

**Universidad de San Carlos de Guatemala
Centro de Estudios del Mar y Acuicultura –CEMA–**

Informe Final Práctica Profesional Supervisada

**Técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos,
Laboratorio de Biología Molecular, perteneciente al Instituto de Biotecnología de
la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León,
Monterrey, México**

**Valero Ramírez Talbott
Guatemala noviembre de 2006**

The seal of the University of Nuevo León is a circular emblem. It features a central shield with a crown on top, flanked by two lions. Below the shield is a figure on horseback. The shield is supported by two columns. The Latin motto "CAETERA SIBI CONSPICUA CAROLINA CAETERA CONCIENMATENSIS INTER" is inscribed around the border of the seal.

Informe Final Práctica Profesional Supervisada

**Técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos,
Laboratorio de Biología Molecular, perteneciente al Instituto de Biotecnología de
la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León,
Monterrey, México**

Universidad de San Carlos de Guatemala
Centro de Estudios del Mar y Acuicultura –CEMA–

Miembros del Consejo Directivo



Presidente	Ing. Agr. Pedro Julio García Chacón
Coordinador Académico	M.Sc. Carlos Salvador Gordillo García
Secretario	M.V. Salomón Medina Paz
Representante Docente	M.Sc. Erick Villagrán
Representante del Colegio de Médicos Veterinarios y Zootecnistas	Licda. Estrella Marroquín
Representante Estudiantil	T.U.A. Julián Sikahall
Representante Estudiantil	Manoel Cifuentes Marckword

ACTO QUE DEDICO

A: A toda mi familia, en especial a mis papas y a mi hermano, por haberme apoyado en mi carrera, y por todo.

A: A mis abuelitas en especial a Ana Maria de R. Por haberme brindado apoyo económico y moral.

A: Dios por haberme dado todo lo que me dio, y haber estado conmigo siempre cuidándome.

A: Mis amigos y compañeros de clase, por ser tan buenos como lo son.

A: Mis amigos y compañeros de laboratorio de México, por haberme tratado muy bien en estadía en México.

AGRADECIMIENTOS

A: Universidad de San Carlos de Guatemala, por darme la oportunidad de realizar estas practicas bajo su nombre.

A: CEMA por apoyarme en la realización de mis practicas.

A: La Universidad Autónoma de Nuevo León, por haberme aceptado para realizar mi pasantía en sus instalaciones.

A: Al Instituto de Biotecnología, en especial al Laboratorio 4, Laboratorio de Genética y Biología Molecular por haberme apoyado y brindado los conocimientos necesarios para concluir mi pasantía.

A: Al Dr. Fernando Jiménez, por haberme conseguido todo lo necesario para poder realizar mi pasantía en la Universidad Autónoma de Nuevo León.

A: La Lic. Sonia Villatoro por su apoyo y estar pendiente de mis actividades.

A: Todos mis catedráticos, por haberme brindado los conocimientos y haberme soportado en las clases.

RESUMEN EJECUTIVO

La Genética y la Biología Molecular, son herramientas útiles para diferentes fines en la acuicultura, siendo la detección de enfermedades una de las más importantes ya que con estas se puede confirmar la presencia de agentes patógenos en los organismos acuáticos.

En este informe se determinaron las técnicas generales de ácidos nucleicos, de las cuales la más importante para la confirmación de enfermedades es PCR, sin embargo para realizar esta prueba es necesario conocer algunos principios y procedimientos para lograr una confiabilidad y validez en el resultado.

Los procedimientos y los principios necesarios para realizar la PCR pueden ser; la extracción de ácidos nucleicos, diseño de Primers, los principios de la PCR y visualización del resultado de la PCR (electroforesis).

También se incluyen unas variantes de PCR, al igual que algunos otros procesos de interés, como son los cortes con enzimas de restricción y la clonación.

INDICE GENERAL

	Pagina
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
2.1. General	3
2.2. Específicos	3
3. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey	4
3.1. Reseña Histórica	4
3.2. Ubicación	6
3.3. Facultades	8
3.4. Facultad de ciencias biológicas	9
3.5. Instituto de biotecnología	14
3.6. Laboratorio de genética y biología molecular	20
3.6.1. Generalidades	20
3.6.2. Croquis del Laboratorio	21
3.6.3. Normativo de seguridad de laboratorio clase 2	22
4. Técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos	29
4.1. Ácidos nucleicos	29
4.1.1. Extracción de ácidos nucleicos	35
a) Extracción de ADN	35
b) Extracción de ARN	37
4.2. Diseño de Oligonucleótidos (Primers) para PCR	38
4.2.1. Diseño y revisión de oligonucleótidos por Internet	43
4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	51
4.3.1. Introducción	51
4.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa	51
4.3.3. Preparación de muestras para PCR	55
4.3.4. Variantes de PCR	57
a) RAPD's	57
b) PCR Multiplex	60
c) PCR anidada	60
d) RT-PCR	60
4.4. Electroforesis	61
4.4.1. Fundamentos	61
a) Electroforesis en gel de poliacrilamida.	64
b) Electroforesis en geles de gradientes.	65
e) Electroforesis en geles de agarosa.	65
4.4.2. Definiciones y materiales	66
4.4.3. Procedimiento	67
4.5. Enzimas de Restricción	69
4.5.1. Tipos de enzimas de restricción	72
4.5.2. Nomenclatura de las enzimas de restricción	74
4.5.3. Procedimiento de cortes con enzimas de	

	restricción	74
.	4.5.3. Elaboración de un marcador de peso molecular.	75
.	4.6. Clonación	78
	4.6.1. Vectores de transformación	81
	a) Plásmido	82
	b) Bacteriófago	84
	c) Cósmido	85
	d) YAC's	86
	4.6.2. Transformación	87
	a) Transformación química	91
	b) Procedimiento de transformación química.	92
	c) Otros tipos de transformación	92
.	5. Conclusiones	94
.	6. Recomendaciones	96
.	7. Referencias Bibliográficas	97
.	8. Anexo	101

ÍNDICE DE CUADROS

		Pagina
Cuadro 1	Componentes y concentraciones de la reacción para la PCR	55
Cuadro 2	Ejemplos de cortes con enzimas de restricción	73
Cuadro 3	Componentes y concentraciones para la preparación de la reacción de cortes con enzimas	75

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pagina
Figura 1	<i>Campus</i> Central de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey; México	7
Figura 2	Ubicación de la ciudad universitaria	9
Figura 3	Organigrama de El Instituto de Biotecnología	15
Figura 4	Croquis del Laboratorio de Genética y Biología molecular	21
Figura 5	Simbología del Croquis de laboratorio (Figura 4)	22
Figura 6	Estructura de los nucleótidos	30
Figura 7	Unión de la doble cadena por los puentes de Hidrógeno del DNA	32
Figura 8	Estructura de doble hélice del DNA.	33
Figura 9	Pagina WEB principal de NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	43
Figura 10	Pagina WEB de NCBI, selección de Secuencia	44
Figura 11	Pagina WEB de NCBI, copia de Secuencia	44
Figura 12	Pagina WEB de NCBI, Búsqueda de Secuencia seleccionada	45
Figura 13	Pagina WEB de NCBI, comparación de Secuencia seleccionada	45
Figura 14	Pagina WEB de IDTNA, búsqueda de primers en la secuencia Seleccionada	46
Figura 15	Pagina WEB de IDTNA, selección de primers en la secuencia Seleccionada	47
Figura 16	Pagina WEB de IDTNA, prueba de primers	47
Figura 17	Pagina WEB de IDTNA, resultados prueba de primers con hairpin	48
Figura 18	Pagina WEB de IDTNA, resultados prueba de primers con self-dimer	49
Figura 19	Pagina WEB de IDTNA, resultados prueba de primers con hetero-dimer	50
Figura 20	Pasos de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR	52
Figura 21	Termociclador	53
Figura 22	Amplificación exponencial del PCR	53
Figura 23	Temperaturas para amplificación exponencial del	54

	PCR		
Figura 24	Primeros 4 pasos de la amplificación de PCR	54
Figura 25	Grafica de ciclos del Termociclador	56
Figura 26	PCR Estándar	57
Figura 27	PCR Estándar RAPD´s # 1	58
Figura 28	Reacción de RAPD´s # 2	59
Figura 29	Visualización de resultados de RAPD´s en un gel de agarosa en agarosa	59
Figura 30	Cámara de Electroforesis	61
Figura 31	Fundamento de la Electroforesis	62
Figura 32	Corrimiento de la Electroforesis	62
Figura 33	Deposito de muestras en la cámara de Electroforesis	63
Figura 34	Electroforesis en Gel de poliacrilamida	64
Figura 35	Electroforesis en Geles de gradiente	65
Figura 36	Ejemplos de cortes con enzimas de restricción	70
Figura 37	Cortes con la enzima <i>Eco RI</i>	71
Figura 38	Unión entre fragmentos de DNA con extremos cohesivos	71
Figura 39	ADN de Lambda, cortado con <i>Eco RI</i> y <i>Hind III</i>	76
Figura 40	Dolly, primer organismo clonado	80
Figura 41	Inserción de un gen en un plásmido	82
Figura 42	Enzima de restricción ha cortado el gen y el plásmido, quedando unos bordes cohesivos o pegajosos	83
Figura 43	Unión de un plasmido con el gen	83
Figura 44	Ciclo de Inserción de un gen al bacteriófago lambda	84
Figura 45	Ciclo de Inserción de un gen a un Cósmido	86

ÍNDICE DE ANEXO

Anexo 1	Área de trabajo Laboratorio de Genética y Biología Molecular
Anexo 2	Cámaras de Electroforesis verticales
Anexo 3	Entrada al Instituto de biotecnología
Anexo 4	Compañeros de trabajo Laboratorio de Genética y Biología Molecular
Anexo 5	Bacterias de <i>E. coli</i> transformadas
Anexo 6	Cámara de luz ultra violeta
Anexo 7	Extracción de ADN en gel de Agarosa 1.5%
Anexo 8	Edificio de el Instituto de biotecnología
Anexo 9	Fotos de distintos resultados de PCR

1. Introducción

La Biología Molecular es una ciencia cuyo objetivo fundamental es la comprensión de todos aquellos procesos celulares, que contribuyen a que la información genética se transmita eficientemente de unos seres a otros y se exprese en los nuevos individuos.

Este conocimiento ha permitido cruzar barreras naturales entre especies y colocar genes de cualquier organismo, en un organismo hospedador no relacionado mediante el empleo de técnicas de Ingeniería Genética. Una de las consecuencias importantes derivadas, fue la producción de fragmentos de ácidos nucleicos a gran escala, abriendo las puertas a la secuenciación de los ácidos nucleicos y, por ende a nuevas disciplinas como el diagnóstico molecular, la terapia génica o la obtención de organismos superiores recombinantes.

No cabe duda de la importancia que la biología molecular ha adquirido en la medicina contemporánea y, más a aún, de la preponderancia que sus técnicas tendrán en la medicina del futuro. Nunca antes en la historia del género humano y la medicina, se habían contado con técnicas que tuvieran una aplicación y una incidencia directa en todas las áreas de la práctica médica. La biología molecular, ha demostrado tener un inmenso potencial en todas y cada una de estas áreas:

Diagnostico: Esta disciplina ha hecho posible el diagnóstico de ciertas enfermedades a nivel molecular.

Prevención: Esta disciplina es capaz de determinar la susceptibilidad que un individuo tiene de contraer una enfermedad, permitiendo su prevención.

