si en un espectrofotómetro, una muestra es expuesta a la luz ultravioleta a 260 nm, cuanta más luz es absorbida por la muestra, mayor será la concentración de ácido nucleico en ella.

En una longitud de onda de 260 nm, el promedio del coeficiente de extinción de ADN de cadena doble es de 0.020 $(g/mL)^{-1}cm^{-1,}$ para una sola cadena de ADN y en el caso del ARN es 0.027 $(g/mL)^{-1}cm^{-1}$ y por sus siglas en oligonucleótidos de cadena sencilla que depende de la longitud y la composición de las bases. Por lo tanto, una densidad óptica de 1 corresponde a una concentración de 50 µg/mL de ADN de doble cadena. Es importante tener en cuenta que dado el emparejamiento de sus bases (por puentes de hidrógeno), el ADN bicatenario (Figura 8) absorbe menos que el monocatenario.

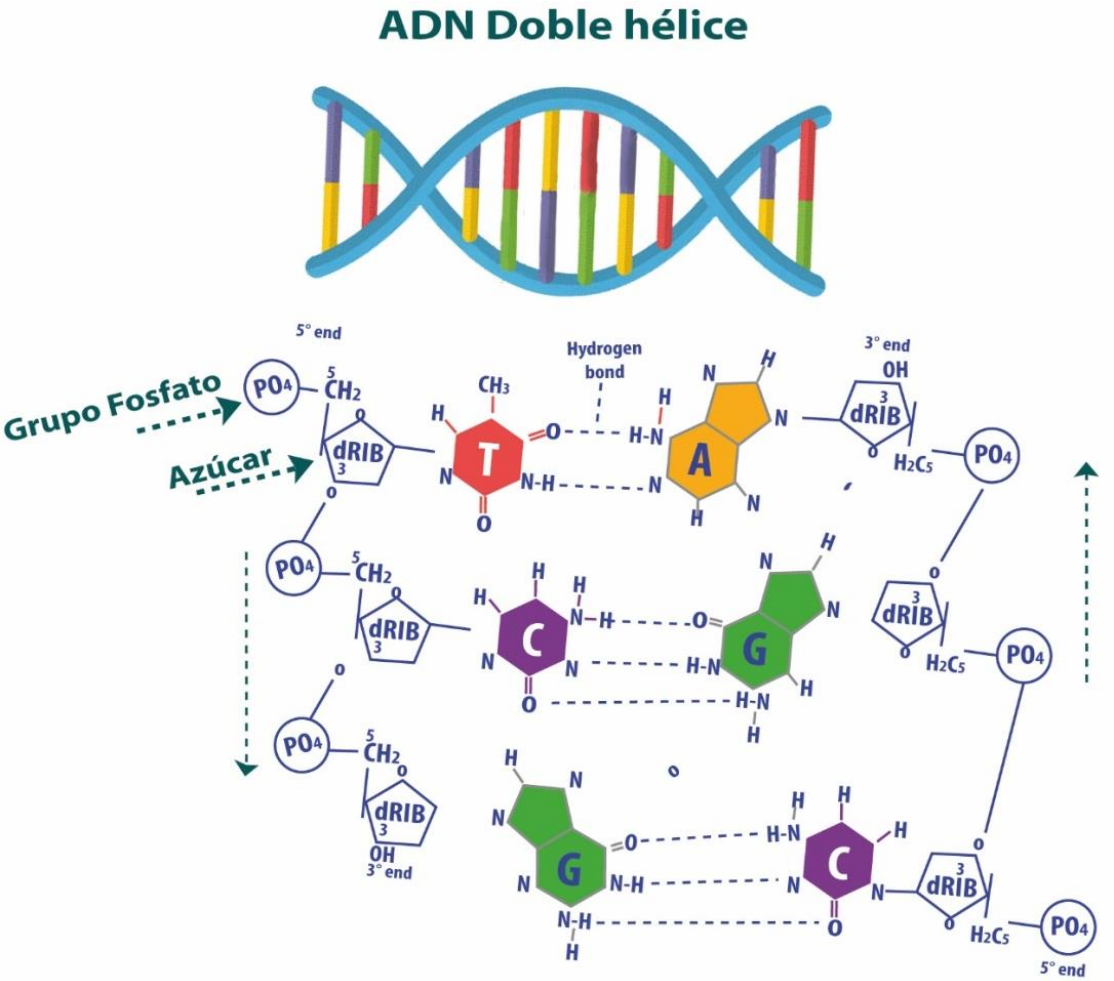



**Figura 8.** DNA bicatenario mostrando el apareamiento de bases, la dirección de polimerización y la formación de los enlaces fosfodiéster. Fuente: Los autores.

La lectura de absorbancia a 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico: Una DO de 1 corresponde a aproximadamente:

*** 50 µg / mL de ADN de doble cadena de ADN**
*** 40 µg / mL para una sola cadena de ADN y ARN**
*** 20 µg / mL de oligonucleótidos**

## Consideraciones importantes



- El máximo de absorción del ADN/ARN es de aproximadamente 260 nm. Esta cifra es un promedio de la absorción de los nucleótidos individuales que varían entre 256 y 281 nm.
- En el caso del ARN la concentración de una muestra puede calcularse con la siguiente ecuación:

**40 x DO (260) de la muestra = concentración de ARN (microgramos / mL)**

- Y esta ecuación para la concentración de ADN:

**DO (260) de la muestra = concentración de ADN (microgramos / mL)**

- La ecuación anterior describe que cuando la DO 260 de la muestra es 1, la concentración de ARN será de aproximadamente 40 microgramos / ml para ARN, o de 50 microgramos / ml para ADN.
- También podemos evaluar el grado de pureza de los ácidos nucleicos mediante el examen de la absorción en otras longitudes de onda en la que las proteínas y polisacáridos han conocido máximos de absorción. Se sabe que las proteínas absorben fuertemente a 280 nm y los polisacáridos pueden ser identificados por su máxima absorción a 230 nm.
- Por lo tanto, al evaluar el grado de pureza de la muestra de ácido nucleico utilizamos la relación entre las mediciones de estas tres longitudes de onda: 230 nm, 260 nm y 280 nm.
- Por ejemplo, una muestra que contiene ARN sólo después de un método de extracción es juzgada como no contaminado, si la relación es de 1: 2: 1, y para el ADN es de 1: 1,8: 1 (que refleja DO-230: 260: 280 ratio). Si hay una desviación significativa de la relación, entonces es evidente que los contaminantes están presentes y que una mayor purificación de la muestra es necesario.
- En muchos casos, la pureza y la concentración puede ser mayor, debido a la presencia de reactivos que se utilizan en el proceso de extracción en sí. Algunos de estos tienen características que son evidentes en un análisis espectrofotométrico que incluye las tres longitudes de onda indicadas. Por lo tanto, cuando se utiliza la espectrofotometría en el análisis de ADN o ARN es necesario ser consciente de los problemas potenciales que pueden resultar en esta relación dudosa.
- Además, el análisis de tasas y las concentraciones de ADN o ARN espectrofotométricamente también es necesario no sólo para obtener lecturas en 280, 260, y 230 nm, sino también para explorar todo el rango de 200-320 nm. Pequeñas cantidades de los reactivos utilizados en el proceso de extracción puede influir negativamente y proporcionar datos engañosos que pueden afectar a cualquier manipulación posterior.

## Materiales

- Espectrofotómetro
- Cubetas
- Micropipetas de diversos volumenes
- Hielo picado o cajitas refrigerantes
- Puntas nuevas y estériles de diferentes volumenes
- Tubos eppendorf
- Agua grado molecular
- Tampón TE II
- Máscara y gorro de protección
- Guantes de nitrilo
- Frascos de descarte
- Libreta de notas
- Lápiz marcador (de preferencia *sharpie*)
- Flotadores para incubación en baño serológico
- Jabón antibacterial
- Papel toalla

## Procedimiento para la medición de la concentración de ADN en el espectrofotómetro

Encender el espectrofotómetro 15 minutos antes de la lectura.

1. Observar que la muestra de ADN no esté muy viscosa para la retirada de la alícuota, en este caso debe realizar una dilución intermediaria de trabajo.
2. Preparar una dilución de ADN, por ejemplo 1/1000 (1 µL de ADN + 999 µL de tampón TE II), dejar por algún tiempo (por lo mínimo 15 minutos) para disolución completa de la muestra de ADN.
3. Poner en cero el espectrofotómetro con el blanco de agua grado molecular o el tampón usado en la resuspensión de ADN (habitualmente es TE), adicionando 1000 µL de este tampón en la cubeta, insertar la cubeta en la posición de lectura y apretar el botón BLANK.
4. Retirar el blanco, removiendo de la cubeta con la pipeta automática.
5. Adicionar la muestra (mínimo 1000 µL) en la cubeta y posicionar en el espectro para la lectura.
6. Realizar el mismo procedimiento para las diluciones respectivas.
7. El valor obtenido será representativo de la solución stock de la muestra de ADN.
8. Realice los cálculos correspondientes para saber con exactitud la concentración de ADN que contiene su muestra y realice las deducciones para dejar ajustada una dilución a 100 ng/µL para ser utilizada en los posteriores protocolos de las prácticas de biología molecular.

## Observaciones:

- Lavar la cubeta entre cada una de las muestras con tampón TE II o el blanco de las muestras respectivas.
- Al final del experimento lavar las cubetas con bastante agua destilada y dejar secar
- Desconectar el espectrofotómetro después del uso.
- La calidad del ADN puede ser observada por la lectura del factor 260/280 nm que debe estar entre 1.8 y 2.0.




## Cuestionario

1. ¿Qué conclusiones puede dar si una muestra de ADN tiene una relación de DO 260/280 mayor que 2.0?

2. Investigue por lo menos tres métodos que se utilizan en la actualidad para la cuantificación de ácidos nucleicos. Establezca un cuadro comparativo entre ellos.
3. Si una muestra de ADN diluida 1/100 que cuantificó en el laboratorio tiene una DO 260 nm de 0.05, ¿cuál será su concentración de ADN? ¿Cuáles serían los cálculos correctos entonces, para ajustar una solución de trabajo (20 µL a 50 ng/µL)?

## Referencias bibliográficas


- Jung, M., Klotzek, S., Lewandowski, M., Fleischhacker, M., Jung, K. (2003). Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. Clin. Chem. 49:1028-1029.
- National Human Genome Research Institute. National Institutes of Health. http://www.genome.gov/25520880.
- Puerta, C., y Urueña, C. (2005). Prácticas de Biología Molecular. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Colección Biblioteca del Profesional. 100p.
- Rogachev, V., Likhacheva, A., Vratskikh, O., Mechetina, L., Sebeleva, T., Bogachev, S., Yakubov L., Shurdov, M. (2006). Qualitative and quantitative characteristics of the extracellular DNA delivered to the nucleus of a living cell. Cancer Cell Int. 2006;6-23.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

## 3.3 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MOLECULAR USANDO EL PROGRAMA PHOTO CAPTW

El tamaño molecular de muestra de ácido nucleico puede calcularse realizando una corrida electroforética usando un marcador de tamaño molecular o escalera, es de recalcar que la comparación basada es aproximada y puede variar dependiendo de la corrida y en algunos casos también de la experticia del observador.
Hoy en día existen varios softwares para el cálculo del tamaño molecular de una muestra, muchos de ellos se basan en las fotografías obtenidas con el sistema de documentación y la asignación de un valor para cada una de las bandas del marcador usado, luego el programa mediante una comparación con respecto a la distancia de corrida, estima el tamaño aproximado de cada banda observada en el gel.

### Objetivo

**Objetivo General**

- Este ejercicio bioinformático nos permitirá determinar el tamaño en pares de bases de una muestra de análisis, usando el marcador λ*Hind*III.

**Objetivo específico**

- Adquirir destreza en el uso de herramientas informáticas para el estudio de la biología molecular.

### Materiales

- Gel fotodocumentado en archivo tipo JPG o tiff
- Computador
- Software PhotoCaptw
- Libreta de notas
- Memoria USB

### Procedimiento

1. Abrir el archivo deseado (imagen guardada en formato JPG o TIFF)
2. Apretar el botón IMAGE QUANTIFICATION/OPCIÓN MOLECULAR WEIGHT después opción LANE DEFINITION
3. Colocar el número total de columnas inclusive la del marcador/ seleccionar SEPARATION
4. Después, arrastrar el mouse y marcar el área seleccionada. Verificar que las bandas estén dentro de las columnas.
5. Ir nuevamente a MOLECULAR WEIGH y seleccionar DETECTION
6. Dar clic la opción DETECTION (esta en rojo)
7. NO CERRAR ESTA VENTANA DE (DETECT MENU)
8. Marcar con mucho cuidado la banda a ser analizada, descartar las que no son bandas.
9. Después de organizar las bandas, seleccionar en OK en la ventana de DETECT MENU.
10. Ir a MOLECULAR WEIGH y seleccionar M.W MARKER
11. COLOCAR EL NÚMERO DE LA COLUMNA DONDE SE ENCUENTRA EL MARCADOR.
12. Dar clic el botón NEW y entrar los valores del marcador (Figura 9), recordando que deben ser en decimales.
13. Después grabar (LOAD) el marcador en una CARPETA de su preferencia.
14. Ir nuevamente a MOLECULAR WEIGHT y oprimir la opción M.W. RESULT DISPLAY.
15. Allí va a aparecer una ventana, preguntado cuál es la columna que se desea analizar, usted puede dar clic en SELECT ALL. Entonces aparecerá el tamaño molecular de cada banda.

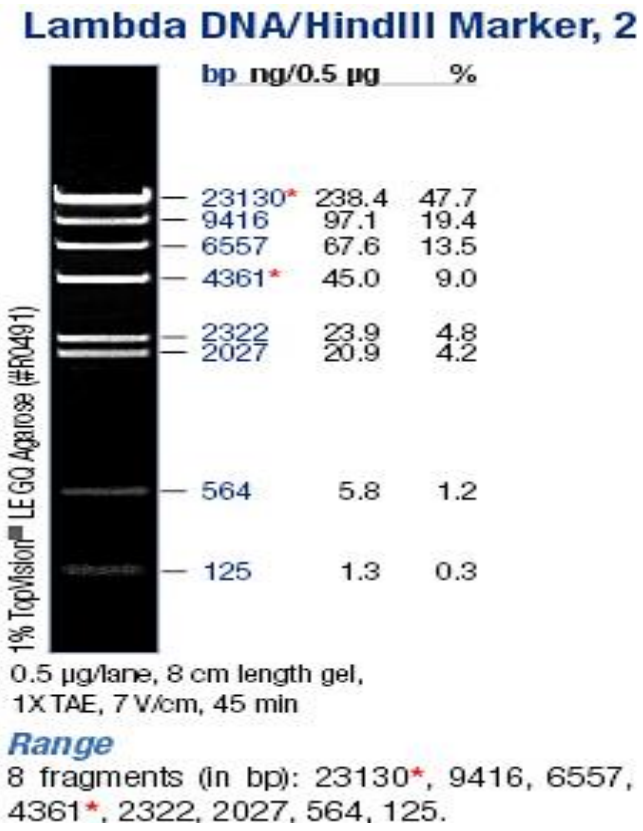



**Figura 9**. Tamaño de los fragmentos del marcador λ*Hind*III. Fuente: Catálogo de Promega (2014).

## Cuestionario



Realice la determinación del tamaño molecular de las bandas del gel que su docente le entregará para el ejercicio. Adicione este análisis en su bitácora con las respectivas observaciones.

