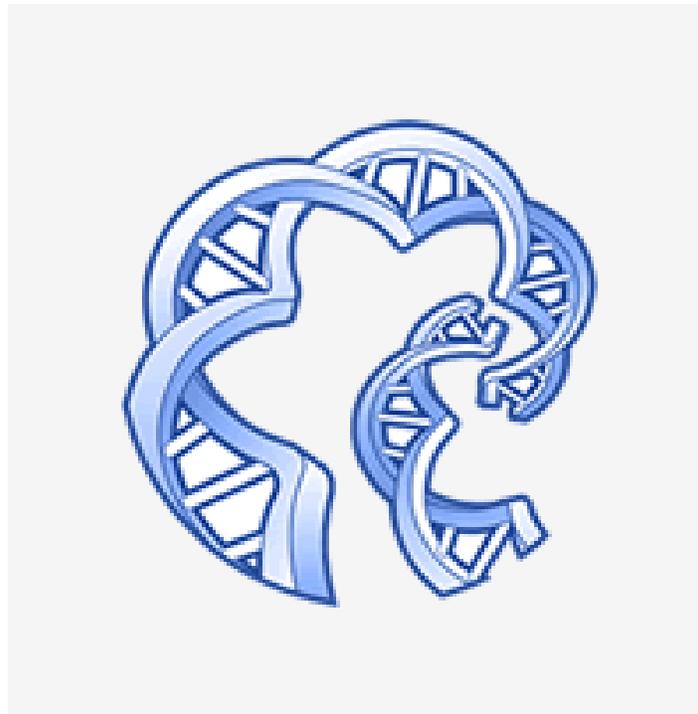

Curso de biología molecular
CIMAT
2010



INTRODUCCIÓN

Este curso-taller tiene como propósito **mostrar de manera teórica y práctica algunos principios básicos de biología molecular e ingeniería genética.**

- Conocerás **que es el DNA** y la importancia en la vida de los organismos que habitan este planeta.
- Aprenderás **técnicas moleculares** que han revolucionado la manera de hacer investigación en biología.
- Ensayarás cómo extraer y manipular DNA de bacterias, **construir un organismo transgénico** (genéticamente modificado)
- Además tendrás la oportunidad de visitar la Unidad Irapuato de Biotecnología y Biología molecular Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N. (www.ira.cinvestav.mx) en el cual realizarás un análisis molecular basado en la técnica de PCR.

CONCEPTOS BÁSICOS

Aplicaciones de la Biología Molecular

Los conocimientos generados y las técnicas empleadas por la ingeniería genética y la biología molecular, han tenido un importante alcance en el desarrollo de otras áreas como: la medicina, ciencias forenses, la agricultura, la ganadería, la farmacia, entre otras. En la agricultura los alimentos transgénicos y en la ganadería (la mejora de las razas) derivan de los organismos genéticamente modificados (OGM), Se define un OGM como aquella planta, animal, hongo o bacteria a la que se le ha agregado por ingeniería genética algún gen con el fin de producir proteínas de interés industrial o bien mejorar ciertos rasgos, como la resistencia a plagas, la calidad nutricional, la tolerancia a estrés (hídrico o biótico), entre otras. En el campo de la medicina los adelantos en diagnósticos clínicos más precisos y en tiempos cortos, se deben al uso de las últimas técnicas y equipo empleado en biología molecular generando incluso la rama de biomedicina, en esta área también se trabaja la terapia génica con proteínas recombinantes y uno de

los proyectos más ambiciosos de los últimos años la secuenciación del Genoma Humano. Como resultado del conocimiento de los múltiples genes involucrados en varias enfermedades y con el fin de llegar a un medicamento, surge la farmacogenómica. Otra importante área es la genética forense que se conoce como una especialidad que engloba la aplicación de las técnicas de biología molecular para análisis del DNA y la relación con el poder judicial.}

Bioluminiscencia

¿Quién no se ha maravillado alguna vez con una luciérnaga? ¿o al ver uno de esos monstruos de las profundidades con sus anzuelos luminosos en algún documental?. La naturaleza tiene sus trucos para emitir luz de una forma increíblemente sofisticada. Los seres vivos pueden emitir luz (bioluminiscencia) gracias a la quimioluminiscencia, fosforescencia o fluorescencia. Estos dos últimos son procesos similares que requieren recibir luz externa previamente. Todos hemos visto ambos alguna vez: los materiales fosforescentes brillan después de "haberse cargado de luz" mientras que la fluorescencia es un acto instantáneo. La quimioluminiscencia en cambio genera luz a partir de una reacción química.

