

FUNDAMENTOS Y TÉCNICAS BÁSICAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

notas
notas
notas
notas
notas
notas
notas

Camilo Ernesto López
editor



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS

**Fundamentos y técnicas básicas
en biología molecular**

Camilo López

EDITOR

Fundamentos y técnicas básicas en biología molecular



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

GRUPO MANIHOT BIOTEC

Bogotá, D. C., noviembre de 2011

Catalogación en la publicación Universidad Nacional de Colombia

Fundamentos y técnicas básicas en biología molecular / editor Camilo López.

– Bogotá : Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.

Departamento de Biología, 2011

92 p. : il.

Incluye referencias bibliográficas

ISBN : 978-958-761-031-4

1. Biología molecular - Técnicas 2. Ingeniería genética 3. Clonación molecular

4. ADN I. López Carrascal, Camilo Ernesto, 1974- II. Grupo Manihot Biotec

CDD-21 572.8 / 2011

© Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá

Facultad de Ciencias, sede Bogotá

Departamento de Biología

Grupo Manihot-Biotec

© Camilo López

Editor

Ana María Bossa, Simón Pedro Cortés Sierra, Paula Díaz,

Catalina Escovar, Juliana Gil, Camilo Ernesto López,

Alejandra Muñoz, Rafik Neme, Juan Camilo Ochoa,

Álvaro Pérez, Andrea Vásquez

Autores

ISBN 978-958-761-031-4

Primera edición: 2011

Jorge Caro, D. G.

Elaboración de figuras

Preparación editorial e impresión

Editorial Universidad Nacional de Colombia

direditorial@unal.edu.co

www.editorial.unal.edu.co

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio
sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales

Impreso y hecho en Bogotá, D. C. Colombia

Contenido

ÁLVARO PÉREZ CAMILO LÓPEZ Introducción	9
ALEJANDRA MUÑOZ SIMÓN CORTÉS CAMILO LÓPEZ 1 Extracción de ADN y electroforesis	15
SIMÓN CORTÉS, PAULA DÍAZ CATALINA ESCOVAR, JULIANA GIL ANDREA VÁSQUEZ, CAMILO LÓPEZ 2 Clonación molecular. Tecnología de ADN recombinante	27
ANA MARÍA BOSSA JUAN CAMILO OCHOA CAMILO LÓPEZ 3 Extracción de ARN, síntesis de ADNc y RT-PCR	55
CATALINA ESCOVAR CAMILO LÓPEZ 4 PCR (Polymerase Chain Reaction)	67
ÁLVARO PÉREZ RAFIK NEME CAMILO LÓPEZ 5 Bioinformática	75
ANEXO. Preparación de soluciones <i>stock</i>	85

Introducción

ÁLVARO PÉREZ¹

CAMILO LÓPEZ²

La historia y evolución de la biología molecular se puede entender dentro del concepto de las *revoluciones científicas* planteado por Thomas Kuhn. El autor menciona que la ciencia se mueve de *paradigma* en *paradigma*, entendiendo este término como un marco o modelo dentro del cual los científicos desarrollan sus ideas. En una revolución científica, el marco es rechazado, reemplazado totalmente o en una medida significativa, y los experimentos son planeados dentro de la nueva estructura conceptual (Kuhn, 1972). El desarrollo de la biología molecular en el siglo XX se acomoda a la descripción de una “revolución científica”, pues crea, sin duda, un nuevo marco de pensamiento a partir del cual, se reexaminan varias teorías en distintas ramas de la biología. Se tiende a ubicar la consolidación de la biología molecular en 1958, cuando Francis Crick acuña el término contundente y poderoso de *dogma central de la biología molecular*.

Este dogma plantea que

[...] una vez la información ha pasado a una proteína *no puede salir de nuevo*. En mayor detalle, la transferencia de información de ácido nucléico a ácido nucléico, o de ácido nucléico a proteína, puede ser posible, pero la transferencia de proteína a proteína, o de proteína a ácido nucléico, es imposible. Se entiende por información, la determinación precisa de secuencia, sea en las bases del ácido nucléico o de residuos de aminoácidos en la proteína (Crick, 1958: 153).

El dogma se hace popular y se empieza a representar como una sucesión causal unidireccional de ADN→ARN→proteína, a partir de su aparición en el libro *Biología molecular del gen* de James Watson (1965). El proceso representado por la primera flecha se denomina *transcripción*, y el de la segunda, *traducción*. Sin embargo, debe ocurrir un largo proceso, llevado a cabo por distintos científicos de diferentes áreas del conocimiento, antes de que se pueda llegar a dilucidar esta relación. A continuación se expone brevemente la

1 Biólogo. Estudiante de maestría, Universidad Nacional de Colombia.

2 Biólogo. Profesor del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Lidera el grupo de investigación Manihot Biotec.

historia de algunos de los descubrimientos que desembocan en las bases de la biología molecular actual.

En 1869, Friedrich Miescher descubrió y describió una sustancia llamada *nucleína* en los núcleos de distintos tipos de células. Dicha sustancia se compone de una parte ácida (los ácidos nucleicos) y una parte básica (las proteínas histonas). Sin embargo, el carácter de esta sustancia como portadora de caracteres hereditarios no fue descubierto sino hasta la década de los cuarenta, mediante los experimentos del grupo de Oswald Avery. Avery y su grupo lograron demostrar que *pneumococos* “lisos” (no patogénicos) podían ser transformados en “rugosos” (patogénicos o virulentos), y que el medio de transferencia de estos rasgos o el “principio de transformación” era el ADN. En el lapso entre estos dos acontecimientos se plantearon las leyes de la herencia de Mendel y se estableció la genética como una disciplina.

La especulación respecto a la naturaleza de los genes fue grande y airada. Muchos científicos creían que las moléculas responsables de la transmisión de caracteres eran proteínas y, aun luego de los descubrimientos de Avery, muchos permanecieron escépticos. Incluso el gran físico pensador Erwin Schrödinger planteó, desde la física cuántica, que las moléculas más “lógicas” para contener la información hereditaria eran las proteínas (Schrödinger, 1943). Mayor confirmación se obtuvo con el trabajo de Hershey y Chase en 1953, quienes demostraron que en el fago T2 era el ADN la molécula que entraba a infectar a la bacteria *Escherichia coli*, y era este quien portaba la información genética para la replicación (reproducción) del virus. Este trabajo fue una de las muchas contribuciones del Grupo del Fago establecido por Max Delbrück al principio de los años cuarenta. En este grupo se facilitó el intercambio y la colaboración entre la biología y la física, que probaron ser necesarias para dilucidar la estructura y función de las moléculas biológicas. Finalmente, con el planteamiento de la estructura de doble hélice del ADN por Watson y Crick, también en 1953, se tuvo una idea más clara de la importancia biológica del ADN. En adelante, la investigación se centró en la elucidación de los mecanismos de replicación genética, la función de los genes y, sobre todo, la relación del ADN con las otras biomoléculas.

Desde 1949 se tenía la idea de que los genes podían codificar la secuencia de aminoácidos de una proteína, gracias a los trabajos de Linus Pauling. Estos señalaron, por primera vez, la causalidad entre una mutación en el ADN y los cambios en una proteína responsable de una enfermedad en los humanos, la anemia falciforme. A partir de este descubrimiento, se establece el concepto *un gen-una enzima*. Se creía además que debía existir un mensajero entre estas moléculas, pues el ADN estaba en el núcleo y la síntesis de las proteínas se llevaba a cabo en el citoplasma. La molécula candidata era el ARN que se encontraba en abundancia en el citoplasma y tenía además un carácter similar al ADN. Los trabajos de Volkin y Astrachan en 1956 fueron cruciales

para determinar la existencia del ARN mensajero, al mostrar que al infectar bacterias con el bacteriófago T₄ se sintetizaba una nueva especie de ARN con una composición de bases similar a la del fago. Quizás el descubrimiento más importante que guió a la completa dilucidación del código genético fue el trabajo de Nirenberg y Matthaei en 1961, quienes mostraron que una única secuencia de tres bases (codón) se puede leer para producir un único aminoácido. Fue solo cuestión de tiempo hasta que fueron asignados a cada aminoácido los posibles codones que los sintetizaban. De esta manera, la relación ADN→ARN→proteína parecía completa e indiscutible.

Desde entonces y durante los últimos cincuenta años, han surgido objeciones o excepciones al dogma. Uno de los primeros aspectos que se combatió fue el de la estricta correspondencia o colinearidad entre ADN y proteína. Se descubrió que no toda secuencia de ADN codifica para una proteína (intrones, regiones intergénicas, transposones), y se acuñó el término *ADN basura*. Ahora se conoce, sin embargo, que el ADN “basura” tiene un papel muy importante en la estructura y función del genoma. Se planteó además que una misma secuencia puede codificar para distintas proteínas (*splicing* alternativo). Otro aspecto que se discutió fue el de la unidireccionalidad en el flujo de la información, tanto por el descubrimiento de organismos que se saltaban el primer paso y llevaban su información genética únicamente en forma de ARN (virus de ARN), como por el descubrimiento de las transcripciones reversas que permitían el paso de información del ARN al ADN. Luego se señalaron otras formas directas e indirectas en que las proteínas y el ARN pueden regular los procesos de transcripción y traducción, haciendo que el dogma pareciera circular (por ejemplo, ARN de interferencia, priones), cada vez surgiendo relaciones más complejas y fascinantes entre estas moléculas.

Los cambios en el “dogma” no significan que este se deba desconocer por completo. Uno de sus méritos es la introducción del concepto de *información* a la genética y a la biología molecular, que se sigue utilizando hoy en día y es muy valioso a la hora de entender y conceptualizar estos procesos. Por otro lado, el objetivo principal del dogma central era introducir un orden simple a las complejas relaciones entre macromoléculas que habían emergido de numerosas observaciones hechas a través de los años previos. En ese sentido fue exitoso, ya que a partir de esta simplificación se ha logrado proponer modelos cada vez más complejos.

No se debe desconocer que gran parte de la investigación en biología molecular hoy en día, aún se dedica a estudiar el flujo de la información del ADN a la proteína. Con este fin, durante las últimas décadas se han desarrollado herramientas cada vez más sofisticadas para estudiar estas moléculas y sus relaciones. La secuenciación del ADN se ha vuelto más fácil, rápida y económica, lo cual permite la producción de más genomas completamente secuenciados de distintos organismos. La técnica de PCR permite amplificar fragmentos de

ADN en gran cantidad y de forma fácil para su estudio. Se dispone de diferentes herramientas para estudiar el paso de ADN a ARN (ADNc, RT-PCR, *northern blot*, microarreglos). La secuenciación de proteínas se hace cada vez más sencilla, aunque aún no completamente sistematizada y a gran escala. Las tecnologías del ADN recombinante han permitido expresar y aislar productos génicos de interés de diversos orígenes, y existen más herramientas para estudiar interacciones entre proteínas y entre proteínas y ácidos nucleicos. De igual manera, existe una cantidad enorme de información biológica disponible y nuevas formas de acceder a esta y analizarla (bioinformática), tanto, que algunas investigaciones pueden prescindir totalmente del trabajo de laboratorio.

Todos estos avances han permitido no solo tener un entendimiento profundo de la vida y sus mecanismos, sino también del desarrollo de aplicaciones médicas, agronómicas e industriales de alta sofisticación, utilidad e impacto social. Algunos ejemplos son la generación de vacunas más efectivas, el descubrimiento de genes ligados a enfermedades, los progresos pioneros en terapia génica, los estudios de genotipificación para estudiar la diversidad y la evolución humana, la creación de animales y plantas transgénicas con mejores características para la alimentación u otras aplicaciones, la síntesis de distintas moléculas de interés biotecnológico o médico utilizando bacterias transformadas, entre otros.

Este libro presenta una aproximación al conocimiento de técnicas básicas en el estudio de la biología molecular y al desarrollo de prácticas sencillas de laboratorio para su comprensión y aplicación.

Bibliografía

- Biro, J. C. Seven Fundamental, Unsolved Questions in Molecular Biology. Cooperative Storage and Bi-directional Transfer of Biological Information by Nucleic Acids and Proteins: An Alternative to “Central Dogma”. *Medical Hypotheses*. 2004. **63**: 951-962.
- Crick, F. On Protein Synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1958. **12**: 138-163.
- Crick, F. *Qué loco propósito, una visión personal del descubrimiento científico*. Barcelona: Tusquets. 1989.
- Culp, S.; Kitcher, P. Theory Structure and Theory Change in Contemporary Molecular Biology. *The British Journal for the Philosophy of Science*. 1989. **40** (4): 459-483.
- Fantini, B. Of Arrows and Flows. Causality, Determination, and Specificity in the Central Dogma of Molecular Biology. *Hist. Philos. Life Sci.* 2006. **28** (4): 567-593.
- Holliday, R. The Early Years of Molecular Biology: Personal Recollections. *Notes and Records of the Royal Society of London*. 2003. **57** (2): 195-208.

- Jacob, F.; Monod, J. Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins. *J. Mol. Biol.* 1961. **3**: 318-356.
- Jacob, F.; Monod, J.; Calvin, M.; Tatum, E.; Brachet, J.; Prigogine, I. *et al.* *Biología molecular*. Madrid: Orbis. 1975.
- Knoers, N.; Monnens, L. Teaching Molecular Genetics. Chapter 1: Background Principles and Methods of Molecular Biology. *Pediatr. Nephrol.* 2006. **21**: 169-176.
- Kuhn, T. S. *The Structure of Scientific Revolutions*. Chicago: University of Chicago Press. 1972.
- Morange, M. *A History of Molecular Biology*. Cambridge, MA: Harvard University Press. 1998.
- Morange, M.. What History Tells Us XIII. Fifty Years of the Central Dogma. *J. Biosci.* 2008. **33** (2): 171-175.
- Olby, R. C. *The Path to the Double Helix: the Discovery of DNA*. Seattle: Washington Press. 1974.
- Pennisi, E. A Hothouse of Molecular Biology. *Science, New Series.* 2003. **300** (5617): 278-282.
- Schrödinger, E. *¿Qué es la vida?* Barcelona, Tusquets. 1943.
- Stanford Encyclopedia of Philosophy (SEP). Molecular Biology. History of Molecular Biology. <http://plato.stanford.edu/entries/molecular-biology/>. 2005.
- Thieffry, D.; Sarkar, S. Forty Years under the Central Dogma. *Trends in Biochemical Sciences.* 1998. **23**: 312-316.
- Watson, D. *La doble hélice*. Barcelona, Plaza & Janés. 1978.

Extracción de ADN y electroforesis

ALEJANDRA MUÑOZ¹

SIMÓN CORTÉS²

CAMILO LÓPEZ³

Marco conceptual

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es la molécula de la información genética que determina las características de los organismos y se encuentra presente en todas las células vivas de todos los organismos. El ADN está conformado por ácidos nucleicos y posee una estructura de doble hélice, con cadenas de carácter antiparalelo (Watson y Crick, 1953).

Los ácidos nucleicos están conformados por un azúcar pentosa, un fosfato y una base nitrogenada que puede ser una pirimidina o una purina. La pentosa está compuesta por cinco carbonos, los cuales determinan la dirección de las cadenas (también llamadas *hebras*) de ADN, y carece de un grupo hidroxilo en su extremo 3'. Para que la estructura formada sea estable, una hebra de ADN se extiende del extremo 5' al 3', mientras que la otra va en sentido contrario. Es esta cualidad la que otorga una de las características del ADN: su carácter antiparalelo. Sin excepción alguna, las pirimidinas se aparean con las purinas. La adenina (A) con la timina (T), y la guanina (G) con la citosina (C). Las uniones de estas bases se dan a través de dos y tres puentes de hidrógeno, respectivamente (figura 1). Estas uniones son lo suficientemente estables para formar la estructura de doble hélice del ADN, que se compone entonces de dos cadenas antiparalelas que pueden desnaturalizarse a altas temperaturas, por lo general, superiores a los 70 °C, pero esto dependerá del contenido GC característico de la molécula (Nelson y Cox, 2004).

Desde el descubrimiento del ADN como la molécula encargada de transmitir la información de una generación a otra en todos los organismos vivos, los estudios en biología molecular se han centrado en su comprensión, funcionamiento y análisis. Casi cualquier estudio de biología molecular parte

1 Microbióloga Estudiante de doctorado, Universidad Nacional de Colombia.

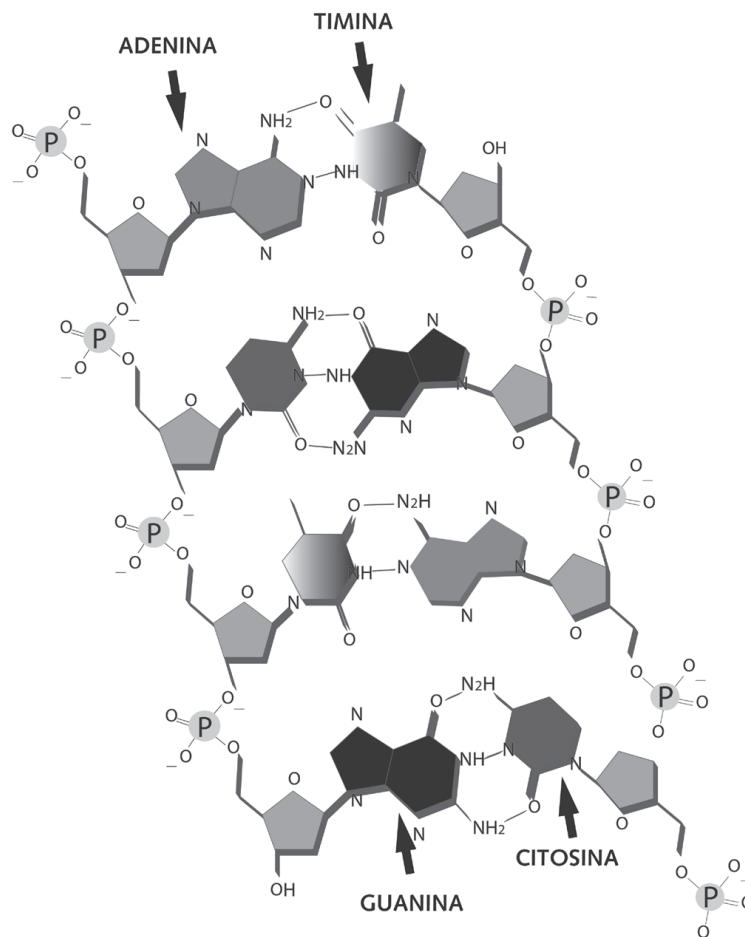
2 Biólogo. Estudiante de doctorado, Universidad Nacional de Colombia.

3 Biólogo. Profesor del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Lidera el grupo de investigación Manihot Biotec.

del aislamiento del ADN; en la mayoría de los casos, se requiere que sea de excelente calidad y pureza.

Una molécula de ADN está formada por regiones codificantes y regiones no codificantes. Dentro de las que codifican están los genes, los cuales poseen la información correspondiente a la secuencia de aminoácidos que conforman las proteínas. Durante años, los genes han sido el centro de atención de los investigadores y han permitido comparar los organismos, describirlos en términos de sus genes (cantidad y características) y establecer una relación evolutiva entre estos. Por otro lado, dentro de la parte no codificante se encuentra una serie de señales de activación que permiten la expresión de los genes, así como regiones que permiten darle una “estructura” al genoma. Estas actúan como un “reservorio” de información que puede ser empleado para generar nuevas variantes génicas y/o de regulación (Cooper, 2003).

Figura 1. Estructura del ADN. Los nucleótidos se encuentran unidos de manera covalente por enlaces fosfodiéster entre el hidroxilo 3' de una desoxirribosa y el hidroxilo 5' de la siguiente. Las bases complementarias se encuentran unidas por puentes de hidrógeno.



El uso del ADN en diversas investigaciones, requiere que esta molécula se encuentre aislada y purificada en el mayor grado posible. Existen múltiples métodos de extracción de ADN que pueden variar según el tejido o muestra inicial. En general, las etapas de aislamiento son similares y se basan en la lisis de las membranas celulares, y en caso de ciertos organismos de la pared celular, la homogenización del material, la separación del ADN de otras moléculas presentes en la muestra (proteínas, carbohidratos y ácidos grasos), la precipitación del ADN, usando lavados con etanol, y la resuspensión en soluciones adecuadas para los posteriores análisis. El contenido en sales de los reactivos, así como las características físicoquímicas del ADN que hacen que este no sea soluble en etanol, son aspectos que se deben considerar para llevar exitosamente el proceso de extracción y purificación del ADN. Para lograr la mayor pureza de la muestra se utilizan soluciones salinas (*salting out*) o agentes orgánicos, como el fenol, que permiten una separación exitosa de los ácidos grasos y de las proteínas que pueden inhibir la acción de otros reactivos necesarios en estudios posteriores (Sambrook y Russell, 2001).

La extracción del ADN tiene diferentes fines en biología molecular, y tanto sus orígenes como sus usos son múltiples. Así, gracias a una extracción exitosa de ADN, se pueden estudiar genes individualmente, comparar la presencia o la ausencia de genes en diferentes individuos o especies, realizar estudios de diversidad e incluso llegar a secuenciar completamente el genoma de un individuo. Respecto a la fuente del ADN, esta puede ser tan variable como se desee. Si bien en un principio se buscaba extraer el ADN presente en un individuo u organismos particular como animales, plantas, bacterias u hongos, hoy el alcance es más ambicioso. Se ha logrado incluso la extracción del ADN de todos los organismos presentes en un determinado ambiente, evaluando su diversidad en la microflora (bacterias, virus y hongos principalmente). De este modo, se puede extraer ADN total de diversos tipos de muestras de suelo, agua, ambientes extremos, y así obtener información genómica de organismos desconocidos. Esto es lo que se conoce como metagenómica (Singh *et al.*, 2009).

Con la extracción del ADN, se abre entonces un mundo de posibilidades en donde se puede lograr un acercamiento a los genes, a la diversidad, a las proteínas y sus funciones, así como cientos de otras características que hacen de esta molécula y su extracción partes fundamentales de cualquier estudio en el campo de la biología molecular.

Determinación de la cantidad y pureza de muestras de ADN mediante espectrofotometría

Muchas biomoléculas tienen la capacidad de absorber luz a longitudes de onda características. En el caso del ADN esta longitud de onda es de 260 nm. La medición de la absorción de luz mediante un espectrofotómetro es una

técnica eficiente para determinar la cantidad y la pureza de una muestra de ADN. El logaritmo de la relación entre la intensidad de la luz incidente y la intensidad de la luz transmitida se conoce como *absorbancia* (A), y se calcula mediante la ley de Lambert-Beer:

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon c l .$$

Donde:

I_0 = intensidad de la luz incidente

I = intensidad de la luz transmitida

ϵ = coeficiente de extinción molar (en litros por mol-centímetro)

c = concentración de la molécula absorbente (en moles por litro)

l = longitud de la trayectoria a través de la muestra (en centímetros)

Se debe tener en cuenta que con una longitud de trayectoria fija, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del soluto (ADN en nuestro caso). Esta longitud se ha estandarizado a un valor de un centímetro en la mayoría de casos.