## Referencias bibliográficas


- Burbano-Rosero, E. M., Ueda-Ito, M., Kisielius, J. J., Nagasse-Sugahara, T. K., Almeida, B. C., Souza, C. P., … Rivera, I. N. G. (2011). Diversity of Somatic Coliphages in Coastal Regions with Different Levels of Anthropogenic Activity in São Paulo State, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), 4208–4216. http://doi.org/10.1128/AEM.02780-10.
- Pinheiro, A. V., Han, D., Shih, W. M., & Yan, H. (2011). Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology. *Nature* Nanotechnology, 6(12), 763–772. http://doi.org/10.1038/nnano.2011.187.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# CAPITULO IV
# REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

## 4.1 REACCIÓN DE PCR

Como la hibridación de ácidos nucleicos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también permite detectar una secuencia específica de ADN dentro del panorama de un genoma complejo. La PCR es básicamente una reacción de duplicación de ADN realizada en un tubo de ensayo para la amplificación selectiva de una secuencia blanco. Para ello se emplean pares de secuencias cortas de ADN de cadena simple (oligonucleótidos) con cerca de 20 a 30 bases, que flanquean la secuencia blanco y sirven como punto de anclaje para que la DNA polimerasa pueda continuar con la reacción. Los cebadores delimitan la región que se va a amplificar, el cebador *forward* es complementario a la secuencia localizada en el comienzo de la secuencia blanco y el cebador *reverse* es complementario a la secuencia final (Figura 10). El ADN blanco es adicionado a una solución tamponada conteniendo DNA polimerasa termo - resistente, cebadores, desoxirribonucleótidos (dNTPs) y $MgCl_2$. Finalmente, la mezcla es sometida a un programa amplificación en el termociclador.

### Componentes de la reacción

**Desoxinucleótidos trifosfato**: Los cuatro dNTPs son requeridos en exceso como sustratos para la síntesis de millones de copias de ADN que se generan al finalizar el programa de termociclado. Usualmente se usan en concentración de 50 a 200 µM. Para ser reconocidos por la polimerasa deben ir acompañados de cationes $Mg^{+2}$, los cuales actúan como cofactores enzimáticos.

**Cebadores, oligonucleótidos o primers**: La selección de los cebadores para cualquier PCR es de vital importancia, los cebadores deben ser altamente específicos, es decir que solo hibriden en una única región de interés. Si un primer tiene 10 bases, la probabilidad que exista una secuencia al azar con la cual hibride es de $(1/4)^{10}$, cerca de un millón. En el genoma humano haploide existen aproximadamente 3 mil millones de pares de bases, lo que haría que esos cebadores hibriden a 3 mil sitios. En cambio, un cebador con 16 bases o más hibridará a un sitio único. Estas estimativas son realizadas imaginando que el genoma tenga secuencias aleatorias de bases, lo que en verdad no es cercano a la realidad, pero sirve como un estimativo preliminar.

Los cebadores deben cumplir con algunos requerimientos tales como, tener entre ellos una temperatura de fusión (Tm) igual o parecida, de manera que se puedan anillar o hibridar a la secuencia diana a la misma temperatura. Una de las fórmulas más sencillas para calcular la Tm de los cebadores es:

$$Tm = 2(AT) + 4(GC)$$

Los cebadores se hibridan al ADN molde en temperaturas entre 50 °C a 65 °C, tres variables determinan la temperatura ideal y el tiempo necesario para que ocurra la hibridación: concentración de los cebadores, longitud de los cebadores y la secuencia de bases de los cebadores.

Generalmente la temperatura de hibridación es cerca de 5 °C abajo de la Tm de los cebadores, donde Tm (Temperatura melting) es definida como la temperatura en que 50% de las moléculas de cadena doble del ADN están desnaturalizadas. La Tm de un cebador puede ser estimada atribuyéndose 4 °C para cada G o C, y 2 °C para cada A o T. Si es necesario, la temperatura óptima de hibridación puede ser determinada experimentalmente.

Igualmente, los cebadores deben tener un contenido de GC de alrededor de 50 %, no poseer regiones ricas de pirimidinas y purinas, no deben ser complementarios entre sí y se deben evitar secuencias con presencia de estructuras secundarias significativas. Por lo general, los cebadores se utilizan en una concentración de 0.1 a 0.5 µM.

## Reconstitución de cebadores

Los cebadores pueden ser resuspendidos en agua grado molecular o tampón TE estéril, seguido por lo menos de 2 minutos de agitación cuidadosa con micropipeta y se deben guardar a -20 °C. http://functionalbio.com/web/dilution_resuspension_input.php

Tener en cuenta las siguientes fórmulas para la determinación de volumen de TE o agua ultrapura a adicionar:

- Cuando llega un primer de una casa comercial, viene una información relacionada con la concentración, entonces, esta concentración en nanomoles debe ser multiplicada por 10 para obtener la cantidad de microlitros en que debe resuspenderse el primer, de esta forma, se tiene una concentración stock de 100 µM. Ejemplo:
  Si un primer llega a la concentración de 96 nM, entonces→96x10 = 960 µL de TE o agua ultrapura que deben ser usadas para reconstituir el primer y dejar la solución a 100 µM. La solución de trabajo en la gran mayoría de PCR es recomendable estar a una concentración de 20 µM, entonces se hace una dilución 1/5.

Conversión de pmoles del cebador a µg =pmoles (longitud x 325) / 1000000
Conversión de µg de cebador en pmoles=µg x 1000000/ (longitud x 325)
10 pmoles de un cebador de 25 mer = (10 x 25 x 325) / 1000000= 0.081 µg de primer

**ADN polimerasa termoestable**: Comúnmente se emplea la Taq polimerasa, originalmente aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*. Es una enzima activa a altas temperaturas (75 °C) y estable con frecuencia hasta 95 °C. Esta característica permite su actuación en sucesivos ciclos de replicación (amplificación) sin inactivarse. Además, la replicación a temperaturas elevadas impide la formación de híbridos parcialmente desapareados y contribuye a la especificidad y rendimiento del proceso. La enzima normalmente se utiliza a una concentración de 1 U/ 50 µL de reacción.

**Tampón o buffer**: El amortiguador estándar para PCR contiene 50 mM de KCl para facilitar la hibridación (una concentración mayor a 50 mM de KCl podría afectar la DNA polimerasa), 10 mM Tris-HCl (pH=8.3) y 1.5 mM $MgCl_2$, el cual actúa como cofactor para la enzima.

**Molde o ADN blanco**: Es la secuencia de ácido nucleico que se desea amplificar. Tanto la calidad como la cantidad de ADN son parámetros críticos. La presencia de sustancias como grupos hemo, urea, etanol y SDS pueden inhibir la acción de la Taq polimerasa.

## Etapas del proceso

1. **Desnaturalización**: Calentamiento para la separación de las cadenas de ADN, la mezcla es llevada por el termociclador a temperatura de 95 °C. Esta temperatura debe ser mayor a la Tm de los cebadores (Figura 10).

2. **Anillamiento**: Hibridación de los cebadores a las hebras de cadena sencilla de la secuencia blanco. Generalmente se usan temperaturas de 37 a 65 °C, durante 10 a 120 segundos.

3. **Elongación o extensión**: Etapa de amplificación propiamente dicha, en la que la DNA polimerasa elonga los cebadores empleando como molde ambas hebras originales de la secuencia diana de ADN. La extensión transcurre en sentido 5'→ 3' a partir del extremo 3' OH de cada cebador, empleando como sustrato los cuatro dNTPs hasta terminar la lectura del molde o hasta que se comience una nueva etapa de desnaturalización (siguiente ciclo).

Por lo general esta etapa sucede durante 30 a 120 segundos, dependiendo de la longitud de la secuencia a amplificar.

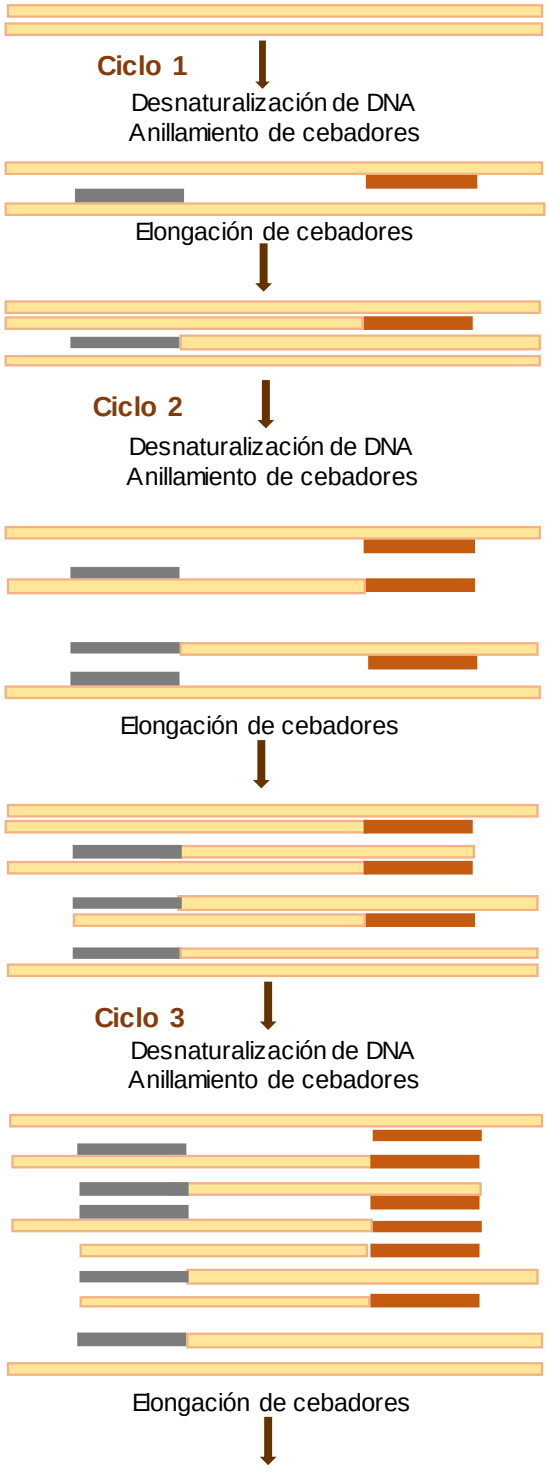



**Figura 10**. Reacción en cadena de la polimerasa. Fuente: Extraída de Lodish *et al.*, 2003 y modificada por los autores.

## Consideraciones importantes y contaminaciones de la PCR

- La técnica de PCR es una técnica extremadamente sensible, capaz de detectar la presencia y amplificar una única molécula de ADN. Por eso, es fundamental obedecer rutinas de laboratorio rigurosas para evitar contaminaciones con otras muestras o con un producto de la amplificación de las reacciones previas.
- Lo ideal es realizar los experimentos de PCR en un sitio exclusivo y la corrida electroforética en otro sitio. Los manipuladores deben utilizar siempre guantes de nitrilo libres de talco y de ser posible usar puntas especiales con filtro que bloquean la contaminación con los aerosoles originados en las muestras pipeteadas.
- Asociaciones no específicas entre los cebadores pueden acontecer inmediatamente después de la adición de cloruro de magnesio, de modo que el equipo ya debe estar previamente programado y todos los estudiantes deben terminar de preparar la reacción simultáneamente. Trabaje rápidamente e inicie los ciclos de temperatura después de terminar de adicionar todos los reactivos.
- Para realizar una PCR se debe usar material nuevo y estéril.
- Los reactivos deben ser descongelados con mucho cuidado.
- El agua ultrapura debe ser desionizada, autoclavada y posteriormente filtrada a través de membrana de 0.22 µm.
- Mantener la Taq polimerasa en congelación o baño de hielo durante su uso, para evitar pérdida de actividad de esta enzima.
- Use un Lápiz marcador (de preferencia *sharpie*) para identificar la tapa de cada tubo.
- Si hay evaporación en el termociclador, adicione 10 µL de aceite mineral estéril grado molecular a cada tubo de PCR, después de la adición de los reactivos.

## Objetivo General

- Amplificar DNA por PCR de forma siguiendo los lineamientos de la guía de laboratorio.

## Objetivos específicos

- Conocer la metodología básica para amplificar un blanco de interés por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.
- Reconocer la importancia de las diferentes etapas de la PCR y sus implicaciones de incorrectas manipulaciones en laboratorio.

## Materiales

- Centrifuga
- Termociclador
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Fotodocumentador o transiluminador
- Micropipetas de diversos volumenes
- Hielo picado o cajitas refrigerantes
- Puntas nuevas y estériles de diferentes volumenes
- Tubos eppendorf
- Reactivos: tampón TE 1X, tampón TAE 1X, azul de bromofenol, bromuro de etidio u otro agente como SyGreen o EZvision, si se dispone de ellos en el laboratorio.
- Marcador de tamaño molecular 1 Kb de Promega
- Mix para PCR: Buffer, Taq-polimerasa, $MgCl_2$, dNTPs, cebadores 27F y 1041R,
- DNA de la muestra ajustado a 100 ng/uL
- Agua grado molecular filtrada
- Desinfectante: alcohol 70 % o hipoclorito diluido
- Máscara y gorro de protección

- Guantes de nitrilo
- Frascos de descarte
- Libreta de notas
- Lápiz marcador (de preferencia *sharpie*)
- Jabón antibacterial
- Papel toalla

**Protocolo de preparación de PCR**

1. Descongelar por completo los reactivos en hielo y mezclar por inversión antes de su uso.
2. Limpiar con solución de hipoclorito de sodio diluido o alcohol a 70 % la superficie de trabajo.
3. Preparar la reacción de la PCR según las condiciones indicadas en la Tabla 3, teniendo en cuenta que la pre-mezcla o reacción con todos los componentes (a excepción del ADN blanco), se debe preparar en un área dispuesta sólo para este fin. Adicionalmente, la bata de laboratorio, gorro y guantes deben ser mantenidos en el área.
4. Los elementos de PCR deben ser almacenados separados de los demás elementos de laboratorio y sólo se destapan en el cuarto de pre-PCR.
5. Para realizar la amplificación de la sub-unidad ribosomal 16S se utilizarán los cebadores 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - Lane, 1991) y 1041R (CGGTGTGTACAAGACCC - Nubel *et al.,* 1996). Inicialmente estos cebadores se diluirán en agua miliq (ultrapura) formando una solución stock de cada primer a una concentración de 100 µM, a partir de esta, se preparará la solución de trabajo a 20 µM. Por otra parte, se realizará un mix de dNTPs a una concentración de 25mM, a partir del cual se hará un mix de trabajo de dNTPs a una concentración de 2,5 mM.
6. Se debe calcular las cantidades de cada uno de los componentes de la reacción para obtener el mix, por ejemplo, si son 10 muestras (2 de ellas deben ser el control positivo y negativo de la reacción), entonces se deben usar las cantidades de la columna 10X (Tabla 3), comenzando con los volumenes mayores hasta los menores, entonces primero se adiciona agua (327.5 µL) a un tubo eppendorf, luego, buffer colorless 5X (100 µL), Solución de $MgCl_2$ 25 mM (20 µL), DNTP 2.5 mM (10 µL), cebador (27F), cebador 1041R y GoTaq de Promega (2.5 µL), mezclar con cuidado con la punta de la micropipeta y luego distribuir 48 µL en diez sendos tubos de PCR de 0.2 µL. Adicionar el agua al control negativo en el cuarto de pre-PCR, no volver a abrir este tubo, hasta después del termociclado y verificación del producto en el gel de agarosa.
7. Salir del área donde se realizó la mezcla y proceder a adicionar 2 µL de la respectiva muestra de DNA para cada uno de los tubos de reacción. Tener en cuenta usar una micropipeta con puntas de filtro y exclusiva para éste fin.