Pronostico: La determinación de ciertos marcadores genéticos es una herramienta útil como factor de pronóstico en ciertas enfermedades.

Tratamiento: A través de la Biología Molecular se ha logrado la elaboración de ciertos bioproductos con finalidades terapéuticas, como las vacuizas, anticuerpos, factores de coagulación sanguínea, enzimas, hormonas, entre muchas otras.

El potencial que esta disciplina encierra es prácticamente infinito, ya que sus aplicaciones van mas allá de la medicina, alcanzando todas las ramas de las ciencias biológicas como lo son la agricultura, acuicultura, la entomología, la zootecnia y todas las demás áreas del que hacer humano, pues como sabemos, el mecanismo de transmisión de la herencia es un fenómeno universal y el código genético es exactamente el mismo (con escasas excepciones) en todos los seres vivos sean estos virus, bacterias, animales, plantas o el hombre. Por lo tanto resulta imprescindible que conozcamos los principios en los que se basa esta disciplina.

Diversos agentes patológicos afectan la sanidad de los animales acuáticos cuando se cultivan en sistemas de producción afectando su rentabilidad y en ocasiones generando zoonosis que afectan la salud pública. Por lo tanto, en la acuicultura es importante conocer mas acerca de estos agentes patógenos para facilitar su diagnóstico, prevención, pronóstico y tratamiento. La biología molecular es una herramienta útil para facilitar estos procesos.

Este trabajo se realizó para mostrar las diferentes técnicas en la manipulación de ácidos nucleicos, por lo tanto en éste se explican cada uno de los procesos y se describe su procedimiento para poder aplicarlos en organismos acuáticos para fines de acuicultura.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Generales:

- Introducir al estudiante en el ejercicio de la carrera de Técnico en Acuicultura en una practica directa, en un espacio territorial, grupo social e institucional.
- Conocer, aprender y practicar las técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos.

2.2 Objetivos específicos:

- Proveer la oportunidad de participar en actividades reales propias dela acuicultura.
- Retroalimentar el proceso de enseñanza-aprendizaje mediante la integración de los conocimientos y experiencias teórico-practicas adquiridas.
- Proporcionar el desarrollo y ejercicio de los valores morales y éticos en el desempeño profesional.
- Asegurar la calidad teórico-practico de los informes finales presentados como requisito de graduación.
- Conocer, aprender y practicar los diferentes tipos de extracción de ácidos nucleicos de diferentes organismos.
- Conocer, aprender y practicar la prueba de PCR para diferentes fines y organismos.
- Aprender a analizar los datos obtenidos de las pruebas de PCR.
- Conocer algunas variantes de PCR.
- Conocer algunas técnicas o métodos de importancia aplicadas a los ácidos nucleicos.
- Conocer los principios e la clonación.

3. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey; México

3.1. Reseña Histórica:

La Universidad Autónoma de Nuevo León inició sus actividades el 25 de septiembre de 1933. Entre los antecedentes históricos debe citarse que el 29 de octubre de 1932, los Comisionados de las Delegaciones de las Escuelas de Jurisprudencia, Medicina, Colegio Civil, Normal y Farmacia del Estado de Nuevo León, sometieron a la consideración de la H. XLIV Legislatura del Estado un proyecto de organización de una Universidad para la ciudad de Monterrey. Las comisiones estuvieron integradas por estudiantes, y en dicho escrito se expresa textualmente lo siguiente:

“Considerando oportuno dar forma a un anhelo que ha venido palpitando hace tiempo en el ambiente estudiantil y cultural del pueblo nuevoleonés, y movidos por el impulso ingente en los habitantes de este Estado hacia el progreso, los estudiantes de Monterrey nos hemos propuesto organizar una Universidad. Que habrá de ser la cuna espiritual de generaciones que sabrán ocupar el lugar que les corresponde entre sus semejantes, hombres que habrán de consolidar mañana la plenitud de nuestro México.”

Comisiones Estudiantiles, Octubre 1932

El H. Congreso del Estado, en su sesión del 7 de noviembre de 1932, acogió con beneplácito tal iniciativa y, por considerarla de vital importancia, ordenó se turnara inmediatamente a la Comisión de Justicia e Instrucción Pública, para su estudio y dictamen, el que posteriormente se formuló de manera favorable.

En 1934, el Gobernador sustituto de Nuevo León, Lic. Pablo Quiroga, en su informe al Congreso del Estado, nos enteró de que en su primer año, la población escolar en nuestra máxima Casa de Estudios ascendió a 1864 alumnos, con 218 profesores, y cuyo sostenimiento importó anualmente \$264,813.54 (Doscientos sesenta y cuatro mil ochocientos trece pesos, con cincuenta y cuatro centavos).

Es éste el, primer documento oficial que nos da a conocer cantidades global es sobre la Universidad en nuestro Estado.

En este mismo informe, en el rubro de "Educación Universitaria", se expresa que la Universidad de Nuevo León se integró con las facultades de Medicina, Derecho y Ciencias Sociales, Ingeniería, Química y Farmacia, Escuela Normal, Escuela de Bachilleres, Escuela Industrial y Preparatoria Técnica "Alvaro Obregón", Escuela Industrial de Labores Femeniles "Pablo Livas", Escuela de Enfermeras y Obstetricia y, finalmente, se incorporó la Biblioteca Pública del Estado.

A causa de diversos incidentes, el 29 de septiembre de 1935, por decreto del Congreso del Estado, la Universidad de Nuevo León se declara desaparecida, estableciéndose en su lugar el Consejo de Cultura Superior, presidido por el Gobernador Provisional del Estado, Profesor y General Gregorio Morales Sánchez, y después por el Dr. Enrique C. Livas.

Durante el gobierno del General Bonifacio Salinas Leal, el 13 de septiembre de 1943 se establece de nuevo la Universidad, y el Dr. Enrique C. Livas es designado Rector. (7)

Generalidades de la institución:

La UANL cuenta con 26 Facultades y ofrecen 221 programas formativos a 65 809 alumnos de licenciatura y postgrado. Adicionalmente, forma técnicos superiores y profesionales asociados y satisface los requerimientos de educación preparatoria y estudios subprofesionales de alrededor de 45 000 estudiantes más. Sus campus abarcan 6 763 hectáreas con más de 100 000 m² de construcción en varios lugares de Nuevo León. Los más grandes son Ciudad Universitaria, Mederos, Área Médica, Loma Larga, y Linares. (8)

3.2 Ubicación:

La región cuenta con la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) que tiene un *campus* principal, conocido como la Ciudad Universitaria y cuatro unidades o áreas adicionales en todo el estado de Nuevo León. La Ciudad Universitaria se localiza en el municipio de San Nicolás de los Garza. En esta área se ubica la Torre de Rectoría, edificio de la administración central de la UANL, además de 13 escuelas, un estadio, dos bibliotecas principales y 13 internas, dos clubes de informática principales y cafeterías. Además de algunos institutos de investigación, auditorios y gimnasios en una gran extensión rodeada de jardines.

El *campus* Médico se sitúan las facultades relacionadas con el área de la salud: Medicina, Odontología, Enfermería, Psicología, Salud Pública y Nutrición, la clínica para el personal de la UANL y el Hospital Universitario. En la actualidad la Facultad de Medicina, se impone como la mejor en el Estado y como una de las mejores opciones educativas de América, contando con intercambios nacionales y extranjeros, así como investigaciones corrientes en genética y otros temas que la mantienen a la vanguardia educativa.

El *Campus* Mederos, a 40 minutos del *campus* principal, está integrado por las facultades de Ciencias Políticas, Medicina Veterinaria y Zootecnia, Música, Artes Visuales, Artes Escénicas, Ciencias de la Comunicación. Además de una infraestructura de apoyo y servicios como el Centro de Acondicionamiento Físico, el Centro de Apoyo y Servicios Académicos y una moderna y funcional Unidad de Seminarios.

El *Campus* Marín se localiza a 40 minutos de Ciudad Universitaria entre los municipios de Marín e Higuera y en él se localiza la facultad de Agronomía.

La Unidad Linares, a dos horas de Ciudad Universitaria en el municipio del mismo nombre, alberga a las facultades de Ciencias Forestales, Ciencias de la Tierra y Contaduría Pública y Administración.

Ciudad universitaria



Figura 1: *Campus Central* de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey; México

3.3 Facultades:

La Universidad Autónoma de Nuevo León organiza los programas educativos por Escuelas y Facultades, que integran disciplinas afines. También existen direcciones generales y departamentos centrales, que apoyan a las Facultades para beneficio de la formación de los universitarios.

En las Facultades y Escuelas el máximo órgano de decisión es la Junta Directiva, formada por los maestros e investigadores de la dependencia y un número igual de representantes alumnos, electos democráticamente de conformidad con sus respectivos Reglamentos Internos. La autoridad ejecutiva corresponde al Director, quien dura tres años en su cargo y puede ser reelecto una sola vez.

- Facultades

Facultad de Agronomía

Facultad de artes escénicas

Facultad de artes visuales

Facultad de ciencias de la comunicación

Facultad de ciencias físico-matemáticas

Facultad de ciencias políticas y administración pública

Facultad de ciencias biológicas

Facultad de ciencias de la tierra

Facultad de ciencias forestales

Facultad de ciencias químicas

Facultad de contaduría pública y administración

Facultad de derecho y criminología

Facultad de economía

Facultad de enfermería

Facultad de filosofía y letras

Facultad de ingeniería civil

Facultad de ingeniería mecánica y eléctrica

- Facultad de medicina
 - Facultad de medicina veterinaria y zootecnia
 - Facultad de música
 - Facultad de odontología
 - Facultad de organización deportiva
 - Facultad de psicología
 - Facultad de salud publica y nutrición
 - Facultad de trabajo social
- (9)

3.4 Facultad de Ciencias Biológicas:

La Facultad de Ciencias Biológicas se encuentra ubicada en la Zona Metropolitana de Monterrey, en el Municipio de San Nicolás de los Garza, en ella se ubica la Ciudad Universitaria, se localiza entre las avenidas: Ave. Alfonso Reyes y Manuel L. Barragán, sobre la Avenida Dr. Pedro de Alba.

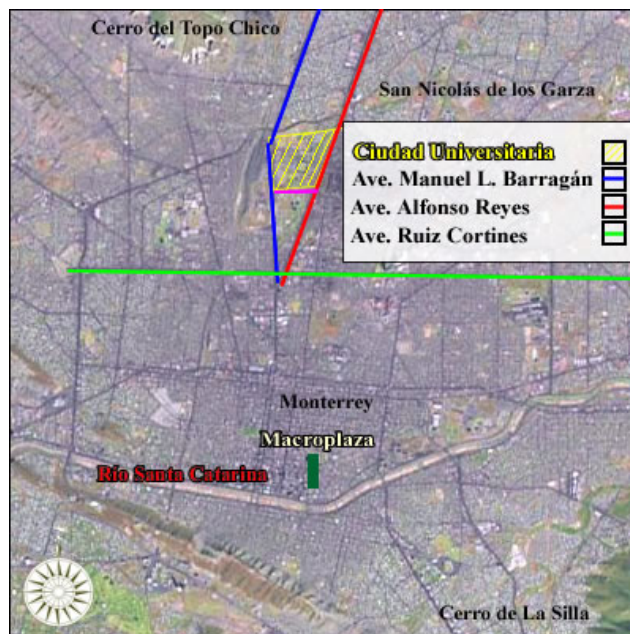


Figura 2: Ubicación de la ciudad universitaria

En este *Campus* se encuentra ubicada la Unidad A, Unidad B, Unidad C, Instituto de Biotecnología y Bioterio.(10)

La Facultad de ciencias biológicas proporciona 5 diferentes carreras que son:

a. Biología:

La Facultad de Ciencias Biológicas ofrece la carrera de biólogo desde el 19 de Septiembre de 1952.