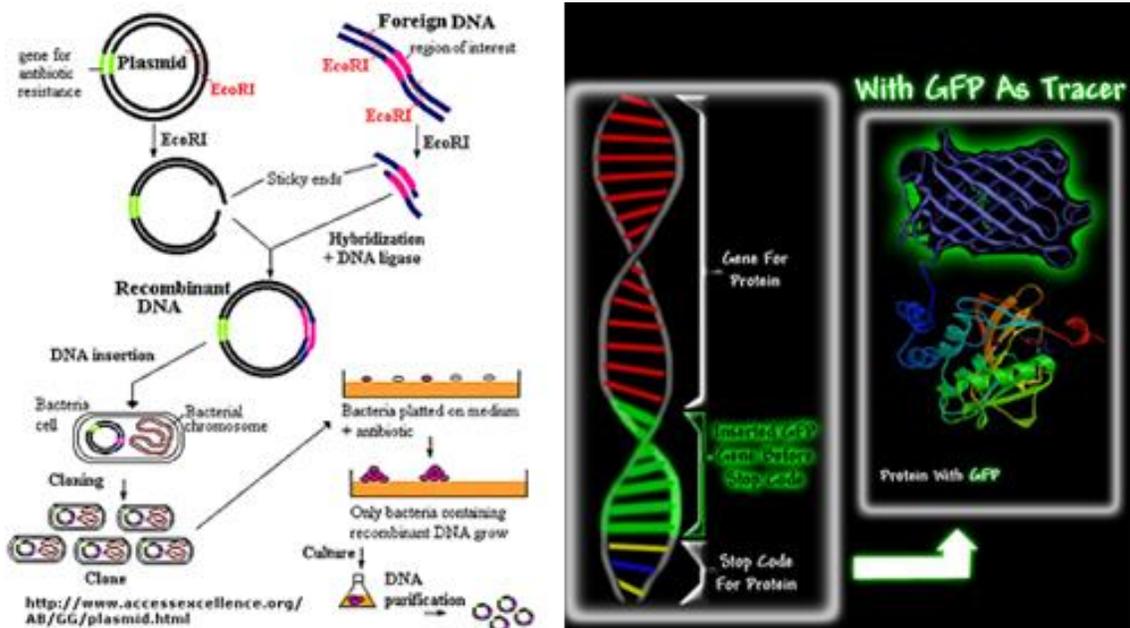
Dos de los procesos naturales más utilizados por la biotecnología son también dos de los procesos bioluminiscentes más sofisticados e interesantes: El producido por las luciérnagas y el de las medusas fluorescentes.



De izquierda a derecha: Luciérnaga americana emitiendo **quimioluminiscencia**. Floración de algas **fosforescentes** en Letonia. Medusa que emite luz gracias a una proteína **fluorescente**.

¿Cómo brilla una medusa? Las medusas fluorescentes son probablemente el sumum de la sofisticación en bioluminiscencia. Poseen una proteína capaz de recibir luz de alta energía (normalmente en el rango del UV) denominada GFP (Green Fluorescence Protein) que emite fluorescencia en el rango de la luz verde (Aunque modificaciones biotecnológicas han conseguido proteínas que emiten en prácticamente todo el espectro visible). Las medusas no son ni con mucho los únicos seres marinos bioluminiscentes, se cree que más del 90% de las especies de la porción media y abisal del océano emiten algún tipo de bioluminiscencia.

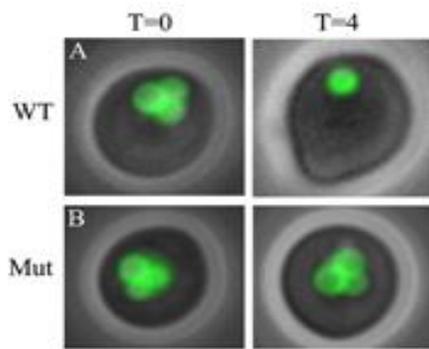
¿Cómo se utiliza la bioluminiscencia en la ciencia? La proteína GFP que se encuentra codificada en una secuencia de DNA es "copiada" desde su huésped original mediante un ingenioso método denominado PCR, capaz de crear millones de copias de una secuencia facilitando su posterior manipulación. Estas copias pueden introducirse dentro de los organismos diana utilizando diferentes métodos, que permiten introducir de forma permanente estas secuencias de DNA para producir estas proteínas.