**Tabla 3**. Listado de reactivos y sus cantidades respectivas para la preparación de la PCR para amplificación del gen 16sRNAr

| **Reactivo** | **1X µL** | **10X µL** |
|---|---|---|
| Agua ultrapura estéril | 32.75 | 327.5 |
| Buffer Colorless 5X | 10 | 100 |
| Solución de $MgCl_2$ 25 mM | 2 | 20 |
| dNTP (10 mM de cada), es lo mismo que mix de dNTPs a (2.5 mM) | 1 | 10 |
| Cebador 27F (F) 20 µM | 1 | 10 |
| Cebador 1041R (R) 20 µM | 1 | 10 |
| GoTaq Promega | 0.25 | 2.5 |
| ADN de la muestra (100 ng/µL) | 2 µL para cada tubo | |

| | |
|---|---|
| Total (Vf) | 50 µL |

8. Realizar un spin de los tubos ya inoculados con el ácido nucleico por 20 segundos a 10000 rpm e inmediatamente colocar en el termociclador, correr el programa adecuado, previamente cargado en el termociclador. En este caso, el programa de termociclado será: 95 °C por 2 minutos; 30 ciclos con las siguientes características: 94 °C por 2 minutos, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 3 minutos; la extensión final será de 10 minutos a 72 °C.
9. Retirar los tubos del termociclador en una placa de refrigeración y analizar las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa a 1.4 %. Para una reacción Vf de 50 µL se recomienda analizar 10 µL del producto final del PCR. Es importante mencionar que el sitio donde se lleva a cabo la electroforesis debe ser en un lugar diferente y separado de las áreas anteriores (Pre-PCR y adición de ADN), por cuanto es en este momento cuando existe mayor peligro de contaminación debido a la dispersión de los amplificados.




## Cuestionario

1. ¿Qué sucedería si usted coloca en una reacción de PCR, exceso de dNTPs?
2. ¿Qué resultado esperaría usted si hay deficiencia de $MgCl_2$ en la reacción de PCR?
3. Realice una tabla comparativa entre PCR tradicional, PCR de canal, PCR de emulsión y Real Time PCR.

## Referencias bibliográficas


- Lane D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E. Oodfellow, M. (Ed.). Nucleic acid techniques in bacterial systematics. England: John Wiley & Sons, Chichester, p. 115–163.
- Lodish Harvey. (2004). Molecular cell biology. 5th edition. Editorial W.H. Freeman. New York, 973pp.
- Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R., Ludwig, W., Backhaus, H. (1996). Sequence Heterogeneities of Genes Encoding 16S rRNAs in Paenibacillus polymyxa. Detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. J. Bacteriol. 178: 5636-5643.
- Puerta, C. y Urueña, C. (2005). Prácticas de Biología Molecular. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. Colección Biblioteca del Profesional. 100p.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# CAPITULO V
# MARCADORES MOLECULARES

## 5.1 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA E IDENTIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Esta práctica presenta un método rápido para la transformación de *E. coli* con un ADN exógeno. Las células bacterianas son tratadas para que se tornen competentes para incorporar ADN plasmídico conteniendo un gen de resistencia a la ampicilina (pAMP). Los transformantes son detectados por su fenotipo de resistencia al antibiótico.

Las muestras de células de *E. coli* son tomadas de una placa petri de agar nutritivo o LB (Luria Bertani) y resuspendidas en dos tubos de poliestireno (falcon) de 15 mL conteniendo una solución de cloruro de calcio ($CaCl_2$). El plásmido pAMP es adicionado en uno de los dos tubos, ambos tubos son incubados a 0 °C por 15 minutos. Después un rápido choque térmico a 42 °C, las células son llevadas a incubación en frio (4 °C), luego se adiciona medio de cultivo LB y las muestras de las suspensiones son plaqueadas en dos medios de cultivo: agar LB con ampicilina (LB/Amp) y medio sin el antibiótico.

Las placas son incubadas por 12 a 24 horas a 37 °C. Las células que fueron transformadas con el ADN plasmídico y que contienen el gen para la resistencia a la ampicilina crecerán en la placa de LB/Amp (Figura 11). Divisiones subsecuentes de una célula resistente al antibiótico producirán una colonia de bacterias resistentes. Por tanto, cada colonia en una caja de ampicilina representa un único evento de transformación.

### Notas introductorias

La mayoría de los protocolos de transformación pueden ser divididos en cuatro pasos principales:

1. **Pre-incubación**: Las células son resuspendidas en una solución de cationes e incubadas a 0 °C. Los cationes interactúan con los fosfatos negativos de la membrana celular de *E. coli* facilitando la entrada de ADN.

2. **Incubación**: El ADN es adicionado y la suspensión de células es nuevamente incubada a 0°C.

3. **Choque de temperatura**: La suspensión de células/ADN es brevemente incubada a 42 °C y entonces nuevamente sometida a 0 °C. La alteración rápida de temperatura genera un desequilibrio térmico entre los dos lados de la membrana de *E. coli*, lo cual probablemente crea un flujo que arrastra los plásmidos hacia el interior de la célula y favorece la acción del $CaCL_2$ sobre la polaridad de la membrana.

4. **Recuperación**: El medio LB es adicionado a la suspensión de células/ADN, se incuba a 37°C con agitación y posteriormente se plaquea en medio selectivo. Las células transformadas se recuperan del tratamiento, amplifican el plásmido transformado y comienzan a expresar la proteína de resistencia al antibiótico.

### Simplificación de la transformación por el método de colonias

Un procedimiento clásico de transformación de colonias emplea todas las etapas anteriormente mencionadas. Sin embargo, la incubación y el choque térmico son pasos absolutamente esenciales. Para disminuir tiempo el método simplificado omite los pasos no esenciales de la pre-incubación y la recuperación. El método de colonias también se inicia tomando colonias de *E. coli* directamente del medio de cultivo en caja de petri, eliminando por tanto la necesidad de preparar células en la fase logaritmica. Debido a que no es necesario el cultivo del microorganismo en medio líquido, el método no requiere equipos para la agitación y análisis por espectrofotometría. Por lo tanto, este

procedimiento tiene como ventajas que requiere un tiempo mínimo de preparación, utiliza menos equipos y es bastante seguro.

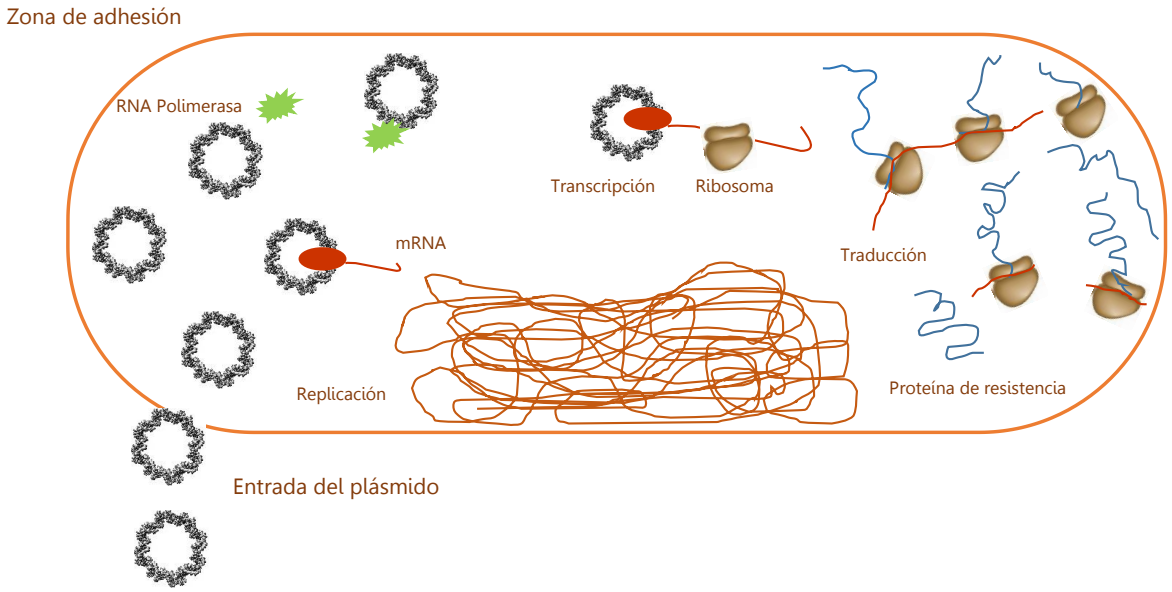



**Figura 11**. Expresión de la resistencia a los antibióticos en células transformadas. Fuente: Los autores.

### La ineficiencia relativa de la transformación de colonias

La eficiencia de transformación conseguida con el protocolo de colonias ($5x10^3$ a $5x10^4$ colonias por microgramo de plásmido) son hasta 200 veces menores que con el producto clásico ($5x10^4$ o $10^6$ colonias por microgramo). La transformación de colonias es perfectamente adecuada a la transformación de *E. coli* con ADN de plásmido intacto purificado. No obstante, esta metodología dará resultados marginales con ADN ligado, que es compuesto de plásmidos circulares relajados y de ADN plasmídico lineal. Estas formas resultan entre 5 a 100 veces menos transformantes que una masa equivalente de plásmido intacto superenrrollado.

### Manutención de líneas celulares de *E. coli* para transformación de colonias

El procedimiento clásico incluye varias etapas de cultivo en medio líquido que garantiza la obtención de células de *E. coli* que son eficientemente transformadas. A pesar que el método de colonias excluye esas etapas y usa células cultivadas en agar sólido, es importante monitorear las células que serán utilizadas en el método de colonias. Se evidencia una caída en el crecimiento del número de transformantes (de las 50 a 500 células esperadas por placa a prácticamente cero), se debe descartar ese cultivo y obtener uno nuevo.

Pases celulares repetidos de células de *E. coli* pueden resultar en la pérdida de la competencia, lo que tornará inviable el proceso de transformación con el método de colonias. Hay evidencias muy sustentadas que la pérdida de la capacidad de transformación en células de MM294 puede ser resultado de congelación inapropiada de las células. Por ello es necesario realizar conservación a temperatura ambiente en medio de cultivo inclinado y placas estriadas para no perder las características celulares de la bacteria.

### Plásmido pAMP

Casi todos los plásmidos que tienen un marcador seleccionable para la resistencia a los antibióticos pueden ser sustituidos por pAMP para demostrar la transformación de *E. coli* para un fenotipo-antibiótico resistente. Sin embargo, el plásmido pAMP fue construido específicamente como una molécula para la enseñanza de mecanismos específicos de biología molecular y por ello tiene ventajas en otros contextos (Figura 12):

1. pAMP es derivado del vector pUC que se replica en un gran número de copias por célula, el rendimiento de preparaciones de este plásmido es significativamente mayor que los obtenidos con pBR322 y otros plásmidos con menor capacidad de amplificación.
2. pAMP fue construido para ser utilizado juntamente con otro plásmido didáctico, el pKAN. Cada uno de ellos produce fragmentos de restricción específicos que son rápidamente identificables en un gel de agarosa. Esto permite que moléculas recombinantes formadas por la ligación de esos fragmentos puedan ser fácilmente caracterizadas (Figura 12).

### Selección por el antibiótico

La ampicilina es el marcador de resistencia a antibióticos más práctico con fines de demostración, especialmente en el protocolo de transformación rápido descrito en esta práctica de laboratorio. La ampicilina interfiere en la construcción de la capa de peptidoglicano de la pared celular y mata solamente células en replicación que están produciendo nuevas estructuras celulares. Las células que no se están replicando no son afectadas. Por tanto, las células pueden ser plaqueadas en medio conteniendo ampicilina directamente después del choque de temperatura, omitiendo el paso de recuperación. Las células transformadas pueden recuperarse en la presencia de ampicilina, porque la mayoría de ellas expresa la proteína para la resistencia antes de dividirse. Por otro lado, la selección con la kanamicina es menos susceptible a la transformación rápida, una etapa de recuperación antes del plaqueado es esencial, debido a que la kanamicina actúa rápidamente, matando todas las células (en replicación o no) que no estén activamente expresando la proteína para la resistencia.

### Colonias de *E. coli*

Cajas sembradas con *E. coli* MM294 son la fuente de las colonias bacterianas que se utilizarán para este laboratorio. MM294 proporciona rendimientos superiores de ADN plasmídico en mini-preparaciones. El fenotipo de tipo salvaje. No contiene plásmidos. Los cultivos deben utilizarse dentro de un mes, pero se utilizan mejor dentro de las 2 semanas de la entrega. Almacenar a + 4 ° C. Para obtención de mejores resultados, deben utilizarse células con incubación de 12-24 horas a 37 °C. Sin embargo, buenos resultados también pueden obtenerse cuando las células son almacenadas a temperatura ambiente por 24 horas después de finalizada la incubación inicial. Durante este periodo las colonias alcanzan un gran tamaño y se adhieren al medio de cultivo, facilitando su selección posterior con asa de inoculación. Una caja con varios días puede también ser reincubada a 37°C por algunas horas o por la noche antes de su uso.

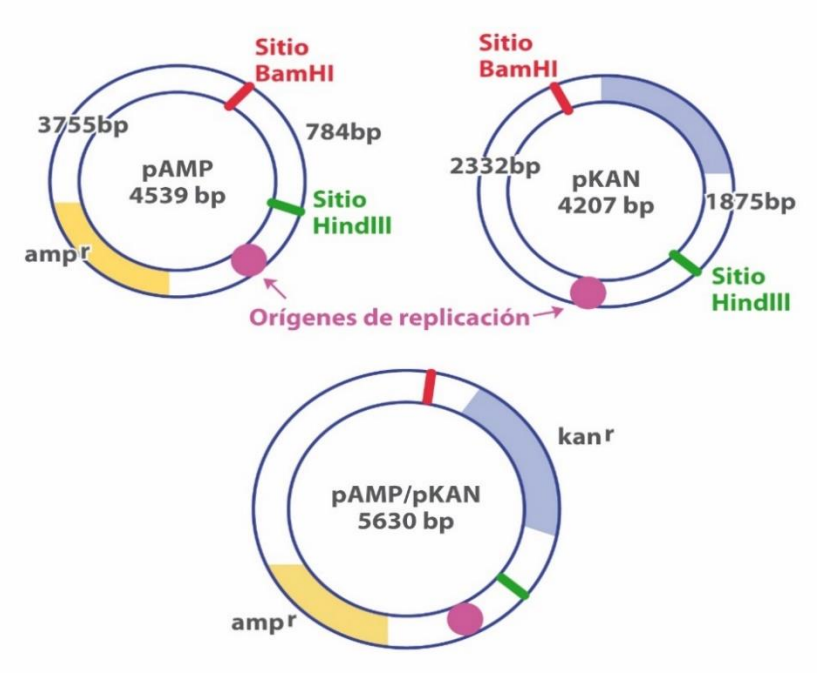



**Figura 12**. Características de los plásmidos pAMP, pKAN y pAMP/pKAN. Fuente: Rediseñada por los autores.

## Materiales

- Cultivo inicial de la bacteria MM294, cepa de *E. coli* aislada en el laboratorio de Matthew Meselson.
- $CaCl_2$ 50 mM
- 0.005 µg/µL de pAMP
- Cajas de medio LB (verificar con el docente el número de cajas por grupo)
- Cajas de medio LB/amp (verificar con el docente el número de cajas por grupo)
- Recipientes con hielo triturado o cajas refrigerantes
- Asa Drigalski o perlas de vidrio
- Asa de inoculación
- Tubos de ensayo
- Incubadora
- Vortex
- Micropipetas de diversos volumenes
- Plancha de calentamiento
- Baño serológico a 37 °C
- Cuenta colonias
- Puntas nuevas y estériles de diferentes volumenes
- Máscara y gorro de protección
- Guantes de nitrilo
- Frascos de descarte
- Libreta de notas
- Lápiz marcador (de preferencia *sharpie*)
- Flotadores para incubación en baño serológico
- Jabón antibacterial
- Papel toalla

**Procedimiento**

Todo el protocolo debe ser realizado bajo condiciones de esterilidad.