El objetivo general de la Licenciatura es formar profesionistas capaces de generar, aplicar y difundir el conocimiento científico y tecnológico de las Ciencias Biológicas, encaminado a la solución de problemas regionales y nacionales acorde a las necesidades de la sociedad actual.

En su perfil profesional se tienen en cuenta una formación académica y científica que le permiten desempeñarse con éxito en sus diversas áreas de trabajo; pondera la actitud emprendedora e innovadora con un alto sentido ético y compromiso social de sus estudiantes.

Su campo de trabajo es el sector público o privado en áreas como: docencia, investigación, agricultura, ganadería, salud, manejo del medio, área industrial alimenticia, farmacéutica y ambiental, pesquerías, turismo ecológico, planeación y ejecución de proyectos de desarrollo, en el área de financiamiento y es capaz de auto emplearse en servicios de consultoría.

El estudiante tiene acceso a los diferentes servicios de informática, al Centro de Autoaprendizaje del Idioma Inglés (CAADI), a proyectos de investigación y convenios de colaboración e intercambio con Instituciones nacionales e internacionales. Además del Postgrado en la misma Institución. (11)

b. Químico Bacteriólogo Parasitólogo:

La carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo ofrece una formación sólida e integral bajo parámetros de corte internacional; busca formar profesionistas de alto nivel científico y tecnológico, así como emprendedores comprometidos socialmente.

El egresado de Q.B.P. posee los conocimientos y habilidades en química, microbiología, análisis clínicos, biología molecular y biotecnología que le permiten desempeñarse en el área de las Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas. Posee un amplio sentido ético, es innovador y se desenvuelve correctamente en el trabajo cotidiano y en la investigación básica y aplicada.

Se desempeña en el sector público y privado en diferentes empresas e instituciones como: industria cervecera y vitivinícola, producción de antibióticos, control biológico, laboratorios de análisis clínicos e inmunológicos, laboratorios de diagnóstico de enfermedades vegetales, industria agrícola, Petróleos Mexicanos (PEMEX), Instituto Nacional de Investigación Forestal (INIFAP) y en el control de calidad de alimentos.

La Facultad ofrece la Maestría y el Doctorado en Ciencias para el desarrollo de estos profesionistas. (12)

c. Licenciatura en Ciencia de Alimentos

La Licenciatura en Ciencia de Alimentos ofrecida por la Facultad de Ciencias Biológicas forma profesionistas calificados para mejorar la producción y conservación de alimentos; así como, el desarrollo de nuevos productos, asegurados mediante sistemas de control y aseguramiento de la calidad; tiene una formación integral bajo parámetros internacionales.

El egresado de esta carrera tendrá una amplia base de conocimientos en Ciencia de Alimentos y la habilidad de pensar crítica e independientemente, siendo consciente y sensible a las necesidades del país.

El campo de trabajo de los egresados lo constituyen las empresas introductoras y comercializadoras de alimentos perecederos, empresas procesadoras de alimentos, laboratorios de análisis de alimentos y de desarrollo de nuevos productos, ventas

técnicas en el área de aditivos y materias primas e iniciar su propio negocio o empresa de servicio.

El estudiante tiene acceso a los diferentes servicios de informática, al Centro de Autoaprendizaje del Idioma Inglés (CAADI), a proyectos de investigación y convenios de colaboración e intercambio con Instituciones nacionales e internacionales. Además del Postgrado en la misma Institución que cuenta con una maestría y un doctorado en el área, ambos reconocidos por el padrón de excelencia de CONACYT. (13)

d. Licenciatura Biotecnología Genómica:

El profesional Asociado en Biotecnología Genómica y el Licenciado en Biotecnología Genómica forman profesionistas que sirven de soporte a los equipos interdisciplinarios los primeros y los segundos son profesionistas competentes, innovadores y emprendedores que aplican las ciencias genómicas, proteómicas y de bioinformática en los sectores salud, agroalimentario, industrial y ambiental.

Los egresados de estas carreras están capacitados para utilizar las ciencias básicas y aplicadas en la solución de problemas en las áreas de salud, tecnología y ambiente; pueden administrar procesos productivos, generar nuevos productos y tendrán un amplio sentido humanista y compromiso con las necesidades, eficiencia y productividad de México.

Su campo de trabajo es en diferentes áreas del sector público y privado, tales como medicina, industria, agricultura, ganadería y en general todos los ámbitos del quehacer humano; también serán capaces de iniciar su propia empresa o dar servicios de consultoría en el ámbito de su competencia.

Una de las fortalezas del programa es el personal académico, integrado por profesores reconocidos a nivel nacional e internacional de las Facultades de Agronomía, Ciencias Biológicas, Ciencias Químicas, Medicina y Veterinaria y Zootecnia. (14)

e. Profesional Asociado en Biotecnología Genómica:

El profesional Asociado en Biotecnología Genómica y el Licenciado en Biotecnología Genómica forman profesionistas que sirven de soporte a los equipos interdisciplinarios los primeros y los segundos son profesionistas competentes, innovadores y emprendedores que aplican las ciencias genómicas, proteómicas y de bioinformática en los sectores salud, agroalimentario, industrial y ambiental.

Los egresados de estas carreras están capacitados para utilizar las ciencias básicas y aplicadas en la solución de problemas en las áreas de salud, tecnología y ambiente; pueden administrar procesos productivos, generar nuevos productos y tendrán un amplio sentido humanista y compromiso con las necesidades, eficiencia y productividad de México.

Su campo de trabajo es en diferentes áreas del sector público y privado, tales como medicina, industria, agricultura, ganadería y en general todos los ámbitos del quehacer humano; también serán capaces de iniciar su propia empresa o dar servicios de consultoría en el ámbito de su competencia.

Una de las fortalezas del programa es el personal académico, integrado por profesores reconocidos a nivel nacional e internacional de las Facultades de Agronomía, Ciencias Biológicas, Ciencias Químicas, Medicina y Veterinaria y Zootecnia.

En la Facultad de ciencias biológicas, se destaca el instituto de biotecnología en el cual se encuentra localizado el laboratorio de Genética, en el cual trabajan investigaciones por medio de PCR con distintos fines. (15)

3.5 Instituto de Biotecnología:

Misión:

Formación de recursos humanos altamente competitivos e innovadores, a través de la actividad académica y de investigación, y contribuir con esto al desarrollo social, tecnológico y económico nacional e internacional.

Visión:

Ser líder a nivel nacional e internacional en la formación de recursos humanos con características de liderazgo, realizando investigación en áreas competitivas e innovadoras.

Política de calidad:

Nuestro compromiso es ofrecer servicios de docencia, investigación y extensión, cumpliendo con las necesidades y expectativas del usuario; logrando así su satisfacción mediante la mejora continua en nuestros procesos.

Valores organizacionales:

Trabajo en equipo
Respeto
Responsabilidad
Creatividad
Innovación
Disciplina
Honestidad
Comunicación
Enfoque a resultados
Puntualidad

(16)

Organigrama del Instituto de Biotecnología:



Figura 3: Organigrama de El Instituto de Biotecnología

Instituto de biotecnología:

El Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas (IB/FCB-UANL), fue creado el 5 de diciembre de 2003 e inició labores académicas y científicas en marzo de 2004.

Históricamente, el IB/FCB-UANL nace como consecuencia del crecimiento gradual y constante de los grupos académicos del Departamento de Microbiología e Inmunología, especialmente del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo, el cual inició actividades en 1976 con tres profesores y un técnico en un área construida de poco más de 50 m.

Doce años más tarde (1988), el laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo se trasladó a un nuevo edificio (Unidad C), transformándose en tres Unidades de investigación y enseñanza, cubículos, unidades de apoyo y oficinas administrativas. En este espacio laboraban seis profesores y tres técnicos académicos.

Gracias a este crecimiento y madurez académico-científica, el grupo de Microbiología Industrial y Suelo constituyó la base del Instituto de Biotecnología. Hoy en día, el Instituto cuenta con 15 profesores, seis asistentes de investigación y seis técnicos en un espacio de seis laboratorios de investigación, biblioteca, cuatro unidades de apoyo, área administrativa y una unidad de enseñanza, lo que representa un total de 4,121 m² de construcción.

Actualmente, el Instituto es sede del programa académico de doctorado en Biotecnología, reconocido como de excelencia dentro del Programa Nacional de Postgrado del CONACYT y un Cuerpo Académico consolidado, de los cuatro que actualmente cuenta la UANL. Además de ser el Primer Instituto Certificado con la Norma ISO-9001-2000.

Cuenta con un total de 42 estudiantes que realizan trabajo de tesis, 24 de la licenciatura, 4 de maestría y 13 de doctorado. El 80% de los nuestros profesores poseen el perfil PROMEP y el 55% pertenecen al Sistema Nacional de Investigadores. (17)

3.5.1 Investigación

El Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL está orientado a la investigación en Biotecnología Microbiana enfocada a las áreas agrícola, industrial, ambiental y de salud humana y animal, para la obtención de productos, desarrollo de procesos y generación de servicios.

a) Biotecnología agrícola:

Investigación básica y aplicada con microorganismos para el desarrollo de productos y procesos con el fin de mejorar la calidad y/o productividad de cultivos agrícolas. Se hace un especial énfasis en el control biológico de plagas de interés agrícola, forestal y salud pública realizando estudios de Genómica y Bioquímica de microorganismos entomopatógenos empleados como bioinsecticidas. Además se desarrollan nuevos métodos de tipificación.

Proyectos de Investigación:

- Aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos para el desarrollo de procesos en el control biológico de plagas de interés agrícola, forestal y salud pública, con énfasis en la bacteria *Bacillus thuringiensis* y los hongos *Paecilomyces fumosoroseus* y *Beauveria bassiana*.
- Genómica estructural y funcional de *Bacillus thuringiensis* y otros microorganismos entomopatógenos.
- Desarrollo de métodos para detección molecular de organismos transgénicos y estado sanitario de origen agrícola.
- Desarrollo y evaluación de formulados bioinsecticidas de *Bacillus thuringiensis* y otros microorganismos entomopatógenos.
- Desarrollo de procesos y productos para el aprovechamiento de desechos agrícolas.
- Desarrollo, evaluación y optimización de dietas artificiales para la cría de insectos plaga aplicados en la evaluación de bioinsecticidas. (18)

b) Biotecnología Industrial:

Investigación básica y aplicada con microorganismos empleando tecnologías tradicionales y del ADN recombinante para el desarrollo de productos y procesos factibles de transferirse al sector industrial. Se desarrollan y estudian microorganismos silvestres y modificados genéticamente para su empleo en procesos industriales. Además se desarrollan y optimizan bioprocesos para la producción y recuperación de estos microorganismos y/o sus metabolitos.

Proyectos de Investigación:

- Bioingeniería de microorganismos a través de la clonación y expresión de genes para la producción de proteínas recombinantes en organismos modificados genéticamente con énfasis en el empleo de levaduras metilotróficas como organismo hospedero.
- Diseño y optimización de bioprocesos para la producción de proteínas recombinantes en organismos modificados genéticamente con énfasis en el empleo de levaduras metilotróficas como organismo hospedero.
- Aislamiento, caracterización bioquímica e ingeniería de proteínas.
- Desarrollo, optimización y escalamiento de bioprocesos para la producción de bioinsecticidas a partir de *Bacillus thuringiensis* y de hongos entomopatógenos.
- Diseño y producción de enzimas con aplicación industrial.
- Desarrollo de formulaciones de películas plásticas para uso industrial.
- Aislamiento y caracterización de enzimas microbianas con aplicación industrial.