Esquema general de clonación en bacterias, básicamente un copy&paste, pero realizado por enzimas. Esquema de una quimera contruida con GFP unida a otra proteína.

¿Para que sirve introducir estas proteínas en otros seres vivos?

Por ejemplo se ha logrado generar gatos siameses con piel fluorescente, estos han sido manipulados genéticamente para producir GFP en sus tejidos epiteliales. La utilidad radica en que de esta manera se pueden ver fácilmente los tejidos y los compartimentos que contienen esa proteína. Si además unimos a ella otra proteína (como en la imagen superior) podremos seguirla fácilmente (es decir actúan como marcadores):



Células que producen GFP unida a una proteína que controla eliminación de un orgánulo (wt), mientras que si la proteína es dañada (mut) es incapaz de conseguirlo.

Gracias a la ingeniería genética se ha conseguido que puedan expresarse estas proteínas (u otras que no brillen) en cualquier tejido, tipo celular o orgánulo deseado. Lo que ha permitido estudiar in vivo gran cantidad de procesos biológicos que permanecían ocultos.

Referencias

Te presentamos aquí las referencias donde fue obtenida esta información además de algunos otros links que te pueden ser de utilidad:

<http://tallcute.wordpress.com/2008/01/15/colores-vivos-de-la-naturaleza-a-la-biotecnologia/>

<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/prasher.html>

<http://biocab.org/Biotecnologia.html>

Objetivos del Curso

- ✚ Observar la fluorescencia verde en una bacteria de *Escherichia coli* transformada con el gen de la GFP.
- ✚ Obtener el DNA de esta bacteria.
- ✚ Insertar este gen a otras bacterias.
- ✚ Observar como se regula la expresión del gen de la proteína verde fluorescente.
- ✚ Cultivo de microorganismos y regulación de fenotipos de acuerdo a su metabolismo en *Streptomyces*.

Calendario de Actividades

	Actividad A Bacterias Fluorescentes	Actividad B Crecimiento Microorganismo
Día 1 (Lunes)	Introducción Picado de Colonia	Introducción Sembrado en caja (+P/-P)
Día 2 (Martes)	Extracción DNA (hasta pp con etanol absoluto)	Observación del crecimiento
Día 3 (Miércoles)	Extracción DNA (continuación) Corrimiento en Gel Agarosa	Observación del crecimiento
Día 4 (Jueves)	Transformación en E. coli del DNA extraído. Visualización Gel de Agarosa (FOTO)	Observación del Crecimiento Discusión
Día 5 (Viernes)	PCR (en cinvestav Irapuato)	Plática Dr. Barona
Día 6 (Sábado)	Visualización de Fluorescencia en las Bacterias Discusión	

DIA UNO (lunes)

A) Bacterias fluorescentes

Inocular 2 ml de caldo de cultivo (LB + Cb) con una asada de las colonias antes mencionadas e incubar el tubo toda la noche a 37°C.

B) Cultivo de la bacteria *S. coelicolor*.

De una placa con *S. coelicolor* tomar una asada y estriar en una caja nueva (en un medio de cultivo con y sin fosfato). Incubar 24 h.

DIA DOS (martes)

A) Bacterias fluorescentes

1. Transferir el cultivo a tubos eppendorff de 1.5 ml.
2. Centrifugar a 12000 rpm durante 1 min y decantar el sobrenadante. Repetir este paso 1 vez más.
3. Agregar 1 ml de agua destilada y centrifugar nuevamente a 12000 rpm durante 1 min, decantar el sobrenadante
4. Resuspender la pastilla celular en 250 uL de buffer STET, (utilizar la pipeta de 1000 uL con una punta; subir y bajar lentamente el volumen hasta que esté completamente disuelto el botón)
5. Adicionar 5 uL de stock de lisozya
6. Incubar durante 5 minutos a Temperatura Ambiente.
7. Colocar agua a hervir en un vaso de precipitados en microondas.
8. Terminados los 5 minutos hervir durante 45-60 segundos la muestra en el tubo eppendorff.
9. Centrifugar la muestra con un contrapeso durante 10 minutos a 13000 rpm.
10. Con cuidado utiliza un palillo y saca el "moco" que se habrá formado. Deséchalo.