1. Use un lápiz marcador para anotar en un tubo de ensayo estéril de 15 mL la señal (+) y en otro tubo la señal (-), significando con y sin plásmido, respectivamente.
2. Use una micropipeta con punta estéril para adicionar 250 µL de la solución de $CaCl_2$ en cada tubo.
3. Coloque los dos tubos en hielo.
4. Use un asa de inoculación estéril para transferir por lo menos 5 colonias (de 3 mm) aproximadamente al tubo marcado como (+), para esto siga las siguientes recomendaciones:
   a. Esterilice el asa hasta que quede roja, deje enfriar.
   b. Enfríe totalmente el asa en las paredes de la caja Petri.
   c. Raspe varias colonias hasta obtener una masa visible. Tenga mucho cuidado para no transferir agar durante el proceso (impurezas de agar pueden inhibir el proceso de transformación).
5. Introduzca el asa directamente en el tubo con $CaCl_2$. Mueva el asa en varias direcciones para que la masa de bacterias sea desprendida totalmente. Levante el tubo contra la luz, para verificar si la masa de células se desprendió totalmente, verifique que el inóculo no haya quedado adherido al tubo.
6. Esterilice el asa nuevamente y déjela sobre el mesón.
7. Suspenda inmediatamente las células del tubo (+) con ayuda de la micropipeta. Evite formación de burbujas. La suspensión debe estar ligeramente lechosa y desprovista de grumos visibles de células.
8. Devuelva el tubo (+) para el hielo.
9. Transfiera otra masa de células para el tubo (-), como se indicó en la etapa 4 y 5.
10. Devuelva el tubo (-) para el hielo. Ambos tubos (+) y (-) deben estar en el hielo.
11. Use una micropipeta p20 para adicionar 10 µL de pAMP 0.005 µg/µL directamente en la suspensión de células del tubo (+). Mezcle con mucho cuidado la suspensión, evite la formación de burbujas.
12. Devuelva el tubo (+) para el hielo. Incube ambos tubos en el hielo por 15 minutos más.
13. Mientras tanto los tubos se están incubando, use un lápiz marcador para anotar su nombre y fecha en dos cajas de Petri con medio LB, dos con medio LB+AMP. Separe estas cajas en dos lotes conteniendo una de cada tipo y márquelas de la siguiente manera:
    - (+): marque una caja LB y una LB+amp
    - (-): marque una caja LB y una LB+amp
14. Después de los 15 minutos de incubación, realice un choque térmico a las células de los dos tubos.
15. Lleve el recipiente con hielo lo más cerca posible del baño maría. Remueva los tubos del hielo e inmediatamente colóquelos en baño maría a 42 °C por 90 segundos.
16. Devuelva inmediatamente los tubos a hielo por 90 segundos.



**Observación:** *Un período más largo en el hielo, después el choque térmico no afectará la transformación. Si es necesario conserve los tubos (+) y (-) en hielo, en el refrigerador (4°C) por varios días, hasta que usted tenga tiempo de plaquear las células. Sin embargo, es de aclarar que* **NUNCA DEBE COLOCAR ESTAS CÉLULAS EN EL FREEZER.**

17. Coloque ambos tubos a temperatura ambiente.

18. Use una micropipeta P1000 con punta estéril para adicionar 250 µL de medio LB a cada tubo. Mezcle levemente los tubos para homogenizar la solución.
19. Utilice la tabla abajo como una lista de control conforme las células (+) y (-) vayan siendo dispersas en cada tipo de placa (Tabla 4).

**Tabla 4**. Lista de control de células transformadas y no transformadas

| | (+) células transformadas | (-) células no transformadas |
|---|---|---|
| **LB/amp** | 100 µL | 100 µL |
| **LB** | 100 µL | 100 µL |

20. Use una micropipeta de P200 para adicionar 100 µL de la suspensión de células del tubo (-) en la caja de LB. Adicione otros 100 µL en la caja de Petri con medio LB/amp.
21. Esterilice el dispersador de vidrio (puede utilizar también perlas de vidrio) y distribuya las células en la superficie del medio de cultivo (Figura 10).
22. Repita los pasos 16 y 17 para plaquear 100 µL de la suspensión de células (+) en una caja de LB y otros 100 µL en una caja con medio LB+amp.
23. Deje sobre el mesón las cajas sembradas por 10 minutos para permitir que las suspensiones de células sean absorbidas.
24. Incube las placas durante 12 horas a 37 °C.
25. Después de este periodo de incubación, almacene las placas a 4 °C para detener el crecimiento de las células de *E. coli* y evitar el crecimiento de microorganismos contaminantes.
26. Realice la limpieza del mesón, organice y descarte el material empleado. Mantenga los restos del cultivo sobre el mesón para posterior autoclavado y descarte.
27. Lave sus manos antes de dejar el laboratorio.

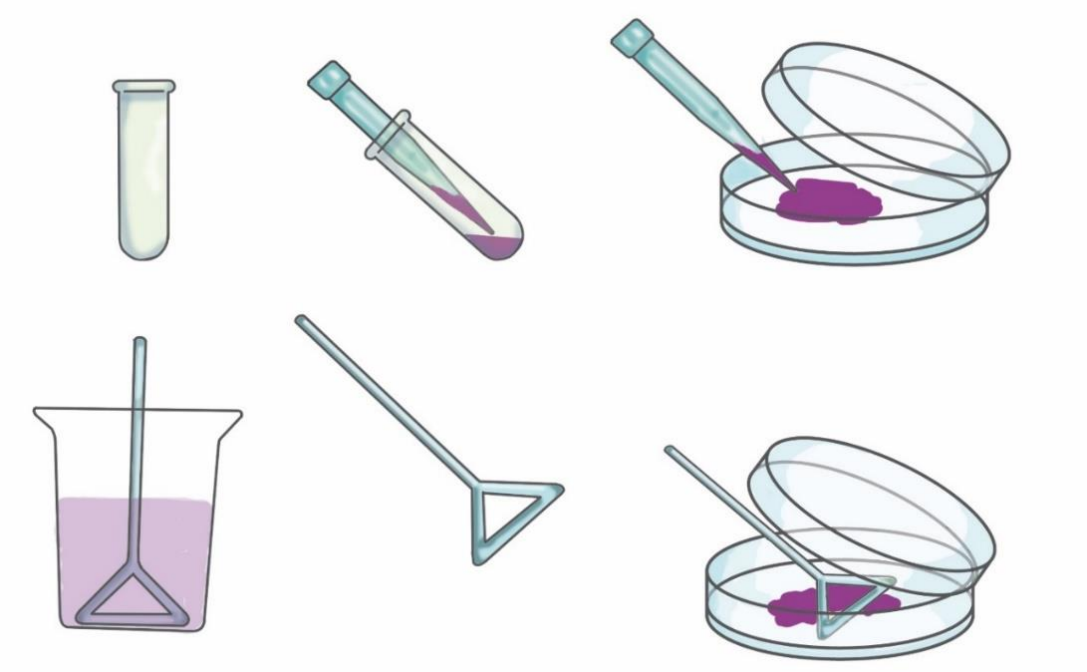


**Figura 13**. Procedimiento para siembra de las colonias positivas en medio sólido. Fuente: Los autores.

## Cuestionario

1. Cuente el número de colonias individuales en la caja LB/amp. Observe las colonias a través del fondo de la caja de Petri y use un lápiz marcador para marcar cada colonia que vaya siendo contada. Deben ser observadas de 50 a 500 colonias: 100 colonias corresponden a una eficiencia de transformación de $10^4$ colonias por microgramo de ADN plasmídico.
2. Si las cajas fueran incubadas por un tiempo mayor o dejadas a temperatura ambiente por varios días, colonias *satélites* pueden ser observadas, irradiando de los bordes de las colonias grandes, bien establecidas. *Colonias satélites* no resistentes crecen en una sombra de antibiótico, en la cual la penicilina fue degradada por la colonia resistente mayor. No incluya las colonias satélites en su cálculo de transformantes. En los controles positivos las colonias individuales no pueden ser identificadas debido a un crecimiento confluente de las células formando una camada o tapete de baterías.
3. Utilice la siguiente tabla y registre el número de colonias en cada caja o como en el caso de los controles positivos, donde el crecimiento fue confluente, registre como tapete. ¿Los resultados fueron los que usted esperaba? Explique las posibles razones para las desviaciones de los resultados esperados.

| | **(+) células transformadas** | **(-) células no transformadas** |
|---|---|---|
| **LB/amp** | Experimento= | Control negativo= |
| **LB** | Control positivo = | Control positivo= |

- Compare el crecimiento en cada uno de los siguientes pares de cajas. ¿Qué revela cada par de resultados sobre el experimento? +LB y –LB
- –LB/amp y –LB
- +LB/amp y –LB/amp
- +LB/amp y +LB

4. La eficiencia de transformación es expresada como el número de colonias resistentes a los antibióticos por microgramo de ADN plasmídico. El objetivo es determinar la masa de pAMP que fue distribuida en la caja experimental y, por lo tanto, responsable por los transformantes observados.
   a. Determine la masa total (en µg) de pAMP utilizada en la transformación= concentración de pAMPx volumen de pAMP usado en el paso 9.
   b. Determine la fracción de la suspensión de células sembradas en la caja LB/amp (paso 18) = volumen de la suspensión plaqueada/volumen total de la suspensión (pasos 2 y 14).
   c. Determine la masa de pAMP en la suspensión de células sembradas en la caja LB/amp =masa total de pAMP (a)x fracción de la suspensión de células plaqueadas (b).
   d. Exprese la eficiencia de transformación, en notación científica, como el número de colonias por µg de pAMP= número de colonias observadas/masa de pAMP en la suspensión de células plaqueadas (c).
5. ¿Qué factores podrían influir en la eficiencia de transformación?
6. El protocolo de transformación es utilizado con 10 µL de ADN plasmídico intacto en nueve concentraciones diferentes. Los siguientes recuentos de colonias son obtenidos cuando 100 µL de células transformadas son plaqueadas en medio selectivo:
   a. Calcule la eficiencia de transformación de cada concentración
   b. Construya un gráfico de masa de ADN vs colonias
   c. Construya un gráfico de masa de ADN vs eficiencia de transformación
   d. ¿Cuál es la relación entre la masa de ADN transformado y la eficiencia de transformación?
   e. ¿En qué punto la reacción de transformación parece estar saturada?
   f. ¿Cuál es la eficiencia de transformación real?

| | |
|---|---|
| 0,00001 µg/µL | 4 colonias |
| 0,00005 µg/µL | 12 colonias |
| 0,0001 µg/µL | 32 colonias |
| 0,0005 µg/µL | 125 colonias |
| 0,001 µg/µL | 442 colonias |
| 0,005 µg/µL | 542 colonias |
| 0,01 µg/µL | 507 colonias |
| 0,05 µg/µL | 475 colonias |
| 0,1 µg/µL | 516 colonias |

## Referencias bibliográficas


- Baltrus D. (2013). Exploring the costs of horizontal gene transfer. Trends Ecol. Evol. 2013;28(8):489–95. doi: 10.1016/j.tree.2013.04.002.
- Bloom, M.V., Freyer, G.A. & Miklos, D.A. (1996). Laboratory DNA Science: an introduction to recombinant DNA techniques and methods of genome analysis. The Benjamin/Cummings Publ. Co. Inc.
- Dziewit, L., & Bartosik, D. (2014). Plasmids of psychrophilic and psychrotolerant bacteria and their role in adaptation to cold environments. Frontiers in Microbiology, 5, 596. http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00596.
- Griffiths, A., Miller, J., Suzuki, D. (2000) An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. New York: W. H. Freeman. Bacterial transformation. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21993/.
- Rocha, E. P. C. (2016). Using Sex to Cure the Genome. PLoS Biology, 14(3), e1002417. http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002417.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Werbowy, O., & Kaczorowski, T. (2016). Plasmid pEC156, a Naturally Occurring Escherichia coli Genetic Element That Carries Genes of the EcoVIII Restriction-Modification System, Is Mobilizable among Enterobacteria. PLoS ONE, 11(2), e0148355. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0148355.

## 5.2 PROTOCOLO DE DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

Hace más de 30 años a partir de estudios sobre restricción y modificación, las enzimas de restricción han sido purificadas de bacterias. Las primeras enzimas identificadas fueron *EcoR*I y *EcoR*II de *Escherichia coli* y *Hind* II, *Hind* III de *Haemophilus influenzae*. Varias otras bacterias han sido evaluadas para esas enzimas y desde entonces se han caracterizado aproximadamente 3.000 enzimas con más de 200 tipos de especificidad.

Las enzimas de restricción no son exclusivas de bacterias; han sido identificadas en virus, aunque poco es conocido sobre ellas en sistemas no procariontes.

La función biológica de las enzimas de restricción consiste en proteger las células de la invasión de ADN exógeno. El ADN invasor es cortado (restricto) por la enzima evitando que se replique y parasite la célula invadida. Normalmente, los organismos producen una enzima de restricción y una enzima modificadora (metiltransferasa) que protege su propio ADN del corte por la enzima de restricción. La enzima modificadora normalmente reconoce la misma secuencia que la enzima de restricción y la protege por metilación. En conjunto forman un sistema de modificación denominado "R-M" de restricción y modificación. Existen por lo menos 4 tipos de sistemas R-M, definidos por la composición de subunidades de las enzimas; por el tipo de secuencias reconocidas; y por los cofactores necesarios para la actividad de la enzima. La mayor parte de las enzimas caracterizadas (~93%) pertenece al Tipo II y IIS, que se encuentran en la mayoría de los sistemas comercialmente disponibles. Enzimas del Tipo I y Tipo III son poco comunes.

El sistema R-M del Tipo II es el más simple: reconoce secuencias simétricas de ADN y cortan en el interior de esa secuencia, dejando un extremo 3' con OH y en el otro extremo 5' con fosfato. Al cortar, pueden producir terminaciones cohesivas ("cohesive ends") o romas ("blunt ends"). Esas enzimas requieren ión magnesio como cofactor para su actividad y sus enzimas modificadoras correspondientes requieren S-adenosilmetionina. La variedad de secuencias reconocidas es limitada, a pesar que pocas reconocen menos de 4 bases o más de 8 bases específicas. Esas enzimas actúan como homodímeros, con subunidades idénticas asociadas en orientación opuesta, responsables del reconocimiento de repeticiones invertidas (palindrómicas). Las enzimas de modificación del Tipo II actúan como monómeros, con una única proteína reconociendo una secuencia de ADN, probablemente porque la modificación ocurre después de la replicación del ADN y por lo tanto, necesita apenas la metilación de una hebra, pues la hebra parental se encuentra metilada.

Las enzimas del Tipo IIS poseen cofactores similares, pero las secuencias de reconocimiento son asimétricas e ininterrumpidas, de 4 a 7 bases de longitud, cortan a una distancia definida del sitio de reconocimiento (hasta 20 bases). La modificación involucra dos enzimas metiltransferasas, una para cada hebra, de tal manera que diferentes bases pueden ser metiladas.