(19)

c) Biotecnología ambiental

Investigación básica y aplicada con microorganismos para el mejoramiento operacional de reactores de tratamiento de aguas de desecho, sistemas de aceite soluble y torres de enfriamiento, así como el desarrollo de estrategias de biorremediación microbiana para disminuir o eliminar el impacto negativo de compuestos contaminantes sobre los ecosistemas. Se realizan estudios de la Genómica y Bioquímica microorganismos extremófilos y consorcios microbianos.

Proyectos de investigación

- Desarrollo de procesos para el mejoramiento operacional de reactores de tratamiento de aguas de desecho, sistemas de aceite soluble y torres de enfriamiento.
- Generación de procesos de biorremediación microbiana.
- Estudio del impacto de inoculantes microbianos introducidos a los ecosistemas.
- Estudio de la aplicación de biopolímeros en el tratamiento de efluentes contaminados.

(20)

d) Biotecnología humana y animal

Investigación con microorganismos aplicada al desarrollo de productos y procesos con impacto en la salud humana y animal, así como en la producción pecuaria y acuícola. Se hace un especial énfasis en la selección, caracterización y aplicación de biomoléculas para el desarrollo de fármacos con actividad antitumoral o antibiótica, además de productos que sirvan para la implementación de métodos de diagnóstico.

Proyectos de investigación

- Obtención de productos microbiológicos potencialmente importantes para la salud humana o animal.
- Identificación y producción de compuestos microbianos con actividad antitumoral.
- Análisis de compuestos presentes en plantas sobre el crecimiento de microorganismos patógenos.
- Desarrollo de sistemas diagnósticos para enfermedades infecciosas.
- Producción de moléculas recombinantes para la aplicación en nutrición de camarón.

(21)

Consta de 5 Laboratorios de diferentes áreas que son:

1. Laboratorio de Genética y biología molecular
2. Criadero de insectos
3. Un cepario de *Bacillus thuringiensis*
4. Criadero de hongos
5. Laboratorio de metales pesados

3.6 Laboratorio de Genética y Biología Molecular

3.6.1 Generalidades

En el Laboratorio de genética y biología molecular, trabajan principalmente con la bacteria *Bacillus thuringiensis*. La bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt), es un bacilo flagelado y esporulado, gram positivo que produce durante la esporulación un cristal de proteína tóxica para insectos conocido también como delta endotoxina.

Simbología del Croquis

1. Oficina de el Dr. Benito Pereyra	● Calentadores con agitacion
2. Oficina de la Dra. Magda Iracheta	■ Centrifuga a -4°C
3. Cuarto de Reactivos	— Estanterias
4. Cuarto de cristaleria	▢ Cuartos de ventilacion
5. Pasillo de comunicacion con otro Laboratorio	● Sillas
6. Congelador -20°C	■ Mesas de tabajo
7. Congelador normal	■ Incubadoras
8. Refrigerador a 4°C	■ Centrifugas
9. Refrigerador a 4°C	■ Lavatrstos
10. Campana de seguridad biologica Clase 2	■ Incubadora en baño de agua
11. Microondas	● Olla de presion
12. Campan extractora de gases	▢ Puertas
■ Computadora	
■ Microscopio	
■ Espectrofotometro	
■ Termociclador	
■ Purificador de agua mQ	
■ Luz Ultra Violeta	
■ Pesas	

Figura 5: Simbología del Croquis de laboratorio (Figura 4)

3.6.3 Normativo de seguridad de Laboratorio Clase 2

El personal del laboratorio tiene entrenamiento específico en la manipulación de agentes patógenos y es dirigido por los científicos competentes; (2) el acceso al laboratorio es limitado cuando se está conduciendo el trabajo; (3) las precauciones del extremo se toman con los artículos agudos contaminados; y (4) ciertos procedimientos en los cuales los aerosoles infecciosos o salpican se pueden crear se conducen en los gabinetes biológicos de seguridad o el otro equipo físico de la contención.

Las prácticas siguientes, el equipo de seguridad, y las instalaciones estándares y especiales se aplican a los agentes asignados al nivel 2 de Bioseguridad:

A. Prácticas Microbiológicas Estándares:

1. El acceso al laboratorio es limitado o restringido en la discreción del director del laboratorio cuando los experimentos están en marcha.
2. Las personas se deben lavar las manos después de que manejen los materiales viables, después de quitar guantes, y antes de salir del laboratorio.

3. El comer, el beber, el fumar, la manipulación de las lentes de contacto, y la aplicación de los cosméticos no se permiten en las áreas de trabajo. El alimento se almacena fuera del área de trabajo en los gabinetes o los refrigeradores señalados para este propósito solamente.
4. Se prohíbe el medir con una pipeta de la boca; se utilizan los dispositivos que miden con una pipeta mecánicos.
5. Las políticas para la dirección segura de sostenidos se instituyen.
6. Todos los procedimientos se realizan cuidadosamente para reducir al mínimo la creación de situaciones peligrosas.
7. Las superficies de trabajo son descontaminadas en la terminación de obras o en el final del día y después de que se derramen o chapoteo del material viable con los desinfectantes que son eficaces contra los agentes de la preocupación.
8. Todas las culturas, acción, y otra regularon basuras son descontaminadas antes de la disposición por un método aprobado de la descontaminación tal como autoclave. Los materiales a ser descontaminados fuera del laboratorio inmediato se colocan en un envase durable, hermético y están cerrados para el transporte del laboratorio. Los materiales a ser descontaminados el in-situ de la facilidad se empaquetan de acuerdo con local aplicable, estado, y regulaciones federales, antes del retiro de la facilidad.
9. Un programa de control del insecto y del roedor está en efecto.

B. Prácticas Especiales

1. El acceso al laboratorio es limitado o restringido por el director del laboratorio cuando el trabajo con los agentes infecciosos está en marcha. En general, no se permite a las personas que están en el riesgo creciente de adquirir la infección, o para quienes la infección puede tener consecuencias serias, en los cuartos del laboratorio o del animal. Por ejemplo, las personas que son inmunovulnerables pueden estar en el riesgo creciente de adquirir infecciones. El director del laboratorio tiene la responsabilidad final de determinar cada circunstancia y de determinar quién puede entrar o trabajar en el laboratorio o el cuarto del animal.

2. El director del laboratorio establece políticas y procedimientos por el que solamente Laboratorio de Genética y Biología Molecular las personas que se han aconsejado de los peligros potenciales y los requisitos específicos de la entrada de la reunión (inmunización) puedan entrar en el laboratorio.
3. Un normativo del biohazard se debe fijar en la entrada al laboratorio cuando los agentes etiológicos están en uso. La información apropiada que se fijará incluye el agente(s) en el uso, el nivel de bioseguridad, las inmunizaciones requeridas, el nombre del investigador y el número de teléfono, cualquier equipo protector personal que se deban usar en el laboratorio, y cualesquiera procedimientos requeridos para salir del laboratorio.
4. El personal del laboratorio recibe inmunizaciones o las pruebas para los agentes manejados o potencialmente el presente apropiadas en el laboratorio (vacuna de la hepatitis B o piel de TB que prueba).
5. Cuando es apropiado, en vista de que recogen y se almacenan el agente(s) manejado, las muestras del suero de la línea de fondo para el laboratorio y al otro personal en riesgo. Los especímenes adicionales del suero se pueden recoger periódicamente, dependiendo de los agentes manejados o de la función de la facilidad.
6. Los procedimientos de bioseguridad se incorporan en procedimientos de funcionamiento de estándar o en un manual bioseguridad adoptado o preparado específicamente para el laboratorio por el director del laboratorio. Aconsejan de peligros especiales y se requieren el personal leer y seguir instrucciones en prácticas y procedimientos.
7. El director del laboratorio asegura ese laboratorio y el personal de ayuda recibe el entrenamiento apropiado en los peligros potenciales asociados al trabajo implicado, a las precauciones necesarias para prevenir exposiciones, y a los procedimientos de la evaluación de la exposición. El personal recibe actualizaciones anuales o el entrenamiento adicional como necesario para los cambios policiales procesales.
8. Un alto grado de precaución se debe tomar siempre con cualquier artículo agudo contaminado, incluyendo agujas y jeringuillas, diapositivas, pipetas, tubos capilares, y bisturí.

- a. Las agujas y las jeringuillas u otros instrumentos agudos se deben restringir en el laboratorio para el uso solamente cuando no hay alternativa, tal como inyección parenteral, flebotomía, o la aspiración de líquidos de animales de laboratorio y de botellas del diafragma. Material de plástico se debe sustituir para la cristalería siempre que sea posible.
 - b. Solamente aguja de traba, las jeringuillas o la jeringuilla-aguja disponible las unidades (es decir, la aguja es integral a la jeringuilla) se utilizan para la inyección o la aspiración de materiales infecciosos. Las agujas disponibles usadas no se deben doblar, esquivar, romper, recapitular, quitar de las jeringuillas disponibles, o manipular de otra manera a mano antes de la disposición; algo, deben ser colocadas cuidadosamente en los envases puntura-resistentes convenientemente localizados usados para la disposición de los sostenidos. Los sostenidos No-disponibles se deben poner en un envase duro-emparedado para el transporte a un área de proceso para la descontaminación, preferiblemente esterilizando.
 - c. Se utilizan las jeringuillas que re-forran la aguja, los sistemas sin agujas, y otros dispositivos de seguridad cuando son apropiados.
 - d. La cristalería quebrada no se debe manejar directamente a mano, sino se debe quitar por medios mecánicos tales como un cepillo y aspiradora, pinzas, o fórceps. Los envases de agujas contaminadas, de equipo agudo, y de cristal roto son descontaminados antes de la disposición, según cualquier local, estado, o regulación federal.
9. Las culturas, los tejidos finos, los especímenes de los fluidos corporales, o las basuras potencialmente infecciosas se ponen en un envase con una cubierta que prevenga salida durante la colección, la dirección, el proceso, el almacenaje, el transporte, o enviar.
 10. El equipo del laboratorio y las superficies de trabajo debe ser descontaminado con un desinfectante eficaz sobre una base rutinaria, después de que el trabajo con los materiales infecciosos se acabe, y especialmente después de que los derrames abiertos, salpican, o la otra contaminación por los materiales infecciosos. El equipo contaminado debe ser descontaminado según cualquier local, estado, o regulación federal antes de que se envíe para la reparación o el mantenimiento o se empaque

para el transporte de acuerdo con local aplicable, estado, o regulaciones federales, antes de retiro de la facilidad.

11. Los derrames y los accidentes que dan lugar a exposiciones abiertas a los materiales infecciosos se divulgan inmediatamente al director del laboratorio. Se proporcionan la evaluación, la vigilancia, y el tratamiento médico mientras que se mantienen los expedientes apropiados y escritos.
12. Los animales no implicados en el trabajo que es realizado no se permiten en el laboratorio.