El coeficiente de extinción molar es una medida de qué tan fuertemente un determinado compuesto absorbe luz, y varía según el tipo de solvente, el pH y la longitud de onda.

A partir de lo anterior, podemos determinar la cantidad y pureza del ADN de nuestra muestra con un espectrofotómetro, teniendo en cuenta la siguiente información adicional.

El coeficiente de extinción de ADN de doble cadena se ha estandarizado a un valor de 50 ng-cm/ μ L, por su parte, para el ADN de cadena sencilla es de 33 ng-cm/ μ L.

Si el proceso de purificación de ADN no fue eficiente, en la muestra puede presentarse otro tipo de moléculas que interferirán con los procesos posteriores en los que deseemos utilizar el ADN. Las proteínas tienen su mayor valor de absorbancia a 280 nm, mientras que diversas sales y contaminantes frecuentes absorben fuertemente a 230 nm.

La concentración de ADN se obtiene al multiplicar la A_{260} por el factor de dilución, y teniendo en cuenta que una A_{260} de 1,0 equivale a 50 μ g/ml de ADN, la concentración de ADN = A_{260} x factor de dilución x 50 μ g/ml.

Generalmente, la mayor contaminación en las extracciones de ADN se da por la presencia de proteínas, fenoles y sales. Para determinar el grado de pureza del ADN es posible tomar el valor de absorbancia a 280 nm y 230 nm, que son las longitudes de onda a las cuales las proteínas y diversas sales absorben la mayor cantidad de luz, respectivamente, y calcular razones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . Valores de A_{260}/A_{280} cercanos a 1,8 indican que el ADN es altamente

puro, al igual que valores de A_{260}/A_{230} entre 1,8 y 2,2. Valores inferiores a este ratio son indicadores de contaminación con proteínas, sales y otros.

Los espectrofotómetros actuales cuentan con la opción de corregir lecturas de absorbancia debidas a ruidos de fondo del instrumento. Esta corrección consiste en tener en cuenta la absorbancia a 320-340 nm, y realizar las relaciones correspondientes.

Los espectrofotómetros son más precisos cuando las mediciones están dentro del rango lineal del instrumento, que generalmente está entre 0,1 y 1,0.

Finalmente, se debe tener en cuenta que los instrumentos modernos realizan todos los cálculos necesarios para deducir los valores de concentración y pureza del ADN, por lo cual, generalmente solo es necesario especificar el tipo de ADN que se está utilizando.

Electroforesis

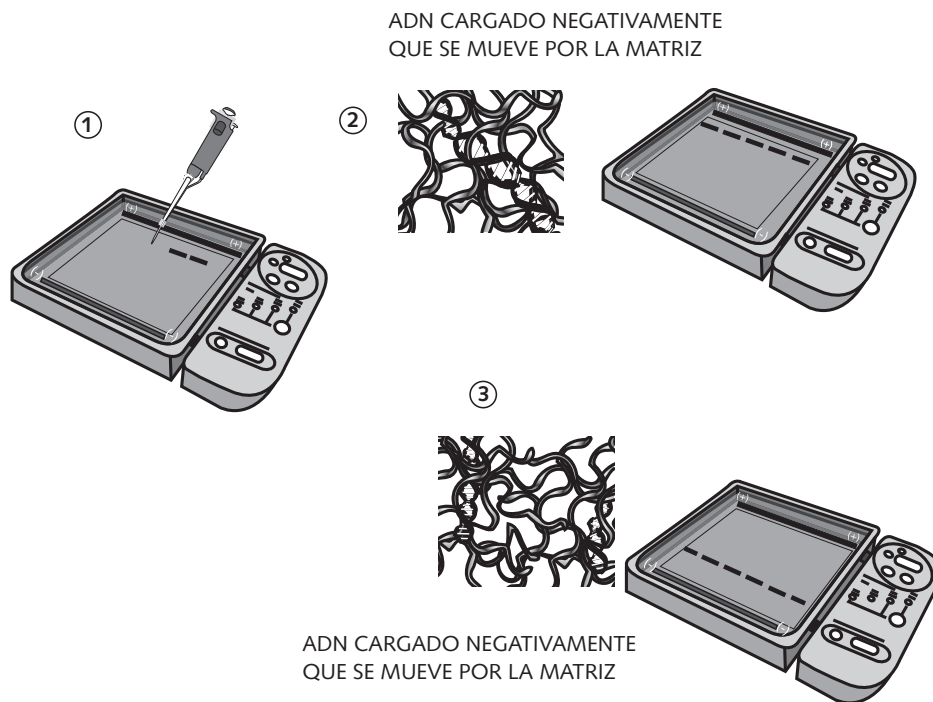
La electroforesis es un procedimiento que se lleva a cabo con el fin de separar el ADN en función de su carga, su tamaño y su nivel de enrollamiento. La agarosa es un polisacárido que tiene la capacidad de formar un enmallado de tamaño de poro constante y que depende de la concentración a la que se utilice al realizar un gel. A través de este gel es posible hacer pasar muestras de ADN mediante la aplicación de un campo eléctrico. Dado que el ADN está cargado negativamente (por la presencia de los grupos fosfatos), se moverá hacia el polo positivo de la cámara de electroforesis. Si la muestra está formada por fragmentos de ADN, aquellos de menor tamaño migrarán a mayor velocidad que los más grandes. Según el tamaño esperado de las moléculas de ADN, se puede modificar la concentración de agarosa. Así, entre más pequeños sean los fragmentos de ADN, se separarán mejor a mayor concentración de agarosa. De la misma forma, según el nivel de enrollamiento del ADN, este migrará con mayor o menor dificultad a través de los poros. Si el ADN se encuentra superenrollado migrará más rápida y fácilmente que aquel que se encuentre en una conformación lineal (figura 2).

De manera estándar, se trabaja con una concentración de 1,2% de agarosa, pero esta puede variar entre 0,8 y 2-4%. Para fragmentos de ADN menores a 100 pb (pares de bases), se puede utilizar otro tipo de geles como los de poliacrilamida. En la tabla 1 se muestran las concentraciones óptimas de agarosa para separar moléculas de ADN de diferentes rangos de tamaño. Para permitir la migración del ADN a través del gel en la cámara de electroforesis, el gel debe ser preparado con el mismo *buffer* con el que se llenará la cámara (generalmente se utiliza TAE o TBE al 0,5 X, véase el anexo).

Para visualizar el ADN, este se debe marcar con algún tipo de sustancia que permita documentar su posición y cantidad dentro del gel. Una de las sustancias más utilizadas es el bromuro de etidio, un compuesto aromático que tiene la capacidad de intercalarse en el ADN y emitir una fluorescencia

naranja cuando es expuesto a luz ultravioleta. La capacidad intercalante del bromuro de etidio en los ácidos nucleicos, hace que este sea un posible agente cancerígeno, por lo cual se debe evitar el contacto directo de la piel con este reactivo. Actualmente se han desarrollado otros marcadores de ácidos nucleicos con menores grados de toxicidad, como los marcadores SYBR, pero el precio de estos suele ser más alto que el del bromuro de etidio, el cual continúa siendo la tinción estándar para geles de agarosa en diversos laboratorios (Sambrook y Russell, 2001).

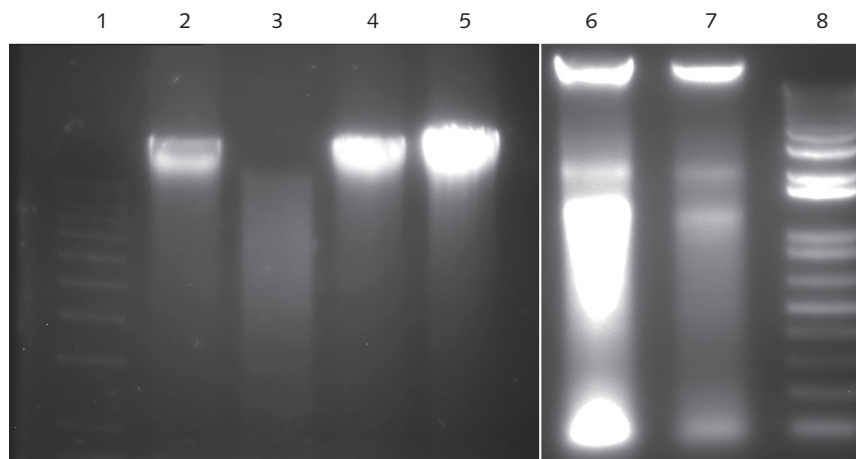
Figura 2. Esquema de una electroforesis en gel de agarosa. 1) Las muestras de ADN son cargadas dentro de los pozos del gel de agarosa ubicado dentro de la cámara de electroforesis. 2) Una vez cargadas las muestras, se aplica la corriente eléctrica haciendo que el ADN migre del polo negativo al positivo a través del enmallado de agarosa. 3) Las muestras de ADN migrarán con diferentes velocidades según su tamaño.



Las moléculas de ADN se observan en el gel como bandas discretas en las posiciones relativas correspondientes a su tamaño. Para saber el tamaño de la molécula de ADN, es necesario correr en un carril una muestra con tamaños conocidos conjuntamente con las muestras de ADN de interés. Se debe tener en cuenta que cuando las moléculas de ADN de gran tamaño (superiores a 30 kb) son corridas en geles de agarosa estándar, estas, sin importar su tamaño, suelen migrar como si fuesen de 30 kb. De esta manera, si en la extracción de ADN se obtiene una buena calidad de ADN, poco fragmentado, se espera ver

una banda de alta intensidad cerca de los 30 kb. De otra forma, si el ADN se ha degradado en cierto grado, en el gel se observa un “barrido”, correspondiente a los diferentes tamaños de moléculas de ADN que empiezan a fragmentarse y disminuir su tamaño. Por otra parte, a causa de que el bromuro de etidio marca tanto ADN como ARN, si no se realiza una buena limpieza de ARN (tratamiento con ARNasa), el ADN estará contaminado con ARN, principalmente ribosomal, que se observará como una banda de bajo peso poco definida (Sambrook y Russell, 2001). En la figura 3 se observan ejemplos de los diferentes casos citados.

Figura 3. Visualización de diferentes muestras en un gel de agarosa, luego de la electroforesis.



En los carriles 1 y 8 se observa el marcador de peso molecular, los carriles 2, 4 y 5 corresponden a muestras de ADN sin contaminación de ARN y a diferentes concentraciones. El carril 3 corresponde a un ADN degradado. Los carriles 6 y 7 muestran ADN contaminado con diferentes cantidades de ARN (cortesía grupo Manihot Biotec).

Tabla 1. Concentraciones de agarosa recomendadas para diferentes rangos de tamaño de ADN por separar.

Concentración de agarosa del gel (% [p/v])	Rango de separación de moléculas de ADN lineal (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Fuente: elaboración propia.

Protocolo de extracción de ADN de tejido vegetal⁴

Precauciones y recomendaciones

- 1 Evitar el contacto con la piel de las diferentes soluciones pues pueden ser irritantes.
- 2 Evitar la aspiración de los gases generados por las distintas soluciones.
- 3 Los elementos utilizados deben estar debidamente esterilizados.
- 4 Manejar con precaución el nitrógeno líquido.

Materiales, equipos y reactivos

- Baño maría
- SpeedVac (opcional)
- Microcentrífuga
- Micropipetas
- Puntas plásticas
- Tubos plásticos de 1,5 ml
- Guantes de látex
- Espátulas
- Mortero y pistilo
- Gradillas
- Cubeta con hielo
- Nitrógeno líquido
- Acetato de potasio 5 M
- Isopropanol
- Acetato de sodio 3 M pH 5,2
- Etanol 70%
- RNAsa 10 mg/ml
- Tris HCl 1 M pH 8,0
- EDTA 500 mM pH 8,0
- NaCl 5 M
- SDS 20 X
- Bisulfito de sodio
- H₂O dos veces destilada
- TE

Procedimiento

- 1 Preparar el *buffer* de extracción, según la tabla 2, luego completar el volumen con agua dos veces destilada y esterilizar.

4 Basado en Dellaporta *et al.* (1983).

Tabla 2. Preparación del *buffer* de extracción de ADN de tejido vegetal

Reactivo	Concentración <i>stock</i>	Concentración final	Volumen para 100 ml de solución
Tris HCl pH 8,0	1000 mM	100 mM	10 ml
EDTA pH 8,0	500 mM	50 mM	10 ml
NaCl	5000 mM	500 mM	10 ml
SDS (p/v)	20X	1,25%	1,25 ml

Fuente: elaboración propia

- 2 Agregar bisulfito de sodio el día de uso (0,38 g x por cada 100 ml de *buffer*).
- 3 Congelar el tejido en nitrógeno líquido y macerar en mortero, rápidamente, hasta obtener un polvo lo más fino posible.
- 4 Agregar 200 mg de tejido macerado a un tubo de 1,5 ml (hasta la marca de 100 µl).
- 5 Calentar el *buffer* de extracción a 65 °C.
- 6 Agregar 940 µl de *buffer* de extracción al tubo.
- 7 Incubar a 65 °C durante 45 minutos, con agitación cada 5 minutos.
- 8 Adicionar 400 µl de acetato de potasio 5 M (frío). Mezclar bien.
- 9 Incubar en hielo por 30 minutos, agitar cada 5 minutos.
- 10 Centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 11 Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5 ml.
- 12 Centrifugar a 6000 rpm por 4 minutos a temperatura ambiente.
- 13 Dividir la muestra en dos tubos de 1,5 ml.
- 14 Agregar un volumen igual de isopropanol y 1/10 del volumen final de acetato de sodio 3 M pH 5,2.
- 15 Incubar a -80 °C por 1 hora, o preferiblemente la noche a -20 °C.
- 16 Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
- 17 Lavar con 400 µl de etanol al 70%.
- 18 Centrifugar a 12000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente.
- 19 Descartar el sobrenadante y secar en SpeedVac o a temperatura ambiente.
- 20 Resuspender en 100 µl de TE + RNAsa 10 mg/ml (1 µg por cada 100 ml de TE).
- 21 Incubar a 37 °C por 30 minutos.
- 22 Almacenar a -20 °C.
- 23 Valorar integridad del ADN mediante corrida en gel de agarosa al 0,8% (ver el protocolo de electroforesis a continuación).

Protocolo de electroforesis

Precauciones y recomendaciones

- 1 Manejar con precaución el bromuro de etidio.
- 2 Preferiblemente utilizar guantes de látex o de nitrilo.

Materiales, equipos y reactivos

- Microondas
- Cámara de electroforesis
- Documentador de geles
- Micropipetas
- Puntas plásticas
- Molde para geles y peines
- Agarosa
- *Buffer* de carga (Blue Juice) 6 X
- Bromuro de etidio 0,5 mg/l
- TAE 0,5 X

Procedimiento

- 1 Para preparar un gel de 100 ml al 1%, mezclar 1 g de agarosa con 100 ml de TAE 0,5 X.
- 2 Calentar en el microondas hasta hacer una mezcla homogénea (aproximadamente 1 minuto).
- 3 Cuando haya enfriado, agregar 0,2 µl de bromuro de etidio 0,5 mg/l.
- 4 Colocar la mezcla en el molde para geles sin olvidar los peines.
- 5 Esperar a que se gelifique completamente.
- 6 Retirar los peines y colocar el gel con el soporte en la cámara de electroforesis previamente llenada con TAE 0,5 X.
- 7 Adicionar *buffer* hasta cubrir completamente el gel.
- 8 Mezclar las muestras de ADN con 1/5 del volumen de *buffer* de carga 6 X (véase anexo).
- 9 Lentamente servir las muestras en los carriles del gel usando una micropipeta. Recordar servir marcadores estándar de peso molecular.
- 10 Colocar la tapa del aparato de electroforesis y conectarlo a la fuente de poder, de forma que el ADN pueda migrar hacia el ánodo.
- 11 Aplicar un voltaje de 1-5 V/cm (esta medida se toma como la distancia entre el ánodo y el cátodo). Si la conexión es correcta, se observarán burbujas, y a los pocos minutos, se observará el azul de bromofenol contenido en el *buffer* de carga migrar hacia el ánodo.
- 12 Correr el gel hasta que el azul de bromofenol y el *xylene cyanol* hayan migrado una distancia adecuada en el gel.

- 13 Retirar el gel y colocarlo en el documentador de geles. La presencia de bromuro de etidio en el gel permitirá visualizar las bandas de ADN al aplicar luz ultravioleta.

Questionario

- 1 ¿Cuáles son los principales factores que afectan el corrido de una molécula de ADN en un gel de agarosa?
- 2 ¿De qué depende el nivel de enrollamiento de una molécula de ADN?
- 3 Si se tiene una molécula de ADN superenrollada, otra lineal y otra enrollada, ¿cómo se espera visualizar cada una en un gel de agarosa?
- 4 Al realizar la extracción de ADN, este no queda bien purificado y se encuentra con restos de proteínas y ácidos grasos. ¿Qué consecuencias acarrea esto? ¿Cómo se espera verlo en un gel de agarosa?
- 5 Al realizar la extracción de ADN de tejido vegetal, hay una contaminación con ADN animal, ¿cómo se ve esto en el gel de agarosa?
- 6 ¿Cuáles son los factores que pueden hacer que el ADN se degrade a lo largo de la extracción?
- 7 ¿Cuál es la función del ADN no codificante?

Bibliografía

- Biochrom. *Biowave II & Biowave II+ User Manual*. 2007.
- Cooper, G. M. *The Cell. A Molecular Approach* (3rd ed.). Sinauer Associates Inc. 2003.
- Dellaporta, S.; Wood, J.; Hicks, J. A Plant DNA Miniprep: Version II. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 1983. 1: 19-21.
- Lehninger, N. *Principles of biochemistry* (5th ed.). New York: W. H. Freeman and Company. 2008.
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, L. S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. *Molecular Cell Biology* (4th ed.). New York: Scientific American Books. 2000.
- Nelson, D.; Cox, M. *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th ed.). New York: Freeman and Co. 2004.
- Promega. *Protocols & Applications Guide*: 2009.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- Singh, J.; Behal, A.; Singla, N.; Joshi, A.; Birbian, N.; et ál. Metagenomics: Concept, Methodology, Ecological Inference and Recent Advances. *Biotechnol J.* 2009. 4: 480-494.
- Thermo Fisher Scientific Inc. *Nanodrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual*. 2009.
- Watson, J. D.; Crick, F. H. Molecular Structure of Nucleic Acids; a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953. 171: 737-738.

Clonación molecular. Tecnología de ADN recombinante

SIMÓN CORTÉS¹, PAULA DÍAZ²
CATALINA ESCOVAR³, JULIANA GIL⁴
ANDREA VÁSQUEZ⁵, CAMILO LÓPEZ⁶

Introducción

A menudo se habla sobre clonación, sin embargo, la clonación de organismos para obtener dos individuos idénticos relaciona el término de *clonación* como un método de reproducción asexual. Esta estrategia reproductiva se lleva a cabo de manera natural en muchos organismos, aunque también se ha implementado de forma artificial para fines productivos y terapéuticos. En el contexto de la biología molecular, el término *clonación* no pierde su sentido en cuanto al resultado del proceso: la generación de copias exactas de un recurso biológico. No obstante, en este caso, el recurso implica moléculas de ADN. La clonación molecular se realiza con el fin de producir múltiples copias de un fragmento de material genético de interés y, para esto, se conserva como una molécula de ADN recombinante, almacenada en células que se replican (clones). Esta consiste en una molécula que contiene ADN de diferentes fuentes. La idea de realizar moléculas de ADN recombinante y clonaras nació en los años setenta, después de que se desarrollaron las tecnologías para realizar la ligación del ADN en 1967 y la digestión mediada por enzimas de restricción en 1968. Fue entonces, en 1972, cuando David Jackson, Robert Symons y Paul Berg aprovecharon estas técnicas y desarrollaron una metodología para crear ADN recombinante, generando, de este modo, una molécula de ADN circular que contenía genes de virus y el operón lactosa de *E. coli*.

1 Biólogo. Estudiante de doctorado, Universidad Nacional de Colombia.

2 Bióloga y MSc Microbiología, Universidad Nacional de Colombia.

3 Bióloga, Universidad Nacional de Colombia.

4 Bióloga, Universidad Nacional de Colombia. Estudiante de Doctorado UC Davis, USA.

5 Bióloga. Estudiante de maestría, Universidad Nacional de Colombia.

6 Biólogo. Profesor del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Lidera el grupo de investigación Manihot Biotec.

El ADN utilizado cuando se realizan metodologías de clonación molecular incluye por lo general productos PCR, ADNc (ADN copia) o fragmentos generados como producto de la digestión del ADN. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) generalmente se emplea para amplificar un gen particular que se desea clonar para su posterior estudio. Por otro lado, cuando se desea estudiar el genoma o el transcriptoma, lo ideal es generar librerías genómicas o de expresión, respectivamente. Para el primer caso, se hace uso de la digestión total del genoma y para el segundo, se emplea la retrotranscripción del ARN, lo cual da origen al ADNc. Una vez se obtiene el genoma digerido o el ADNc, se procede a realizar la clonación de estos miles de fragmentos de ADN con el fin de generar librerías. Es así como una librería de ADN consiste en miles de bacterias, cada una de las cuales contienen el mismo vector pero con distintos fragmentos ADN.

A continuación, se describirán los pasos básicos por seguir en el proceso de clonación molecular.

Digestión de ADN

Marco conceptual

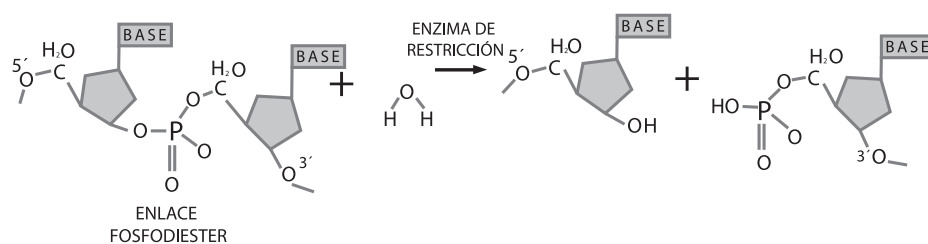
Uno de los acontecimientos más importantes en la historia de la tecnología del ADN recombinante fue el descubrimiento de las enzimas de restricción. A finales de los años sesenta, Stuart Linn y Werner Arber, al estudiar un fenómeno denominado *restricción del crecimiento de bacteriófagos controlada por el hospedero*, descubrieron que dicha restricción era causada por enzimas de las células hospederas que cortaban el ADN no metilado del fago en numerosos sitios, limitando así su crecimiento. Un par de años más tarde, H. Smith y K. Wilcox reportaron el aislamiento y caracterización de la primera enzima de restricción llamada en ese entonces *endonucleasa R* (posteriormente renombrada *HindII*). Esta enzima fue aislada de extractos de *Haemophilus influenzae* cepa Rd, y como característica especial, tiene la capacidad de degradar el ADN foráneo sin afectar el ADN nativo (Arber y Linn, 1969).

