Taller de Ciencia para Jóvenes 2014

**Visita al CINVESTAV**

**25 de Julio 2014**

**Horario de actividades:**

9:30 AM Llegada al Cinvestav

9:30-11:00 AM A. Extracción de DNA

B. PCR del gen 16S ribosomal de DNA de bacterias aisladas de Cuatrociénegas, Coahuila

C. Análisis de resultados (centro de computo LANGEBIO)

11:00AM-12:30 PM Visita a las instalaciones de Langebio

12:30AM-1:00 PM RECESO

1:00 PM-1:30 PM Platica "La Biodiversidad de Cuatrociénegas, Coahuila"

.

1:30-3:00 PM B. Extracción de DNA

C. PCR del gen 16S ribosomal de DNA de bacterias aisladas de Cuatrociénegas, Coahuila

A. Análisis de resultados (centro de computo LANGEBIO)

3:00PM FOTO DE GRUPO

3:00PM-4:30PM COMIDA

4:30-6:00PM C. Extracción de DNA

A. PCR del gen 16S ribosomal de DNA de bacterias aisladas de Cuatrociénegas, Coahuila

B. Análisis de resultados (centro de computo LANGEBIO)

6:00PM-7:00PM PRESENTAN RESULTADOS

7:30 PM Regreso a Guanajuato

Introducción

¿Cómo identificamos bacterias?

Las **bacterias son** **microorganismos unicelulares que miden tan solo unos micrómetros de largo.** Son los organismos más abundantes que hay en el planeta encontrándose en todo hábitat de la tierra y además son muy diversas. La salinidad, temperatura, pH, concentración de oxígeno, etc. del ambiente pueden determinar la distribución y abundancia de las diferentes “especies” de bacterias. El valle de Cuatrociénegas, Coahuila es un buen modelo para determinar la relación entre diversidad con respecto a las condiciones y recursos, por lo que se ha realizado un muestreo de bacterias que nos interesa identificar.

Para identificar bacterias de algún ambiente primero tenemos que colectarlas; una vez en el laboratorio rompemos su pared celular y la membrana plasmática para extraer únicamente el DNA, que es el material genético de las células y es el que determina las características de los seres vivos. La molécula de DNA está formada por compuestos químicos llamados nucleótidos. Existen cuatro tipos de nucleótidos: adenina, timina, citosina y guanina. El DNA de una bacteria puede contener hasta 300 millones de nucleótidos. Para identificar bacterias solo usamos una pequeña porción del DNA, un gen llamado “16S” que tan solo tiene 1500 nucleótidos.

Para obtener el gen “16S” utilizamos una técnica de biología molecular llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que nos permite hacer muchas copias de cualquier gen. La reacción de PCR consiste en agregar a un tubo:

1. Una pequeña fracción de DNA
2. DNA polimerasa la molécula encargada de sacar las copias.
3. Dos iniciadores que le indican a la DNA polimerasa cual es el fragmento que se va a copiar. Para la identificación de bacterias se usan iniciadores específicos para el gen “16S”.
4. Nucleótidos que son los ladrillos para construir nuevos fragmentos de DNA.



Así pues, la reacción de PCR amplificará un millón de veces el gen “16S”. ¿Cómo se detecta el gen amplificado? Se utiliza una técnica que consiste en separar el fragmento de DNA en una matriz de gel y posteriormente teñir el DNA para poder verlo directamente. Este el el método de electroforesis cuyo procedimiento se describe más adelante.

¿Para que me sirve tener amplificado el gen “16S” ? Este gen es una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales de modo que si leemos la secuencia de los 1500 nucleótidos, es decir el orden de las adeninas, timinas, citosinas y guaninas y comparamos estas secuencias, en amplias bases de datos que existen para el “16S”, podemos obtener información taxonómica.

Para esta práctica recibirán muestras de DNA provenientes de aislados bacterianos de Cuatrociénegas, Coahuila. Ustedes deberán realizar el PCR con estos DNAs y mediante análisis bioinformático de la secuencia de DNA del producto de este PCR podrán determinar la clasificación taxonómica del aislado. (Dado que no habría tiempo de secuenciar el producto el mismo día de la práctica, se les dará la secuencia de un producto obtenido con anterioridad).