11. Guarda el sobrenadante y adiciónale 10 uL de stock CTAB
12. Centrifuga durante 5 minutos.
13. Desecha el sobrenadante.
14. Adiciona 350 uL de solución 1.2M de NaCl
15. Vortexea durante 1 minuto.
16. Adiciona Etanol absoluto (750 uL)
17. Deja precipitando toda la noche a -20°C .

B) Revisar la placa de cultivo.

DIA TRES (miércoles)

A) Bacterias fluorescentes

18. Centrifuga el tubo que estuvo a -20°C toda la noche durante 10 minutos a 13000 rpm .
19. Decanta y quédate con la pastilla.
20. Lava la pastilla con 750 uL de Etanol 70%
21. Centrifuga 10 minutos a 13000 rpm
22. Decanta y golpea unas veces el tubo volteado contra una servilleta colocada sobre la mesa.
23. Seca durante 10 minutos a $40-45^{\circ}\text{C}$
24. Resuspende en 25 uL de Buffer TE. Vortexea durante 30 segundo centrifuga 30 segundos a 6000 rpm y coloca el tubo 10 minutos a $40-45^{\circ}\text{C}$.

Monitoreo del DNA plasmídico obtenido por miniprep con CTAB.

Para monitorear que hayamos extraído el ADN mediante el protocolo que realizamos estos dos días, las muestras de ADN se deben separar de acuerdo a tamaños por medio de un gel de electroforesis. Preparar un gel de electroforesis usando agarosa al 1% y buffer TAE. *Mezclar 50 ml de TAE y 500 mg de agarosa, fundir en el horno de microondas y formar el gel vaciando la agarosa fundida sobre la base de la cámara de electroforesis evitando que*

se tire y se formen burbujas. Colocar el peine para formar los pozos antes de vaciar la agarosa.

Tomar 5 μ l de tus muestras de ADN y añadirles 3 μ l de buffer de carga y correr hasta que el colorante llegue hasta $\frac{3}{4}$ partes del gel. ***Teñir el gel y observar el ADN.***

B) Revisar la placa

DIA CUATRO (jueves)

1) Bacterias fluorescentes

Para introducir el ADN que contiene el gen de la fluorescencia en una bacteria E. coli realizaremos lo siguiente.

- 1) Adicionar entre 1-2 μ l del ADN obtenido a un tubo con células receptoras.
- 2) A modo de experimento control tomar un tubo de células receptoras y añadirles solo agua (el mismo volumen que se añadió de ADN).
- 3) Incubar en hielo 25-30 min, calentar a 42°C por 1:30 min e inmediatamente colocar en hielo durante 3 - 5 min. Añadir al tubo con las células receptoras 1000 μ l de medio rico (LB).
- 4) Incubar con agitación a 37°C 1 hora.
- 5) Tomar 200 μ l del cultivo transformado y sembrar primero en:
 - 5.1) Una caja petri con LB + Ampicilina (**marcador de selección**)
 - 5.2) Otra caja petri LB + Amp + Arabinosa (**regulador de la expresión**)
- 6) Tomar 200 μ l del cultivo del experimento control y sembrar en dos cajas:
 - 6.1) LB

6.2) LB + Marcador de Selección (Ampicilina)

B) Revisar las placas: Observación del crecimiento de *S. coelicolor*
Discusión.

DIA CINCO (viernes)

Visita al Cinvestav Campus Guanajuato (Irapuato, Gto.). En la visita al Cinvestav Campus Guanajuato, conocerás la instalaciones de unos de los centros de investigación en biotecnología e ingeniería genética más importantes del país, además realizarás una práctica donde conocerás acerca de una de las herramientas que revolucionó a la Biología Molecular: PCR. Además de que tendrás una breve introducción a los tópicos de Bioinformática así como una práctica con computadoras

DIA SEIS (sábado)

Discusión de resultados de la transformación.