El método más común para construir mapas de restricción envuelve la digestión del ADN con varias enzimas. El mapa de restricción puede ser deducido al analizar los productos de las diferentes reacciones de digestión mediante electroforesis en gel de agarosa. Se inicia la digestión con varias enzimas individualmente, pero fecuentemente es necesaria la digestión con más de una enzima. En ese caso, se debe considerar la concentración de sal en los buffers de reacción para cada enzima. El tampón de reacción típico de endonucleasas de restricción contiene de forma general:



- Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$)
- Cloruro de Sodio (NaCl) o de Potasio (KCL)
- Tris-HCl
- 2-βmercaptoetanol o ditiotreitol (DTT)
- Albúmina de suero bovino (BSA)

La presencia de un catión divalente, normalmente $Mg^{++}$, es un requerimiento absoluto para la actividad de las enzimas. El tampón, típicamente Tris-HCl, es necesario para mantener el pH óptimo para la función de la enzima. Ciertas enzimas de restricción (endonucleasas) son mucho más sensibles a la concentración de iones de Na o K, mientras otras son activas en un amplio rango de fuerza iónica. Las condiciones ideales de reacción son recomendadas por los fabricantes de cada enzima específica.

Alternativamente, algunos proveedores o laboratorios emplean tampones basados en Glutamato de Potasio o Acetato de Potasio, conocidos como "Tampones Universales" para digestión de ADN (McClelland *et al..,* 1988). La característica típica de esos tampones es poseer glutamato de potasio o acetato de potasio en lugar de NaCl, y Tris-Acetato en lugar de Tris-HCl, basándose en el concepto que las enzimas probablemente mantienen la actividad cuando están tamponadas en sales. Debido a que los iones de glutamato pueden interferir con la electroforesis en gel de agarosa, comercialmente el glutamato fue sustituido por acetato de potasio.

La mayoría de las enzimas de restricción son activas en esos tampones, a pesar de algunas poseer una actividad menor (a veces apenas 20 %) que en las condiciones ideales. Varias enzimas de modificación de ADN también son activas en esos tampones, incluyendo T4 ADN polimerasa y T4 ADN ligasa. Los tampones basados en glutamato de potasio y/o acetato de potasio son muy útiles cuando se pretende hacer digestiones múltiples con varias enzimas de restricción, y principalmente cuando una de las enzimas es incompatible con el tampón de las otras.

De forma general, las reacciones pueden seguir la regla que 10 Unidades de enzima de restricción son suficientes para digerir una gama de variaciones en la concentración, pureza y calidad del ADN. Generalmente, 1 µl de enzima es adicionado para 1 µg de ADN purificado en una reacción de volumen final de 50 µl con el tampón apropiado para incubación de 1 hora en la temperatura adecuada de actividad enzimática.

Si un exceso de enzima es usado, es recomendable reducir el tiempo de digestión. Alternativamente, se puede usar menor cantidad de enzima por un tiempo mayor (hasta 16 horas). Las preparaciones de ADN deben ser puras y libres de contaminaciones con fenol, cloroformo, alcohol, EDTA, detergentes y sales excesivas, que pueden interferir con la actividad de las enzimas. En términos de volumen la reacción, se debe considerar que la concentración de glicerol no debe ultrapasar 5 %, y las enzimas de restricción son ofrecidas en tampones de almacenamiento que contiene 50 % de glicerol. Por lo tanto, no se debe acrecentar más de 10 % del volumen final con enzimas.

Para detener una reacción de digestión, en caso que ninguna otra manipulación sea planeada, se adiciona una solución 50 % de glicerol, 50 mM EDTA (pH 8.0) y 0.05 % de azul de bromofenol. Si otras manipulaciones son necesarias, se pueden inactivar las enzimas por calentamiento (65 °C por 20 minutos).

Las enzimas deben ser mantenidas a –20 °C y en hielo durante el experimento (a excepción de nuevas enzimas liofilizadas - RT). Los tampones, ofrecidos en concentración 10X, también son mantenidos en hielo. Se debe evitar la contaminación de las enzimas, por ello, siempre deben ser manipuladas usando guantes de nitrilo nuevos, estériles y libres de talco,.

### Actividad Inespecífica (STAR)

Se ha demostrado que bajo condiciones extremas no estandarizadas, las enzimas de restricción son capaces de cortar secuencias que son similares, pero no idénticas a las secuencias de reconocimiento específicas. Esa especificidad relajada o no específica fue denominada actividad "STAR". Fue sugerido que esa actividad no específica es una propiedad general de las endonucleasas y que cualquier enzima de restricción puede cortar sitios no específicos en ciertas condiciones extremas. Las condiciones que pueden llevar a ese relajamiento de especificidad dependen de cada enzima.

La mudanza en la actividad más típica consiste en el reconocimiento de una u otra base, truncaje de las bases externas y corte de hebras simples. En la mayoría de los casos la actividad STAR puede ser controlada y, en general, no genera preocupación en digestiones con endonucleasas de restricción. Las condiciones que favorecen esa actividad STAR no específica son:

1. Alta concentración de glicerol (>5%).
2. Alta relación de unidades de enzimas por µg de ADN (varía para cada enzima, pero en general > 100 Unidades/µg).
3. Baja fuerza iónica (< 25 mM).
4. Alto pH (> pH 8.0).
5. Presencia de solventes orgánicos (DMSO, etanol, etilenglicol).
6. Sustitución de $Mg^{2+}$ por otros cationes divalentes ($Mn^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Co^{2+}$, $Zn^{2+}$).

## Condiciones para la inhibición de la actividad STAR

1. Usar el mínimo posible de unidades de enzima (reduce la concentración de glicerol).
2. Reducir contaminación por solventes orgánicos.
3. Aumentar la fuerza iónica del tampón de reacción para 100-150 mM (a no ser que la enzima sea inhibida por alta concentración de sales).
4. Reducir el pH a 7.0.
5. Usar $Mg^{2+}$.

Se sugiere una visita al sitio: http://rebase.neb.com. En esta página se encuentra la información sobre varias enzimas de restricción, sitios de reconocimiento y disponibilidad comercial (Figura 14).




**Figura 14**. Ventana de la página de internet http://rebase.neb.com, sitio que contiene la información sobre enzimas de restricción.

## Materiales

- pHmetro
- Micropipetas de diversos volumenes
- Balanza analítica

- Fotodocumentador o transiluminador
- Plancha de calentamiento
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Baño serológico a 37 °C
- Baño serológico a 65 °C
- Hielo picado o cajitas refrigerantes
- Puntas nuevas y estériles de diferentes volumenes
- Tubos eppendorf de 1.5 mL
- Agua deionizada
- Enzima de restricción, BSA, buffer de la enzima, solución 0.5 M de EDTA
- DNA de la muestra de buena concentración y calidad (mínimo 1 µg /mL)
- Máscara y gorro de protección
- Guantes de nitrilo
- Frascos de descarte
- Libreta de notas
- Lápiz marcador (de preferencia *sharpie*)
- Flotadores para incubación en baño serológico
- Jabón antibacterial
- Papel toalla

## Protocolo de reacción del patrón de digestión

1. Pipetee en un nuevo tubo de microcentrífuga los siguientes reactivos en el orden estipulado
   a. 16.3 µL de agua estéril desionizada
   b. 2 µL de buffer 10X (propio de cada enzima)
   c. 0.2 µL de BSA acetilado (10 µg/mL)
   d. 1 µL de ADN (1 µ/µL)
   e. Mezclar con la punta de la micropipeta y después adicionar: 0.5 µL de la enzima de restricción (10 U/µL). El volumen final de la reacción debe ser de 20 µL.
2. Incubar a la temperatura recomendada por la casa comercial (generalmente 37 ºC).
3. En el caso de tener que parar la reacción se puede adicionar 0.5 µL (o 20 % del volumen total) de 0.5 M EDTA (en caso que se desee realizar otra reacción enzimática **NO** adicionar EDTA) o calentar la reacción a 65 ºC (¡algunas enzimas son tolerantes a altas temperaturas! – en este caso es necesario hacer una extracción con fenol y precipitar el ADN de nuevo). Analizar la digestión por gel de electroforesis.

## Digestión de ADN con múltiples endonucleasas

Varias enzimas son activas en un rango muy amplio de concentración de sales y es posible frecuentemente escoger una concentración donde dos o más enzimas mantengan actividad. Alternativamente, siga el protocolo siguiente.

1. Digerir el ADN completamente con la primera enzima de restricción que sea activa en la concentración de NaCl más baja, luego adicionar 1 M de NaCl para alcanzar la concentración apropiada final para la digestión por la próxima enzima (1 a 3 µL para una reacción de 20 µL).
2. Adicionar la próxima enzima y digerir.
3. Para enzimas con temperaturas de incubación diferentes, cortar el ADN con una enzima, y cambia a la segunda temperatura para adicionar la segunda enzima.

Verifique el corte de la muestra de ADN con las enzimas de restricción en un gel de agarosa a 1 %.

## Cuestionario

1. Mediante el programa Photo-Captw, determine el tamaño molecular de cada uno de los fragmentos generados con el corte de cada una de las enzimas utilizadas en la práctica.
2. ¿Por qué fue tan importante el descubrimiento de las enzimas de restricción, para el desarrollo de la biología molecular?
3. Explique brevemente la función de las enzimas de restricción en la naturaleza y en el laboratorio.

## Referencias Bibliográficas


- Loenen, W. A. M., Dryden, D. T. F., Raleigh, E. A., Wilson, G. G., & Murray, N. E. (2014). Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. Nucleic Acids Research, 42(1), 3–19. http://doi.org/10.1093/nar/gkt990.
- Loenen, W. A. M., & Raleigh, E. A. (2014). The other face of restriction: modification-dependent enzymes. Nucleic Acids Research, 42(1), 56–69. http://doi.org/10.1093/nar/gkt747.
- McClelland, M., Hanish, J., Nelson, E., Patel, Y. (1988). KGB: a single buffer for all restriction endonucleases. Nucleic. Acid. Research. 16:634.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. BioMed Research International, 2013, 329121. http://doi.org/10.1155/2013/329121.
- Pingoud, A., Wilson, G. G., & Wende, W. (2014). Type II restriction endonucleases—a historical perspective and more. Nucleic Acids Research, 42(12), 7489–7527. http://doi.org/10.1093/nar/gku447.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Zhang, C., & Kim, S.-K. (2010). Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. Marine Drugs, 8(6), 1920–1934. http://doi.org/10.3390/md8061920.

## 5.3 POLIMORFISMO GENERADO POR BOX-PCR

Metodología modificada de Versalovic, J., *et al.*, 1991.

La amplificación de elementos repetitivos en el genoma (rep-PCR) ha sido reconocida como una importante herramienta para establecer la relación genética entre los organismos (Versalovic, J., *et al.*, 1991; Versalovic, J., *et al.*, 1994; Rademaker, J. & De Bruijn, 1997). Además, esta técnica basada en PCR es relativamente fiable, rápida, de bajo costo y sensible para discriminar una amplia gama de microorganismos (Rademaker, J. & De Bruijn, 1997).

Aunque la metodología de rep-PCR se ha aplicado con mayor frecuencia en microbiología médica y en análisis epidemiológicos, algunos investigadores han utilizado esta técnica para estudiar la diversidad microbiana en las muestras ambientales (Pellizari, V., *et al.*, 1996; Zlatkin, I., *et al.*, 1996; Ishii, S. & Sadowsky, M. 2009). Varios investigadores han demostrado que los elementos repetitivos de ADN (REP) se encuentran ampliamente distribuidos entre varios miembros de bacterias filogenéticamente diversas que permite la utilización de estas secuencias en análisis genotípicos (Versalovic, J., *et al.,* 1991; Rivera, I., *et al.*, 1995; Rademaker, J. & De Bruijn, F. 1997, Di Giovanni, G., *et al.,* 1999; Ishii, S. & Sadowsky, M., 2009). rep-PCR usando el cebador BOXA1R fue considerado por Masco y colaboradores (2003), como una herramienta prometedora para la identificación genotípica de una amplia gama de bacterias en las especies y subespecies. Rodrigues y colaboradores (2009) sugirieron que el primer BOXA1R podía discriminar entre las cepas de *Klebsiella* y observaron algunas similaridades en la agrupación cuando fueron construidos dendrogramas y árboles filogenéticos basados en secuencias del gen 16S rRNA.

### Materiales

- Centrifuga
- Termociclador
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Fotodocumentador o transiluminador
- Micropipetas de diversos volumenes
- Hielo picado o cajitas refrigerantes
- Puntas nuevas y estériles de diferentes volumenes
- Tubos eppendorf
- Reactivos: tampón TE 1X, tampón TAE 1X, azul de bromofenol, bromuro de etidio u outra agente como SyGreen o EZvision, si se dispone de ellos en el laboratorio.
- Marcador de tamaño molecular 1 Kb de Promega
- Mix para PCR: Buffer, Taq-polimerasa, $MgCl_2$, dNTPs, cebador BOXA1
- DNA de la muestra ajustado a 100 ng/µL
- Agua grado molecular filtrada
- Desinfectante: alcohol 70 % o hipoclorito diluido
- Máscara y gorro de protección
- Guantes de nitrilo
- Frascos de descarte
- Libreta de notas
- Lápiz marcador (de preferencia *sharpie*)
- Jabón antibacterial
- Papel toalla

### Protocolo de preparación de BOX-PCR

1. Descongelar por completo los reactivos en hielo y mezclar por inversión antes de su uso.
2. Limpiar con solución de hipoclorito de sodio diluido o alcohol a 70 % la superficie de trabajo.

3. Para realizar la amplificación del elemento BOX, usaremos el primer BOXA1 que tiene la siguiente secuencia nucleotidica: (5 'CTA CGG CAA GGC GAC GCT G 3') (Versalovic, J., *et al.,* 1991). Inicialmente este primer se diluyó en agua ultrapura formando una solución stock de una concentración de 100 µM y a partir de esta suspensión se preparó la solución de trabajo a 20 µM. También con antelación se preparó un mix de dNTPs a una concentración de 25 mM a partir del cual se diluyó un mix de trabajo de dNTPs a una concentración de 2.5 mM.
4. Para esta práctica los cebadores y los dNTPs se prepararán con anterioridad.
5. La reacción debe ser realizada usando las condiciones indicadas en la Tabla 5, recordar que la mezcla debe ser preparada en un área aislada, dispuesta sólo para este fin y usando un juego de micropipetas único de uso exclusivo para PCR, es recomendable usar siempre puntas con filtro. Adicionalmente a esto, se debe usar una bata exclusiva, la que debe ser mantenida en el área. Los elementos de PCR deben ser almacenados separados de los demás elementos de laboratorio y sólo se destapan en el cuarto de pre-PCR, en general, se deben seguir todas las recomendaciones indicadas en la guía donde se explica la realización de una PCR convencional (ítem 4.1).

**Tabla 5**. Listado de reactivos y sus cantidades respectivas para BOX- PCR

| Reactivo | **1X (µL)** |
|---|---|
| Agua ultrapura estéril | 32.75 |
| Buffer Colorless | 10 |
| Solución de $MgCl_2$ 25 mM | 2 |
| DNTP (10 mM de cada) | 1 |
| Primer BOXA1 20 µM | 2 |
| GoTaq polimerasa Promega | 0.25 |
| ADN de la muestra (100 ng/µL) | 2 |
| Total (Vf) | 50 µL |

10. Adicionar el agua al control negativo en el cuarto de pre-PCR y no volver a abrir este tubo.
11. Adicionar el ADN blanco a la reacción, utilizando para ello una micropipeta exclusiva con puntas con filtro, en un área diferente y separada de la anteriormente usada para la preparación de la pre-PCR.
12. Centrifugar por 20 segundos a 10000 rpm e inmediatamente colocar en el termociclador, correr el programa adecuado según el tamaño del fragmento a amplificar y la Tm del primer. En este caso, el programa de termociclado será: 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos con las siguientes características: 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 3 minutos; la extensión final es de 15 minutos a 72 °C.
13. Retirar los tubos del termociclador y analizar las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa. Para una reacción Vf de 50 µL se recomienda analizar por lo menos 15 µL del producto de PCR. Es importante mencionar que el sitio donde se lleva a cabo la electroforesis debe ser en un lugar diferente y separado de las áreas anteriores (Pre-PCR y adición de ADN), por cuanto es en este momento es cuando existe mayor peligro de contaminación debido a la dispersión de los amplificados (amplicones).