C. Equipo De Seguridad (Barreras Primarias)

1. Se utilizan los campanas biológicas correctamente mantenidos de seguridad, preferiblemente clase II, u otros equipos protectores personales apropiados o dispositivos físicos de la contención siempre que:
 - a. Los procedimientos con un potencial para crear los aerosoles infecciosos o salpican se conducen. Éstos pueden incluir la centrifugación, moler, mezclar, sacudir vigoroso o mezclarse, interrupción sonora, abriendo los envases de los materiales infecciosos que presiones internas pueden ser diferentes de las presiones ambiente, inoculando animales intranasal, y cosechando tejidos finos infectados de animales o de huevos del embrión.
 - b. Utilizan las altas concentraciones o a los volúmenes grandes de agentes infecciosos. Tales materiales se pueden centrifugar en el laboratorio abierto si se utilizan las cabezas de rotor o las tazas selladas de la seguridad de la centrifugadora, y si estos rotores o tazas de seguridad se abren solamente en una campana biológico de seguridad.
2. La protección de la cara (los anteojos, la máscara, el protector de la cara o el otro protector de la salpicadura) se utiliza para anticipado salpica o rocía materiales infecciosos o de otros peligrosos a la cara cuando los microorganismos deben ser manipulados fuera del BSCA.
3. El laboratorio protector cubre, los vestidos, delantales, o los uniformes señalados para el uso del laboratorio se usan mientras que en el laboratorio. Esta ropa

protectora es quitada y dejada en el laboratorio antes de irse para las áreas del no-laboratorio (cafetería, biblioteca, oficinas administrativas).

Toda la ropa protectora se dispone en el laboratorio o es lavada es planchada por la institución; debe nunca ser tomada a casa por el personal.

4. Se usan los guantes cuando las manos pueden entrar en contacto con los materiales potencialmente infecciosos, las superficies contaminadas o el equipo. Usar dos pares de guantes puede ser apropiado. Se disponen los guantes cuando están contaminados abiertamente, y quitados cuando el trabajo con los materiales infecciosos se termina o cuando la integridad del guante se compromete. Los guantes disponibles no se lavan, reutilizado, o utilizado para tocar "limpie" las superficies (teclados, teléfonos, etc.), y no deben ser gastados fuera del laboratorio. Las alternativas a los guantes pulverizados del látex deben estar disponibles. Las manos se lavan después del retiro de guantes.

D. Instalaciones Del Laboratorio (Barreras Secundarias)

1. Proporcione las puertas bloqueables para las instalaciones que contienen agentes restrictos.
2. Considere el localizar los laboratorios nuevos lejos de áreas públicas.
3. Cada laboratorio contiene un fregadero para lavamanos. Se recomiendan el pie, la rodilla, o los fregaderos automáticamente funcionados.
4. Se diseña el laboratorio para poderlo limpiar fácilmente. Las alfombras y las mantas en laboratorios son inadecuadas.
5. Las tapas de los bancos son impermeables al agua y son resistentes al calor moderado y los solventes orgánicos, los ácidos, los álcalis, y los productos químicos usados al descontaminar las superficies y el equipo de trabajo.
6. Los muebles del laboratorio son capaces de apoyar el cargamento y aplicaciones anticipados. Los espacios entre los bancos, los gabinetes, y el equipo son accesibles para la limpieza. Las sillas y otros muebles usados en trabajo del laboratorio se deben cubrir con un material de no tela que pueda estar fácilmente descontaminado.
7. Instale los gabinetes biológicos de seguridad de manera que las fluctuaciones del aire de la fuente y de extractor del sitio no hagan los gabinetes biológicos de

seguridad funcionar fuera de sus parámetros para la contención. Localice los gabinetes biológicos de seguridad lejos de puertas, de las ventanas que se pueden abrir, de áreas pesadamente viajadas del laboratorio, y del otro equipo potencialmente quebrantador para mantener los parámetros del flujo de aire de los gabinetes biológicos de seguridad para la contención.

8. Una estación de lavado para ojos está fácilmente disponible.
9. La iluminación es adecuada para todas las actividades, evitando las reflexiones y el fulgor que podrían impedir la visión.
10. No hay requisitos específicos de la ventilación. Sin embargo, el planear de nuevas instalaciones debe considerar los sistemas de la ventilación mecánica que proporcionan un flujo interno del aire sin la recirculación a los espacios fuera del laboratorio. Si el laboratorio tiene ventanas que dan al exterior, se tapan con las pantallas de la mosca.

1. Técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos

El ácido desoxiribonucleico o ADN (DNA) es la molécula que guarda el código genético de todas las células. Sin importar que el organismo sea multicelular o unicelular, eucariota o procariota, todos tienen el DNA como vehículo de su código genético.

Muchas de las técnicas de biología molecular incluyen algún tipo de manipulación del material genético. Estos procedimientos han logrado adelantar hasta tal grado el conocimiento del código genético, que ya es posible clonar organismos enteros. Los procedimientos iniciales eran largos y tediosos y podían pasar varios días antes de saber con certeza que se había logrado obtener DNA en calidad y cantidad suficiente para poder manipularlo. Además algunos de los reactivos usados para estos procesos son tóxicos y mutagénicos. Hoy día podemos obtener suficiente DNA de buena calidad en unas horas.

4.1 Ácidos Nucleicos

El DNA o ácido desoxiribonucleico, se puede considerar como el “cerebro” celular que regula el número y naturaleza de cada tipo de estructura y composición celular, transmitiendo la información hereditaria y determinando la estructura de las proteínas, que a través de enzimas determinará el resto de funciones celulares.

A finales del siglo pasado se descubrió también la existencia de una segunda clase de ácido nucleico, denominado ácido ribonucleico (RNA). El RNA se encuentra tanto en el núcleo (concretamente en el nucleolo) como en el citoplasma de las células de manera abundante.

Ambos tipos de ácido nucleico, DNA y RNA, se encuentran simultáneamente en organismos eucariotas (con células de núcleo diferenciado) y procariotas (bacterias, etc.), y sólo uno de ellos en los virus.

COMPOSICIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Los ácidos nucleicos polímeros de alto peso molecular constituidos por unidades elementales denominadas **“nucleótidos”**, los cuales están formados por tres componentes:

1. Molécula de azúcar

⇒ Ribosa, en el caso del RNA

⇒ Desoxirribosa, en el caso del DNA

2. Base orgánica nitrogenada

⇒ Adenina, guanina (bases púricas), citosina y timina (bases pirimidínicas) en el caso del DNA.

⇒ Adenina, guanina (bases púricas), citosina y uracilo (bases pirimidínicas) en el caso del RNA.

3. Grupos fosfato

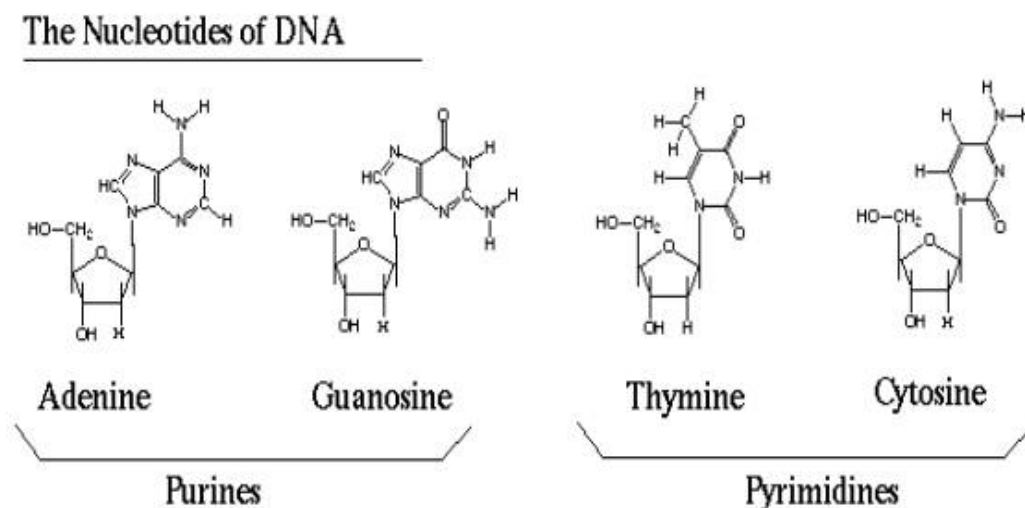


Figura 6: Estructura de los nucleótidos

Los nucleótidos se unen formando cadenas cuyo esqueleto está formado por la unión entre un azúcar de un nucleótido y el fosfato del siguiente, quedando las bases nitrogenadas en la parte central, unidas cada una al carbono 1 del azúcar. Estas bases son las que rinden especificidad al ácido nucleico.

ESTRUCTURA DEL DNA

Estructura primaria

La estructura primaria viene dada por la secuencia de nucleótidos. Cuando se quiere representar la secuencia de un oligonucleótido o de un ácido nucleico, se representa mediante la terminología de cada una de las bases. Por ejemplo:

5'-ATCCCAGCCCGATTAAAGCC-3'

Esta secuencia representa un oligonucleótido con 20 bases, de las cuales 6 son adeninas (A), 3 son timinas (T), 8 son citosinas (C) y 3 guaninas (G).

El orden de la secuencia es muy importante, ya que en él reside la información contenida en el ácido nucleico; la orientación viene dada en el sentido 5' → 3' ó 3' → 5'; el 5' representa el extremo terminal del fosfato y el 3' el extremo final del átomo de carbono de la desoxirribosa.

Estructura secundaria

Edwin Chargaff analizando las bases del DNA mediante métodos cromatográficos descubre, que éstas no se encuentran en la misma proporción y que el número de adeninas es igual al de timinas y el de citosinas, al de guaninas.

En 1953 James Watson y Francis Crick construyeron un modelo tridimensional del DNA con la configuración más favorable energéticamente combinando los datos obtenidos hasta entonces sobre él, los descubrimientos de Chargaff y la interpretación tridimensional de los espectros de difracción de Rayos X; esto último fue de gran importancia para la consecución de tal modelo, el cual consiste en una doble hélice

antiparalela cuyo esqueleto fundamental está formado por las cadenas de azúcar-fosfato, quedando en la parte central las bases, enfrentadas las de una cadena con las de la otra complementaria y formando entre sí puentes de hidrógeno, factor que da estabilidad a la doble hélice. El enfrentamiento de bases es constante; la adenina siempre se enfrenta con la timina y entre sí se forman dos puentes de hidrógeno, y la guanina con la citosina, formándose entre ambas tres puentes de hidrógeno. Esta característica provoca que las dos cadenas sean complementarias. Las dos cadenas de la doble hélice tienen sentidos opuestos, mientras una va en sentido 5' → 3' y la otra lo hace en sentido 3' → 5'. Por eso hablamos del DNA como una doble hélice antiparalela.

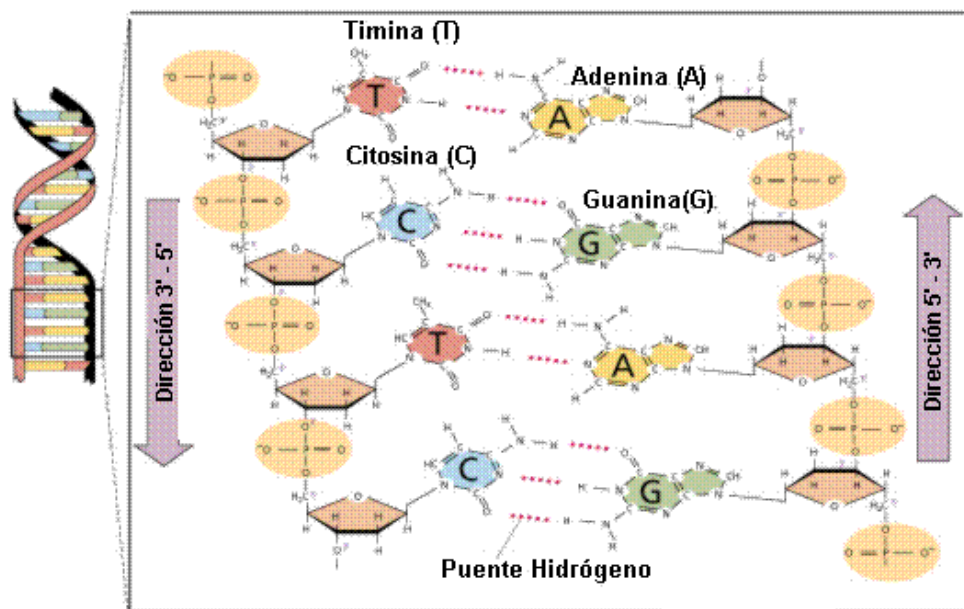


Figura 7: Unión de la doble cadena por los puentes de Hidrógeno

Disposición de la unión entre bases formando dos puentes de hidrógeno entre adenina –timina y tres puentes de hidrógeno entre citosina - guanina.