En 1972, J. Mertz y R. Davis demostraron por primera vez el potencial de recombinación de las enzimas de restricción. Estos investigadores mostraron que la endonucleasa de restricción R₁ produce cortes “escalonados”, que generan extremos “cohesivos” idénticos y complementarios. A partir de estos descubrimientos, se sugirió que, al ser incubados en presencia de una ADN ligasa, los extremos generados por la acción de R₁ pueden unirse para generar una molécula híbrida de ADN (ADN recombinante). Este hallazgo es considerado como el nacimiento de la tecnología del ADN recombinante (Mertz y Davis, 1972).

Las enzimas de restricción son moléculas que reconocen una secuencia de ADN y la cortan rompiendo el enlace fosfodiéster (figura 4), generando

en ambas hebras extremos romos o cohesivos (figura 5). Esta reacción se denomina *digestión*, y el sitio en donde se realiza el corte se conoce como *sitio de restricción*. De este modo, cuando un virus inyecta su ADN y las bacterias logran reconocerlo como ADN foráneo, estas procederán a cortarlo en pequeñas fracciones gracias a las enzimas de restricción. La especificidad en el sitio de corte de las enzimas de restricción está dada por el reconocimiento de secuencias palindrómicas en el ADN. Es decir, la secuencia de ADN es la misma si la hélice es girada 180 grados alrededor de la pequeña zona de la hélice que es reconocida. Dicha zona de reconocimiento puede variar desde una secuencia de cuatro nucleótidos hasta una de doce. Este tamaño de secuencia está directamente relacionado con la frecuencia del corte, razón por la cual, entre más grande sea la secuencia de nucleótidos reconocida por la enzima, mayor será la especificidad y, por ende, el corte será más raro. De la misma manera, entre menor sea el tamaño de la secuencia de reconocimiento, la enzima será menos detallada en cuanto al reconocimiento, y entonces el corte será de tipo frecuente. Las secuencias palindrómicas son comunes en el ADN viral, sin embargo, también se presentan en el genoma bacteriano. Como un mecanismo de protección del ataque de las enzimas de restricción sobre el ADN propio (podría llamarse *autoinmunidad*), las regiones palindrómicas endógenas se encuentran protegidas por la adición de grupos metilo (-CH₃) en las bases A o C, lo cual impide su reconocimiento y posterior corte. Este proceso de adición de grupos metilo se conoce como metilación del ADN (Ausubel *et al.*, 2003).

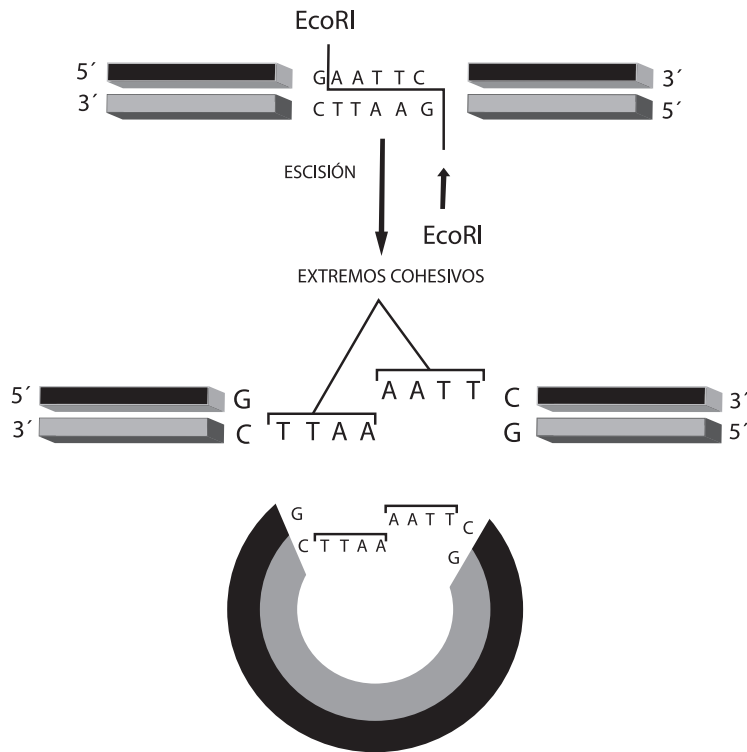
Figura 4. Reacción de digestión mediada por enzimas de restricción. Las enzimas digieren o cortan a nivel del enlace fosfodiéster del ADN.



En función de los cofactores requeridos por las enzimas, la capacidad que tienen para cortar y/o metilar el ADN y la distancia a la cual cortan a partir de la secuencia reconocida, se han descrito tres grandes tipos de enzimas de restricción:

- *Tipo I:* estas enzimas no solo cortan sino que también tienen la capacidad de metilar el ADN. Se caracterizan por cortar al azar sitios distintos al de restricción y dejar siempre extremos cohesivos. Requieren ATP para moverse en el ADN una vez que reconocen la secuencia,

Figura 5. Enzima de restricción con corte cohesivo. La enzima *EcoRI* reconoce y corta el ADN generando dos extremos que se pueden unir por complementariedad de bases. Estos extremos se denominan extremos cohesivos, pegajosos o escalonados.



aproximadamente 1000 pb a partir de dicho punto, y realizar el corte. También necesitan la presencia de los cofactores SAM (S-adenosil-metionina) y magnesio para su correcto funcionamiento.

- *Tipo II*: no tienen la capacidad de metilar, solo poseen actividad de restricción. El corte se lleva a cabo en el sitio de restricción, por esta razón, son las más utilizadas a la hora de generar moléculas de ADN recombinante y, al no tener que desplazarse sobre el ADN para realizar el corte, no requieren ATP para su funcionamiento. Este tipo de enzimas pueden producir extremos cohesivos o romos.
- *Tipo III*: tienen la capacidad de cortar y metilar y, una vez que reconocen el sitio de restricción, cortan de 25 a 27 pares de bases antes o después de este, dejando extremos cohesivos. Requieren ATP, magnesio y SAM como cofactores.

Cabe resaltar que un cuarto tipo de enzimas de restricción fue descubierto en *E. coli*, cuya acción se lleva a cabo solo en ADN metilado (Ausubel *et al.*, 2003).

Las enzimas de restricción de tipo II, por su modo de acción, son empleadas para múltiples fines en cualquier procedimiento en el que sea necesario

cortar secuencias de ADN en sitios específicos. En el caso de la clonación molecular, donde se requiere introducir un fragmento de ADN de interés dentro de un vector de clonación, se llevará a cabo la digestión con una enzima de restricción que reconozca su respectiva secuencia de restricción en el sitio de multiclonaje en el vector y en los extremos de la secuencia de interés. De este modo, se generarán moléculas de ADN cuyos extremos pueden ser unidos mediante una reacción de ligación (véase el apartado “Ligación de ADN” del presente capítulo) y se obtendrá una construcción consistente en el vector de clonación (véase el apartado “Vectores de clonación” del presente capítulo), que contiene la secuencia de ADN de interés que ha sido insertada (Ausubel *et al.*, 2003).

Todos los organismos presentan cierto grado de variabilidad genética en su genoma. Esta también se evidencia en las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción, lo cual ha permitido generar diversas técnicas de caracterización genética basadas en las diferencias en los perfiles de restricción, obtenidos al digerir el genoma de diferentes individuos y compararlos. Por ejemplo, es posible conocer su número y distribución en el genoma, mediante técnicas de marcaje de secuencias específicas de ADN dentro del genoma, al realizar este tipo de marcajes sobre productos de restricción. Es así como el uso de las endonucleasas de restricción ha permitido no solo el desarrollo de técnicas de ADN recombinante, sino también la caracterización de la variabilidad genética y el análisis funcional de secuencias génicas en el genoma completo (Nelson y Cox, 2004).

Protocolo de digestión de ADN con enzimas de restricción

Consideraciones iniciales

A causa de las diferentes aplicaciones de la digestión de ADN, es conveniente tener en cuenta algunos factores que influyen en este tipo de reacciones. Los principales son:

- *Cantidad de enzima.* Por convención, una unidad de enzima (1 U) se define como la cantidad de enzima necesaria para digerir 1 µg de ADN purificado en 60 minutos bajo condiciones estándar de reacción. Es importante también considerar el tamaño del ADN por digerir, así como la frecuencia de la aparición de sitios de restricción. Sin embargo, factores como la concentración, pureza y tipo de ADN pueden hacer que se requiera una mayor cantidad de enzima. En el caso de reacciones en volúmenes finales grandes, se debe tener en cuenta que las enzimas de restricción se encuentran diluidas en glicerol por lo que el volumen de enzima no debe superar 1/10 del volumen final para evitar que esta sustancia interfiera en la reacción.

- *Tipo y concentración del ADN por digerir.* De manera general, moléculas de ADN de baja complejidad (secuencias repetitivas), ADN circular superenrollado y ADN viral suelen requerir el uso de un número mayor de unidades de enzima. Por otra parte, cuando se desea digerir ADN para experimentos sencillos de clonación (un fragmento de ADN en un vector estándar), se pueden utilizar bajas concentraciones de ADN (100 ng). Si, en cambio, el interés es generar una cantidad importante de fragmentos de restricción, ya sea para análisis de variabilidad o generación de librerías genómicas, la cantidad de ADN por digerir debe ser alta (2-10 µg).
- *Pureza del ADN.* Impurezas en el ADN (proteínas, sales) y trazas de reactivos utilizados en su extracción (SDS, EDTA) interfieren directamente en la eficiencia de las reacciones de restricción enzimática. En casos en los que se presente una baja pureza de ADN es conveniente utilizar una mayor cantidad de unidades de enzima.
- *Tiempo de incubación.* En general, una hora de incubación es suficiente para la mayoría de restricciones, sin embargo, en experimentos sencillos de clonación de pequeños insertos en un solo vector, treinta minutos pueden ser suficientes. Por el contrario, la digestión de vectores superenrollados o grandes cantidades de ADN puede requerir entre dos y tres horas para ser eficiente. De cualquier manera, no es aconsejable realizar digestiones que excedan seis horas de incubación, pues se pueden presentar cortes inespecíficos en el ADN. Además, la vida útil de muchas enzimas de restricción en la reacción no suele ser superior a este tiempo. Sin embargo, en algunos casos se hacen digestiones por toda la noche (ON, por sus siglas en inglés).
- *Coadyuvantes de la reacción y procedencia de las enzimas.* Muchas enzimas de restricción necesitan de la adición de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés), mientras que otras no. Sin embargo, la adición de BSA en reacciones que no la requieren no afecta la eficiencia de la reacción. A causa del amplio uso de las enzimas de restricción, actualmente existen diversas casas comerciales que las distribuyen.

El protocolo que se presenta a continuación sigue condiciones estándar de reacción, pero se deben consultar las recomendaciones del productor de la enzima de restricción para obtener resultados óptimos (Ausubel *et al.*, 2003).

Precauciones y recomendaciones

- 1 Evitar el contacto con la piel de las diferentes soluciones pues pueden ser irritantes.
- 2 Mantener siempre en frío (-20 °C) la enzima de restricción.

- 3 Evitar la contaminación del *stock* de enzima con ADN, otras enzimas de restricción o DNAsa I.

Materiales, equipos y reactivos

- Incubadora, termomixer o baño maría
- Micropipetas
- Puntas plásticas
- Tubos plásticos de 1,5 ml
- Tubos plásticos de 0,2 ml
- Gradillas
- Cubeta con hielo
- ADN por digerir
- Enzima de restricción
- *Buffer* de restricción 10 X
- BSA 100 X
- H₂O destilada estéril

*Digestión de una muestra de ADN con una enzima de restricción
(volumen final 20 µl)*

Tabla 3. Condiciones de reacción para digestión de ADN

Reactivo	Cantidad
ADN por digerir	0,1-4,0 µg
Enzima de restricción	1-4 U
<i>Buffer</i> de restricción 10 X	2 µl
BSA 100 X	0,2 µl
H ₂ O destilada	hasta 20 µl

Fuente: elaboración propia.

Procedimiento

- 1 Mezclar los siguientes reactivos en un tubo plástico:
 - x µl de ADN
 - 2,0 µl de *buffer* de restricción 10 X
 - 0,2 µl BSA 100 X
 - H₂O, 18- x µl
- 2 Adicionar la enzima de restricción (1-4 U; en la mayoría de los casos 1 µl de enzima es suficiente) e incubar la mezcla de la reacción 1 hora a la temperatura recomendada (suele ser 37 °C).
- 3 Detener la reacción incubándola a 65 °C 15 minutos, y observar en un gel de agarosa el perfil de restricción (véase el protocolo de electroforesis, capítulo “Extracción de ADN y electroforesis”).

Digestión de varias muestras de ADN con una enzima de restricción

En este caso y para reducir los errores en el pipeteo y posibles contaminaciones cruzadas, es conveniente realizar una mezcla que contenga todos los reactivos, excepto el ADN, en las escalas adecuadas respecto al número de reacciones, y posteriormente adicionar la cantidad respectiva a cada tubo que contiene el ADN por digerir.

Digestión de una muestra de ADN con dos enzimas de restricción (doble digestión)

En diferentes procesos es necesario digerir el ADN con dos enzimas diferentes, por ejemplo, para introducir un fragmento de ADN en una dirección específica dentro de un vector, o para incrementar la cantidad de fragmentos de restricción obtenidos con una sola enzima. En estos casos, se debe tener en cuenta que cada enzima necesita características particulares del *buffer* de restricción para su acción eficiente. De esta forma, para realizar una doble digestión es indispensable consultar las diferentes tablas de afinidad de enzimas para dobles digestiones y los *buffers* que deben ser usados. Esta información es suministrada por la casa productora de las enzimas. En el caso en el que las enzimas que se deben usar no sean compatibles para una doble digestión, es necesario realizar digestiones escalonadas, es decir, digerir primero con una enzima y digerir el producto obtenido con una segunda enzima. Para esto, es necesario purificar antes el producto de la primera reacción, ya que trazas de *buffer* pueden inhibir la segunda digestión. A causa del bajo rendimiento final de digestiones escalonadas es recomendable elegir adecuadamente desde el principio enzimas compatibles para dobles digestiones.

Digestión parcial de ADN

Para algunos procedimientos se hace necesario realizar digestiones “incompletas” del ADN, en otras palabras, no todos los sitios de restricción existentes son cortados. Por ejemplo, si el fragmento de interés contiene internamente el sitio de restricción de una enzima que se deba usar para su inserción en el vector para su clonación. En estos casos, la digestión parcial de ADN se puede realizar mediante dos aproximaciones diferentes. En una, se realizan diluciones seriadas de la mezcla de reacción haciendo que la cantidad de enzima sea el limitante de la reacción. En la otra, se pueden incubar las mezclas de reacción durante tiempos cortos (diez, quince o veinte minutos) haciendo que el tiempo de reacción sea el limitante que produzca la reacción de digestión parcial. Alternativamente se pueden emplear temperaturas diferentes a las específicas, por lo general, menores a las óptimas de actividad.

Cuestionario

- 1 ¿Cómo se espera observar un ADN genómico de un organismo digerido en gel de agarosa?
- 2 ¿En qué casos se utiliza una enzima de corte frecuente? ¿En qué casos una enzima de corte raro?
- 3 ¿Qué implicaciones tienen el tipo de extremos que se generan en una reacción de digestión para posteriores reacciones de clonación?
- 4 ¿Cómo funciona la nomenclatura de las enzimas de restricción?
- 5 Las enzimas de restricción que generan extremos cohesivos pueden generarlos en sentido 5' o 3' respecto a la dirección del ADN digerido (5' o 3' *overhangs*). ¿Esto se debe tener en cuenta en el momento de plantear experimentos de clonación dirigida con enzimas de restricción? ¿Clonación en vectores de expresión?

Vectores de clonación

Marco conceptual

La clonación molecular consiste en la introducción de un fragmento de ADN en células que son capaces de producir copias idénticas por replicación (clones). Para poder lograr esto, es necesario usar un vehículo que sea capaz de contener el ADN de interés y permitirle el paso hacia el interior de las células. Este vehículo se conoce con el nombre de *vector de clonación*. Los vectores de clonación son moléculas de ADN de tamaño muy variable, generalmente circulares, que contienen regiones especiales que permiten la inserción del fragmento de ADN que se desea clonar.

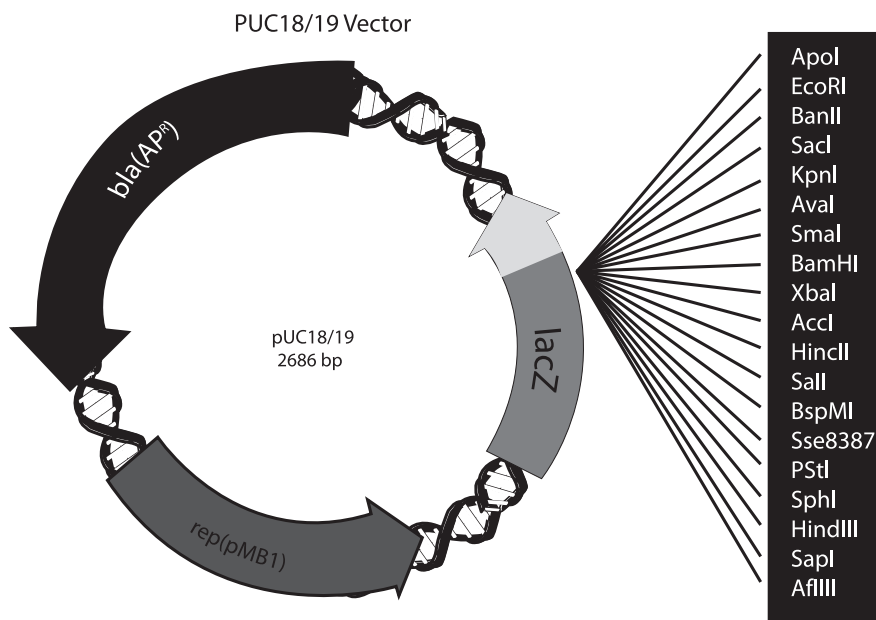
En la actualidad, existen diversos tipos de vectores de clonación, los cuales varían en su tamaño y, a su vez, en la capacidad del fragmento que puede ser clonado. El vector más utilizado en un laboratorio de biología molecular es el plásmido, el cual puede albergar un fragmento de hasta 10 Kb. Aún así existen otros tipos de vectores como fagémidos, fagos, BAC (utilizados en la construcción de librerías de ADN genómico) y YAC, siendo este último capaz de contener un fragmento de hasta 2.000.000 pb. Este capítulo se concentra en el estudio de los plásmidos, los cuales son los vectores más comúnmente empleados en biología molecular. Se caracterizan por presentar un sitio de origen de replicación, el cual les permite replicarse dentro de las bacterias independientemente de la replicación de su cromosoma, con la ventaja de generar múltiples copias dentro de una bacteria. Adicionalmente, presentan genes que codifican para proteínas que confieren resistencia a antibióticos, lo cual hace fácil la selección de bacterias que contienen los plásmidos (figura 6).

Los plásmidos se encuentran presentes en pocas o muchas copias en la mayoría de bacterias. Los plásmidos bacterianos pueden ser muy grandes, incluso alcanzan tamaños similares al del ADN cromosómico, y presentar

la capacidad de integrarse al genoma (episomas). Existen diversos tipos de plásmidos, algunos están involucrados en la “fertilidad” o intercambio de material genético por medio de conjugación bacteriana (transferencia horizontal de genes), y por eso se les conoce como *plásmidos F*. También existen algunos denominados *R*, ya que están involucrados en resistencia contra antibióticos. Otros contienen enzimas que son capaces de degradar compuestos tóxicos para las bacterias. Adicionalmente, existen ciertos plásmidos cuya presencia en algunas cepas está relacionada con la virulencia de la bacteria. Los plásmidos naturalmente cumplen funciones importantes en las bacterias que los portan, en la medida en que les confieren características adicionales que les permiten una adaptación al medio.