## Procedimiento para la preparación del gel de agarosa

Para preparar una concentración de agarosa determinada se deben seguir las instrucciones de la práctica de electroforesis en gel de agarosa (capítulo III, ítem 3.1), así:

1. Pesar la agarosa para la concentración de 1 % y adicionar tampón TAE 1X en el volumen deseado.
2. Disolver la agarosa en baño María, estufa o microondas hasta que esté totalmente transparente.
3. Dejar enfriar hasta que el gel alcance la temperatura aproximada de 50-60 ˚C (cuidado, si la agarosa está muy caliente puede quebrar o fragmentar la bandeja de la cámara de electroforesis)
4. Adicionar 5 µL de solución de bromuro de etidio y agitar suavemente.
5. Preparar la bandeja de la cámara de electroforesis sellarla y colocar el peine deseado, verificando que este nivelada.
6. Llenar la bandeja con la agarosa precalentada, evitando la formación de burbujas (dispersar la agarosa lentamente)
7. Dejar solidificar la agarosa.

**Preparación de la muestra para electroforesis**

1. Sobre papel parafina o caja therazaki coloque 3 µL de azul de bromofenol y posteriormente adicionar 15 µL del producto de PCR.
2. Homogenizar las muestras con cuidado y cargar las muestras en las posiciones correspondientes a los pozos del gel de agarosa sumergido en la cámara que contiene ya el tampón respectivo (TAE 1X, TBE 1X).
3. *Recuerde que la corrida debe ser realizada con el mismo buffer con el cual preparó su gel, es decir si usted preparó el gel en TAE 1X, su buffer de corrido debe ser TAE 1X, si su gel fue preparado en TBE 1X, dentro de la cámara de electroforesis debe contener el mismo tampón TBE 1X.*
4. Una vez se hayan cargado los pozos con las muestras, colocar en los dos pozos distales el marcador 1 Kb, teniendo en cuenta el tamaño de fragmento esperado. Usar 6 µL para cada pozo.

**Preparación del marcador de tamaño molecular 1 Kb**

1. En un tubo de microcentrífuga estéril adicionar 4 µL de agua desionizada estéril
2. Adicionar 1 µL de Marcador Ladder (tubo de solución transparente) y 1 µL de 6x *loading dye buffer* (viene con el marcador, es el tubo que tiene el líquido azul)
3. Homogenizar la mezcla y adicionar el volumen total de 6 µL a cada uno de los pozos.
4. Si son varias aplicaciones del marcador, se puede preparar mayor cantidad observando las relaciones de cada uno de sus constituyentes.

**Corrida electroforética**

1. Cerrar o sellar correctamente la tapa de la cámara de electroforesis. Posicionar los electrodos en la cámara de electroforesis de modo que la ubicación de las muestras quede próxima al electrodo negativo (negro).
2. Encender la fuente de energía y seleccionar el voltaje y tiempo de corrida apropiado.
3. Realizar la corrida electroforética bajo una intensidad de corriente eléctrica apropiada para la muestra en estudio (Máximo 5 V/cm). Calcular el valor para la cámara a utilizarse en esta práctica de laboratorio. Correr como mínimo dos horas para que se puedan visualizar con claridad los perfiles generados para cada muestra.
4. Después de la corrida apagar la fuente y remover los electrodos.
5. Retirar el gel de agarosa de la cámara de electroforesis con mucho cuidado y usando siempre guantes de nitrilo libres de talco. Así mismo, se debe tener cuidado para **NO** contaminar otras superficies del laboratorio. **El bromuro de etidio es carcinogénico**.

6. Visualizar en el trans-iluminador y tomar la fotografía usando la extensión tiff (Figura 15).
7. Con toalla de papel y usando guantes desechables, limpiar cuidadosamente toda la superficie de contacto con el bromuro de etidio y descartar el papel en el lugar designado para desechos peligrosos y/o tóxicos.

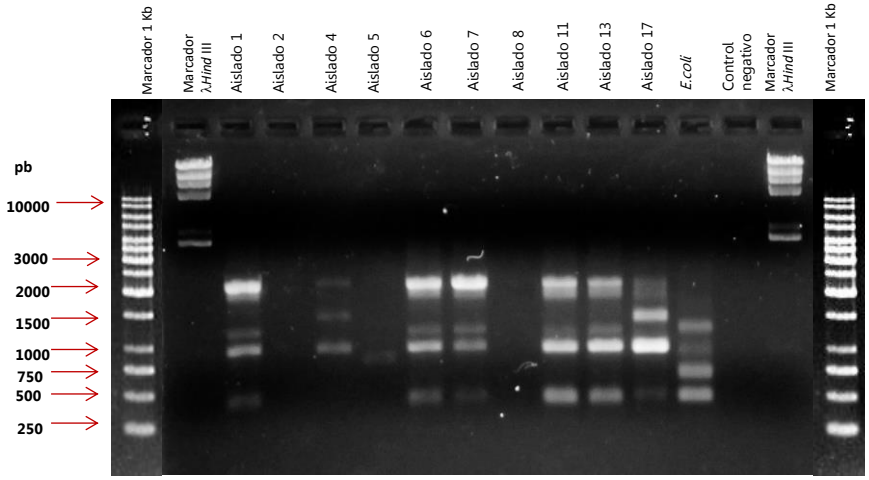



**Figura 15**. BOX-PCR de aislados presumiblemente productores de polihidroxialcanoatos. Electroforesis corrida en buffer TAE 1X por 3 horas a 80 V. Fuente: Los autores.

## Análisis del gel

Recuerde que para esta etapa de su guía de laboratorio debe usar el programa photocapwt para la determinación del tamaño molecular de cada uno de los fragmentos generados.

1. Abrir el archivo deseado (imagen guardada en formato JPG o TIFF)
2. Apretar el botón IMAGE QUANTIFICATION/ OPCIÓN MOLECULAR WEIGHT después opción LANE DEFINITION
3. Colocar el número total de columnas inclusive la del marcador/ seleccionar SEPARATION
4. Después, arrastrar el mouse y marcar el área seleccionada. Verificar que las bandas estén dentro de las columnas.
5. Ir nuevamente a MOLECULAR WEIGH y seleccionar DETECTION
6. Clicar la opción DETECTION (esta en rojo)
7. NO CERRAR ESTA VENTANA DE (DETECT MENÚ)
8. Marcar con mucho cuidado la banda a ser analizada, descartar las que no son bandas.
9. Después de organizar las bandas, seleccionar en OK en la ventana de DETECT MENÚ.
10. IR A MOLECULAR WEIGH y seleccionar M.W MARKER
11. COLOCAR EL NÚMERO DE LA COLUMNA DONDE SE ENCUENTRA EL MARCADOR.
12. Clicar el botón NEW y entrar los valores del marcador (figura de abajo), recordando que deben ser en decimales.
13. Después grabar (LOAD) el marcador en una CARPETA de su preferencia.
14. Ir nuevamente a MOLECULAR WEIGHT y oprimir la opción M.W. RESULT DISPLAY.
15. Allí va a aparecer una ventana, preguntado cuál es la columna que se desea analizar, usted puede clicar en SELECT ALL. Entonces va a aparecer el tamaño molecular de cada banda.

## Cuestionario

1. Esquematice el proceso de reconocimiento del primer BOX A1 por la secuencia diana, ¿cómo es que se logra amplificar un fragmento utilizando un único primer?
2. Realice una tabla comparativa entre ERIC-PCR, Rep-PCR y BOX-PCR
3. ¿Cuál de los índices corridos evidenció mejor interpretación de los datos?
4. ¿Cuál es la diferencia entre dendrograma y árbol filogenético?

## Referencias bibliográficas


- DiGiovanni, G., Watrud, L., Seidler, R., Widmer, F. (1999). Fingerprinting of Mixed Bacterial Strains and BIOLOG Gram-Negative (GN) Substrate Communities by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence-PCR (ERIC-PCR). Curr. Microbiol. 38: 217-223.
- Ishii, S., Sadowsky, M. (2009). Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. Environ, Microbiol. 11: 733-740.
- Masco, L., Huys, G., Gevers, D., Verbrugghen, L., Swings, J. (2003). Identification of Bifidobacterium species using rep-PCR fingerprinting. Syst. Appl. Microbiol. 26: 557-563.
- Pellizari, V., Bezborodnikov, S., Quensen, I., Tiedje, J. (1996). Evaluation of Strains Isolated by Growth on Naphthalene and Biphenyl for Hybridization of Genes to Dioxygenase Probes and Polychlorinated Biphenyl-Degrading Ability. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2053-2058.
- Rademaker. J., De Bruijn, F. (1997). Characterization and classification microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. (Ed). DNA Markes: protocols, applications and overviews. New York: J. Wiley & Sons. p. 151-171.
- Rivera, I., Chowdhury, M., Huq A., Jacobs, D., Martins, M., Colwell, R. (1995). Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences and the PCR to Generate Fingerprints of Genomic DNAs from Vibrio cholerae O1, O139, and Non-O1 Strains. Appl. Environ. Microbiol 61: 2898-2904.
- Rodrigues, D., Sakata, S., Comasseto, J., Bícego, M., Pellizari, V. (2009). Diversity of hydrocarbon-degrading *Klebsiella* strains isolated from hydrocarbon-contaminated estuaries. J. Appl. Microbiol. 106: 1304–1314.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 19: 6823-6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F., Lupski, J. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Meth. Mol. Cell. Biol. 5: 25-40.
- Zlatkin, I., Schneider, M., De Bruijn, F., Forney, L. (1996). Diversity among bacteria isolated from the deep subsurface. J. Ind. Microbiol. 17: 219-227.

## 5.4 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE ADN USANDO LOS PROGRAMAS BIOEDIT RDP II Y MEGA 5.0

El análisis de las secuencias obtenidas después de un proceso de secuenciación es de vital importancia para la correcta caracterización o identificación de un microorganismo o del tipo de muestra que sea objeto de estudio. Es responsabilidad del investigador seguir el procedimiento adecuado que conlleve a una conclusión objetiva y veráz de lo que se desea analizar.

### Objetivos

- Adquirir los conocimientos básicos para el análisis de secuencias de una determinada muestra.
- Conocer las diferentes bases de datos empleadas para el análisis de secuencias.

### Materiales

- Secuencias crudas generadas por secuenciación Sanger
- Computador
- Software Bioedit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)
- Software Mega 5.2 o Mega 7.0 (http://www.megasoftware.net/download_form)
- Acceso a página Ribosomal Database Project (https://rdp.cme.msu.edu/)
- Office (Excel)
- Memoria USB

### Procedimiento:

**Software BioEdit**

1. Abrir el BioEdit *Sequence Alignment Editor*
2. Abrir una única secuencia del Archivo – *File* – *Open* – Escoger la secuencia y Abrir. Aparecerán dos ventanas, una será el Cromatograma (Figura 16) y la otra será la ventana de trabajo de la secuencia (Figura 17).
3. **Importante**: Verifique la calidad de todas las secuencias a través de la visualización del cromatograma antes de comenzar el análisis; descarte las secuencias que presenten problemas.

Importante: Seleccione y abra solo una secuencia en esta etapa. Si usted selecciona todas las secuencias de interés al mismo tiempo no será posible hacer el alineamiento de ellas.

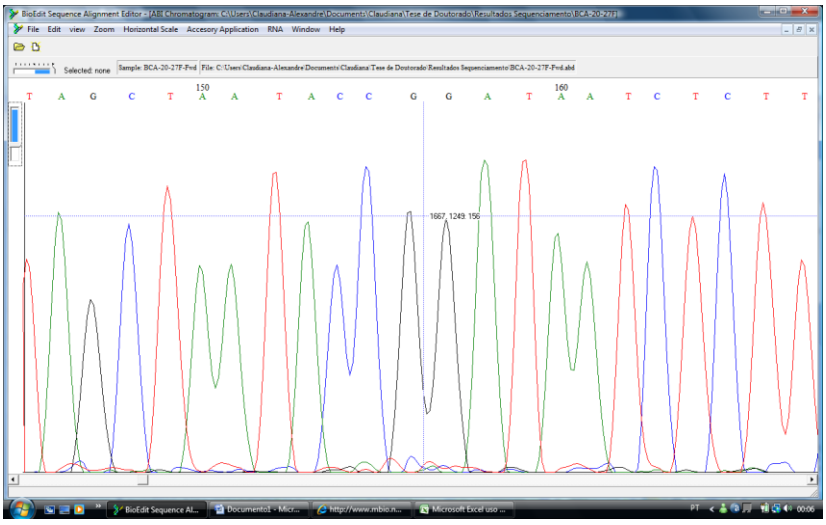


**Figura 16**. Cromatograma de la secuencia de interés usando el programa BioEdit

4. Abrir todas las secuencias de interés: *File – Import – Sequence Alignment file*.
5. Para cambiar el nombre de las secuencias: selecciona las secuencias – *Edit – Copy Sequences Titles* – pega en Excel – copia el nombre de las secuencias renombradas de Excel – vuelve para el BioEdit – *Edit – Paste Over Titles*.
6. Selecciona todas las secuencias: *File – Save as* – coloca el nombre y graba en el formato *Fasta* (Figura 18).

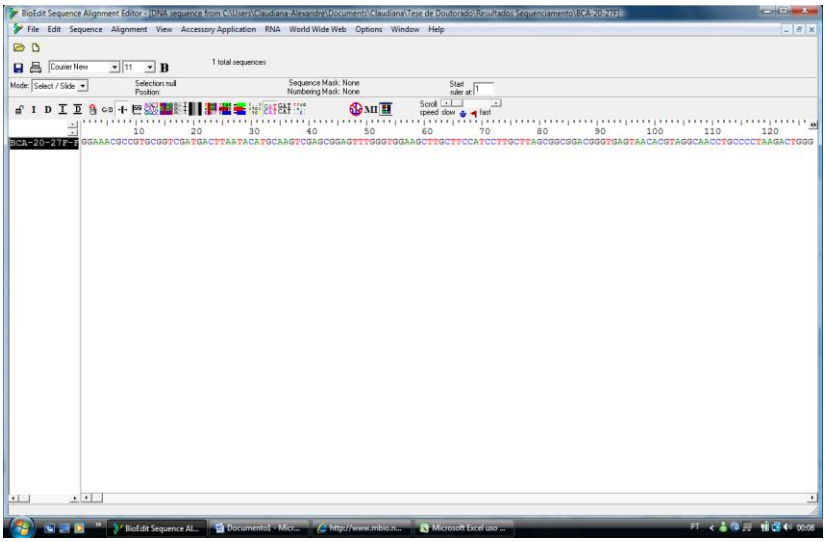


**Figura 17**. Ventana de trabajo de la secuencia de interés

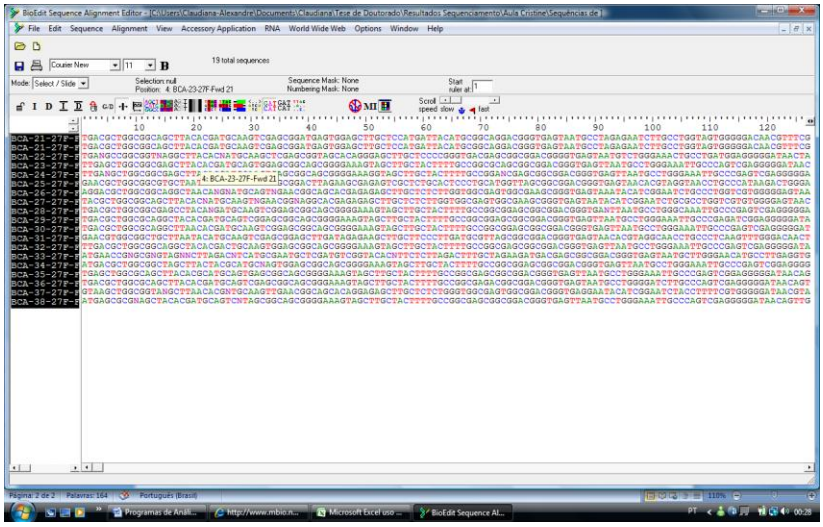


**Figura 18**. Secuencias de interés almacenadas en formato fasta

## RDP II – Ribosomal Database Project (http://rdp.cme.msu.edu/)

*CLASSIFIER*

1. Clic en el link *CLASSIFIER* (Figura 19A) – en la caja *Choose a file to upload* y seleccione el archivo que usted grabó en BioEdit con todas las secuencias de interés (Figura 19B) – *Submit* – el resultado aparecerá en la próxima página (Figura 19C).