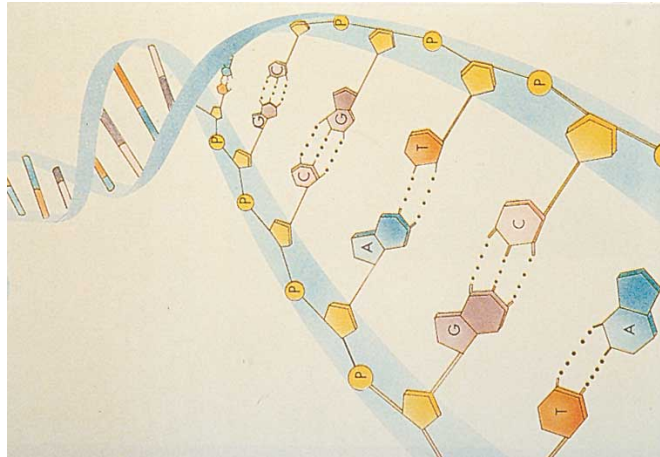


Figura 8: Estructura de doble hélice del DNA.

Estructuras terciaria y cuaternaria

Teniendo en cuenta que la longitud de una hebra de DNA humano es de varios metros, por necesidad debe adoptar otras estructuras para poder estar en el interior celular. Estas estructuras, terciaria y cuaternaria, permiten el empaquetamiento del DNA formando los cromosomas. En las células eucariotas existen varios cromosomas y en los procariontes, existe un DNA empaquetado denominado pseudocromosoma.

ESTRUCTURA DEL RNA

El RNA generalmente está formado por una sola cadena de nucleótidos, aunque existen algunos virus que poseen RNA de doble cadena.

Los ácidos ribonucleicos no sólo pueden tener información propia, sino que constituyen la herramienta para la conversión de la información contenida en el DNA en proteínas específicas.

PROPIEDADES DEL DNA

Las hebras del DNA que forman la hélice tienen orientaciones opuestas: una va en la dirección 5'-3' y su complementaria en la 3'-5'. La ruptura de los puentes de hidrógeno por calor, álcali o diversos compuestos químicos, produce la separación

física de las dos hebras del DNA en un proceso denominado **desnaturalización**. La desnaturalización por calor es total a los 90°C y por alcalinidad a pH superior a 11,3. En ambos casos el proceso es reversible, y al desaparecer el agente desnaturalizante se produce la **renaturalización** de la molécula, esto es, la re-adquisición de la estructura helicoidal perdida. ´

El proceso de desnaturalización va seguido por un aumento de la absorción de luz ultravioleta (260 nm) denominado **efecto hipercrómico**.

Otro concepto interesante de definir es el de **temperatura de fusión (Tm)**, que es la temperatura a la que la mitad de las moléculas de una solución de ácido nucleico, han pasado a estado desnaturalizado. Esta temperatura depende del número de pares G-C que existan en la molécula de ácido nucleico. Cuando mayor sea este mayor será la Tm.

FUNCIONES DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

- **DNA**

Su función principal consiste en la conservación de la información de la célula u organismo que lo contiene y la transmisión de esta información al replicarse.

- **RNA**

En algunos virus su función es contener y transmitir información. Pero, como hemos citado anteriormente, su función más importante consiste en la conversión de la información contenida en el DNA en proteínas específicas. Para ello existen varios tipos de RNA: RNA mensajero (RNAm), RNA transferente (RNAt) y RNA ribosómico (RNAr).

4.1.1 Extracción de ácidos nucleicos

a) Extracción de ADN

Materiales:

- Tejido del organismo
- Mortero y pistilo
- Tubos eppendorf 2 ml
- Tubos eppendorf 1.5 ml
- Micropipetas
- Centrifuga
- Buffer de extracción
- Incubadora de baño de agua
- Fenol- cloroforma (1:2)
- Isopropanol
- Etanol al 70%
- Agua bidestilada o mQ
- Refrigeradora 4°C
- Vortex

Métodos:

- 1) tomamos una muestra del tejido del organismo que quiere examinar, la cantidad necesaria de tejido depende de el organismo y el tejido del organismo y la cantidad necesaria. Ejemplos para PCR: Sangre: de 1-3 ml; tejido muscular 3 gr.; hepatopancreas: 3 gr.; Branquias 2 gr. Etc..
- 2) Moler los tejidos en un mortero frió en un ambiente estéril, hasta obtener una mezcla homogénea y viscosa.
- 3) Tomar 1.5 ml de la muestra molida y depositar en tubos eppendorf de 2ml y concentrar un paquete centrifugando por 5 min. a 10,000 rpm.
- 4) Decantar, añadir de nuevo 1.5 ml de la muestra, centrifugar por 5 min. a 10,000 rpm. para obtener un paquete celular de 3 ml.

5) Al paquete celular agregar 1.5 ml de buffer de extracción, que contiene:

Sustancia	Concentración
• Tris – HCl, pH 8.0.....	50 mM
• SDS.....	2%
• NaCl.....	0.75 M
• EDTA.....	10 mM
• Proteinaza K	100 µg/ml

6) Resuspender completamente y incubar las muestras en baño de agua a 65°C por un tiempo aproximado de 30 min. a 60 min.

7) Luego de la incubación, se debe recuperar el sobrenadante y transferirlo a tubos eppendorf de 1.5 ml., adicionar un volumen igual la extraído de Fenol -cloroformo (1:2).

8) Mezclar completamente, mediante la agitación.

9) Centrifugar 14,000 rpm por 2 – 4 min.

10) Extraer la fase acuosa y transferir a otros tubos eppendorf de 1.5 ml.

11) Verificar que la fase acuosa este clara y transparente, en caso de que no, aplicar de nuevo el mismo volumen de Fenol – cloroformo (1:2), resuspender por agitación, y centrifugar a 14,000 rpm por 2 – 4 min.. Repetir hasta que se aclare.

12) A la fase acuosa ya transferida a un tubo limpio eppendorf de 1.5, agregar 60% del volumen de la muestra de Isopropanol.

13) Dejar precipitando a –20°C por 1 horas, o a 4°C por 12 - 16 horas.

14) Centrifugar las muestras a 12 rpm por 5 – 10 min.

15) Decantar, y añadir 1 ml de etanol al 70 % frío.

16) Resuspender completamente, y centrifugar a 10,000 rpm por 5 min.

17) Decantar y dejar secando boca abajo por 1 – 2 horas, hasta que se seque por completo.

18) Resuspender en 50 µL de agua bidestilada estéril o agua mQ.

b) Extracción de ARN

Materiales:

- Tejido del organismo
- Hielo
- Mortero y pistilo
- Guantes, bata
- Micropipetas
- Tubos eppendorf de 2 ml
- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Trizol
- Vortex
- Centrifuga
- Cloroformo
- Isopropanol
- DEPC o Etanol al 70%
- Espectrofotómetro.

Métodos:

1. Tomar una muestra del tejido del organismo que quiere examinar, la cantidad necesaria de tejido depende del organismo y el tejido del organismo y la cantidad necesaria. Ejemplos para PCR: Sangre: de 1-3 ml; tejido muscular 3 gr.; hepatopancreas: 3 gr.; Branquias 2 gr. Etc..
2. Moler los tejidos en un mortero frío en hielo y en un ambiente estéril, hasta obtener una mezcla homogénea y viscosa.
3. Trabajar todo lo mas estéril posible con guantes y bata.
4. Coloque la muestra en el hielo en un tubo de 1.5 ml y agregue hasta 300µL de Trizol.
5. Homogeneice la muestra agitando en vortex el pellet por 30 seg. en pulsos cortos. Evite de calentar la muestra.
6. Agregue 700 µL más de Trizol para completar 1 ml. La muestra se puede almacenar a una temperatura de -80°C .
7. Centrifugar a 13,000 RPM por 3 min.
8. Transfiera el sobrenadante a un tubo limpio de 1.5 ml.
9. Agregue 0.2 volumen de cloroformo (200 µL) y mézclase fuertemente por el 15 seg.

10. Incube en la temperatura ambiente por 2-3 min.
11. Centrifugar a 13,000 RPM por 5 min.
12. Transfiera la fase superior a un tubo limpio (evite de tocar la interfase!).
13. Agregue 0.7 volumen (de la fase superior) del isopropanol ($\mu\text{L} \pm 350$).
14. Mezcle suavemente por inversión el tubo 10 veces.
15. Incube en la temperatura ambiente por 5 min.
16. Centrifugue a 13,000 RPM por 5 min.
17. Quite el sobrenadante con el cuidado de quede el pellet en la parte inferior del tubo.
18. Lave la pellet con 1 ml de etanol al 70% o DEPC.
19. Centrifugar a 13,000 RPM por 10 min.
20. Decantar y secar el pellet (brevemente), dejar secando por un tiempo breve.
21. Resuspenda de nuevo en el volumen del deseado de agua de DEPC (para 15 μl de las moscas ± 30).
22. (el agua de DEPC calentada en 55°C ayuda al resuspensión).
23. Mida la concentración en espectrofotómetro.
24. Correr 1 μl en un gel del agarosa al 1%.
25. Almacene en -80°C hasta uso.

4.2 Diseño de Oligonucleótidos (Primers) para PCR

Uno de los parámetros más importantes para tener éxito en la amplificación por PCR es el diseño de los oligonucleótidos cebadores (oligos o *primers*). Si éstos no están bien diseñados la PCR puede no funcionar bien; el resultado es la nula amplificación del producto debido a amplificación no específica o a la formación de dímeros de oligonucleótidos que pueden competir con la amplificación del producto deseado.

Variables a tener en cuenta (muy importantes)

1. **Tamaño del oligonucleótido**
2. **Temperatura de fusión (T_m)**

- 3. Especificidad**
- 4. Secuencias complementarias**
- 5. Contenido en G/C y trectos de polipirimidinas (T, C) or polipurinas (A, G)**
- 6. Secuencia 3' terminal.**
- 7. Secuencia 5' terminal y regiones centrales**

Se verá cada elemento por separado:

Tamaño del oligonucleótido

El tamaño del oligonucleótido influye en la especificidad, en la temperatura de fusión y en el tiempo necesario para la hibridación del oligonucleótido a su secuencia complementaria, por tanto es decisivo para que salga bien la PCR. Los oligonucleótidos de 18 a 24 bases son muy específicos de secuencia, siempre que la temperatura de hibridación sea óptima.

El tamaño del oligonucleótido es proporcional a la eficiencia de hibridación: en general, cuanto más largo sea el oligonucleótido más ineficiente será la hibridación. Si hay pocos moldes con su oligonucleótido hibridado (o anillado) en cada paso de la PCR el resultado va a ser muy poco producto amplificado.