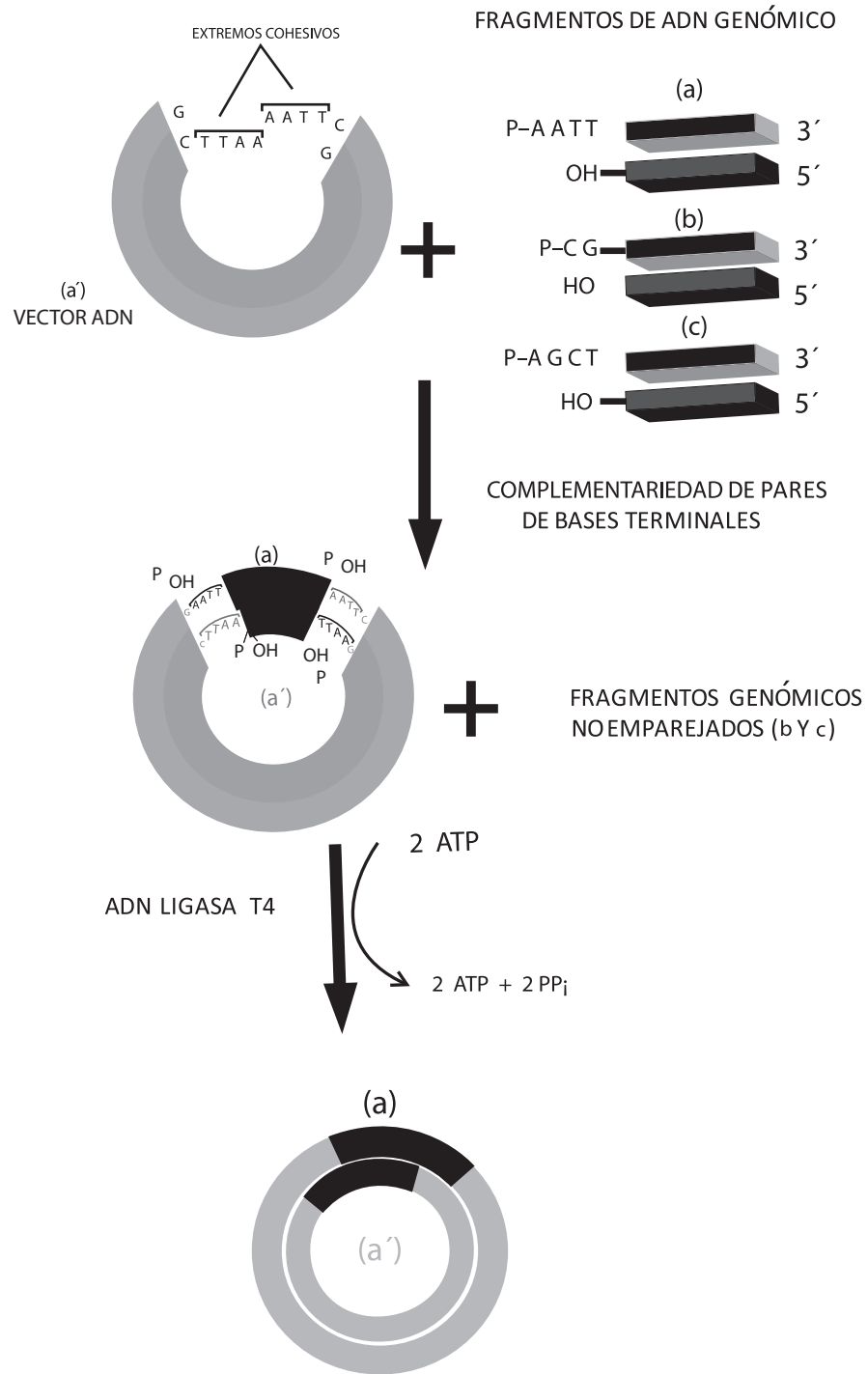
Otra característica importante de los plásmidos es que presentan un sitio de clonación múltiple (MCS, del inglés *multiple cloning site* o *polylinker*). Este consiste en una región de ADN que contiene muchos sitios de reconocimiento para enzimas de restricción ampliamente utilizadas en el laboratorio, pero están solamente presentes allí y en ninguna otra parte del ADN del vector (figura 6). Este sitio permite la inserción de un fragmento de ADN externo al plásmido, que se logra cuando el fragmento y el plásmido son digeridos con una misma enzima de restricción cuyo sitio de corte está presente en el MCS. Luego se procede a realizar la ligación de los dos ADN por medio de una enzima denominada *ligasa* (figura 7).

Figura 6. Esquema del vector de clonación pUC18/19. Las principales secuencias de un vector son: un sitio de inicio de la replicación, una región que confiere resistencia a un antibiótico, un gen reportero (por ejemplo *LacZ*) interrumpido por un sitio de clonación múltiple. El sitio de clonación múltiple (MCS o *polylinker*) es una región que contiene las secuencias de reconocimiento de diversas enzimas de restricción, lo cual permite introducir fragmentos de ADN por medio de digestión y ligación.



2 Clonación molecular. Tecnología de ADN recombinante

Figura 7. Esquema de una reacción de ligación en la construcción de una librería genómica. Los fragmentos de ADN digeridos con diferentes enzimas de restricción (a, b y c) junto con el vector digerido con la enzima a (a') son ligados mediante la acción de la enzima ADN ligasa. Esta reacción de ligación requiere la hidrólisis de ATP que libera pirofosfato.



Es importante tener en cuenta que antes de que se realice el proceso de ligación es esencial tener, por un lado, el ADN del inserto que se quiere clonar y, por otro, el ADN plasmídico. Ya se ha mencionado que el ADN del inserto puede obtenerse a partir de PCR de digestión del genoma o ADNc. Por otro lado, el plásmido se obtiene a partir de un proceso de extracción desde la bacteria y posterior purificación, conocido con el nombre de *minipreparación* o “*miniprep*” (véase el apartado “Extracción de ADN plasmídico a pequeña escala por lisis alcalina: *miniprep*” del presente capítulo).

Aunque tradicionalmente se han utilizado enzimas de restricción y ligasas para producir moléculas de ADN recombinante, en la actualidad se cuenta con una generación de vectores de tecnología Gateway® (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) que evitan los pasos de digestión y ligación para la generación de ADN recombinante. Esto se logra utilizando una mezcla de enzimas clonadoras que realizan una recombinación homóloga de estos vectores, y el fragmento de interés, sin necesidad de enzimas de restricción y ligasas.

Ligación de ADN

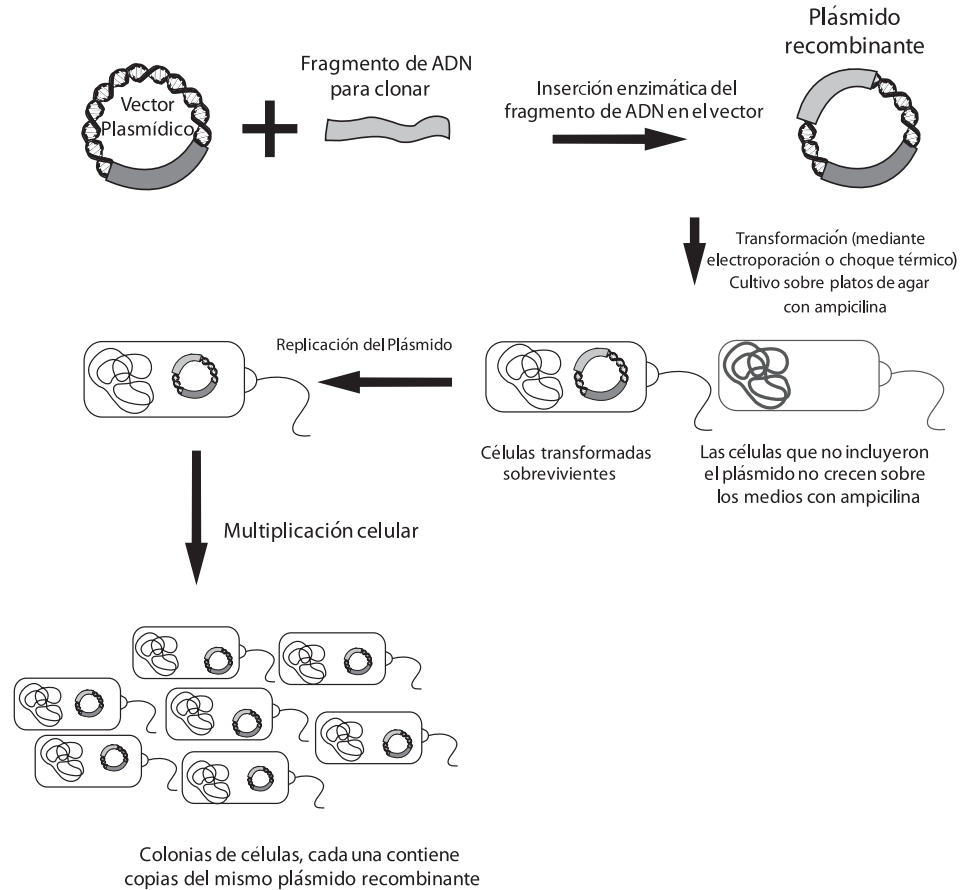
Marco conceptual

Adicionalmente al corte dirigido de moléculas de ADN, es necesario poseer una tecnología que permita el proceso inverso, es decir, la unión de fragmentos de ADN para generar moléculas de ADN recombinante. Esta tecnología inició su desarrollo con el descubrimiento de la enzima ADN ligasa, por parte de diversos laboratorios. Esta enzima cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre dos cadenas de ADN. El papel fisiológico de la ADN ligasa es el de sellar las fisuras que quedan en el esqueleto de ADN de doble cadena después del proceso de replicación y durante la reparación de daños en el ADN. Esta enzima requiere de un grupo hidroxilo libre en el extremo 3' de una cadena de ADN y un grupo fosfato en el extremo 5' de la otra cadena por unir. A diferencia de las enzimas de restricción, las ligasas necesitan de energía en forma de ATP para realizar su función, pero, al igual que las endonucleasas, solo actúan en el ADN de doble cadena y no pueden unir fragmentos de ADN de cadena sencilla (Doherty *et al.*, 1996).

La importancia de las ADN ligasas en biotecnología radica en su capacidad de unir los extremos, ya sea romos o cohesivos, generados por las enzimas de restricción. De esta manera, una vez digeridas dos moléculas de ADN de diferente procedencia con enzimas de restricción, los productos de interés pueden ser integrados dando como resultado una nueva molécula de ADN, lo cual es la base de la tecnología del ADN recombinante (figura 8).

La ADN ligasa más usada en biotecnología es la proveniente del bacteriófago T4, ya que tiene la capacidad de unir eficientemente extremos cohesivos y extremos romos de ADN, aunque con menor eficiencia. Esta diferencia en

Figura 8. Pasos por seguir en el proceso de clonación molecular. Primero se digiere el ADN y el vector de clonación con enzimas de restricción; en segundo lugar, se realiza la ligación de estas moléculas de ADN; tercero, se transforman células competentes; cuarto, se seleccionan bacterias transformadas; y quinto, se seleccionan bacterias con el plásmido recombinante.



cuanto a eficiencia de ligación se explica si se tiene en cuenta que en el caso de los extremos cohesivos, los extremos de ADN de cadena sencilla generados al final del ADN digerido forman puentes de hidrógeno entre sus bases complementarias de manera termodinámicamente favorable. Lo anterior hace más sencillo el trabajo de la ADN ligasa de unir solamente el esqueleto de ADN mediante la generación de los enlaces fosfodiéster (uno a cada lado de la hélice). En cambio, en el caso de la unión de extremos romos es necesaria la cercanía física de los dos extremos por unir, para que la ligasa pueda actuar. Es por esto que en reacciones de ligación de extremos romos suele ser necesaria una gran cantidad de ADN (Doherty *et al.*, 1996).

En el nivel técnico, el uso de la ligación de ADN está restringido a sus aplicaciones para la generación de ADN recombinante. A diferencia de las enzimas de restricción, las ligasas no tienen un papel relevante en estudios de diversidad o caracterización genética.

Protocolo de ligación de moléculas de ADN

Consideraciones iniciales (Ausubel et al., 2003)

La ligación de ADN se lleva a cabo para generar moléculas de ADN recombinante. Para la obtención de buenos resultados en esta reacción, se deben tener en cuenta algunas recomendaciones, entre las que se encuentran:

- *Cantidad de enzima.* Para una reacción estándar de ligación con 10 μL de volumen final pueden usarse entre 0,1-1,0 U de enzima (1 U = 1 unidad Weiss, 0,01 U Weiss se definen como la cantidad de ADN ligasa T4 necesaria para catalizar la ligación de más del 95% de los fragmentos generados por la digestión con *HindIII* de 1 μg de ADN Lambda a 16 $^{\circ}\text{C}$ en 20 minutos).
- *Tipo de extremos por ligar.* Como se mencionó previamente, la ligación de extremos cohesivos es mucho más eficiente (cerca de 25 a 100 veces) que la de extremos romos. De esta manera, si se requiere una alta eficiencia en la ligación de extremos romos (en librerías, por ejemplo), se debe considerar realizar modificaciones en los tiempos de incubación, la temperatura y las relaciones molares del ADN por ligar.
- *Temperatura de incubación.* La temperatura óptima para la generación del enlace fosfodiéster por parte de la ADN ligasa es de 37 $^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que si se están ligando extremos cohesivos producto de una digestión, estos consistirán de unas cuantas bases (4-12) complementarias y los puentes de hidrógeno que se deben generar entre estas para la unión del ADN no son estables a 37 $^{\circ}\text{C}$. Por lo tanto, es necesario hacer un balance térmico entre la eficiencia de ligación y la eficiencia de hibridación de los extremos cohesivos. Se ha encontrado que temperaturas adecuadas de incubación para ligación de extremos cohesivos están entre 4 y 22 $^{\circ}\text{C}$, mientras para extremos romos se usan rangos de temperatura que van de 15 a 20 $^{\circ}\text{C}$.
- *Tiempo de incubación.* En general, las reacciones de ligación que se llevan a cabo a bajas temperaturas requieren mayores tiempos de incubación. De esta manera, ligaciones de extremos romos realizadas entre 15 y 20 $^{\circ}\text{C}$ deben incubarse de 4 a 18 horas, mientras la ligación de extremos cohesivos con rango de temperatura entre 20 y 22 $^{\circ}\text{C}$ puede incubarse por 3 horas, o reacciones entre 4 y 8 $^{\circ}\text{C}$ dejarse incubando por 12 horas.
- *Relación molar vector: inserto.* Para obtener una eficiencia adecuada de ligación de los productos deseados, es decir, un inserto con un vector, y no ligaciones vector-vector o inserto-inserto, se debe trabajar con relaciones molares entre 3:1 a 1:3 vector : inserto. La relación molar puede calcularse con la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño en kb de inserto}}{\text{tamaño en kb del vector}} \times \text{relación molar de } \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \text{ng de inserto} \quad (1)$$

- *Recircularización de plásmidos digeridos con una sola enzima de restricción.* Si el vector por usar ha sido cortado con una sola enzima de restricción, este fácilmente puede recircularizarse sin el inserto en presencia de la ADN ligasa, ya que los extremos son complementarios. Para prevenir este proceso, es conveniente tratar el plásmido linealizado con fosfatasa alcalina, una enzima que remueve el grupo fosfato de los extremos 5' de los ácidos nucleicos y las bases fosfatadas. Dado que los fragmentos de ADN tratados con fosfatasa carecerán del grupo fosfato en el extremo 5' necesario para la acción de la ADN ligasa, este tratamiento evitará la recircularización del vector y promoverá la formación de moléculas vector-inserto.
- *Procedencia de la ADN ligasa T4.* Actualmente, diversos fabricantes ofrecen versiones mejoradas de la ADN ligasa T4. Algunas de estas requieren tiempos menores de incubación y eficiencias de ligación mayores a las obtenidas con la ligasa silvestre u original del bacteriófago T4. Por esta razón, es necesario tener en cuenta las recomendaciones del productor en cuanto a los diversos parámetros experimentales en el momento de realizar reacciones de ligación.

Precauciones y recomendaciones

- 1 Evitar el contacto con la piel de las diferentes soluciones pues pueden ser irritantes.
- 2 Mantener siempre en frío (-20 °C) la enzima de restricción.
- 3 Evitar la contaminación del *stock* de enzima con ADN, otras enzimas de restricción o DNAsa I.

Materiales, equipos y reactivos

- Nevera 4 °C o termociclador
- Micropipetas
- Puntas plásticas
- Tubos plásticos de 0,2 ml
- Gradillas
- ADN del vector
- ADN del inserto
- *Buffer* de ligación 10 X
- ADN ligasa T4 (unidades Weiss)
- H₂O libre de nucleasas

Procedimiento

La siguiente es una reacción de ligación estándar entre un vector de 3000 pb y un inserto de 500 pb de extremos cohesivos, usando una relación 1:1 vector : inserto, como se recomienda en el manual de uso de la enzima ADN ligasa T₄ suministrada por Promega Corporation. Ligasas de otra procedencia y el uso de vectores e insertos de diferentes tamaños a los indicados aquí requerirán diferentes cantidades de ADN y/o distintos tiempos y temperaturas de incubación.

- 1 Mezclar los siguientes reactivos en un tubo de 0,2 ml:
 - ADN del vector 100 ng
 - ADN del inserto 17 ng
 - *Buffer* de ligación 10X 1 μ l
 - ADN ligasa T₄ (unidades Weiss) 0,1-1,0 U
 - H₂O libre de nucleasas hasta un volumen final de 10 μ l

- 2 Incubar la reacción a:
 - Temperatura ambiente por 3 horas o
 - 4 °C toda la noche o
 - 15 °C por 4-18 horas

Cuestionario

- 1 ¿Cómo se puede explicar la menor eficiencia de ligación de extremos romos respecto a cohesivos de la ADN ligasa T₄?
- 2 ¿Qué función tiene la ADN ligasa T₄ en el ciclo de replicación de este bacteriófago dentro de la célula infectada?
- 3 La bacteria *Escherichia coli* posee una enzima ligasa, sin embargo, esta es incapaz de ligar extremos romos. ¿A qué se puede deber esto? ¿Existen enzimas de restricción de *E. coli* que generen extremos romos en el ADN?
- 4 Si se desea generar una librería genómica que contenga la mayor cantidad posible de fragmentos diferentes de ADN clonados en el vector de trabajo ¿qué relación vector : inserto se debe utilizar en la reacción de ligación? Por el contrario, si solo se necesita clonar un fragmento de ADN en el vector de trabajo, ¿qué relación se debe usar?
- 5 En un experimento de clonación se desea hacer una inserción dirigida de un inserto en el vector de trabajo, para lo cual se utilizan dos enzimas de restricción. Una de estas genera un extremo cohesivo y la otra genera un extremo romo. ¿Es conveniente trabajar con dos tipos de extremos? ¿Para la eficiente ligación del vector : inserto es necesario hacer un pretratamiento con fosfatasa alcalina?

Transformación genética

Marco conceptual

Después de realizar la ligación de fragmentos de ADN, como productos de un proceso de digestión con enzimas de restricción, amplicones de PCR (véase el capítulo “Polymerase Chain Reaction (PCR)”) o ADNc (véase el capítulo “Extracción de ARN, síntesis de ADNc y RT-PCR”) en vectores de clonación o de expresión, se procede a introducir estos vectores con el fragmento de interés dentro de células de *Escherichia coli*, con el fin de conservar y amplificar el ADN plasmídico (figura 8). A este proceso de captación de ADN libre del medio por parte de células bacterianas se le conoce como *transformación genética*. Estas células se pueden transformar por diferentes métodos químicos y físicos, de los cuales los más usados son choque térmico con cloruro de calcio (CaCl_2) y choque eléctrico o electroporación. Ambos procesos implican la desestabilización de la membrana celular y la formación de poros a través de los cuales se va a permitir el paso de moléculas cargadas de gran tamaño, como el ADN. Para conseguir este objetivo es indispensable preparar las células para el procedimiento de transformación escogido.

Para la transformación química por choque térmico con CaCl_2 , se deben preparar inicialmente las células bacterianas haciendo lavados con CaCl_2 a una temperatura de 4 °C. Los iones Cl^- entran a la célula acompañados de moléculas de agua y permiten que esta se hinche. Por otro lado, los iones Ca^{2+} permanecen en el medio y les brindan a las bacterias la capacidad de tomar ADN (competencia). Una vez se adiciona el ADN a las células competentes, se someten a un choque térmico (42 °C por 90 segundos) permitiendo la entrada del ADN en las células bacterianas. El estado de competencia de estas bacterias es mayor a 10^6 bacterias transformadas por μg de ADN. Aún así, esto puede variar dependiendo de si las células competentes son comerciales o preparadas en el laboratorio.

Por otro lado, durante el proceso de transformación por medio de electroporación, el campo eléctrico generado por el electroporador y transmitido a través de la celda, abre poros en las membranas celulares y actúa, al mismo tiempo, como fuerza que impulsa el paso de moléculas e iones. El impulso eléctrico se transmite al líquido extracelular contenido en la celda, lo que provoca la elevación del voltaje en el espacio intermembranal. La célula responde, conduciendo iones a través de la membrana, principalmente iones Na^+ y Cl^- , que evitan la destrucción de la membrana. El total de poros disponibles es la suma de los existentes más los recién formados por el campo eléctrico.

En este proceso es importante que las células competentes se encuentren privadas de medio de cultivo, ya que este puede actuar como una resistencia al paso de la corriente eléctrica. Otro factor que puede afectar la electroporación es la presencia de sales tanto en las células competentes como en el ADN

que se desea introducir. Por esta razón, es fundamental hacer lavados sucesivos en la preparación de las células competentes. El estado de competencia o eficiencia de la transformación de estas bacterias es mayor a 10^9 bacterias transformadas por $1 \mu\text{g}$ de ADN, aun así puede llegar a ser mayor que 10^{10} cuando se utilizan células competentes comerciales.

El cálculo de la eficiencia de la transformación es particularmente importante cuando se realiza la transformación de una librería, ya que es fundamental para estimar el título de esta y garantizar que todos los fragmentos de un genoma de un organismo estén representados en la librería. No es muy necesario el cálculo de la eficiencia cuando se realiza la clonación de un fragmento individual, en estos casos una colonia positiva puede ser suficiente.

Una vez realizada la transformación, se prosigue a evaluar cuáles de las colonias crecidas presentan el plásmido recombinante, es decir, el plásmido con el inserto de interés. A lo largo del tiempo se han desarrollado diversas estrategias con el fin de distinguir aquellas bacterias que han incorporado el plásmido recombinante de las que solo han incorporado el vector vacío. Algunos consisten en hibridización *in situ* con el fin de identificar fragmentos de ADN exógenos, otros consisten en realizar PCR directamente sobre las colonias. Uno de los métodos generalmente más usados consiste en detectar la actividad β -galactosidasa. Varios de los plásmidos empleados en los procesos de clonación presentan el sitio de clonación múltiple interrumpiendo el gen *LacZ*, el cual codifica para una enzima denominada β -galactosidasa (figura 6). Esta enzima naturalmente hace parte del operón lactosa en *E. coli* y, en presencia de lactosa, es la responsable de romper el disacárido lactosa en sus monómeros glucosa y galactosa. Para la determinación de la inserción de un fragmento de interés dentro del sitio de clonación múltiple, se evalúa la actividad de esta enzima utilizando como inductor IPTG (Isopropil tiogalactosido) y, como análogo de la lactosa, X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosido). Cuando la enzima degrada el X-Gal, se produce un derivado indólico el cual le brinda una coloración azul a las bacterias. Es así como la presencia del fragmento de ADN dentro del sitio de clonación múltiple generalmente interrumpe el gen *LacZ* y, por lo tanto, no hay actividad enzimática (bacterias blancas). En el caso en que no ocurre la clonación del fragmento, la enzima se sintetiza normalmente y degrada el X-Gal (bacterias azules). Por lo tanto, el medio de crecimiento de bacterias es un medio de selección y contiene antibiótico, IPTG y X-Gal. Por medio del antibiótico se seleccionan bacterias que se transformaron con el plásmido, la adición de IPTG y X-Gal permite la evaluación de la actividad de la β -galactosidasa y de este modo la clonación (figura 8).

Protocolo de preparación de células químicamente competentes

Los siguientes protocolos han sido modificados por los autores basados en los protocolos estándares encontrados en las referencias citadas.

Precauciones y recomendaciones

- 1 Realizar el siguiente procedimiento en cámara de flujo laminar para prevenir la contaminación de las células.
- 2 Los elementos utilizados deben estar debidamente esterilizados.
- 3 Todo el procedimiento debe realizarse a 4 °C (en centrifuga o en hielo).
- 4 Procurar que todos los materiales, como puntas, tubos, cloruro de calcio y glicerol se hayan enfriado previamente. Para esto puede situarlos dentro de la nevera o en hielo con anticipación.
- 5 Para facilitar el pipeteo del glicerol, cortar el pico de las puntas azules (1000 µl) que se van a utilizar para tal fin.
- 6 Encender con anticipación la centrifuga refrigerada para que tenga tiempo de disminuir su temperatura (4 °C).