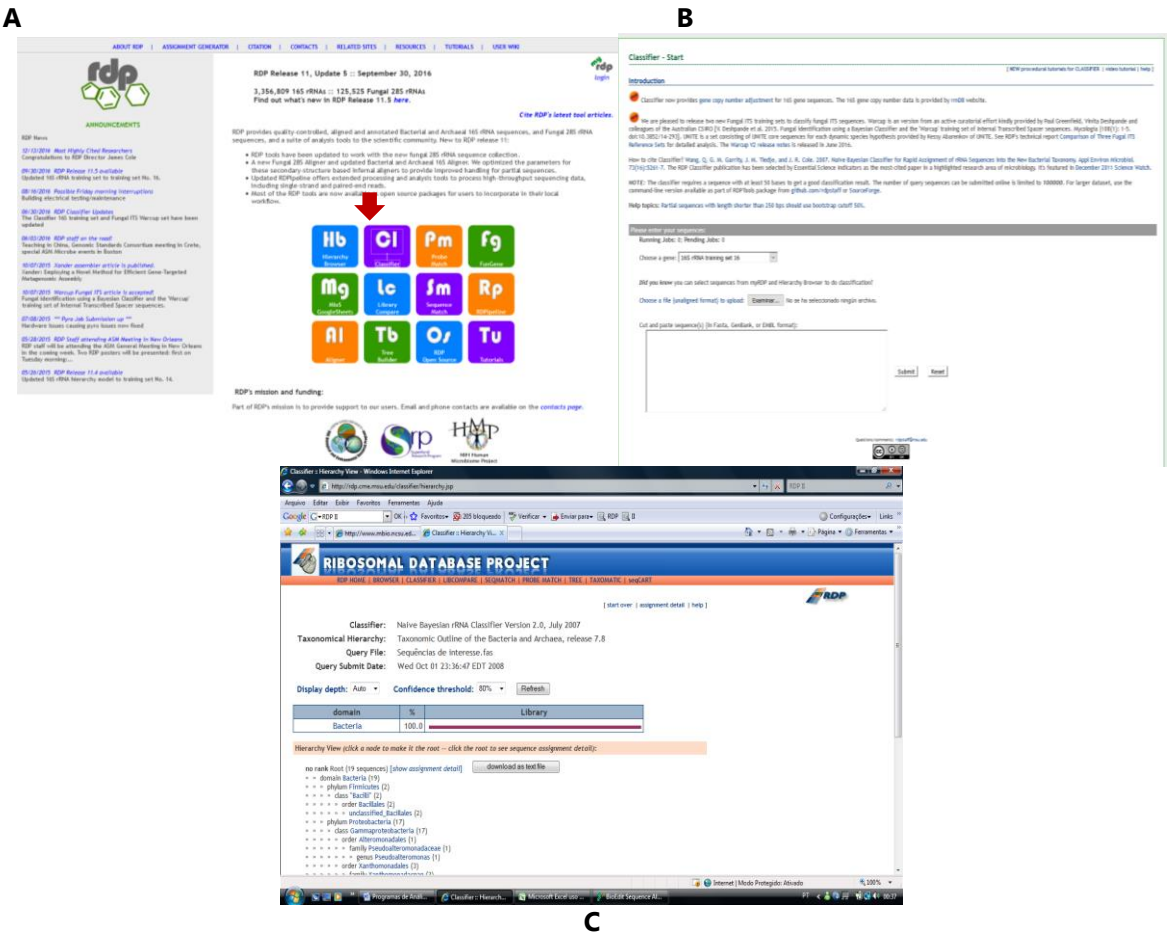



**Figura 19**. Resultado de la comparación de las secuencias de interés con el banco de dados de RDP II. A. Página inicial de *Ribosomal Database Project.* B. Página para cargar el archivo con las secuencias de análisis. C. Página inicial de la herramienta *classifier*.

2. Para visualizar todas las características clic en *show assignment detail* y para grabar el resultado en formato de texto clic en *download as text file* – grabar.
3. Para abrir el archivo grabado siga los siguientes pasos: Abrir Microsoft Excel – Abrir la carpeta donde fue grabado el archivo (Mostrar todos los archivos) - Clic en el archivo – en la próxima ventana seleccione la caja *delimitado* – Avanzar – Seleccione la caja *Espacio* – Avanzar – Concluir - grabar el archivo en el formato Excel. Después de grabar en formato Excel, puede borrar el archivo en formato texto (.txt).

**Importante: Los pasos de 1 a 4 de RDP II son utilizados apenas para una obtención rápida del resultado de secuenciación. No utilizar ese procedimiento como un resultado final.**

## *SEQMATCH* (Herramienta del RPDII)

1. Clic en Seqmatch en la barra superior de la página de RDP II.
2. En la caja de diálogo *Choose a file to upload* encuentre la secuencia grabada en BioEdit – *Submit*
3. **Antes de someter las secuencias, seleccionar en el cuadro al lado de Submit:** *Strain (Both), Source (Both), Size (> 1200), Quality (Good), Taxonomy (Nombrenclatural), KNN Matches* (2). KNN Matches es el número de secuencias que el programa mostrará que existe

similaridad con sus secuencias de interés. Puede escoger cuantas secuencias quiera (Recomendado escoger KNN = 2).

4. El resultado aparecerá como se presenta en la figura 20. Para grabar el resultado en formato de texto clic en *download as text file* – Grabar
5. Para abrir el archivo grabado siga los siguientes pasos: Abrir Microsoft Excel – Abrir la carpeta donde fue grabado el archivo (Mostrar todos los archivos) - Clic en el archivo – En la próxima ventana seleccione la caja *delimitado* – Avanzar – Seleccione la caja *Espacio* – Avanzar - Concluir - Grabar el archivo en el formato Excel. Después grabar en formato Excel, puede deletar el archivo en formato texto (.txt).

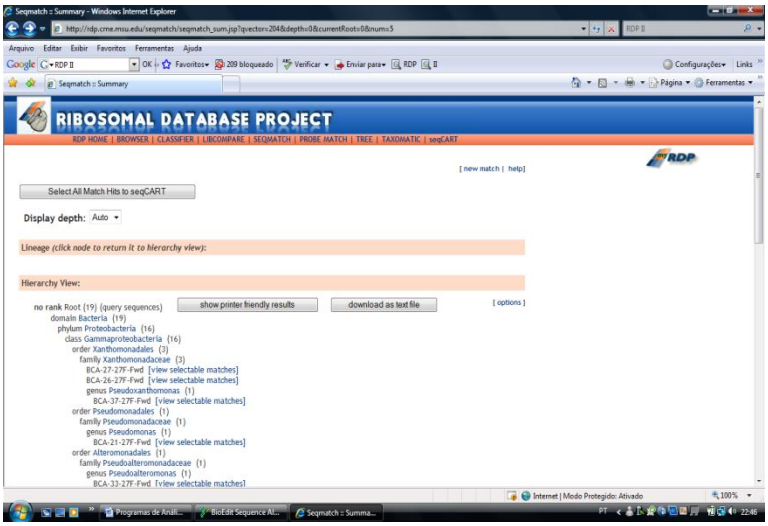



**Figura 20**. Resultado de secuencias de interés analizadas en Seqmatch.

6. Clic en *Show printer friendly results* para visualizar el resultado de acuerdo con el número de KNN Matches que fue escogido (item 2) (Figura 21).

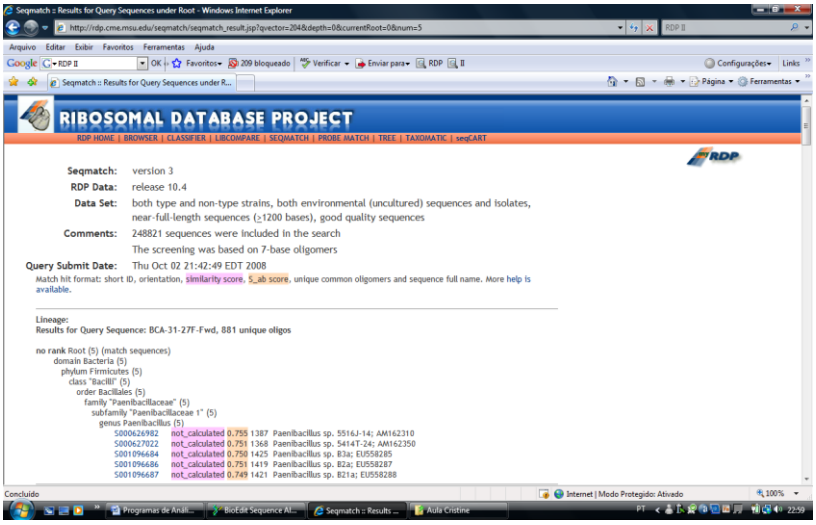



**Figura 21**. Resultado de las secuencias de interés analizadas por el Seqmatch. En naranja aparece el índice de identidad (Similarity score).

7. Volver a la página mostrada en la Figura 20. Clic en *Select all Match Hits to seqCART.*
8. En la parte superior de la página clic en *seqCART.*
9. En la página *Sequence Cart* clic en *Download* en la parte superior derecha (Figura 19).

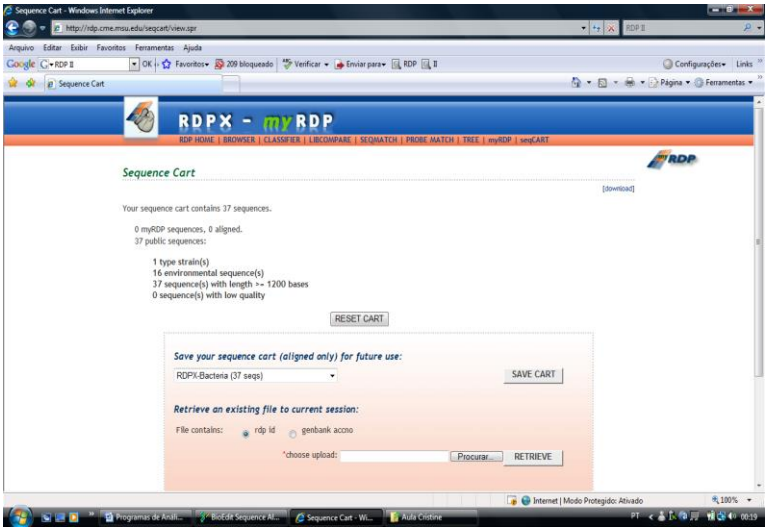



**Figura 22**. Página *Sequence Cart*

10. En la próxima página clic en *Download. sequence(s) for alignment model: RDPX-Bacteria*. Marque la opción *GenBank* en *Format Options (*Figura 23) – Grabar.

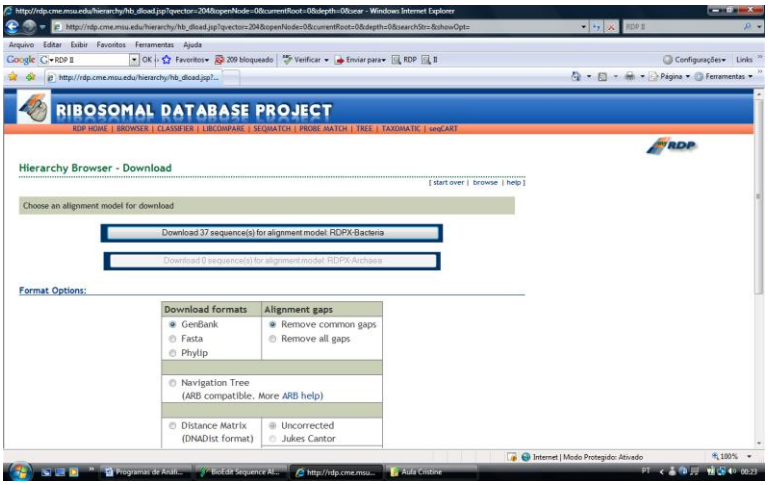



**Figura 23**. Página de download de secuencias del Banco de Dados de RDP.

## BioEdit Software

1. Volver para el programa BioEdit y, sin cerrar la página anterior donde están las secuencias de interés, abrir el archivo que acabó de ser grabado en el formato *GenBank e*n la página de RDP (resultado de sus muestras secuenciadas) (Figura 24).
2. Clic en *File* - *Save as* - graba con otro nombre (Ejemplo: Secuencias para Mega).

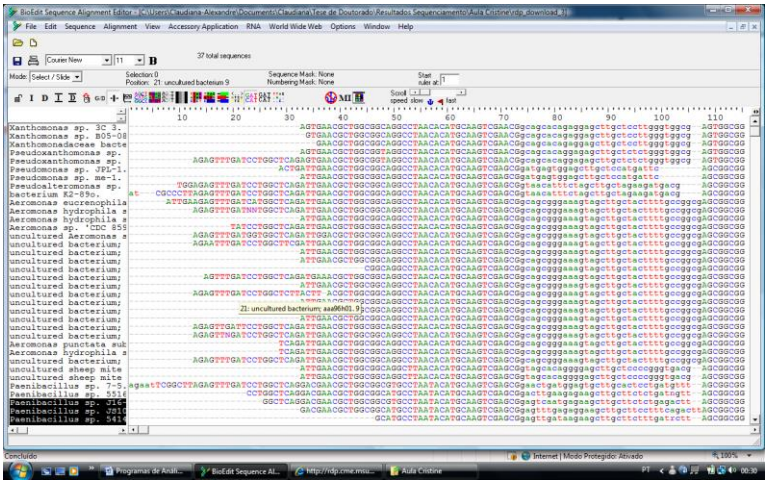


**Figura 24**. Página de BioEdit Software con las secuencias grabadas en la página de RDP

## RDP II – Ribosomal Database Project

*SEQMATCH*

1. En la página de RDP correspondiente a *Sequence Cart* (idem Figura 21) – Clic en *Reset Cart.*
2. En la parte superior izquierda de la página de RDP Clic en *Browser* – Seleccione el banco de datos que presente secuencias próximas a las secuencias de sus muestras de interés. Clic en la cruz en la lateral izquierda para seleccionar.
3. Clic en *SeqCart* y en seguida en *Download* en la parte superior derecha. En la próxima página Clic en *Download sequence(s) for alignment model: RDPX-Bacteria*. Marque la opción *GenBank* en *Format Options* – Grabar.
4. En la página del RDP correspondiente a la figura 24 – Clic en *Reset Cart.*
5. En la parte superior izquierda de la página do RDP Clic en *Browser* – *Root* para seleccionar la raíz del grupo externo (*Archaea Outgroup*). Clic en la cruz en la lateral izquierda para seleccionar.
6. Clic en *SeqCart* y en seguida en *Download* en el extremo superior derecho. En la próxima página Clic en *Download ... sequence(s) for alignment model: RDPX-Bacteria*. Marque la opción *GenBank* en *Format Options* – Grabar.

