

Biología: Ingeniería Genética

Alfredo Sánchez Villarreal, alsanchez@ira.cinvestav.mx

Este curso-taller tiene como propósito mostrar de manera teórica y práctica algunos principios básicos de biología molecular e ingeniería genética. Conocerás qué es el DNA y su importancia en la vida de todo organismo en este planeta. Aprenderás técnicas moleculares que han revolucionado la manera de hacer investigación en biología, con las que podrás desde extraer y manipular DNA de bacterias hasta construir un organismo transgénico (genéticamente modificado). Durante este curso visitarás la Unidad de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N., en el cual realizarás un análisis molecular que te permitirá detectar la presencia de plantas transgénicas. Por último, tendrás la oportunidad de convertirte en un detective para descubrir la identidad de un asesino...

Curso de Biología Molecular

CINVESTAV, Irapuato

Práctica núm. 1: "El curandero de la Selva"

INTRODUCCIÓN:

Es bien sabido que la riqueza de la biodiversidad de un bosque tropical, representa una fuente inexplorada de posibles sustancias útiles al ser humano. Los bosques tropicales han servido desde hace siglos como las "farmacias" naturales a las que recurren los habitantes de esas zonas. Este conocimiento empírico ha sido recopilado por una rama de la biología llamada Etnobotánica, esta rama de la Ciencia busca probar si las plantas usadas por los habitantes de cierta región, pudieran poseer realmente las sustancias activas responsables de curar el padecimiento para el cual son usadas. Para ello, se busca establecer contacto con las comunidades y mediante su conocimiento se colectan plantas y otros materiales biológicos anotando el uso que se les da. Por ejemplo, si se trata de una planta hay que identificarla hasta género y especie, se debe anotar la región donde se colecta, si existe alguna fecha del año en que su eficacia es mayor o si solo se consigue en determinadas fechas. Además hay que saber como se prepara para ser suministrada al paciente, digamos: preparando infusiones, tés, ungüentos, etc. Posteriormente comienzan los estudios fitoquímicos, en estos se busca aislar distintas sustancias que generalmente forman parte de los metabolitos secundarios de la planta (sustancias no esenciales pe. compuestos aromáticos.) y cada uno de ellos de probará por separado para saber si poseen una actividad bactericida por ejemplo. A veces en estos estudios se descubre que el principio activo no es producido directamente por la planta, en ocasiones se trata de sustancias que se producen por organismos que viven en la planta o que tienen en algún momento contacto con ella. Una vez identificado el organismo responsable de la producción del

medicamento potencial, lo que sigue es identificar el o los genes responsables de producir tal sustancia. mediante técnicas de Biología Molecular se aíslan esos genes y se clonan en organismos que sean más fáciles de manipular, o de los que sea más fácil extraer la sustancia activa por ejemplo bacterias o levaduras.

ANTECEDENTES* DE ESTA PRÁCTICA

* Algunos hechos (todos) de esta práctica son ficticios y fueron diseñados solo con fines didácticos.

En el mercado de Sonora, en la Ciudad de México un estudiante de Biología que realizaba encuestas etnobotánicas como parte de su tesis descubrió un hecho que no pudo dejar pasar: Un tendero de aspecto extraño le dijo que podía preparar un medicamento mágico, sin sospechar lo que iba a encontrar accedió a entrar a su local. Aquel sitio estaba lleno de objetos de brujería, distintas yerbas, olores y una iluminación con lámparas ultravioleta. El "curandero" sacó entonces una botella que brillaba en sus manos. Aquel medicamento era capaz de curar la diarrea y distintos malestares. El estudiante persuadió al personaje para que le mostrara cómo se preparaba la bebida. Después de recibir una "ayuda monetaria" le dejó observar creyendo el que su secreto se encontraba a salvo. En una olla con algo que parecía ser caldo de res, añadía un poco de una yerba seca, revolvía y dejaba en reposo hasta que fermentaba, curiosamente el fermento era vigilado y conforme pasaba el tiempo aparecía aquel brillo misterioso, el brillo en el caldo se observaba cuando era iluminado con luces ultravioleta. Cuando alcanzaba cierto nivel de brillantez se hervía el fermento y listo!!!. El estudiante le pidió una muestra de aquella planta y por supuesto el hombre se negó. Sólo pudo comprar una muestra del jarabe. Ya en el laboratorio de su escuela el estudiante y su tutor analizaron la muestra y pudieron aislar una proteína fluorescente que mostraba una potente actividad bactericida. Sólo se pudo concluir que por el hecho de que el caldo al inicio no presentaba brillo y después de añadir la planta el brillo aparecía en 24 hrs se pensó que posiblemente un microorganismo que crecía en aquella planta pudo haber sido cultivado en un medio como era el caldo de res, y que ese microorganismo pudiera ser responsable de la producción de esa proteína fluorescente. No se sabe nada más.