Materiales, equipos y reactivos

- Cámara de flujo laminar
- Espectrofotómetro
- Incubadora
- Centrifuga refrigerada
- Micropipetas
- Puntas plásticas
- Tubos de polipropileno de 50 ml
- Tubos plásticos de 1,5 ml
- Erlenmeyer de 500 ml
- Tubos de vidrio con tapa
- Cubeta con hielo
- Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y sólido
- Cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5a
- Cloruro de calcio (CaCl₂) 100 mM
- Glicerol 10%

Procedimiento

- 1 Picar una colonia fresca de *E. coli*, sembrarla en medio LB líquido y dejar crecer el cultivo a 37 °C durante 12-16 horas a 225 rpm.
- 2 Realizar una dilución del cultivo 1:1000 con 100 ml de medio LB en un erlenmeyer de 500 ml, y dejarlo crecer a 37 °C a 225 rpm. Para la preparación de las células se requiere tanto un gran número de bacterias, así como su buena calidad y viabilidad. Es por esto que se debe utilizar un cultivo que se encuentre en la fase exponencial del crecimiento

bacteriano, y esto se logra cuando el cultivo alcanza una densidad óptica de 0,6 a 0,7 (a una longitud de onda de 600 nm) que se obtiene luego de 5 a 7 horas de incubación (pero depende de la cantidad de inóculo inicial). Por esto es importante monitorear la densidad óptica con ayuda de un espectrofotómetro.

- 3 Transferir el cultivo a tubos de polipropileno de 50 ml y centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
- 4 Descartar el sobrenadante y resuspender suavemente con 5 ml de CaCl₂ cada *pellet* y mezclar el contenido de 2 tubos en uno solo.
- 5 Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
- 6 Descartar el sobrenadante y resuspender suavemente con 1 ml de CaCl₂.
- 7 Pasar el volumen a la mitad de tubos de polipropileno de 50 ml y agregar 1 ml de glicerol al 10%, previamente enfriado.
- 8 Repartir las células en alícuotas de 200 µl en tubos plásticos de 1,5 ml, previamente enfriados.
- 9 Las células se pueden utilizar inmediatamente o se pueden almacenar a -80 °C para su uso posterior.

Protocolo de transformación con choque térmico con cloruro de calcio

Precauciones y recomendaciones

- 1 Realizar el siguiente procedimiento en cámara de flujo laminar para prevenir la contaminación de las células.
- 2 Los elementos utilizados deben estar debidamente esterilizados.

Materiales, equipos y reactivos

- Cámara de flujo laminar
- Incubadora con agitación
- Baño maría o termomixer
- Microcentrífuga
- Micropipetas
- Puntas plásticas
- Cubeta con hielo
- Tubos de vidrio
- Cajas de Petri
- Perlas de vidrio, asa de Drigalsky o rastrillo
- Células químicamente competentes (1 vial por transformación)
- Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y sólido
- IPTG 0,5 mM
- X-Gal. 80 mM
- Ampicilina 100 mg/ml u otro antibiótico según se requiera (depende del vector por emplear).

Procedimiento

- 1 A un tubo de 200 μ l de células, adicionar 1 μ l de ADN suavemente, en círculos por el borde del tubo, tocando las células. Colocar el tubo en hielo durante 30 minutos.
- 2 Agregar 800 μ l de medio LB líquido a tubos de ensayo.
- 3 Precalentar el baño maría o el termomixer a 42 °C.
- 4 Colocar el tubo de la mezcla de células y ADN en el baño maría o en el termomixer a 42 °C durante 90 segundos exactos.
- 5 Pasar el tubo a la cubeta con hielo, mínimo durante dos minutos.
- 6 Transferir las células a los tubos de ensayo con medio LB líquido, suavemente y bajando el medio hasta la boca del tubo. Incubar a 37 °C durante una hora a 225 rpm. Tener cuidado que los tubos no choquen con otros o con los soportes de la incubadora porque pueden quebrarse.
- 7 Servir 200 μ l del cultivo en medio sólido LB con selección (antibiótico) y platear con ayuda de perlas, con asa de Drigalsky o con rastrillo.
- 8 Centrifugar el resto del cultivo a 3000 rpm durante 2 minutos, descartar casi todo el sobrenadante con cuidado de que queden aproximadamente 200 μ l para platear en otra caja petri con medio LB sólido con selección. Esto se hace con el objetivo de concentrar las bacterias y asegurarse de obtener colonias en el plateo, ya que es posible que el plateo anterior no genere colonias.
- 9 Incubar 12-16 horas a 37 °C para permitir el crecimiento de las colonias transformadas.

Protocolo de preparación de células electrocompetentes

Precauciones y recomendaciones

- 1 Realizar el siguiente procedimiento en cámara de flujo laminar para prevenir la contaminación de las células.
- 2 Los elementos utilizados deben estar debidamente esterilizados.
- 3 Todo el procedimiento debe realizarse a 4 °C (en centrifuga o en hielo).
- 4 Procurar que todos los materiales, como puntas, tubos y glicerol se hayan enfriado previamente. Para esto puede situarlos dentro de la nevera o en hielo con anticipación.
- 5 Para facilitar el pipeteo del glicerol, cortar el pico de las puntas azules (1000 μ l) que se van a utilizar para tal fin.
- 6 Encender con anticipación la centrifuga refrigerada para que tenga tiempo de disminuir su temperatura (4 °C).

Materiales, equipos y reactivos

- Cámara de flujo laminar
- Espectrofotómetro

- Incubadora con agitación
- Centrífuga refrigerada
- Micropipetas
- Puntas plásticas
- Tubos de polipropileno de 50 ml
- Tubos plásticos de 1,5 ml
- Erlenmeyer de 500 ml
- Tubos de vidrio con tapa
- Cubeta con hielo
- Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y sólido
- Cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*)
- Glicerol 10%

Procedimiento

- 1 Picar una colonia de un cultivo fresco y dejar crecer durante toda la noche en tubos de ensayo con 3 ml de LB a 37 °C, 210 rpm.
- 2 Transferir una parte del cultivo a erlenmeyers de 500 ml con 160 ml de medio LB en una dilución 1:1000 y cultivarlas a 37 °C a 275 rpm, hasta que alcancen una densidad óptica de 0,5 a 0,7. Esto se logra al cabo de 7 horas, aproximadamente. A menor densidad óptica se obtiene mayor competencia, pero menor número de células. Es importante monitorear la densidad óptica con ayuda de un espectrofotómetro.
- 3 Pasar el cultivo a seis tubos de 50 ml enfriados previamente y centrifugar a 5000 g durante 7 minutos a 4 °C. *Importante:* a partir de este momento, las células deben permanecer en hielo.
- 4 Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* de células en 10 ml (1/5 del volumen total) de glicerol al 10%, y agitar vigorosamente hasta que se resuspenda completamente. Completar hasta 50 ml con glicerol 10%.
- 5 Centrifugar a 9500 g durante 10 minutos, descartar el sobrenadante y resuspender con 10 ml de glicerol al 10%. Agitar vigorosamente.
- 6 Combinar el contenido de dos tubos en uno solo. Agregar un poco de glicerol al 10% al tubo que se desocupó para lavarlo. Completar a 50 ml con glicerol frío.
- 7 Repetir los pasos 5 y 6. Retirar el sobrenadante con la ayuda de una micropipeta de 1.000 µl para evitar la perturbación del *pellet*.
- 8 Resuspender en 800 µl de glicerol al 10% con puntas frías. Se puede resuspender en un volumen menor.
- 9 Alicuotar 50 µl de células en tubos plásticos de 1,5 ml. Estas células se pueden utilizar inmediatamente o se pueden almacenar a -80 °C.

Protocolo de transformación por choque eléctrico (electroporación)

Precauciones y recomendaciones

- 1 Realizar el siguiente procedimiento en cámara de flujo laminar para prevenir la contaminación de las células.
- 2 Los elementos utilizados deben estar debidamente esterilizados.
- 3 Procurar que todos los materiales, como puntas y celdas de electroporación, se hayan enfriado previamente.

Materiales, equipos y reactivos

- Cámara de flujo laminar
- Incubadora con agitación
- Electroporador
- Microcentrífuga
- Micropipetas
- Puntas plásticas
- Cubeta con hielo
- Celdas de electroporación
- Tubos plásticos de 1,5 ml
- Tubos de vidrio
- Cajas de Petri
- Perlas de vidrio, asa de Drigalsky o rastrillo
- Células electrocompetentes (1 vial por transformación)
- Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido y sólido
- IPTG 0,5 mM
- X- Gal. 80 mM
- Ampicilina 100 mg/ml u otro antibiótico

Procedimiento

- 1 Despacio y con la punta de la micropipeta en contacto con las células, añadir una concentración de 10 pg-25 ng de ADN, en un volumen de 1-2 μ l. Mantener las células en hielo. Permitir que el ADN se mezcle con las células mediante una incubación de 30-60 segundos.
- 2 Transferir la mezcla de células y ADN a la celda de electroporación, previamente enfriada, situándola entre los electrodos de la celda, preferiblemente en su fondo. Evitar al máximo la formación de burbujas.
- 3 Introducir la celda dentro del electroporador y oprimir el botón que activa la descarga eléctrica, con las condiciones de voltaje adecuadas.
- 4 Inmediatamente adicionar 1 ml de medio LB a la celda de electroporación. Recuperar las células con el medio y disponer en tubos de vidrio con tapa rosca. Incubar con agitación a más de 200 rpm durante una

- hora a 37 °C. Tener cuidado de que los tubos no choquen con otros o con los soportes de la incubadora porque pueden quebrarse.
- 5 Platear 200 µl del cultivo en medio sólido LB con selección (antibiótico) con ayuda de perlas, con asa de Drigalsky o con rastrillo.
 - 6 Centrifugar el resto del cultivo a 3000 rpm durante 2 minutos, descartar casi todo el sobrenadante con cuidado de que queden aproximadamente 200 µl para platear en otra caja de Petri con medio sólido LB con selección.
 - 7 Incubar 12-16 horas a 37 °C para permitir el crecimiento de las colonias transformadas.

Cuestionario

- 1 ¿Cuál es la importancia de los vectores de clonación en el proceso de transformación?
- 2 ¿Cuál es la importancia y cuáles son las aplicaciones de la transformación genética?
- 3 ¿Todas las células pueden ser transformadas?
- 4 ¿Qué otros procesos de transferencia de material genético a una célula existen?

Extracción de ADN plasmídico en pequeña escala por lisis alcalina: *miniprep*

Marco conceptual

La caracterización del plásmido con el inserto de interés, así como otras metodologías como su secuenciación, requieren la extracción del ADN plasmídico únicamente. Para ello, el método de minipreparación, comúnmente denominado *miniprep*, emplea un tratamiento de lisado de las células mediante la acción de un detergente fuerte y la precipitación diferencial del ADN plasmídico, respecto al ADN cromosómico, además de las proteínas celulares. Este procedimiento se fundamenta en el hecho de que los plásmidos son moléculas de ADN pequeñas, mientras que el ADN cromosómico está asociado con proteínas, es más grande y menos superenrollado. Esta diferencia topológica permite la precipitación selectiva del ADN cromosómico y las proteínas celulares, separándolos del ADN plasmídico y las moléculas de ARN. Así, las células son lisadas bajo condiciones alcalinas, las cuales desnaturalizan tanto los ácidos nucleicos como las proteínas, hecho seguido por la adición de acetato de potasio que neutraliza la reacción, permitiendo la correcta renaturalización únicamente del ADN plasmídico. Este permanece en resuspensión, en contraste con el ADN cromosómico y las proteínas que se precipitan (Monroe y Knight, 2000; Preuss, 2006). En este sentido, existen

diversos métodos para purificar el ADN plasmídico de bacterias que en general incluyen tres pasos:

- 1 El cultivo de la bacteria de interés: una vez se obtiene una bacteria transformada con un plásmido de interés, se selecciona una colonia aislada y se deja crecer en medio líquido con el antibiótico al cual el plásmido que posee le confiere resistencia.
- 2 La concentración de las bacterias y su lisis: el *pellet* se resuspende en un *buffer* isotónico (por la glucosa de la solución I) en donde el EDTA degrada los componentes externos de la pared celular y el SDS lisa la membrana, desestabilizando las interacciones hidrofóbicas de diferentes macromoléculas, alterando su conformación. De igual forma, el alto pH del NaOH 0,2 N desnaturaliza las macromoléculas como el ADN, debido a un cambio de condición del estado iónico.
- 3 La purificación del plásmido: una vez liberados los componentes citoplasmáticos se procede a la purificación del ADN plasmídico de las proteínas, azúcares, lípidos y otros ácidos nucleicos de la bacteria. Para ello, se procede lo más pronto posible a la neutralización del líquido viscoso mediante la adición de la solución III, donde el bajo pH del acetato de potasio neutraliza el NaOH, y al retornar el estado iónico las macromoléculas se renaturalizan. Sin embargo, las proteínas y el ADN cromosómico, debido a su tamaño, no se renaturalizan correctamente, formando interacciones hidrofóbicas no específicas, dado que la correcta conformación no se mantiene durante la desnaturalización. En contraste, las moléculas de ADN del plásmido no se desnaturalizan por completo debido a su pequeño tamaño y su forma circular superenrollada, y aunque el alto pH rompa los puentes de hidrógeno al bajar el pH, estos vuelven a formarse. De esta forma, el ADN cromosómico y las proteínas son precipitadas, mientras que el ADN plasmídico permanece resuspendido. Este finalmente se concentra mediante la adición de etanol y se resuspende en *buffer* TE.

Protocolo de extracción de ADN plasmídico en pequeña escala por lisis alcalina: "miniprep"

Materiales, equipos y reactivos

- Incubadora con agitación
- Refrigerador -80 °C
- Microcentrífuga (refrigerada, opcional)
- Micropipetas
- Puntas plásticas
- Tubos plásticos de 1,5 ml
- Tubos de vidrio

- Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido con selección
- Colonias bacterianas
- Etanol 100%
- Etanol 70%
- Sol I: 50 mM glucosa, 10 mM EDTA pH 8,0 y 25 mM Tris-HCL pH 8,0 (esta solución debe ser esterilizada y conservada a 4 °C, o incluso es mejor prepararla fresca)
- Sol II: 0,2 N NaOH, 1% SDS: preparar fresca justo antes de empezar el procedimiento mezclando partes iguales de NaOH 0,4 N y SDS al 2%
- Sol III: acetato de potasio 3 M pH 4,8
- 10xTE: 100 mM Tris pH 7,6 y 10 mM EDTA

Procedimiento

- 1 Picar una colonia de un cultivo fresco y dejar crecer en un tubo de ensayo con 5 ml de LB líquido con selección, durante 12-16 horas, a 37 °C, 220 rpm.
- 2 Centrifugar el cultivo en un tubo de 1,5 ml a máxima velocidad por 5 minutos.
- 3 Descartar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en 250 µl de Sol I, esto se puede hacer pipeteando o dándole breves toques con un tubo de vortex.
- 4 Una vez resuspendido el *pellet*, añadir 250 µl de Sol II, mezclar suavemente, el líquido se tornará viscoso. Dejar por máximo 5 minutos.
- 5 Añadir 250 µl de Sol III a este líquido viscoso y mezclar, después de mezclar aparecerán en el líquido flóculos blancos.
- 6 Centrifugar por 10 minutos a máxima velocidad, tomar 450 µl del sobrenadante, cuidando de no tocar el *pellet*.
- 7 Transferir el sobrenadante en un tubo de 1,5 ml con 450 µl de etanol al 100%. Incubar el etanol con el sobrenadante a -80 °C por 30 minutos.
- 8 Centrifugar a máxima velocidad por 10 minutos, de ser posible centrifugar a 4 °C.
- 9 Descartar el sobrenadante, cuidando de no desprender el *pellet*. Lavar el *pellet* con 100 µl de etanol al 70%, descartar inmediatamente.
- 10 Dejar secando el *pellet* a temperatura ambiente 20 minutos o a 65 °C por 10 minutos.
- 11 Resuspender el *pellet* de ADN en 30 µl de *buffer* TE.

Cuestionario

- 1 ¿Cómo actúa el SDS sobre las células al ser un detergente iónico?
- 2 ¿A qué se debe la viscosidad y la transparencia con la que se torna la solución después de la lisis alcalina?

- 3 ¿Cuál es la importancia de la neutralización de la reacción después del procedimiento de lisis?
- 4 ¿Qué otro tipo de procedimientos de extracción de ADN plasmídico existen y en qué se diferencian?
- 5 ¿Por qué en el paso 9, se utiliza etanol al 70% y no al 100%?

Bibliografía

- Ames, B. N.; Martin, R. G. Biochemical Aspects of Genetics: The Operon. *Annu. Rev. Biochem.* 1964. **33**: 235-258.
- Arber, W.; Linn, S. DNA Modification and Restriction. *Annu. Rev. Biochem.* 1969. **38**: 467-500.
- Ausubel, F.; Brente, R.; Kingston, R.; Moore, D.; Seidman, J. *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons. 2003.
- Doherty, A.; Ashford, S.; Subramanya, H.; Wigley, D. Bacteriophage T7 DNA Ligase. Overexpression, Purification, Crystallization, and Characterization. *Jour. Biol. Chem.* 1996. **271**: 11083-11089.
- Fulton, T. *Mini-prep Protocol*. Ithaca, N.Y.: Cornell University-Institute for Genomic Diversity. 2006.
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, L. S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. *Molecular Cell Biology* (4th ed.). New York: Scientific American Books. 2000.
- MacGregor, G.; Nolan, G. P.; Fiering, S.; Roederer, M.; Herzenberg, L. A. Use of *Escherichia coli* (*E. coli*) lacZ (β -Galactosidase) as a Reporter Gene. *Methods Mol. Biol.* 1991. **7**: 217-35.
- Mertz, J.; Davis, R. Cleavage of DNA by RI Restriction Endonuclease Generates Cohesive Ends. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1972. **69**: 3370.
- Monroe, J. D.; Knight, I. T. Plasmid Miniprep. *Advanced Molecular Biology BIO 480/580. CUR Quarterly.* 2000. **16**: 109-114.
- Murray, E. J. Gene Transfer and Expression Protocols. *Springer Protocols.* 1991: 217-235.
- Nelson, D.; Cox, M. *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th ed.). New York: Freeman and Co. 2004.
- Preuss, D. *Alkaline Lysis Mini-Prep-Protocols*. Chicago: The University of Chicago/The Preuss Lab. 2006.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

Extracción de ARN, síntesis de ADNc y RT-PCR

ANA MARÍA BOSSA¹

JUAN CAMILO OCHOA²

CAMILO LÓPEZ³

Marco conceptual

El ARN es uno de los ácidos nucleicos presentes en todas las células, tanto procariotas como eucariotas, y está conformado por un azúcar (ribosa), un fosfato y una base nitrogenada (citosina, guanina, adenina o uracilo). Posee una estructura similar al ADN, pero a diferencia de este, es de cadena simple y no suele formar dobles hélices extensas. La ribosa se distingue por la presencia de un hidroxilo libre en la posición 2'. En consecuencia, los enlaces fosfodiéster del ARN en las regiones en que no se forma doble hélice son más susceptibles a la hidrólisis química que los del ADN, siendo más fácilmente hidrolizables en soluciones alcalinas. La vida media de las moléculas de ARN es menor que las de ADN y, por lo tanto, son más inestables (Davidson, 1979; Lodish *et al.*, 2000). Las moléculas de ARN son las encargadas de transcribir y traducir la información contenida en el genoma de cada organismo y portar la información para la síntesis de proteínas (figura 9).

Las 3 clases principales de ARN presentes en la célula son el ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosomal (ARNr) y ARN mensajero (ARNm). El ARNr constituye la mayor parte del ARN total, aproximadamente 80%, y forma el núcleo estructural y funcional de los ribosomas, donde se realiza la síntesis protéica. Los eucariotas poseen 4 tipos de ARNr: 28S, 18S, 5,8S y 5S, de los cuales, 28S, 5,8S y 5S forman parte de la subunidad mayor del ribosoma, y el 18S de la subunidad menor. Los procariotas tienen solo 3 ARNr, 23S, 16S, 5S, de los cuales, el primero y el último se asocian con la subunidad mayor del ribosoma y el segundo con la menor. Los ARNr son monocatenarios pero se pliegan formando dominios estructurales autónomos (Cooper, 2003).

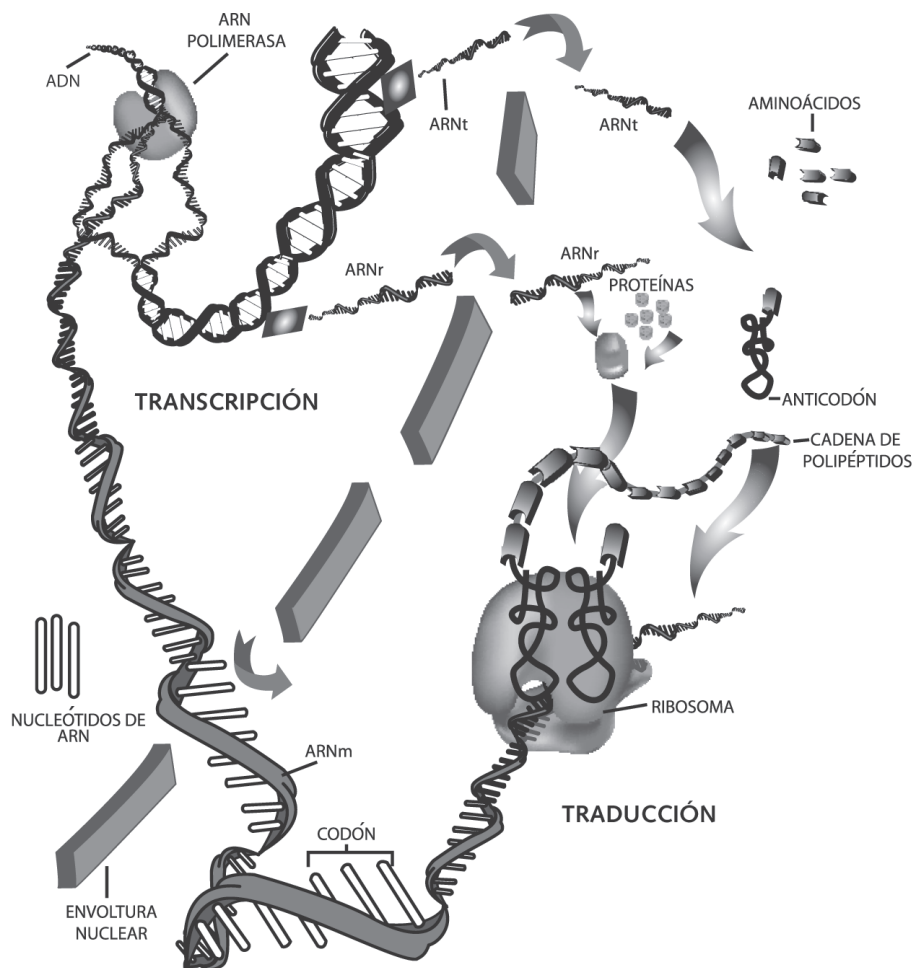
1 Bióloga, Universidad Nacional de Colombia. Asistente de Investigación CIAT.