**Uso de micropipetas**

#### Introducción

Por diversas razones, en el laboratorio se utilizan cantidades y volúmenes muy pequeños que requieren el uso de equipo especializado como son las micropipetas. Estas se usan para dispensar volúmenes muy pequeños de líquidos con la mayor exactitud posible. La intención de esta práctica es que te familiarices con las micropipetas, pues las vas a necesitar en la práctica de PCR.

Las micropipetas más comunes miden volúmenes de 1 ml (1000 l) o menos y son las siguientes:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Modelo** | **Rango de volumen** | **Punta** |
| P2 | 0.2 a 2 l | blanca |
| P20 | 2 a 20 l | amarilla |
| P200 | 20 a 200 l | amarilla |
| P1000 | 100 a 1000 l | azul |

1 ml= 1,000 l = 1 cm3

#### Materiales

Puntas amarillas

Micropipetas 20 l y 200 l

Recipiente con agua

Tubos Eppendorf

Recipiente para desechos de puntas

#### Protocolo

**1**. Elegir la micropipeta adecuada para 100 ul

Seleccionar el volúmen (100 ul)

Ponerle la punta adecuada

**2**. Tomar el líquido con la punta de la micropipeta

Presionar (solo hasta el primer tope) el pistón superior con el dedo pulgar y mantenerlo presionado mientras se sumerge el extremo de la punta en el recipiente con agua. ¡Sólo el extremo de la punta debe estar sumergido!

Suelta despacio el pistón y observa como entra el agua en la punta

**3**. Ahora transfiere el líquido a un tubo Eppendorf:

Coloca la punta de la micropipeta dentro del tubo Eppendorf al cual vas a transferir el agua. Presiona suavemente el pistón hasta que sientas el primer tope y presiona aún más para vencer esta resistencia y expulsar el líquido.

Ahora elimina la punta en el recipiente que se te dio para este fin, colocando encima del recipiente la punta y presionando el pistón ubicado en la parte inferior, atrás del pistón de succión.

Ensaya varias veces este procedimiento con las diferentes micropipetas y cambiando los volúmenes

**EXTRACCIÓN DE DNA**

1. Crecer 10 ml de medio marino 1 noche a 37°C
2. Centrifugar 1 mL de cultivo a 13,000 r.p.m. por 5 min.
3. Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 100 μl de agua, agregar
4. 2 μl de Tris pH 8 y lizosima en un palillo.
5. Vórtex máxima velocidad por 15 s.
6. Incubar a 37°C por 30 minutos.
7. Dar un pulso de microcentrifuga.
8. Agregar 180 μl de LDT, 20 μl de EDT y 20 μl de triton 100X al 10%.
9. Vórtex máxima velocidad por 15 s.
10. Incubar a 65°C por 20 min.
11. Dar un pulso de microcentrifuga.
12. Agregar 240 μl de etanol 100%. Vortex máxima velocidad por 15 s.Dar un pulso de microcentrifuga.
13. Cargar el lisado en las columnas.
14. Lavar la columna 3 veces con el buffer WDT.
15. Para resuspender el DNA agregar a la columna 30 μl de agua.

##### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

## Materiales

- Tubos para PCR

- Nucleótidos

- Taq polimerasa

- Regulador

- Mg 10X

- Agua desionizada estéril

- Mezcla de iniciadores 16S:

16S forward: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

16S reverse: TACGGYTACCTTGTTACGACTT

- Muestras de DNA de una bacteria

- Equipo para PCR: termociclador

## Protocolo

**1.** Marcar tubos de los chiquitos para PCR de la siguiente manera:

Control – (quiere decir control negativo, no se le añade DNA)

DNA de Bacteria 1

DNA de Bacteria 2

1. Preparar la siguiente mezcla en cada tubo marcado. Hay que mantenerlo en hielo.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Control -** | **Bacteria (1)** | **Bacteria (2)** |
| Taq polimerasa | 0.2 µl | 0.2 µl | 0.2 µl |
| Nucleótidos | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| Regulador | 5 µl | 5 µl | 5 µl |
| Mg 10X | 1.5 µl | 1.5 µl | 1.5 µl |
| Iniciadores 16S | 2 µl | 2 µl | 2 µl |
| DNA (1) | - | 1 µl | 1 µl |
| DNA (2) | - | 1 µl | 1 µl |
| Agua desionizada | 39.3 µl | 39.3 µl | 39.3 µl |
|  | 50 µl | 50 µl | 50 µl |

**3.** Colocar los tubos en el termociclador y poner el siguiente programa:

(1) 94°C 5 min.