## SOFTWARE BIOEDIT

1. Volver para el programa BioEdit y, sin cerrar la página anterior donde están las secuencias de interés y las secuencias con los resultados de sus aislados, abrir los archivos que acabaron de ser grabados en el formato *GenBank* en la página de RDP (secuencias referencias y raíz del grupo externo).
2. Selecciona todas las secuencias. Clic en *Sequence* – *Gaps* - *Unlock Gaps.* Clique en *Sequence* – *Gaps* - *Degap.* Corta las caudas.
3. Debes cambiar el nombre de los títulos antes de enviar para Mega, pues este programa no acepta archivos que contengan espacio, punto y coma, etc. Clic en *Edit* – *Select All Sequences* o seleccione las secuencias que va a editar el nombre.
4. Después de seleccionar las secuencias, Clic
5. en *Edit* – *Copy Sequences Titles* – pega en Word – pide localizar los espacios y substituir por *underline.* Hacer lo mismo para punto y coma, dos puntos, etc.
6. Selecciona todos los nombres de las secuencias en Word – vuelve para BioEdit – *Edit* – *Paste Over Titles.*

7. Seleccionar todas las secuencias. Clic en *Accessory Application - ClustalW Multiple Alignment* – Desmarca *Bootstrap NJ Tree - Run ClustalW – Ok.*

## MEGA 5.2

1. Clic en *File – Text Editor – File – Open* – ubica las secuencias grabadas en formato fasta (.fas) y dele abrir. Va abrir una segunda pantalla del programa (*Text File Editor and Format Conventer).*
2. Clic en *Utilities – Convert to MEGA format* o clic derecho en el 4º dibujo de abajo del menú principal - *Ok – Ok – File – Save as* – graba esas secuencias en formato mega (.meg).
3. Vuelve para la primera pantalla del programa (MEGA 5.2) y clic en *File – Open Data* – abre las secuencias grabadas en formato mega – *Nucleotide Sequences* – Ok –

### Construcción del árbol filogenético

1. Abrir el archivo guardado para MEGA, verificar que se encuentren todas las secuencias de estudio (Figura 25).
2. Seleccionar la herramienta Phylogeny para construcción filogenética (verificar flecha).

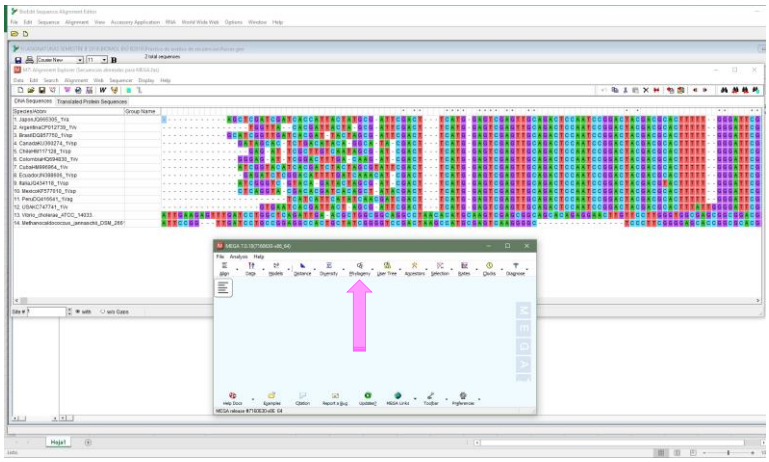


**Figura 25**. Importación de las secuencias de estudio en el programa Mega.

3. Una vez verificado el contenido del archivo, seleccionar el método que se usará para la construcción del árbol filogenético. Si no se tiene certeza, es mejor correr varios métodos y luego seleccionar el que mejor se aproxime a la naturaleza de los datos de estudio (Figura 26).
4. En nuestro casom usaremos inicialmente el método UPGMA para ejemplificar el procedimiento, dar OK a *Nucleotide Sequences* y *yes* a la opción *protein codind nucleotide sequence data*, como se indica en la figura abajo (Figura 27).

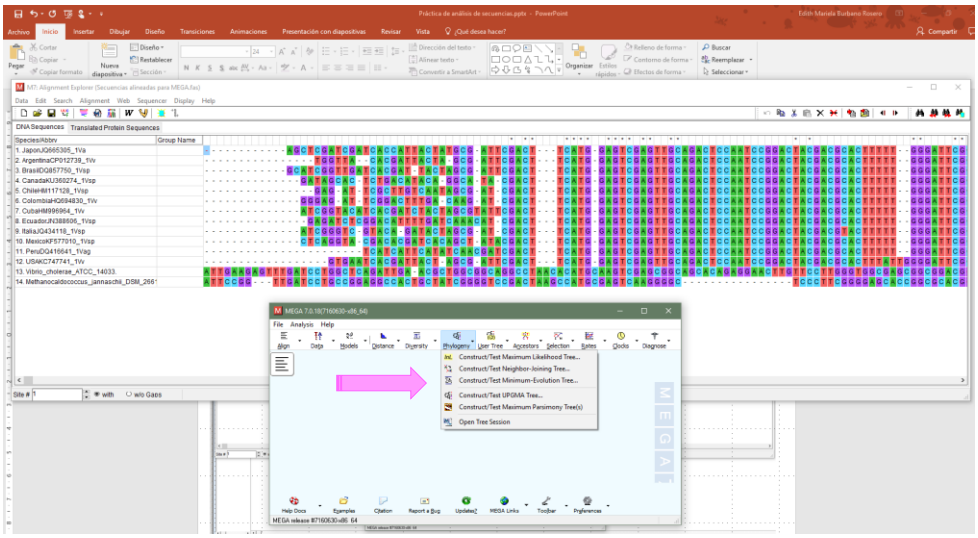


**Figura 26**. Selección del método apropiado para la construcción filogenética en el programa Mega.

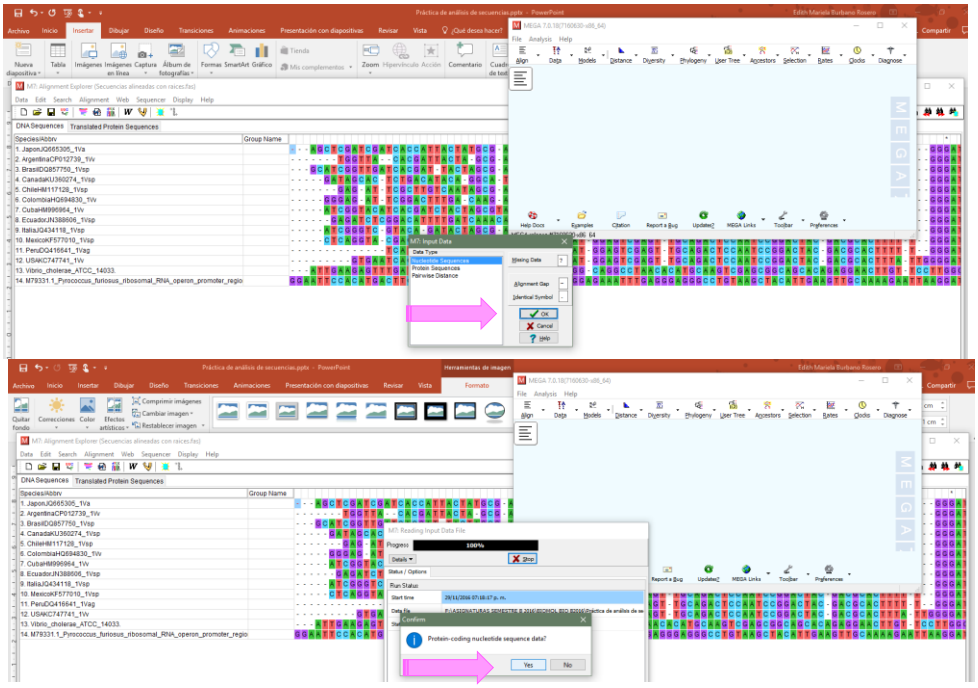


**Figura 27**. Selección de criterios para construcción de árbol filogenético en Mega.

5. Posteriormente, aparecerá una ventana donde le indica los parámetros seleccionados y el cómputo de las secuencias para la obtención de la figura. Dar clic en *compute* (Figura 28).

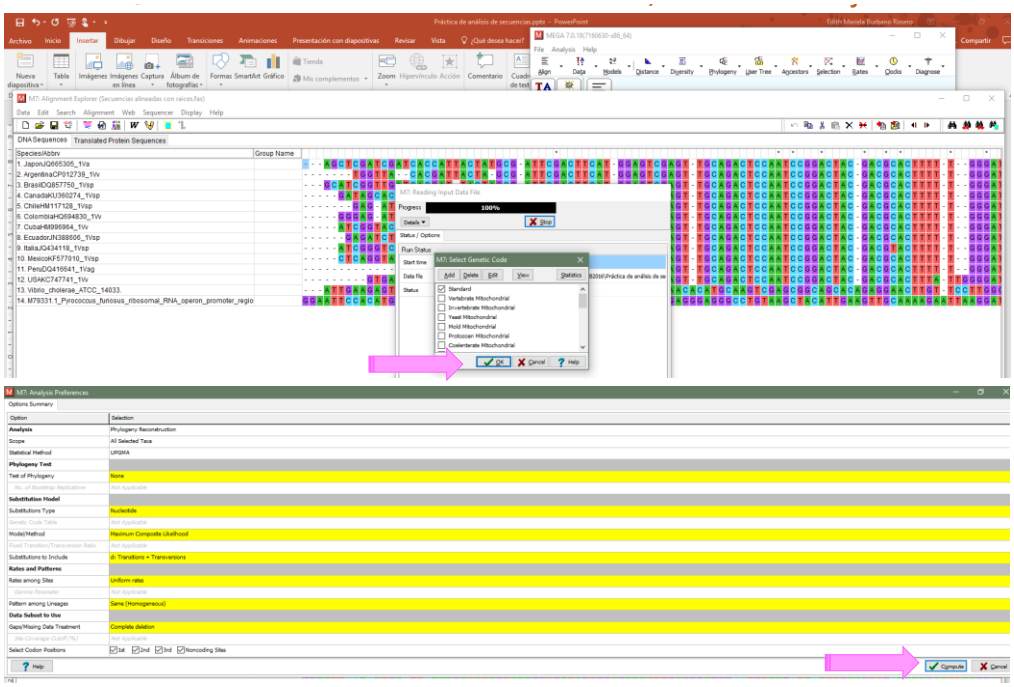
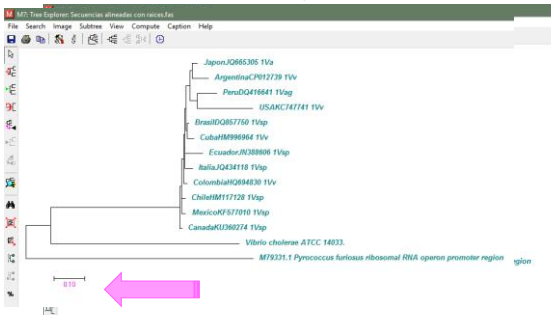


**Figura 28**. Ventana indicando los criterios seleccionados y la opción para computar los datos que darán origen al árbol filogenético.

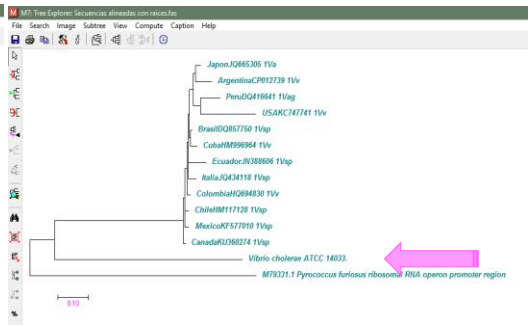
6. Como ejercicio, construya tres árboles más como proceso de comparación y confrontación con los datos ya obtenidos anteriormente.

UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means)



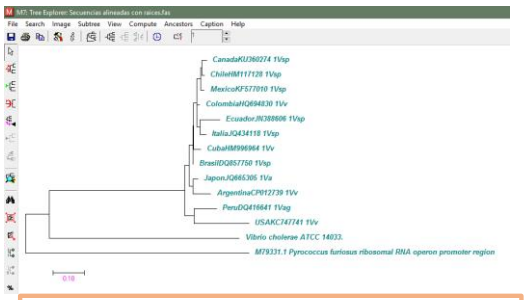
- Es el método más simple.
- UPGMA significa (agrupamiento pareado no ponderado utilizando media aritmética).
- Asume la existencia de un reloj molecular evolutivo.
- Ultramétrico, se obtiene un árbol enraizado.

Neiborg Joining (Vecino más cercano)



- No asume la existencia de un reloj evolutivo.
- Principio de "minimum evolution": el mejor árbol es aquél que minimiza la longitud total de las ramas.
- Heurístico. Greedy algorithm.
- Muy rápido.
- Aditivo, se obtiene un árbol sin raíz.

Maximum Likelihood (Máxima Verosimilitud)




Es un método que utiliza un modelo probabilistico para escoger el árbol que tiene la mayor probabilidad de reproducir los datos observados.

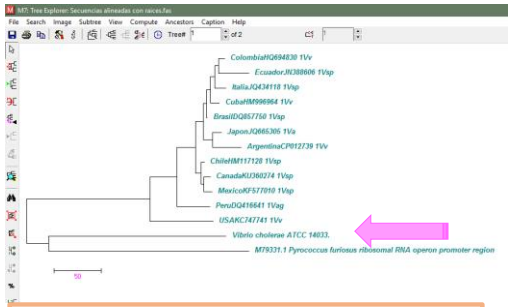
Es un método exhaustivo que considera todas las posiciones del alineamiento y utiliza un modelo evolutivo.

Para una posición en particular, ML calcula el camino desde la raíz hasta las puntas, multiplicando los valores de probabilidad, lo que resulta en valores muy pequeños de probabilidad.

Ventajas: Es riguroso y utiliza modelo evolutivo.

Desventajas: Es lento.

Maximum Parsimony (Máxima Parsimonia)




- La parsimonia busca topologías que requieran el menor número de cambios para "evolucionar" las secuencias observadas.
- Evalúa diferentes topologías de árboles y el que tenga el menor número de cambios, se dice, es el más parsimonioso.

**Figura 29**. Arboles filogenéticos construidos con los datos de estudio. Según criterios de cada uno, se selecciona el de mejor acople a la naturaleza de los datos.




## Cuestionario

1. ¿Para qué es útil construir un árbol filogenético?
2. ¿Cuál es la diferencia entre similaridad genética y homología genética?
3. ¿Por qué es tan importante la elección de una raíz interna y una externa?
4. ¿Cuáles son las precauciones que deben tenerse en cuenta para la edición de cromatogramas?
5. ¿Qué criterios se deben considerar para la selección de la mejor construcción filogenética?

## Referencias Bibliográficas


- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Souza, C., Almeida, B., Colwell, R., Rivera, I. (2011). The Importance of Chitin in the Marine Environment. Marine Biotechnology (Print) JCR, v. 13, p. 823-830.
- Souza, C., Burbano-Rosero, E., Almeida, B. Martins, G., Albertini, L., Rivera, I. (2009). Culture medium for isolating chitinolytic bacteria from seawater and plankton. World Journal of Microbiology & Biotechnology JCR, v. 25, p. 2079-2082.