Unos años después y sin poder revelar la fuente se te entrega una muestra de esa planta misteriosa.

TU OBJETIVO:

- Identificar si en esta muestra existe un microorganismo responsable de conferir la fluorescencia al jarabe.

SI FUERA EL CASO PUEDES:

- Aislar al microorganismo.
- Obtener el material genético en el que está codificada la información para la producción de la proteína fluorescente.
- Clonar el gen o genes en una bacteria de laboratorio. (*Escherichia coli*).

PROCEDIMIENTOS:

DIA UNO

Al material vegetal que se te proporcionó en un tubo de 50 ml agrégale 5 ml de medio líquido de cultivo. Agita bien y toma 5, 50 y 200 μl de la solución para sembrarlas en cajas petri con medio de cultivo rico.

Incubar a 37°C toda la noche.

DIA DOS

Verificar con una lámpara de luz ultravioleta si alguna de las colonias que crecieron poseen la famosa fluorescencia verde.

Si encontraste alguna con tales características resiébrala en una caja nueva.

Para la obtención del ADN bacteriano se deben inocular 3 ml de caldo de cultivo; utiliza la misma colonia bacteriana que escogiste para la resiembra.

Incubar el tubo toda la noche a 37°C.

DIA TRES

Transfiere el cultivo a tubos eppendorf de 1.5 ml. Centrifuga a 8 Krpm 10 minutos, decanta el sobrenadante hasta dejar aproximadamente 200 μl de medio. Resuspende la pastilla bacteriana. Añade 200 μl de la solución de lisis (**TENS**) revuelve muy gentilmente volteando el tubo lentamente unas cinco veces e incuba a temperatura ambiente 10 minutos. Añade 300 μl de la solución de precipitación (**Acetato de amonio 7.5M**) y agita lentamente otra vez. Incuba en hielo 10 minutos. Centrifuga nuevamente y transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo. Agrega 400 μl de isopropanol, incuba a temperatura ambiente 10 minutos. Centrifuga una vez más. Agrega 500 μl de etanol al 70%, agita suavemente, desecha el etanol y deja secar la pastilla de ADN con la boca del tubo sobre papel higiénico durante 5 minutos. Resuspende el ADN en 50 μl de solución de almacenamiento.

DIA CUATRO

Para analizar las muestras de ADN que extrajiste debes cortarlas, ya que algunas moléculas son muy grandes y pueden ser fragmentadas por ciertas proteínas llamadas endonucleasas, toma 10 μl de tu muestra y añádeles 1 μl de endonucleasa (**Hind III**), incuba en el horno de microondas 10 segundos a máxima potencia tres veces con periodos de descanso de dos minutos entre cada incubación. Para verificar si hubo cortes en tu muestra de ADN lo debes separar de acuerdo a tamaños por medio de un gel de electroforesis.

Prepara un gel de electroforesis usando agarosa al 0.8% y buffer TAE. Para ello mezcla 10 ml de TAE y 80 mg de agarosa, fúndelos en el horno de microondas y forma el gel vaciando la agarosa fundida sobre un portaobjetos evitando que se tire (se ocupan aproximadamente 5 ml) Coloca el peine para formar los pozos antes de vaciar la agarosa. Toma 3 μl de tus muestras de ADN (intacta y cortada) y añádeles 3 μl de buffer de carga, carga en el gel 3 μl de dicha mezcla

tus muestras y córrelas hasta que el colorante llegue hasta $\frac{3}{4}$ partes del gel. Tiñe el gel y observa el ADN.

Para clonar el ADN que contiene el gen de la fluorescencia de debe hacer lo siguiente: Añade entre 1 y 10 μl del ADN que obtuviste a un tubo con células receptoras. A modo de experimento control toma un tubo de células receptoras y añádeles solo agua (el mismo volumen que añadiste del ADN) Incuba en hielo 30 minutos, después debes incubar a 42C 2 minutos y luego en hielo nuevamente durante cinco minutos. Añade al tubo con las células receptoras 1 ml de medio ric. Incuba a 37C media hora. Toma 200 μl del cultivo y siémbrales en cajas petri con medio rico .Incuba toda la noche a 37°C.