Los oligos no deberían ser demasiado cortos a menos que se especifique lo contrario en el protocolo. La meta es diseñar un oligonucleótido con una temperatura de hibridación (la que programamos en el termociclador) de al menos 50°C.

La relación entre temperatura de hibridación y temperatura de fusión es muy importante en la PCR. Como regla general la temperatura de hibridación debe ser 5-8°C más baja que la de fusión. Por tanto, si queremos un oligonucleótido con una temperatura de hibridación de al menos 50°C, correspondería a un oligonucleótido con una temperatura de fusión de ($T_m \sim 55-58^\circ\text{C}$).

A menudo, la temperatura de hibridación así determinada no es óptima y es necesario determinarla empíricamente. Se puede hacer fácilmente con un termociclador con gradiente.

Temperatura de fusión (Tm)

Es importante tener en cuenta que en una reacción de PCR hay dos oligonucleótidos. Ambos oligonucleótidos deberían diseñarse de manera que tengan temperaturas de fusión similares. Si los oligonucleótidos no tienen Tm parecidas, la amplificación será menos eficiente o incluso puede no funcionar ya que el oligonucleótido con la Tm más alta hibridará mal o inespecíficamente a bajas temperaturas mientras que el oligonucleótido con la Tm más baja puede que no funcione a temperaturas más altas.

Las temperaturas de fusión de los oligos se calculan de una manera muy exacta con cálculos termodinámicos usando la siguiente fórmula:

$$T_{m_{\text{oligonucleótido}}} = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln (c/4)} - 273.15^{\circ}\text{C} + 16.6 \log_{10} [K+]$$

Donde H es la entalpía y S la entropía para la formación de la hélice, R es la constante molar y c es la concentración del oligonucleótido. Pero lo más sencillo es usar cualquiera de los paquetes de software para el diseño de oligonucleótidos del mercado. Por suerte, una buena aproximación (generalmente válida para oligos en el rango de 18–24 bases) a la Tm se puede calcular con la fórmula:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C) \text{ Fórmula de Wallace}$$

En esta tabla hay valores de Tm de oligonucleótidos de varios tamaños usando la fórmula de Wallace asumiendo un contenido en G/C del 50%.

Las temperaturas calculadas usando la ecuación de Wallace son inexactas en los valores extremos.

Además hay que tener cuidado de que la T_m del producto sea lo suficientemente baja para asegurar que esté totalmente desnaturalizada a 92° . Este parámetro ayudará a asegurar una PCR más eficiente, pero no siempre es necesario para amplificar por PCR. En general, productos entre 100–600 pares de bases se amplifican eficientemente en muchas reacciones de PCR. En caso de duda, la T_m del producto puede calcularse con la fórmula:

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log_{10}[K+] + 0.41 (\%G+C) - 675/\text{tamaño}.$$

Bajo condiciones estándar de PCR de 50 mM KCL, se reduce a:

$$T_m = 59.9 + 0.41 (\%G+C) - 675/\text{tamaño}$$

Especificidad

La especificidad del oligonucleótido depende parcialmente del tamaño del oligonucleótido. Es evidente que hay más combinaciones de oligos de 24 bases que de 15 bases. Con todo, debemos elegir oligonucleótidos que tengan una secuencia única en el molde de DNA que queremos amplificar. Por ejemplo: un oligonucleótido diseñado con una secuencia altamente repetitiva resultará en un “smear” cuando amplifiquemos DNA genómico; sin embargo, el mismo oligonucleótido puede dar una sola banda si amplificamos un clon de una genoteca de DNA.

Como la Taq Polimerasa es activa en un amplio rango de temperaturas, puede extender el oligonucleótido a temperaturas bajas de hibridación. Si la temperatura es demasiado baja, puede suceder una hibridación no específica que será extendida por la polimerasa con que haya una pequeña homología en el extremo 3' del oligonucleótido. En general, una temperatura de fusión de 55°C – 72°C es la más adecuada (Fíjate que corresponde a un tamaño de oligonucleótido de 18–24 bases según la regla de Wallace).

Complementariedad en la secuencia de los oligonucleótidos

Es muy importante que los oligonucleótidos no tengan homología intra-oligonucleótido en más de 3 pares de bases. Si un oligonucleótido tiene una región de auto-homología, se pueden formar estructuras parcialmente de doble cadena que interferirán con la hibridación al molde.

Otro peligro es la homología entre los dos oligonucleótidos. Homología parcial en las regiones medias de dos oligonucleótidos puede interferir con la hibridación. Si la homología ocurriese en el extremo 3' de cada oligonucleótido, se dará la formación de dímeros de oligonucleótido que impedirán la formación del producto por competición.

Contenido en G/C y extensiones de polipirimidinas (T, C) o polipurinas (A, G)

La composición de bases de los oligonucleótidos debería ser del 45% al 55% en GC. La secuencia del oligonucleótido debería elegirse de manera que no contenga zonas de poliG o poliC que puedan llevar a hibridación no específica. Hay que evitar también las zonas ricas en poli A y poli T ya que es por donde puede deshibridarse el complejo molde–oligonucleótido lo que llevaría a una menor eficiencia de amplificación. También hay que evitar secuencias ricas en polipirimidinas (T, C) y polipurinas (A, G). Idealmente el oligonucleótido deberá tener una mezcla casi a alzar de nucleótidos, un contenido en GC del 50% y ~ 20 bases (la Tm estaría en el rango de 56°C – 62°C).

Secuencia 3'-terminal

Se sabe que la posición 3' terminal de los oligonucleótidos de PCR es esencial para controlar el apareamiento incorrecto. Ya hemos visto el problema de la homología del oligonucleótido en esas regiones. Otra variable que hay que considerar es que haya algún residuo de G o C en el extremo 3' del oligonucleótido. Este “cepo de GC” (en inglés “CG Clamp”) ayuda a asegurar que el extremo 3' hibride correctamente debido a los enlaces de hidrógeno que se dan entre los residuos de GC. También ayuda a mejorar la eficiencia de la reacción de PCR minimizando cualquier deshibridación que pudiese ocurrir.

Los oligos con secuencias inestables en el extremo 3' ($G > -9$ kCal/mol) a menudo son más específicos ya que el potencial de apareamiento en lugares incorrectos es menor. Por lo general, esta condición se puede cumplir incluyendo como mucho dos residuos G o C en la últimas cinco bases del extremo 3' terminal.

Secuencia 5'-terminal y regiones centrales.

Es conveniente incluir en esas zonas “cepos GC” para dar mayor estabilidad a la hibridación del oligonucleótido con su secuencia diana.

4.2.1. Diseño y revisión de oligonucleótidos por medio de la informática:

1) Primero se debe ingresar a la pagina:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

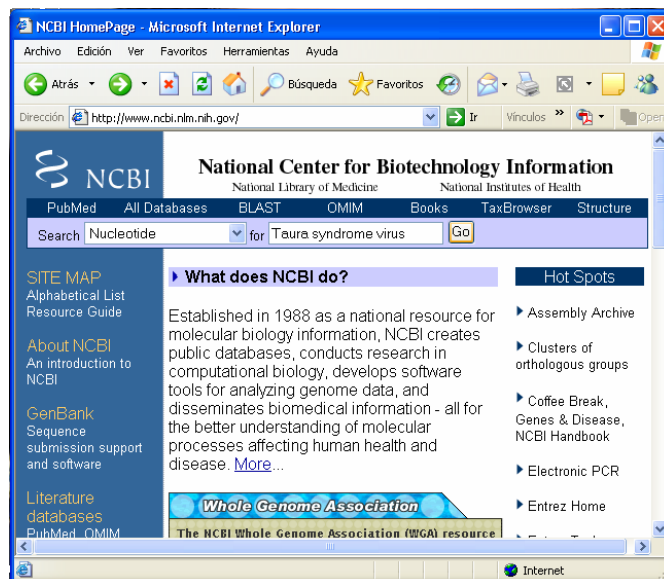


Figura 9: Pagina WEB principal de NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- 2) Estando en la pagina principal, se debe seleccionar donde “search” la opción Nucleotide y donde dice “For”, el nombre de la enfermedad: en este caso Taura síndrome virus. Presionar Go o Enter.
- 3) Luego se secciona el artículo que estamos buscando, en este caso el primero.

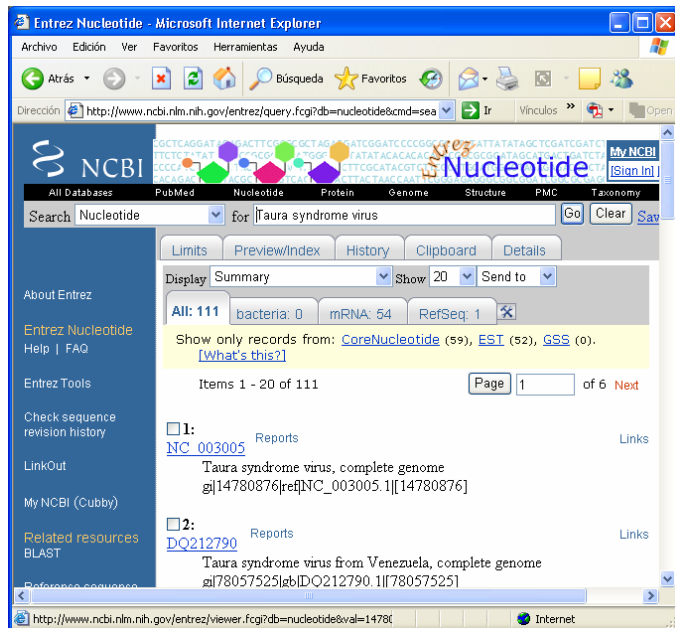


Figura 10: Pagina WEB de NCBI, selección de Secuencia

- 4) Luego nos sale toda la información de la secuencia y la secuencia, seleccionar en donde dice “Display” la opción FASTA, y de allí nos cambia al formato que necesitamos la secuencia, seleccionar y copiar un segmento de la secuencia de aproximadamente 500 a 1000 pares de bases (Únicamente la secuencia).