2 Biólogo. Estudiante de maestría, Universidad Nacional de Colombia.

3 Biólogo. Profesor del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Lidera el grupo de investigación Manihot Biotec.

El ARNt corresponde el 15% del ARN de una célula y es un adaptador de aminoácidos durante la síntesis proteica. En un extremo contiene 3 nucleótidos, el anticodón, que reconoce al codón de secuencia complementaria en el ARNm, y en el extremo 3' se une el aminoácido correspondiente. Cada ARNt es específico y, por lo tanto, reconoce un solo aminoácido. La mayor parte de los nucleótidos están apareados formando brazos u horquillas y poseen una estructura secundaria característica, denominada *hoja de trébol* (Nelson y Cox, 2004).

Figura 9. Esquema representativo de la transcripción y la traducción. En el núcleo, el ADN es transcrito a ARNm, por la ARN polimerasa. El ARNm es llevado a los ribosomas, en el citoplasma, donde se lleva a cabo la traducción a aminoácidos. Los nucleótidos del anticodón del ARNt reconocen a los del codón y se aparean permitiendo la síntesis de una cadena de polipéptidos.

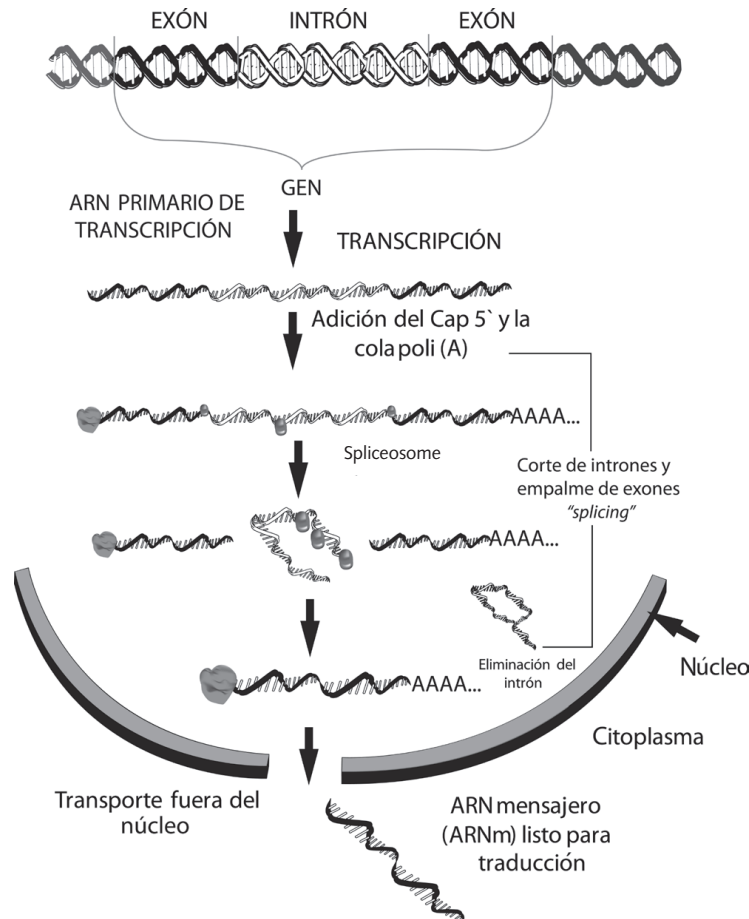


Los ARNm comprenden del 1 al 5% del ARN total, y tienen el importante papel de transferir la información desde el ADN hasta los ribosomas, donde son traducidos a proteínas. Por el contrario, los ARNr y ARNt no sufren este

proceso. Los ARNm son hebras monocatenarias de secuencia complementaria al ADN molde a partir del cual se originaron, y varían respecto al tamaño de cada gen. En todos los tipos de células existen las endonucleasas (ARNasas) que son enzimas que hidrolizan el ARN para regular sus niveles celulares e, indirectamente, la biosíntesis de proteínas (Davidson, 1979; Cooper, 2003).

En los eucariotas, luego de la generación de los ARNm, se lleva a cabo su maduración (figura 10). Esta consiste en la eliminación de secuencias internas, no codificantes, llamadas *intrones*: la adición de una cabeza CAP en el extremo 5' y una cola poliA en el extremo 3'. Estas últimas aseguran la estabilidad del ARNm, intervienen en la exportación del ARNm al citoplasma y sirven como señal de reconocimiento al ribosoma. En las células procariotas no ocurre este proceso, ya que estas no poseen intrones en su ADN y los ARNm no requieren de la cabeza CAP ni de la cola poliA, pues la unión a los

Figura 10. Esquema de la maduración del ARNm de eucariotas. A partir de una hebra de ADN que contiene un gen, se sintetiza un ARNm primario de transcripción, caracterizado por regiones codificantes (exones) y no codificantes (intrones). La maduración consiste en el corte y empalme de dichas regiones (*splicing*), la adición de una cabeza CAP en el extremo 5' y una cola poliA en el extremo 3' del ARNm para su posterior transporte al citoplasma celular.



ribosomas ocurre mientras la cadena de ARNm está siendo sintetizada en el citoplasma (Cooper, 2003).

En un organismo multicelular, el ADN de todas sus células es idéntico, sin embargo, la expresión génica es de carácter diferencial. Por lo tanto, no todos los genes se expresan al mismo tiempo, en la misma cantidad, ni en todas las células. Existen genes de naturaleza constitutiva, que siempre se expresan dado que codifican para proteínas esenciales para el funcionamiento de todas las células, y otros de naturaleza inducida, que son activados por diversos factores, bióticos o abióticos. Generalmente, la abundancia de un ARNm y el número de moléculas por célula de ese transcrito se correlaciona con el nivel de síntesis de la proteína correspondiente. De este modo, el grado de expresión de un gen puede ser estudiado mediante la detección o cuantificación de los ARNm funcionales en el citoplasma (Cooper, 2003). Es por esta razón que adquiere tanta importancia la extracción del ARN y los estudios relacionados con este.

Es fundamental aislar un ARN de alta pureza e integridad para un uso efectivo en aplicaciones como RT-PCR, *northern blot*, purificación de ARNm, análisis de microarreglos, entre otras. Para ello, se han diseñado diferentes métodos de extracción que tienen como objetivo separar el ARN de las demás moléculas celulares y mantenerlo en un ambiente libre de ARNasas, para evitar su degradación. Entre estos se encuentran varios tipos de kits desarrollados por distintas casas comerciales y protocolos manuales de diferentes características según las necesidades de los investigadores.

El aislamiento y purificación de ARN es la fase que da inicio a los distintos ensayos que permitirán determinar la dinámica de expresión génica, función génica y, en casos más específicos, elaborar librerías de Expressed Sequences Tags (EST), ADNc o la clonación completa de un gen. El primer método desarrollado para estudiar la presencia de un ARN en particular fue el *northern blot*, método derivado del *southern blot* y fundamentado en la detección de ácidos nucleicos por hibridación de una sonda marcada con isótopos radioactivos o moléculas luminiscentes. Actualmente esta técnica ha sido desplazada por otras más sensibles, sencillas, automatizables y menos costosas, dado que el *northern blot* requiere de cantidades bastante altas de ARNm (superiores a 1 µg) y equipos e instalaciones que permitan trabajar isótopos radioactivos (Lodish *et al.*, 2000; Cooper, 2003).

La transcripción reversa (RT, por sus siglas en inglés) es el proceso biológico por el cual se sintetizan cadenas de ADN usando como molde cadenas de ARN. El descubrimiento de este proceso biológico ha revolucionado tanto los estudios relacionados con el flujo de la información génica y el dogma central de la biología molecular, como los estudios que permiten determinar la expresión génica. La RT fue la primera modificación descrita para el dogma central de la biología molecular. Esta fue inicialmente estudiada en retrovirus,

y hoy en día se conocen enzimas eucariotas como las telomerasas, las cuales son transcriptasas reversas especializadas (Griffiths, 2002). Adicionalmente, el aislamiento y la clonación de los genes que codifican para transcriptasas reversas virales ha permitido la purificación y comercialización de enzimas recombinantes que dan la posibilidad de hacer RT *in vitro*. En la actualidad, la transcriptasa reversa más utilizada proviene del virus de la leucemia de roedores murinos (*Moloney Murine Leukaemia Virus –M-MuLV–*) dado que cataliza de forma eficiente la síntesis de ADN complementario (ADNc) *in vitro*. Debido a que el ADN presenta una estabilidad mayor que el ARN, y además permite la elaboración de amplificaciones por PCR, gracias a la especificidad de la Taq polimerasa, la RT se ha convertido en un herramienta fundamental para estudios con ARN.

El ADNc es una cadena de ADN que es sintetizada usando como molde una cadena de ARN sin importar el tipo. Al igual que el funcionamiento de todas las ADN polimerasas, las transcriptasas reversas solo inician la síntesis si hay un *primer* complementario que permita hacerlo. Una vez el *primer* es reconocido por la polimerasa, esta inicia la síntesis de ADN complementario en dirección $5' \rightarrow 3'$ (Cooper, 2003).

La transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) es una de las técnicas más sensibles, económicas y de fácil aplicación para determinar la presencia de ARN de cualquier tipo en cualquier ser vivo. El método RT-PCR se fundamenta en la reacción de PCR a partir de cadenas de ADNc. A diferencia de la PCR convencional, la RT-PCR permite detectar la expresión de distintos genes bajo determinadas condiciones ambientales, presencia de cadenas de ARN viral, actividad de microARN y desarrollo de estudios sobre ARN ribosomal o de transferencia. Gracias a que la síntesis de ADNc requiere de un *primer* para iniciar, es posible sintetizar ADNc partiendo exclusivamente de ARN mensajero eucariota, ARN total o simplemente usando un *primer* gen específico si solo se quiere detectar la expresión de un gen.

Dada la alta sensibilidad que presenta la técnica de PCR, es necesario eliminar por completo el ADN contaminante en el ARN por medio de tratamiento con ADNasas libres de ARNasas antes de iniciar la síntesis de la primera cadena de ADNc. Para determinar la presencia de ADN en una muestra es de gran utilidad la elaboración de una reacción de PCR usando como muestra el ARN extraído, debido a que la enzima Taq polimerasa es incapaz de usar como molde cadenas de ARN. De acuerdo con lo anterior, si se observa amplificación por PCR en una muestra de ARN, esta es debida a una contaminación con ADN.

Una vez se tienen las muestras de ARN puro, se puede proceder a la síntesis de ADNc, y para ello, se debe escoger el *primer* que dará inicio a la reacción. Si se requiere detectar la expresión de uno o distintos ARN mensajeros de un

organismo eucariota, se puede usar un *primer* oligo dT, que contiene entre 12-18 timinas, y se unirá específicamente a la cola poliA típica del ARNm de eucariotas. Si se trata de un organismo procariota o se requiere estudiar un tipo distinto de ARN (por ejemplo, ARNr, ARNt, ARNmi, ARNsn) es posible utilizar hexámeros aleatorios (oligonucleótidos compuestos por 6 bases nitrogenadas), los cuales por azar serán capaces de alinearse con cualquier hebra del ARN. Finalmente, si solo se desea detectar la expresión de un gen es posible sintetizar ADNc con un *primer* específico (Fermentas, 2008).

Protocolo de extracción de ARN total a partir de tejido vegetal

Precauciones y recomendaciones

- 1 Limpiar bien el mesón antes de iniciar.
- 2 Utilizar siempre doble guante.
- 3 Todo el material utilizado debe estar esterilizado 3 veces.
- 4 No hablar sobre las muestras y las soluciones.
- 5 Trabajar lo más rápido posible para evitar la degradación del ARN.
- 6 Preparar las soluciones con H₂O DEPC (libre de ARNasas).
- 7 Todo el procedimiento debe realizarse a 4 °C (en centrífuga o en hielo).
- 8 Manejar con precaución el nitrógeno líquido.
- 9 Manejar con precaución el fenol ácido y el cloroformo (no deben ser inhalados).
- 10 Encender con anticipación la centrífuga refrigerada para que tenga tiempo de disminuir su temperatura (4 °C).

Materiales, equipos y reactivos

- Vórtex
- Microcentrífuga refrigerada
- Micropipetas
- Puntas plásticas
- Tubos de polipropileno de 15 ml
- Tubos plásticos de 2,0 ml
- Tubos plásticos de 1,5 ml
- Guantes de látex
- Espátulas
- Mortero y pistilo
- Bolsas aluminio
- Gradillas
- Cubeta con hielo
- Nitrógeno líquido
- Acetato de sodio 3 M

- EDTA 100 mM
- SDS 20%
- H₂O DEPC (o agua libre de ARNasas)
- Etanol 70%
- Fenol ácido: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1)
- Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
- LiCl 8 M

Procedimiento

- 1 Preparar el *buffer* de extracción en un tubo de 15 ml, según la tabla 4, y luego completar el volumen con agua DEPC:

Tabla 4. Preparación del buffer de extracción de ARN de tejido vegetal

Reactivo	Concentración <i>stock</i>	Concentración final	Volumen para 5 ml de solución
Acetato de sodio	3 M	100 mM	167 µl
EDTA	100 mM	1 mM	50 µl
SDS	20%	4%	1 ml

Fuente. elaboración propia

- 2 Congelar el tejido en nitrógeno líquido y macerar en mortero, rápidamente, hasta obtener un polvo lo más fino posible.
- 3 Agregar 300 mg de tejido macerado a un tubo de 2 ml.
- 4 Calentar el *buffer* de extracción a 65 °C.
- 5 Agregar 500 µl de *buffer* de extracción al tubo. Agitar por vórtex durante un minuto.
- 6 Agregar 500 µl de fenol ácido: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1) y dar vórtex hasta crear emulsión.
- 7 Centrifugar a 10 500 rpm por 5 minutos a 4 °C. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5 ml sobre hielo.
- 8 Repetir 2 veces los pasos 6 y 7.
- 9 Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5 ml sobre hielo y agregar 300 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y dar vórtex por 1 o 2 minutos.
- 10 Centrifugar a 10 500 rpm por 3 minutos a 4 °C.
- 11 Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo nuevo de 1,5 ml sobre hielo y agregar LiCl 8 M a una concentración final de 2 M.
- 12 Incubar a -20 °C toda la noche.
- 13 Descongelar en hielo y centrifugar a 14 000 rpm por 20 minutos a 4 °C.
- 14 Descartar el sobrenadante y lavar el *pellet* con etanol 70% (200 µl).
- 15 Centrifugar por 20 minutos a 4 °C.
- 16 Descartar el sobrenadante y retirar los restos de etanol con micropipeta.

- 17 Dejar secar el *pellet* por 5-10 minutos.
- 18 Resuspender el *pellet* en H₂O DEPC (50 µl).
- 19 Almacenar el tubo a -80 °C.
- 20 Correr el extraído en un gel de agarosa al 1,2% para verificar que haya ARN (véase el protocolo de electroforesis, en el capítulo “Extracción de ADN y electroforesis”).

Nota: posiblemente el ARN estará contaminado con ADN, por lo tanto, se requiere un posterior tratamiento con ADNasa.

Protocolo de ensayos de expresión génica (síntesis de ADNc y RT-PCR)

Precauciones y recomendaciones

- 1 Utilizar siempre doble guante
- 2 Todo el material utilizado debe estar esterilizado tres veces
- 3 No hablar sobre las muestras y las soluciones
- 4 Trabajar lo más rápido posible para evitar la degradación del ARN

Materiales, equipos y reactivos

- Termociclador
- Micropipetas
- Puntas plásticas
- Tubos de 0,2 ml (para PCR)
- Guantes de látex
- Gradillas
- Cubeta con hielo
- Kit de síntesis de primera cadena de ADNc (fermentas)
- Muestras de ARN procesadas previamente con ADNasa 100 ng/µl
- Taq polimerasa 25 u/µl
- MgCl₂ 25 mM
- dNTPs 40 mM
- *Primers forward* y *reverse*
- H₂O DEPC (o agua libre de ARNasas)

Procedimiento (figura 11)

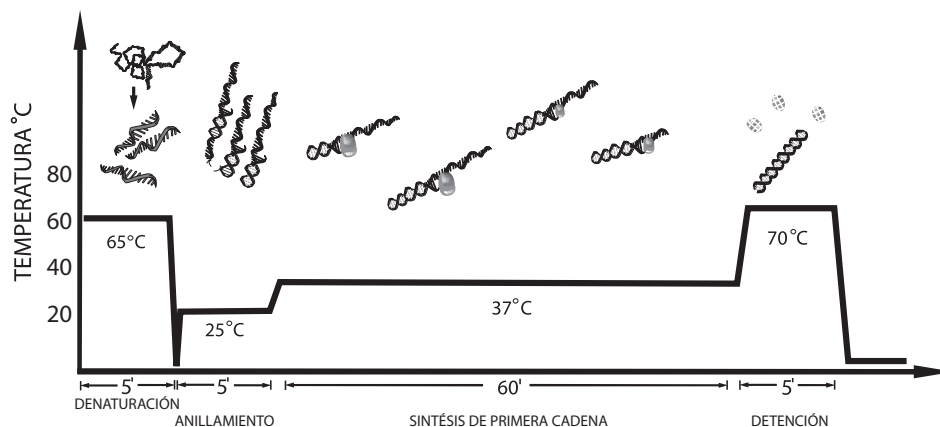
- 1 En un tubo estéril de PCR añadir 1µg de la muestra de ARN y 1 µl de hexámeros aleatorios, o 1 µl de *primer* polidT o *primers* específicos. Completar con H₂O DEPC a un volumen final de 11 µl.
- 2 Incubar en el termociclador los tubos con las muestras y los *primers* a 65 °C por 5 minutos, colocar inmediatamente en hielo (esto permitirá

denaturar el ARN y eliminar las estructuras secundarias para un correcto funcionamiento de la enzima).

- 3 Añadir a cada tubo los siguientes reactivos:
 - 4 μ l de *buffer* 5 X (brinda las condiciones de pH óptimas de funcionamiento de la enzima)
 - 1 μ l de inhibidor de ribonucleasas (RiboLock) (inhibe la actividad de ribonucleasas que puedan degradar el ARN durante la síntesis)
 - 2 μ l de dNTPs 40 mM
 - 2 μ l de *Moloney Murine Leukaemia Virus-reverse transcriptase* (M-MuLV-RT)
- 4 Mezclar resuspendiendo 2 veces suavemente con la punta.
- 5 Incubar en el termociclador por 5 minutos a 25 °C (permite el anillamiento de los hexámeros).
- 6 Incubar a 37 °C por 60 minutos para iniciar la actividad enzimática y la síntesis de la primera cadena.
- 7 Incubar las muestras a 70 °C por 5 minutos para detener la actividad enzimática.

Las muestras obtenidas entonces estarán listas para realizar un PCR convencional (véase el capítulo “Bioinformática”).

Figura 11. Esquema representativo de los ciclos de temperatura en el proceso de transcripción reversa *in vitro* mediado por la enzima M-MuLV-RT. El ARN se denatura durante cinco minutos a 65°C, los hexámeros se anillan durante cinco minutos a 25°C y se realiza la síntesis de primera cadena a 37°C por una hora. Finalmente se detiene la reacción enzimática a 70°C durante cinco minutos.



Cuestionario

- 1 ¿De qué modos se puede comprobar la calidad y cantidad del ARN extraído?
- 2 ¿Cómo se debe observar un ARN en un gel de agarosa? ¿Cómo se verá uno parcialmente degradado?
- 3 ¿A qué corresponden las bandas de un ARN en un gel de agarosa?
- 4 ¿Todos los tipos de ARN pueden ser observados en un gel de agarosa? ¿De qué depende?
- 5 ¿Cómo se puede verificar si el ARN extraído está o no contaminado con ADN?
- 6 ¿Con qué fin se utiliza el *buffer* de extracción, el fenol ácido y el cloroformo?
- 7 ¿Qué factores pueden ocasionar la degradación del ARN durante la extracción?
- 8 ¿Cómo se puede aislar el ARNm de una célula eucariota? ¿Para qué se puede emplear?
- 9 ¿Cuáles son los principios comunes a los tratamientos para la extracción de ARN?
- 10 ¿Además de detectar la expresión de un gen, qué función alternativa le han dado los investigadores a la técnica *northern blot*?
- 11 Explicar cómo funciona y para qué sirve un PCR de tipo 3'-5' RACE.
- 12 Al ver el resultado de una RT-PCR en un gel de agarosa se obtienen dos bandas amplificadas a partir de su muestra de ADNc, pero una sola banda a partir de ADN genómico, ¿cómo se explica este hecho? Téngase en cuenta que el ARN utilizado para la RT se encontraba libre de ADN.
- 13 Mencionar dos técnicas empleadas para la cuantificación de expresión de genes por PCR.
- 14 ¿Cómo se puede verificar que el ADNc fue exitosamente sintetizado si el gen de interés que se va a evaluar no se expresa bajo las condiciones en las que se colectó la muestra de ARN?

Bibliografía

- Cooper, G. *The Cell. A molecular Approach* (3rd ed.). Sunderland MA, Sinauer Associates Inc.. 2003.
- Davidson, G. *Bioquímica de los ácidos nucleicos*. Barcelona, Reverté. 1979.
- Fermentas. First Strand Synthesis Kit. www.fermentas.com. Revised august 2008.
- Griffiths, A.; Miller, J.; Suzuki, D.; Lewontin, R.; Gelbart, W. *An Introduction to Genetic Analysis* (7th ed.). New York: W. H. Freeman and Company. 2002. pp. 614-616.

- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, L. S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. *Molecular Cell Biology* (4th ed.). New York: Scientific American Books. 2000.
- Nelson, D.; Cox, M. Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed.). New York: Freeman and Company. 2004.
- Tanese, N.; Goff, S. Domain Structure of the Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase: Mutational Analysis and Separate Expression of the DNA Polymerase and RNase H Activities. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1988. **85**: 1777-1781.
- Verma, I. Studies on Reverse Transcriptase of RNA Tumor Viruses III. Properties of Purified Moloney Murine Leukemia Virus DNA Polymerase and Associated RNase H. *J. Virol.* 1975. **15** (4): 843-854.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

CATALINA ESCOVAR¹

CAMILO LÓPEZ²

Marco conceptual

La PCR es una técnica que permite amplificar secuencias de ADN *in vitro*, por repetición de la reacción de elongación a partir de *primers* específicos, con el uso de una ADN polimerasa. La PCR se desarrolló gracias al descubrimiento de la eubacteria termófila *Thermus aquaticus* en aguas del Parque de Yellowstone, en Estados Unidos, que se encuentra a temperaturas de 70-75 °C, y cuya ADN polimerasa es estable a temperaturas de hasta 100 °C. Esta técnica ha revolucionado la investigación en biología molecular, aplicándose a múltiples usos, desde la clonación y el estudio de la expresión génica, hasta la búsqueda de polimorfismos genéticos (Lodish *et al.*, 2000).

La técnica de la amplificación *in vitro* se basa en la repetición de tres procesos (figuras 12 y 13)

- La desnaturalización de las dos cadenas de ADN a una temperatura elevada (cerca de 95 °C) para producir moléculas de ADN monocatenarias.
- La hibridación (*annealing*) de los *primers* oligonucleicos complementarios a las secuencias de los extremos del ADN por amplificar (para ello se baja la temperatura hasta valores normalmente comprendidos entre 40 y 65 °C).
- La reacción de elongación a partir de los *primers* usando una ADN polimerasa termoestable (para la Taq polimerasa la temperatura óptima es de 72 °C).

Los productos de elongación se desnaturalizan de nuevo por calor y se repite el proceso, de manera que en cada ciclo el número de copias de ADN se duplica, por lo que se obtienen 2ⁿ moléculas después de *n* ciclos (Sambrook y Russell, 2001).

1 Bióloga, Universidad Nacional de Colombia.

2 Biólogo. Profesor del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Lidera el grupo de investigación Manihot Biotec.

Figura 12. Esquema representativo de los procesos y temperaturas durante la PCR. Una doble cadena de ADN es desnaturizada a 95°C, para iniciar la síntesis, separando sus dos hebras por la ruptura de los enlaces de hidrógeno. A continuación, se baja la temperatura a un rango entre 50-65 °C que permite la hibridación de los primers complementarios a las secuencias de los extremos del ADN a amplificar. En última instancia, se sube de nuevo la temperatura a 72 °C, bajo la cual la ADN polimerasa lleva cabo su función, sintetizando una copia del fragmento de ADN de interés a partir de los primers hibridados.

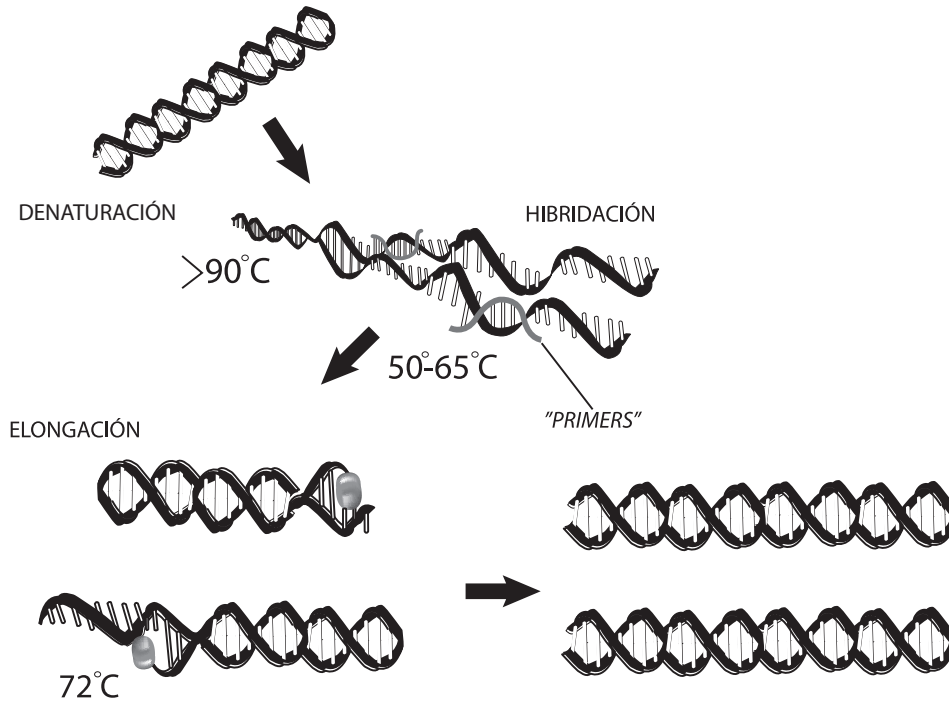


Figura 13. Esquema representativo de un termociclador. Se compone de un bloque térmico donde se ubican las muestras, cuyos cambios de temperatura se llevan a cabo a una gran velocidad gracias a un sistema especializado y programados por un software que determina las temperaturas y tiempos correspondientes.



Se debe resaltar que el proceso de hibridación de los *primers* es de fundamental importancia, dado que la manipulación de su temperatura de *annealing* resulta en un grado de especificidad mayor o menor en proporción a la temperatura. La gran versatilidad de la PCR se basa en el tipo de *primers* que se emplean en esta técnica. Dependiendo de las secuencias de los *primers*, se pueden amplificar secuencias específicas, regiones aleatorias del genoma, secuencias que contienen sitios de restricción, entre otros. Asimismo, el diseño de *primers* con secuencias específicas permite clonar productos de PCR en vectores sin la necesidad de utilizar enzimas de restricción y de ligación. Además, se pueden amplificar dominios conservados mediante el diseño de *primers* degenerados, los cuales tienen un número de opciones en varias posiciones en la secuencia para permitir la hibridación y la amplificación de una variedad de secuencias relacionadas. También se suelen emplear *primers* diseñados con el fin de dar lugar a mutaciones dirigidas (Sambrook y Russell, 2001).

Entre los tipos de PCR se encuentran:

- Anidado: dos procesos de amplificación seguidos de tal forma que en la segunda reacción se emplean *primers* contenidos en la secuencia amplificada en la primera reacción, proporcionando una mejoría en la sensibilidad y la especificidad.
- Múltiple: se emplean múltiples pares de *primers* (hasta ocho), con lo cual se obtiene una serie de productos que ahorran ADN molde, tiempo y costos, por esta razón es frecuentemente utilizado en diagnósticos médicos.
- Inverso: implica una serie de reacciones de digestión y ligación, dando lugar a un fragmento en bucle, a partir del cual, puede llevarse a cabo la PCR con solo conocer una única secuencia. Este tipo de PCR es especialmente útil en la determinación de inserciones provenientes de retrovirus o transposones, donde conociendo su secuencia es posible identificar los sitios de su inserción en un ADN genómico, así como la secuencia interrumpida si se conoce de antemano la secuencia original.

Protocolo PCR

Precauciones y recomendaciones

- 1 La preparación de la muestra de ADN y de la mezcla de la reacción de PCR, además de la posterior reacción de análisis del producto, deben realizarse en áreas aisladas.

- 2 Los elementos utilizados para la PCR deben estar debidamente esterilizados.
- 3 Los reactivos para la PCR deben prepararse por separado y ser utilizados exclusivamente para este propósito. Se deben esterilizar todas las soluciones, excepto dNTPs, *primers* y Taq ADN polimerasa. Las soluciones deben alicuotarse en pequeñas porciones y almacenarse en áreas designadas para la PCR.
- 4 Siempre debe llevarse a cabo una reacción de control (negativo), donde se omita ADN, para confirmar la ausencia de contaminación.

Materiales, equipos y reactivos

- Termociclador
- Micropipetas
- Puntas plásticas
- Tubos plásticos de 1,5 ml
- Tubos de 0,2 ml (para PCR)
- Gradillas
- *Buffer* PCR 10 X
- MgCl₂ 25 mM
- dNTPs 20 mM
- *Primer forward* 10 mM
- *Primer reverse* 10 mM
- Taq ADN polimerasa
- Muestra de ADN
- H₂O desionizada y estéril

ADN

La calidad del ADN influye considerablemente en el producto de la PCR, una muestra impura puede contener inhibidores de la polimerasa, lo que reduce la eficiencia de la reacción. Asimismo, la concentración de la muestra influye fuertemente en los resultados. Por lo general, la cantidad de ADN está supeditada a un rango comprendido entre 0,01-1 ng, para plásmidos, y 0,1-1 µg para ADN genómico, para una reacción de 50 µl. Cantidades bajas, por ejemplo, < 10 ng de ADN genómico, requieren modificaciones específicas de la reacción, tales como cambios en el número de ciclos o el rediseño de los *primers*.

Primers

La mayor parte del éxito de la PCR recae en la secuencia y la concentración de los *primers*, por lo cual, algunas de las directrices que deben tomarse en cuenta son:

- Los *primers* son generalmente de 15 a 30 nucleótidos de longitud, para proporcionar suficiente especificidad.
- El contenido de CG debe ser 40-60%. Los nucleótidos C y G deben estar distribuidos de manera uniforme en toda la longitud del *primer*.
- El *primer* no debe ser complementario consigo mismo, o con otros *primers* incluidos en la reacción, para evitar la formación de horquillas. Deben tenerse en cuenta todos los posibles sitios de complementariedad entre *primers* y el ADN.
- La temperatura de fusión de los *primers* (T_m) debe oscilar entre 55-65 °C (máxima especificidad para uso de temperaturas entre 62 y 65 °C), lo cual está determinado por el contenido de GC y la longitud del *primer*.
- La concentración óptima del *primer* oscila entre 0,1 y 0,6 μM . Concentraciones más altas pueden promover *mispriming* y la acumulación de productos inespecíficos. Bajas concentraciones puede conllevar a un agotamiento antes de que la reacción se haya completado, lo que resulta en una disminución del rendimiento de producto deseado.

MgCl₂

La ADN polimerasa es una holoenzima que requiere de un cofactor para funcionar correctamente, correspondiente al ión de magnesio. Dado que los iones Mg^{2+} forman complejos con dNTPs, *primers* y el ADN, la concentración óptima de MgCl_2 ha de ser seleccionada para cada experimento. Una baja concentración de iones Mg^{2+} dará como resultado un bajo rendimiento de la PCR y una alta concentración aumentará el rendimiento de productos no específicos. El rango recomendado de concentración de MgCl_2 es 1-4 mM.

dNTPs

La concentración de cada dNTP en la mezcla de reacción suele ser de 200 μM . Es muy importante contar con la igualdad de las concentraciones de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ya que la inexactitud de la concentración de dNTPs aumenta la baja fidelidad.

Taq ADN polimerasa

Por lo general, se utilizan 1-1,5 unidades de Taq polimerasa en 50 μl de la mezcla de la reacción. Una cantidad superior de Taq polimerasa puede causar la síntesis de productos inespecíficos. Sin embargo, si hay inhibidores presentes en la mezcla de la reacción (por ejemplo, si el ADN utilizado no es muy purificado), mayores cantidades de Taq ADN polimerasa (2-3 U) son útiles en la obtención de un mejor rendimiento de productos de amplificación.

Procedimiento

Para llevar a cabo varias reacciones simultáneas, se recomienda la preparación de una mezcla primaria, de la cual se partirá para alicuotar cada una de las reacciones individuales, seguido de la adición de las muestras de ADN. Este método minimiza los errores debidos al pipeteo y ahorra tiempo al reducir el número de transferencias de los reactivos.

- 1 Mezclar suavemente todas las soluciones después de haberlas descongelado.
- 2 Preparar la mezcla según el número de muestras, teniendo en cuenta la tabla 5. Mezclar suavemente. Agregar por último la Taq polimerasa.

Tabla 5. Preparación de la mezcla para la reacción de PCR

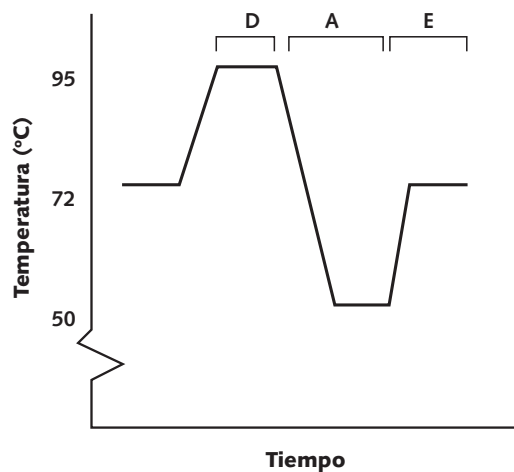
Reactivo	Concentración stock	Concentración final	Volumen para 50 μ l de reacción
H ₂ O desionizada y estéril		-----	Variable
Buffer PCR	10 X	1 X	5 μ l
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	5 μ l
dNTPs	20 mM	0,2 mM	0,5 μ l
Primer forward	10 mM	0,1 mM	0,5 μ l
Primer reverse	10 mM	0,1 mM	0,5 μ l
Taq ADN polimerasa			0,3 μ l
ADN			5 μ l

Fuente: elaboración propia

- 3 Dispensar el contenido de la reacción en tubos para PCR.
- 4 Agregar el ADN a cada tubo PCR correspondiente y el H₂O al control negativo. Mezclar suavemente.
- 5 Colocar los tubos PCR que contienen las muestras en el termociclador (figura 13) e iniciar la PCR. El termociclador es un equipo que permite llevar a cabo de forma automática y reproducible la sucesión de ciclos de temperatura necesarios para la consecución de la PCR.
- 6 Colocar los tubos PCR en la gradilla en el interior (figura 13).
- 7 Programar la duración y temperatura de los ciclos que componen la PCR. La desnaturalización (*D*) de las dos cadenas de ADN se lleva a cabo a una temperatura elevada (cerca de 95 °C), con una duración típica de 15-40 segundos (según el tamaño del ADN). A continuación, la hibridación o *annealing* (*A*) de los *primers* se realiza normalmente entre 40 y 65 °C por 30 segundos (según los *primers*). Por último, se lleva a cabo la reacción de elongación (*E*) catalizada por la ADN polimerasa cuya temperatura optima es de 72 °C, con un tiempo de duración dependiente del tamaño del fragmento de ADN que se desea amplificar, así por cada 1 Kpb se programa 1 minuto de elongación (figura 14).

8. Resultado. Correr los productos obtenidos en un gel de agarosa (véase protocolo de electroforesis, capítulo “Extracción de ADN y electroforesis”). Se pueden presentar los siguientes casos:
- Inespecificidad: puede ser por una temperatura de hibridación de los *primers* muy baja.
 - Dimerización de *primers*: *primers* complementarios que se dimerizan impidiendo la efectividad de la amplificación.
 - Barrido, inespecificidad o degradación del DNA plantilla.
 - Tamaño no esperado: *primers* mal diseñados o contaminación.
 - Tamaño y especificidad esperadas.
 - Negativo (no debe amplificar, ya sea porque no se incorporaron los *primers* o el ADN plantilla).

Figura 14. Representación de la PCR. Se evidencian los procesos de desnaturalización (D), hibridación o *annealing* (A) y elongación (E).

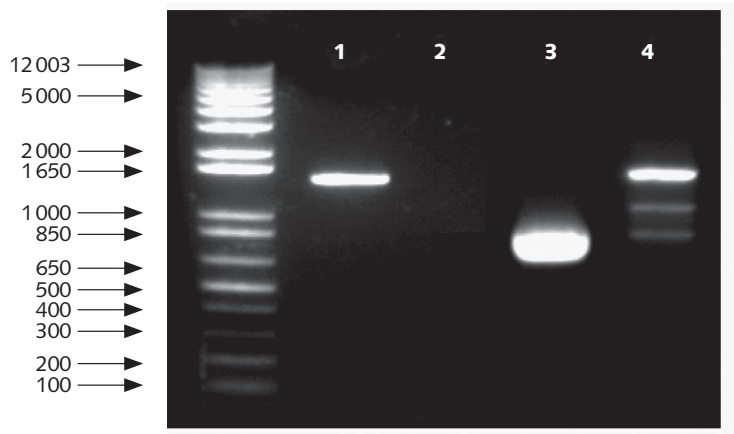


Cuestionario

- 1 ¿Qué otros tipos de ADN polimerasa son utilizados y cuáles son sus propiedades?
- 2 ¿Qué factores causan el *mispriming* y la dimerización de *primers* y cómo puede remediarse este hecho?
- 3 ¿Qué componentes le atribuyen la versatilidad a la técnica del PCR y en qué forma?
- 4 ¿Qué programas de *software* se encuentran disponibles para el diseño de *primers*? Diseñar los *primers* para un gen que se encuentre reportado en una base de datos. Diseñar los *primers* para otro gen sin emplear estas herramientas de bioinformática.

- 5 Asumiendo que las cuatro muestras representadas en la figura 15 son el resultado de reacciones de PCR independientes, pero realizadas a partir de la misma muestra, siendo el resultado esperado correspondiente al observado en la muestra 1, explicar cada uno de los casos detalladamente.
- 6 Mencionar cinco ejemplos de los usos y aplicaciones que se le pueden atribuir a la técnica PCR.
- 7 Mencionar las ventajas y desventajas de esta técnica.

Figura 15. Resultado obtenido a partir de una PCR.



Bibliografía

- Fermentas. Protocol for PCR Using *Taq* DNA Polymerase. <http://www.fermentas.com/techinfo/PCR/dnaamplprotocol.htm>.
- Lewin, B. *Genes IX*. Londres: Oxford University Press/. 2008.
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, L. S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. *Molecular Cell Biology* (4th ed.). New York: Scientific American Books. 2000.
- Roche Diagnostics Corporation. PCR Reaction Components. http://www. Roche-applied-science.com/pcr/application_hints_01_1c.htm
- Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- Tagu, D.; Moussard, C. *Fundamentos de las técnicas de biología molecular*. Zaragoza: Acribia. 2003.

Capítulo 5

Bioinformática

ÁLVARO PÉREZ¹

RAFIK NEME²

CAMILO LÓPEZ³

Introducción

La bioinformática es una nueva y emocionante disciplina situada en el campo de la biología, cuyas herramientas se han vuelto cada vez más indispensables en muchas otras áreas. Actualmente se encuentra en el centro de algunos de los más importantes desarrollos de la biología como el desciframiento de genomas, el desarrollo de la biología de sistemas y de la biotecnología, entre otros temas. En un sentido amplio, la bioinformática, más estrictamente la bioinformática molecular, consiste en el desarrollo y uso de técnicas matemáticas, estadísticas y computacionales para ayudar a resolver problemas de biología molecular.

Las aplicaciones de la bioinformática en la biología molecular son muchas. Uno de los principales usos y retos de esta disciplina es la organización y almacenamiento de la información. La producción de secuencias en distintos laboratorios alrededor del mundo (de ADN, ARN, proteínas) aumenta exponencialmente a diario, y es cada vez más necesario que esta información sea procesada rápidamente, organizada, y que sea fácilmente accesible. Actualmente, existen muchas bases de datos especializadas en distintos tipos de secuencias e información, la mayoría de libre acceso. Al final de este capítulo se sugieren algunas de las más importantes.

Esta información debe ser posteriormente analizada, y en este punto, se diversifican enormemente las aplicaciones de la bioinformática. Algunos ejemplos son: alineamientos de secuencias, búsqueda de marcos de lectura, predicción de genes, anotación de genomas, diseño de *primers*, análisis de diversidad genética, predicción de estructuras secundarias y terciarias de

1 Biólogo. Estudiante de maestría, Universidad Nacional de Colombia.

2 Biólogo, Universidad Nacional de Colombia. Estudiante de doctorado, Max Planck Institute, Alemania.

3 Biólogo. Profesor del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Lidera el grupo de investigación Manihot Biotec.

proteínas, predicción de interacciones entre biomoléculas, modelamiento de redes metabólicas, etcétera.

En este capítulo se examinarán brevemente algunas herramientas bioinformáticas de rutina para la biología molecular. Se explorará el NCBI GenBank, la base de datos de información biológica más utilizada; se realizarán alineamientos pareados de secuencia con la herramienta Blast; alineamientos múltiples de secuencias con ClustalW; y se diseñarán *primers* para PCR utilizando Primer3.

Exploración de NCBI (GenBank y otras herramientas)

Muchas de las herramientas y bases de datos que se encuentran disponibles actualmente, están construidas de manera que su exploración es bastante intuitiva. Si el usuario reconoce la terminología y el tipo de información que se le está mostrando, podrá hacer un uso casi inmediato de dicha herramienta. Para ejemplificar esta situación, se ha escogido la base de datos de genes norteamericana, mejor conocida como el GenBank. Esta base de datos hace parte del Centro de Información Biotecnológica Nacional de Estados Unidos (NCBI), y en este mismo centro es posible hacer uso de herramientas tanto o más interesantes que el mismo GenBank.

- 1 Ingresar al NCBI (véase: www.ncbi.nlm.nih.gov).
- 2 Observar el entorno de usuario. Revisar los tipos de búsqueda que se pueden hacer. En la parte izquierda se observan distintas herramientas y recursos organizados según distintos criterios. ¿Se reconoce alguna? ¿Se conoce para qué sirven?
- 3 Dirigirse a la base de datos molecular (véase: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/>) y analizar las distintas opciones que se brindan. Ubicar el GenBank dentro de estas bases de datos.
- 4 Volver a la base de datos molecular y seleccionar Entrez (o ir a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery>).
- 5 Observar las distintas opciones que componen Entrez. Hacer *click* en la ayuda de las opciones que sean de interés.
- 6 En la caja de búsqueda introducir un término biológico de interés (por ejemplo, *toxoplasma*, *rubisco*, *cytochrome oxidase*. Nota: dado que la base de datos está en inglés, es obligatorio que aquellos términos que requieran traducción estén correctamente escritos.
- 7 Seleccionar PubMed y observar qué artículos existen actualmente sobre el término de interés.
- 8 Volver a Entrez y seleccionar Nucleotide.
- 9 Hacer *click* en la primera entrada y observar su contenido. Analizar las diferentes opciones en la parte superior: tipos de formato, formas de descarga de datos o las publicaciones relacionadas con la entrada.

- 10 Solicitar al portal mostrar la entrada en formato Fasta y hacer *click* en *download* (descargar).
- 11 Volver a la página de Entrez y buscar genes de interés (preferiblemente los relacionados unos con otros). Repetir los pasos que se consideren necesarios hasta descargar entre tres y seis secuencias en formato Fasta. Guardar estas secuencias como EjemploADN1.FASTA, EjemploADN2.FASTA, etcétera.
- 12 Repetir los pasos que se consideren necesarios para descargar las secuencias de proteínas de interés de la base de datos Protein. Guardar estas secuencias como EjemploProtein1.FASTA, EjemploProtein2.FASTA, etcétera.