(2) 94°C 30 min

(3) 48°C 1 min

(4) 72°C 2 min

25 ciclos (pasos 2 a 4 se repiten)

72°C 2 min

4°C

**4.** Retira los tubos del termociclador y mantén en hielo

## Electroforesis en gel de agarosa

## Introducción

Si aplicamos una corriente podemos generar un campo eléctrico en el cual se mueva un cuerpo cargado. El DNA es una molécula cargada negativamente, por lo que en un campo eléctrico sera atraída hacia el polo positivo. Si pongo moléculas de diferente tamaño dentro de una red tridimensional, las moléculas más grandes se moverán más lentamente que las pequeñas. Un gel de agarosa es simplemente esa malla tridimensional por la cual se moverán moléculas de DNA a diferente velocidad, dependiendo de su tamaño y del campo eléctrico. Posteriormente, se tiñe con un compuesto afín a DNA y es posible entonces visualizar el DNA directamente.

# Materiales

guantes

solución de gel de agarosa

equipo de electroforesis: “peines”, cámara, cables, fuente de poder

micropipeta de 20 µL + puntas amarillas

regulador de corrida Tris Acetato EDTA (TAE)

colorante para la muestra

marcador de peso molecular de DNA (preparado con colorante)

fuente de poder

# 1. Preparación de gel de agarosa

Prepara tu molde de vaciado para la agarosa (no olvides el peine)

Añade suavemente la agarosa caliente (¡cuidado!)

Espera unos minutos a que solidifique

Quita las barreras del extremo del gel y ponlo en la cámara de electroforesis

Añade el regulador TAE de modo que cubra completamente el gel pero apenas rebase unos milímetros la superficie del gel

Saca con cuidado el peine

## 2. Poner muestras de DNA en el gel de agarosa

Prepara tus muestras de DNA añadiendo a cada tubo 7 ul del colorante y coloca 10 ul de cada muestra en los pozos del gel con una micropipeta. Cambia de punta cada vez que cambies de muestra.

El orden de carga en el gel será:

Control -

Bacteria 1

Bacteria 2

Marcador de peso molecular

## 3. Tapar cámara y conectar a la fuente de poder (las siguientes instrucciones pueden cambiar según el modelo de la cámara)

## Cierra la cámara con cuidado y conéctale los cables (rojo con rojo y negro con negro). Conecta los cables a la fuente de poder APAGADA. Prende la fuente de poder y ajusta el voltaje según las instrucciones que recibas (entre 50 y 100 volts). Fíjate en las burbujas del lado del electrodo negro (qué significa?) y observa también que el color azul de los pozos comienza a migrar.

Continúa la electroforesis hasta que el azul llegue a uno o dos centímetros del borde opuesto del gel. Si tienes otra actividad encarga al instructor que vigile la electroforesis y apague la fuente de poder al alcanzar el corrimiento deseado.

## 4. Fotografía del gel

El gel se lleva a una cámara oscura y se pone sobre un transiluminador de rayos ultra violeta y se le toma una fotografía.

**5. Análisis de resultados**

Tamaño de los Productos amplificados:

Para el 16S del DNA control (mismo DNA control que usarán todos los equipos)

Para el 16S del aislado 1:

Para el 16S del aislado 2:

¿Qué esperas observar en el control sin DNA?

¿Qué esperas observar en el control con DNA e iniciadores 16S?

## **¿Cómo se secuencia el DNA?**

**La reacción de secuenciación es comparable a una reacción de** PCR donde se replica DNA. La mezcla de reacción incluye el DNA molde (templado), nucleótidos, DNA polimerasa modificada (variante de la *Taq* polimerasa) y un oligonucleótido o premer (20-30 nt de longitud) que puede hibridar en una de las cadenas del templado de DNA.

La reacción inicia con la separación de las cadenas de DNA. Posteriormente el oligonucleótido se alinea al templado y la DNA polimerasa inicia la síntesis de la cadena complementaria. Este ciclo se repite hasta la obtención de varias copias.

**Dideoxinucleótidos:** En la reacción de secuenciación se introducen además dideoxiribonucleótidos (nucléotidos similares a los que presenta el DNA excepto que carece de grupos hidroxilo en el Carbono 3’), que al introducirse en la cadena en vía de síntesis provocan que se detenga la polimerización. Esto produce cadenas de distintos tamaños, dependiendo de dónde se introducen, e indican el punto preciso donde se ubica cada uno de los 4 diferentes nucleótidos.

Los dideoxinucleótidos están marcados con un fluoróforo que es diferente para cada base, emitiendo una señal específica cuando se excita con un láser (A= verde, T= rojo, C= azul y G= amarillo).

**Duplicación de una cadena de DNA en presencia de dideoxi-T:** La mayor parte del tiempo cuando se requiere una timina (T) para hacer la nueva hebra, la enzima podrá adicionar una T normal y no hay problema, la síntesis continuará. Sin embargo, 5% de las veces la enzima adicionará un dideoxi-T y la hebra no puede ser elongada o extendida. Ésta eventualmente se separara de la enzima y la síntesis de la hebra terminara.De esta manera, todas las copias terminaran con una T, pero cada vez que la enzima sintetice una nueva hebra el lugar donde la síntesis se detenga será al azar. Produciéndose así millones de cadenas de tamaño variable. Esto mismo ocurre para cada uno de los dideoxinucleótidos.

**Determinación del tamaño de los fragmentos:** La electroforesis en gel se emplea para separar los fragmentos por tamaño. La secuencia de DNA es bastante obvia si nosotros conocemos los patrones de color sólo leyendo los colores del fragmento más pequeño al más grande.

**En un secuenciador automático, el principio es el mismo, la diferencia radica en que en el secuenciador automático el paso de electroforesis se realiza en un capilar, donde los fragmentos se separan por tamaño al pasar a través de una delgada fibra de vidrio. Al final del capilar, un rayo láser emite pulsos sobre los fragmentos y la señal emitida (color) es registrada por una computadora.**

**La computadora interpreta los colores imprimiendo la secuencia de nucleótidos sobre una gráfica. Este es sólo un fragmento de la secuencia completa, pues un secuenciador (tipo Sanger) puede arrojar hasta 900 nucleótidos de secuencia de manera eficiente.**

**El secuenciador también proporciona un archivo de texto conteniendo la secuencia de nucleótidos sin la gráfica de las señales. Con el objeto de obtener buenos resultados, es necesario examinar la gráfica de secuenciación (cromatograma o electroferograma).**

**Práctica: “Identificando al sospechoso”**

**PARTE 1**

En la práctica se te proporcionaran dos electroferogramas tipo obtenidos de secuencias de 16S ribosomal de aislados bacterianos de Cuatrociénegas, Coahuila. El objetivo de esta sección, calificar las secuencias que se te proporcionaron. Al final de esta sección responde las preguntas:

1. Dentro del programa FinchTV, deberás visualizar los electroferogramas que se te proporcionaron. ¿Es posible determinar las regiones de baja calidad en la secuencia?
2. ¿Sabes que indican los colores de cada uno de los picos?
3. ¿Aparecen nucleótidos diferentes a T, A, G y C? Si es así ¿Qué quiere decir esto?
4. ¿Por qué el inicio y final de la secuencia son de baja calidad?
5. ¿De qué tamaños son las secuencias proporcionadas?

Secuencia 1: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Secuencia 2: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**PARTE 2**

El objetivo de esta sección es identificar la filiación taxonómica del aislado.

Los archivos en formato FASTA de tus secuencias se compararan con la base de datos de nucleótidos depositados en la página <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, <http://greengenes.lbl.gov/> y <http://rdp.cme.msu.edu/>

1. De los resultados de tus secuencias, determina ¿cuál es la secuencia a la cual se parece más?

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | NCBI | GreenGenes | RDP |
| Secuencia 1 |  |  |  |
| Secuencia 2 |  |  |  |

2. Los resultados obtenidos en las tres bases de datos son similares, sí no es así ¿A qué crees que se debe?