Para ilustrar cómo se lee una entrada (o *accesión*) de una secuencia, existe un archivo de ayuda disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sitemap/samplerecord.html>.

Alineamientos de secuencias

Basic Local Search Alignment Tool (Blast)

Emplear BlastN para hacer una búsqueda nucleótido-nucleótido

- 1 Visitar la dirección electrónica: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- 2 Seleccionar nucleotide blast.
- 3 Insertar la secuencia de búsqueda usando la opción *examinar* y hallando el archivo EjemploADN1.FASTA, o copiando la secuencia de este archivo en el espacio. Si se desea puede darse un título a la búsqueda en la opción *Job Title*.
- 4 En *database* seleccionar *Nucleotide collection (nr/nt)*.
- 5 En *program selection*, utilizar *Highly similar sequences (megablast)*.
- 6 Hacer *click* en Blast.

¿Qué secuencia produjo el mejor alineamiento? ¿A qué organismo pertenece? ¿Cuánto es el E-value? ¿Cuántas secuencias se alinearon con la secuencia insertada? ¿Son de distintos organismos?

Parámetros de Blast

- 7 Repetir los pasos 1 al 3

A partir de ahora se puede optar por modificar la búsqueda anterior para delimitar o ampliar sus resultados.

Choose search set

- A Se puede reducir la búsqueda a bases de datos menos generales que *nucleotide collection*, como las bases de datos genómicas, las bases *refseq* (bases de datos curadas, poco redundantes) o las bases de EST.
- B En *Organism*, se puede limitar la búsqueda únicamente a un organismo de interés, por ejemplo, *Homo sapiens*, *Dario rerio*, *Escherichia coli*.
- C En *Entrez Query* se puede reducir aún más el campo de búsqueda, limitándolo a los resultados de una búsqueda en el NCBI, colocando, por ejemplo: “Hormone AND receptor NOT pseudogene NOT predicted”. Indicando que solo se buscarán secuencias en cuya descripción aparezcan las palabras *hormone* y *receptor* y no *pseudogene* o *predicted*. “AND, OR y NOT” son operadores booleanos útiles para este tipo de búsquedas, deben ir en mayúsculas.

Program selection

- D Puede experimentarse con los tres tipos de Blast ofrecidos en esta opción. ¿Cómo cambian los resultados?, ¿disminuyen o aumentan?

General parameters

- E En esta sección se puede modificar la cantidad de resultados que se desea que aparezcan, el máximo E-value permitido (valores más bajos significan menos alineamientos debidos puramente al azar) y el Word-size o tamaño de palabra, esto es, la mínima cantidad de nucleótidos que deben estar alineados para obtener un alineamiento positivo.

Scoring parameters

- F En un alineamiento, cada “evento” tiene un puntaje, que es modificable. En *match/mismatch* se modifica la recompensa otorgada por la alineación de dos nucleótidos idénticos y la penalización por nucleótidos contrarios; menores diferencias entre estos dos valores requerirán mayor identidad en los alineamientos.
- G En *gap costs*, se puede variar la penalización que se da a la apertura de un *gap* y a su extensión.

Las diferencias entre la penalización de existencia y la extensión determinarán que se presenten, por ejemplo, muchos *gaps* pequeños (Existence: 0, Extension: 4) o pocos *gaps* de gran extensión (Existence 6: Extension: 2). Nota: la suma de la penalización de los *gaps* debe ser mayor que la de *matches* y *mismatches*, pues se espera que *indels* sean menos frecuentes que sustituciones.

Filters and masking

- H Si se sospecha que la secuencia que se está introduciendo contiene regiones repetitivas o de baja complejidad que pueden arrojar resultados de poco interés biológico (como regiones ricas en leucinas o microsate- lites), se puede dar al programa la opción de ignorarlas.
- I La opción *mask for lookup table only* hace que el programa enmascare estas regiones únicamente en la búsqueda preliminar que el programa realiza.
- J La opción *mask lower case letter* sirve para archivos modificados por los usuarios en que se han colocado en minúsculas aquellas regiones de la secuencia que no son de particular interés.

En el sitio web <http://www.manihot-biotec.unal.edu.co/> puede descargar archivos en formato fasta con secuencias que puede utilizar para realizar los ejercicios.

Ejercicio: buscar un splicing alternativo

- 1 Ir a <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- 2 Seleccionar *nucleotide blast*.
- 3 Insertar la secuencia por buscar usando la opción *examinar* y hallando el archivo EjemploEST1.FASTA.
- 4 Limitar la búsqueda a las bases de datos de EST.
- 5 Modificar los parámetros que se deseen.

¿Se detectó *splicing* alternativo en el gen de estudio? ¿Cómo se evidencia esto?

Emplear BlastP para hacer una búsqueda proteína-proteína

- 1 Ir a <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- 2 Seleccionar *protein blast*.
- 3 Insertar la secuencia de búsqueda usando la opción *examinar* y hallan- do el archivo EjemploProtein1.FASTA o copiando la secuencia.
- 4 Seleccionar *Non-redundant protein sequences* (notar que las bases de datos disponibles son diferentes a las de BlastN).
- 5 Seleccionar *blastp*.
- 6 Hacer *click* en Blast.

Nótese que la salida no difiere mucho de la de BlastN. Si se desea, ahora es posible regresar y cambiar algunos de los parámetros de BlastP.

- 7 Regresar a BlastP y antes de ejecutar Blast, explorar *algorithm parame- ters*.

General parameters y filters and masking

- A Los parámetros generales se pueden describir igual a los de BlastN. Nótese que el *Word-size* para *blastP* es mucho menor, dado que es menos probable encontrar aminoácidos consecutivos alineados que nucleótidos. Los filtros funcionan igual que en BlastN.

Scoring parameters

- B *Matrix* se refiere a una matriz de sustitución de aminoácidos. Es básicamente una matriz de distintas penalizaciones para cambios de aminoácidos en un alineamiento, teniendo en cuenta las probabilidades de que estas ocurran. Estas probabilidades pueden variar de acuerdo con la longitud de la proteína. Comúnmente se utiliza PAM-30 para menores de 35 aa, PAM70 entre 35 y 70 aa, BLOSUM80, entre 50 y 85 aa y BLOSUM 60 para proteínas mayores.

Por explorar...

- Otros tipos de Blast ¿Cuándo utilizarlos?
- Opciones de formatos de Blast.
- ¿Cómo hacer Blast con bases de datos locales?

Alineamientos múltiples de secuencias

CLUSTALW2

- 1 Escoger las secuencias por alinear.
- 2 Determinar en qué formato está cada secuencia y asegurarse de que todas estén en el mismo formato y tipo de secuencia (recordar que no es posible alinear directamente secuencias de aminoácidos con nucleótidos y viceversa).
- 3 Entrar a la página electrónica de CLUSTALW2 (véase <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>).
- 4 Escoger las opciones que mejor se ajusten a las necesidades (si es usuario nuevo, se sugiere usar las opciones por defecto).
- 5 Someter las secuencias al programa. Recordar que se pueden pegar directamente (como formato Fasta) o subir (deben estar en un mismo archivo o multiFasta). Luego de tener las secuencias listas hacer *click* en *run* (ejecutar).
- 6 Esperar un tiempo (depende del número de secuencias) a que los resultados estén listos.
- 7 La salida se interpreta según las opciones suministradas por el programa. Puede ser descargada directamente (o ser enviada a un correo si se selecciona esta opción en el paso).

En el momento de pensar en alineamientos múltiples, es importante tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- Las secuencias se alinean según su identidad y similaridad. Identidad implica la misma entidad molecular (por ejemplo, el mismo aminoácido), y similaridad implica que pueden tener la misma naturaleza química (*verbi gratia*, dos aminoácidos cargados positivamente o dos aminoácidos hidrofóbicos).
- La posibilidad de *gaps* y su extensión (conocidos como Gap Opening y Gap Extension, respectivamente) puede ser más o menos aleatoria en regiones de baja complejidad (por ejemplo, en regiones repetitivas), por lo que debe tenerse cuidado a la hora de interpretar este fenómeno.
- A partir de estos alineamientos múltiples, muchos programas generan árboles de distancia, herramienta fundamental de los análisis filogenéticos. Es necesario conocer correctamente los supuestos en los que se basa uno u otro algoritmo para evitar interpretar erróneamente una salida.
- Existen varios programas gratuitos (BioEdit es uno de estos) que permiten editar manualmente los archivos de alineamientos y reacomodar regiones mal editadas por el programa que los generó.
- Si se desean hacer alineamientos de grandes cantidades de secuencias, es recomendable utilizar las versiones locales de estos tipos de *software*.

Una alternativa al uso de CLUSTALW₂ menos exacta, pero más versátil si se comparan muchas secuencias simultáneamente, es Muscle (véase <http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/>).

Diseño de *primers* usando Primer3

Factores para tener en cuenta al diseñar un primer

- 1 Tamaño óptimo (18 a 24): los *primers* cortos tienen baja especificidad y los largos poca eficiencia de hibridación.
- 2 Temperaturas de fusión (t_m) de ambos *primers* deben ser similares (máximo ± 5 °C uno respecto al otro) y preferiblemente estar entre 55 y 72 °C.
- 3 Contenido de GC entre 45 y 55%.
- 4 Evitar regiones de polinucleótidos (GGGG, AAAAA...).
- 5 Se asegura la hibridación en el extremo 3' si la secuencia termina en G o C (CG clamp).
- 6 No más de tres G's o C's en los últimos cinco nucleótidos.
- 7 Evitar formación de dímeros entre los *primers*.
- 8 Evitar autocomplementariedad de los *primers*.

- 9 Al realizar la PCR, la temperatura de hibridación o de anillamiento debe estar entre 5 y 8 °C debajo de la temperatura de fusión (t_m).

Procedimiento

- 1 Ingresar a <http://frodo.wi.mit.edu/>
- 2 Copiar la secuencia del archivo EjemploADN1.FASTA en el primer recuadro de la página.
- 3 Verificar que las casillas *pick left primer* y *pick right primer* estén chequeadas.
- 4 Sin modificar aún ningún parámetro seleccionar *Pick primers*.
- 5 Observar los *primers* arrojados, ¿cumplen con los criterios mencionados?
- 6 Regresar a la página principal.
- 7 Modificar los parámetros que se deseen. Sugerencias: ajustar el rango de tamaño deseado del *primer* para que cubra una mayor parte de la secuencia, ajustar *general primer picking conditions* de acuerdo con los parámetros mencionados, cambiar GC clamp de 0 a 1.
- 8 ¿Cómo cambian los *primers* arrojados de acuerdo con los parámetros?

Por explorar...

- 1 Realizar un BlastN de los *primers* arrojados.
- 2 ¿Los *primers* hibridan con alguna otra secuencia del organismo de interés? ¿Qué problemas representaría esto?

Otras bases de datos por explorar

- DNA Database of Japan (DDBJ): equivalente japonés del GenBank. Secuencias de DNA, RNA y proteínas. Véase: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/searches-e.html>
- Nucleotide Sequence Database (EMBL): equivalente europeo del GenBank. Secuencias de DNA, RNA y proteínas. Véase: <http://www.ebi.ac.uk/embl/>
- ENSEMBL: base de datos de genomas completos y anotados de vertebrados y algunos eucariotas modelo. Véase: <http://www.ensembl.org/index.html>
- Life Science Directory EXPASY: directorio de bases de datos biológicas. Véase: <http://www.expasy.ch/links.html>
- Gene Ontology: clasificación de genes anotados de acuerdo con su función. Véase: <http://www.geneontology.org/>
- GoBase: base de datos de genomas de organelos (plastos y mitocondrias). Véase: <http://gobase.bcm.umontreal.ca/>

- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG): base de datos general de genes, genomas, proteínas e interacciones. Véase: <http://www.genome.jp/kegg/kegg1a.html>
- OMIM: genes humanos relacionados con distintos fenotipos. Véase: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>
- Protein Data Bank (PDB): proteínas con estructuras terciarias comprobadas experimentalmente. Véase: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- Pfam: familias de proteínas organizadas gracias a alineamientos múltiples resultado de modelos ocultos de Markov. Véase: <http://pfam.sanger.ac.uk/>
- Prints: *fingerprints* de proteínas para asignar familias y atributos funcionales a secuencias. Véase: <http://www.bioinf.manchester.ac.uk/db-browser/PRINTS/index.php>
- Uniprot: secuencias y estructuras de proteínas. Véase: <http://www.uniprot.org/>

ANEXO

Preparación de soluciones *stock*

TAE 50 X

Para preparar 1000 ml de solución, mezclar:

- Base Tris 242 g
- Ácido acético glacial 57,1 ml
- EDTA 0,5 M pH 8,0 100 ml

Disolver y completar un volumen de 1000 ml con H₂O destilada. Diluir hasta la concentración de trabajo; una solución de TAE 1 X está compuesta de Tris-acetato 40 mM/EDTA 1 mM.

Buffer de carga 6X (*blue juice*)

Mezclar los siguientes reactivos en las concentraciones finales indicadas:

- 0,25% (p/v) azul de bromofenol
- 0,25% (p/v) xylene cyanol FF
- 30% (v/v) glicerol en H₂O

Almacenar a temperatura ambiente o a 4 °C.

Bromuro de etidio 10 mg/ml

- Bromuro de etidio 1 g

Disolver en 100 ml de H₂O. Agitar con agitador magnético por varias horas para asegurar que el bromuro se disuelva. Cubrir el contenedor con papel de aluminio o mantener la solución en una botella oscura. Almacenar la solución de bromuro de etidio 10 mg/ml a temperatura ambiente.

IPTG (isopropil-β-D-galactósido) 20% (p/v, 0,8 M)

Para preparar 10 ml de solución, pesar:

- IPTG 2 g

Disolver en 8 ml de H₂O destilada. Ajustar el volumen de la solución a 10 ml con H₂O y esterilizar pasándola por un filtro de 0,22 μm. Almacenar en alícuotas de 1 ml a -20 °C.

X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) 2% (p/v) o 20 mg/ml

Agregar 20 mg y disolver en 1 ml de N,N'-dimetilformamida. Utilizar un tubo de vidrio o polipropileno y envolverlo en papel de aluminio, ya que el X-gal se degrada con la luz. Almacenar la solución a -20 °C. El X-gal no necesita ser esterilizado por filtración.

Ampicilina

Para preparar una solución *stock* de ampicilina 1000 X se debe utilizar una concentración de 100 mg/ml, de esta forma en el momento de preparar medios que necesiten una concentración de ampicilina de 100 µg/ml solo será necesario adicionar 1 µl de solución de ampicilina por cada mililitro de medio. Almacenar la solución a -20 °C.

LB líquido

Para preparar 1000 ml de solución, pesar:

- Bactotriptona 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 5 g

Disolver y ajustar pH a 7,0, completar a un volumen de 1000 ml con H₂O destilada o desionizada. Esterilizar por 15 minutos a 120 °C.

LB agar

Para preparar 1000 ml pesar:

- Bactotriptona 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 5 g
- Agar 15 g

Disolver y ajustar el pH a 7,0; completar a un volumen de 1000 ml con H₂O destilada o desionizada. Esterilizar por 15 minutos a 120 °C.

LB agar-X-Gal-IPTG

Esterilizar LB agar, autoclavando por 15 minutos a 120 °C, y dejar enfriar hasta una temperatura no menor a 50 °C. En cámara de flujo, adicionar X-Gal (concentración final de 80 µg/ml) e IPTG (concentración final 0,5 mM). Si se necesita agregar ampicilina, se le adiciona de la misma manera con concentración final de 100 µg/ml.

Acetato de potasio 3 M

Para preparar 1000 ml de solución, pesar:

- Acetato de potasio anhidro 294,45 g

Disolver y completar a un volumen de 1000 ml con H₂O destilada.

Acetato de potasio 5 M

Para preparar 1000 ml de solución, pesar:

- Acetato de potasio 490,75 g

Disolver y ajustar el pH a 7,5 con ácido acético glacial, completar a un volumen de 1000 ml con H₂O destilada. Esterilizar por 15 minutos a 120 °C.

Acetato de sodio 3 M

Para preparar 1000 ml de solución, pesar:

- Acetato de sodio 408,1 g

Disolver y ajustar el pH a 5,2 con ácido acético glacial, completar a un volumen de 1000 ml con H₂O destilada. Esterilizar por 15 minutos a 120 °C.

Glucosa 1 M

Para preparar 100 ml de solución, pesar:

- Glucosa 18 g

Disolver y completar a volumen de 100 ml con H₂O desionizada. Esterilizar pasando la solución a través de un filtro de 0,22 µm.

NaOH 10N

Para preparar 200 ml de solución, pesar:

- NaOH 80 g

Disolver y completar a un volumen de 200 ml con H₂O desionizada.

Tris-HCl 1M

Precaución: el HCl es un ácido fuerte, debe trabajarse en cámara de extracción, con guantes; evítese respirar los vapores.

Para preparar 1000 ml de solución, pesar:

- Tris-base 121,1 g

Disolver y ajustar el pH a 8,0 con 42 ml de HCl concentrado. Completar el volumen a 1000 ml con H₂O destilada. Con ácido acético glacial, completar a un volumen de 1000 ml con H₂O destilada. Esterilizar por 15 minutos a 120 °C.

KCl 500 mM

Para preparar 100 ml de solución, pesar:

- KCl 3,72 g

Disolver y completar a un volumen de 100 ml con H₂O desionizada. Esterilizar por 15 minutos a 120 °C.

EDTA 500 mM pH 8,0

Para preparar 1000 ml de solución, pesar:

- EDTA 186,1 g
- NaOH 18 g

Disolver y ajustar el pH a 8,2, completar a un volumen de 1000 ml con H₂O desionizada. Esterilizar por 15 minutos a 120 °C.

NaCl 5 M

Para preparar 1000 ml de solución, pesar:

- NaCl 292,2 g

Disolver y completar a un volumen de 1000 ml con H₂O desionizada. Esterilizar por 15 minutos a 120 °C.

TE buffer

Para preparar 500 ml de solución, mezclar:

- Tris-HCl pH 8,0 5 ml
- EDTA 0,5 M 1 ml

Completar a un volumen de 500 ml con H₂O destilada. Esterilizar por 15 minutos a 120 °C. Almacenar a 4 °C.

ARNasa 10 mg/ml

- ARNasa 10 mg/ml
- Tris-HCl pH 7,5 10 mM
- NaCl 15 mM

Disolver a temperatura de ebullición durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente. Dispensar en alícuotas y almacenar a -20 °C.

Glicerol 10%

Para 100 ml de glicerol 10% (V/V), añadir:

- Glicerol puro 10 ml

Completar a un volumen de 100 ml con H₂O destilada. Esterilizar por 15 minutos a 120 °C.

CaCl₂ 2,5 M

Para preparar 200ml de solución, pesar:

- CaCl₂•6H₂O 11 g

Disolver y completar a volumen final con 20 ml de H₂O destilada. Esterilizar la solución pasándola por un filtro de 0,22 µm. Almacenar en alícuotas de 1 ml a 4 °C.

SDS 20%

Para preparar 1000 ml de solución, pesar:

- SDS 200 g

Disolver en 800 ml de H₂O destilada. Cuando esté completamente disuelto llevar hasta 1000 ml. Esterilizar pasando la solución a través de un filtro de 0,22µm.

Buffer PCR 10 X

Para preparar 50 ml de solución, mezclar:

- KCl 500 mM
- Tris-HCl 100 mM pH 8,8
- Triton X-100 1%

MgCl₂ 1M

Para preparar 100 ml de solución, pesar:

- MgCl₂ 8,5 g

Disolver y completar el volumen a 100 ml con H₂O desionizada. Esterilizar por 20 minutos a 120 °C.

dNTPs 40 mM

Para preparar 100 µl de una mezcla de dNTPs con concentración final 40 mM (10 mM de cada uno), añadir en un tubo de 200 µl los siguientes componentes:

- dATP 10mM 10 µl
- dGTP 10 mM 10 µl
- dCTP 10 mM 10 µl
- dTTP 10 mM 10 µl
- H₂O libre de nucleasas 60 µl

Solución I para lisis alcalina

Para preparar 250 ml de solución, mezclar:

- Glucosa 1 M 12,5 ml
- Tris-HCl 1 M pH 8,0 6,25 ml
- EDTA 0,5 M pH 8,0 5 ml

Completar a volumen final de 250 ml con H₂O desionizada. Esterilizar por 15 minutos a 120 °C. Almacenar a 4 °C.

Solución II para lisis alcalina

Para preparar 100 ml de solución, mezclar:

- NaOH 10N 2 ml
- SDS 20% (p/v) 5 ml

Completar a volumen final de 100 ml con H₂O desionizada. Preparar Solución II fresca a partir de soluciones *stock* y usarla a temperatura ambiente.

Solución III para lisis alcalina

Para preparar 100ml de solución, mezclar:

- Acetato de Potasio 5 M 60,0 ml
- Ácido acético glacial 11,5 ml
- H₂O desionizada 28,5 ml

La solución resultado es 3 M con respecto al potasio y 5 M respecto al acetato. Almacenar la solución a 4 °C.

LiCl 8M

Para preparar 50 ml de solución, pesar:

- LiCl 16,96 g

Disolver en 50 ml con H₂O DEPC (H₂O libre de ARNasas).

Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)

Precaución: no inhalar los gases, realizar el procedimiento en cámara de extracción.

Para preparar 50 ml de solución, mezclar:

- Cloroformo 48 ml
- Alcohol isoamílico (3-metil-1-butanol) 2 ml

Cubrir el recipiente con papel aluminio y almacenar a 4 °C.

Fenol ácido: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1)

Precaución: no inhalar los gases, realizar el procedimiento en cámara de extracción.

El fenol ácido usualmente se comercializa ya mezclado con cloroformo y alcohol isoamílico. Dependiendo de las proporciones iniciales se requerirán diferentes cantidades para alcanzar las proporciones 24:24:1.

Partiendo de fenol ácido : cloroformo : alcohol isoamílico en proporción 125:24:1 (pH = 4,5± 0,2), mezclar:

- Fenol ácido : cloroformo : alcohol isoamílico 125:24:1 25 ml
- Cloroformo 16,8 ml
- Alcohol isoamílico 0,8 ml

Cubrir el recipiente con papel aluminio y almacenar a 4 °C.

**Fundamentos y técnicas básicas
en biología molecular**

Se terminó de imprimir digitalmente en noviembre de 2011
en la **Editorial Universidad Nacional de Colombia**.

En su composición se utilizaron caracteres *Minion Pro*
& *Syntax*. Formato 16,5 x 24 cm, páginas interiores
en bond de 75 g y carátula en propalcote de 240 g.

Se imprimieron 300 ejemplares en Bogotá, Colombia