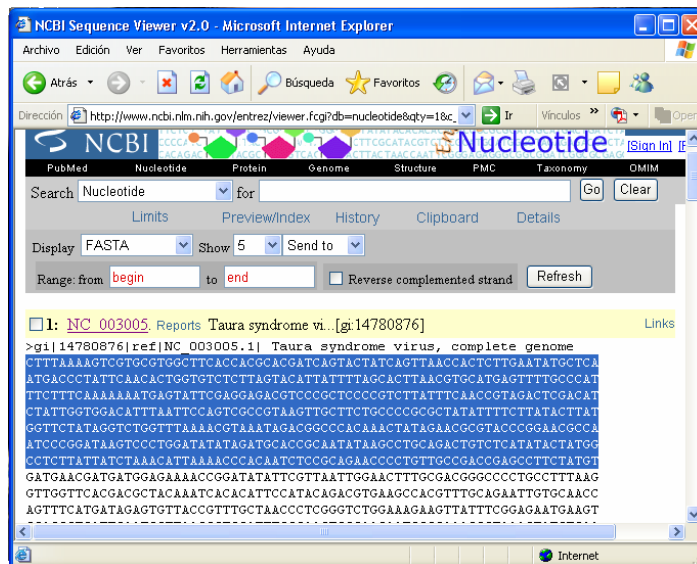


Figura 11: Pagina WEB de NCBI, copia de Secuencia

- 5) Regresar a la pagina principal y presionar “BLAST”, y allí seleccionar en el cuadro de “Nucleotide” la opción “Search for short, nearly exact matches”

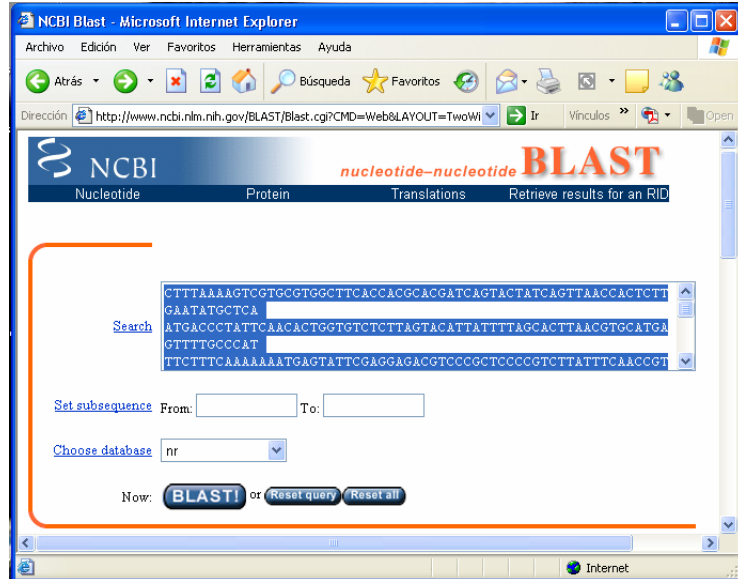


Figura 12: Pagina WEB de NCBI, Búsqueda de Secuencia seleccionada

- 6) Pegar la secuencia en el cuadro en blanco donde dice “search” y presionar la tecla que dice “BLAST!”. Y luego sale una pagina en la que se debe presionar “Format!”

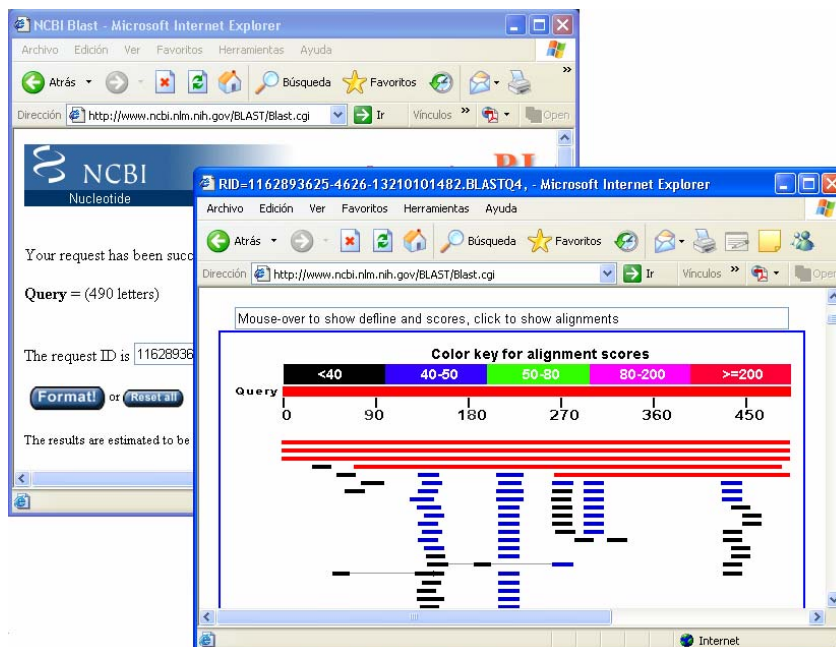


Figura 13: Pagina WEB de NCBI, comparación de Secuencia seleccionada

- 7) En la pagina se abrirá es para encontrar secuencias similares a la que nosotros seleccionamos, en esta pagina nueva se debe de revisar si no hay algún otro organismo parecido, si no lo hay como en este caso, quiere decir que nuestra secuencia, es adecuada para realizar Primers.
- 8) Luego abrir otra pagina con esta dirección:
<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>
- 9) En esta pagina nos sirve para buscar opciones de primers, para que los podamos usar. Pegar la secuencia que se ha seleccionado con anterioridad en el cuadro en blanco donde dice “Sequence” y presionar “calcular”

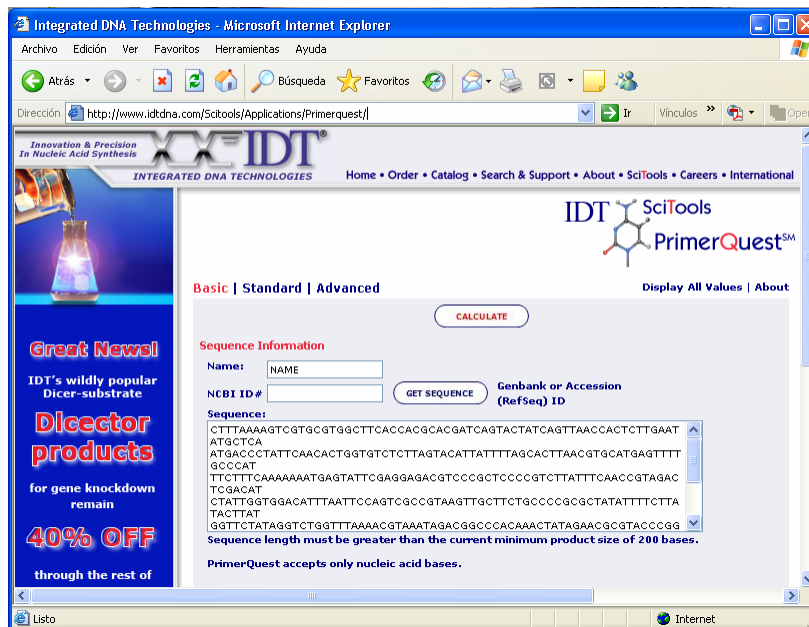


Figura 14: Pagina WEB de IDTNA, búsqueda de primers en la secuencia Seleccionada

- 10) Se abrirá una pagina en la cual dará toda la información del segmento y diferentes opciones de primers de los cuales se escogen los mas adecuados según la necesidad.

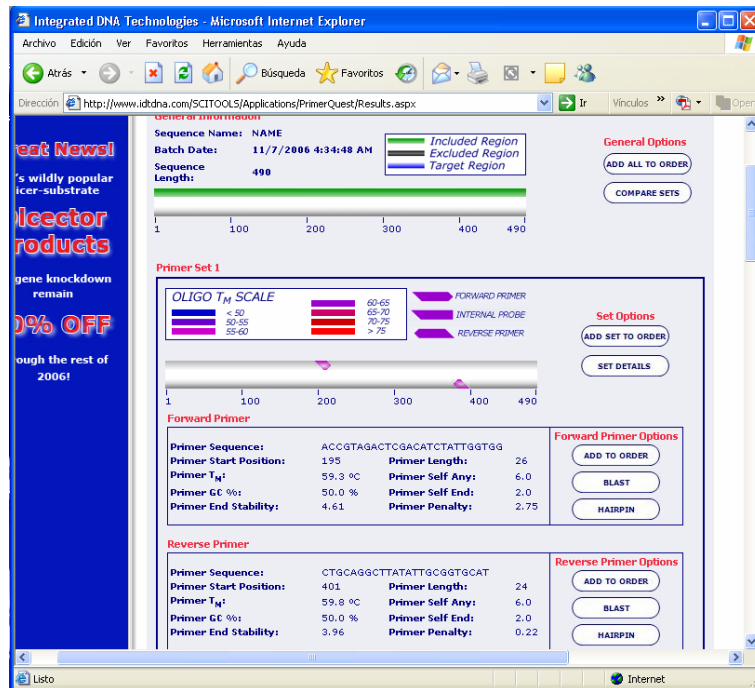


Figura 15: Pagina WEB de IDTNA, selecci3n de primers en la secuencia Seleccionada

11) Seleccionar los primers y anotarlos en alg3n lugar. Y abrir una pagina con la siguiente direcci3n:

<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

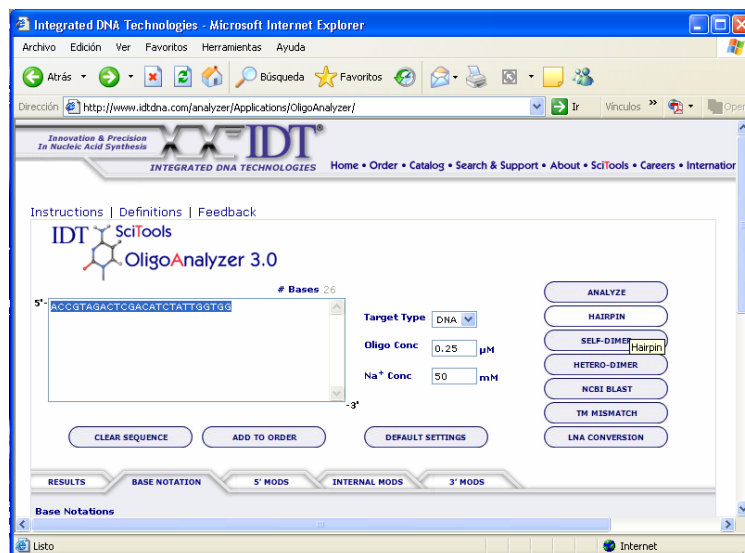


Figura 16: Pagina WEB de IDTNA, prueba de primers

- 12) En esta página es para verificar que los primers son buenos y que no se asociaran entre ellos mismos, con otros iguales a ellos o con el primer reversa. Se debe colocar el primer forward para comprobarlo, presionar la tecla que dice “HAIRPIN” y luego “SUBMIT”. (probar Después el primer reverse)

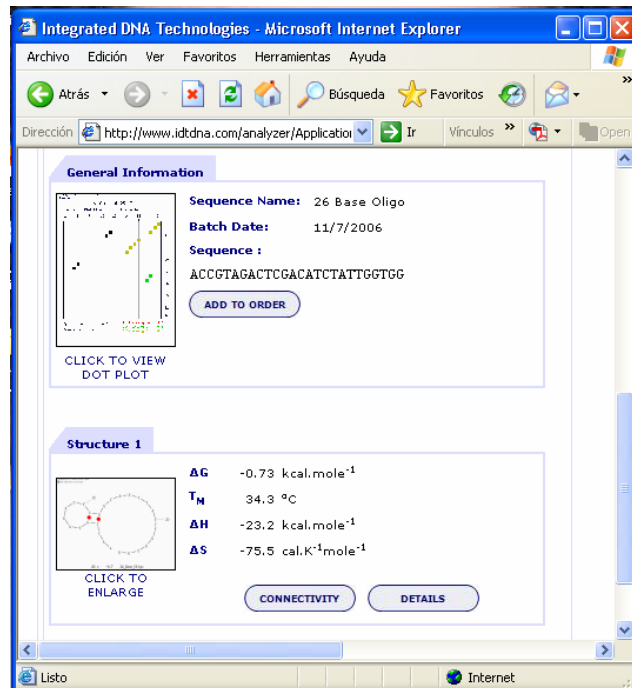


Figura 17: Pagina WEB de IDTNA, resultados prueba de primers con hairpin

- 13) Luego presionar la tecla que dice “*SELF-DIMER*”, en el cual aparecerá toda la información para ver la posibilidad de que el un primer forward se una a otro primer forward. Verificar que no sean complementarios unos con otros, verificar que la cantidad de energía Delta G máxima no se aproxime a ninguna Delta G de las posibilidades de unión. (probar Después el primer reverse)

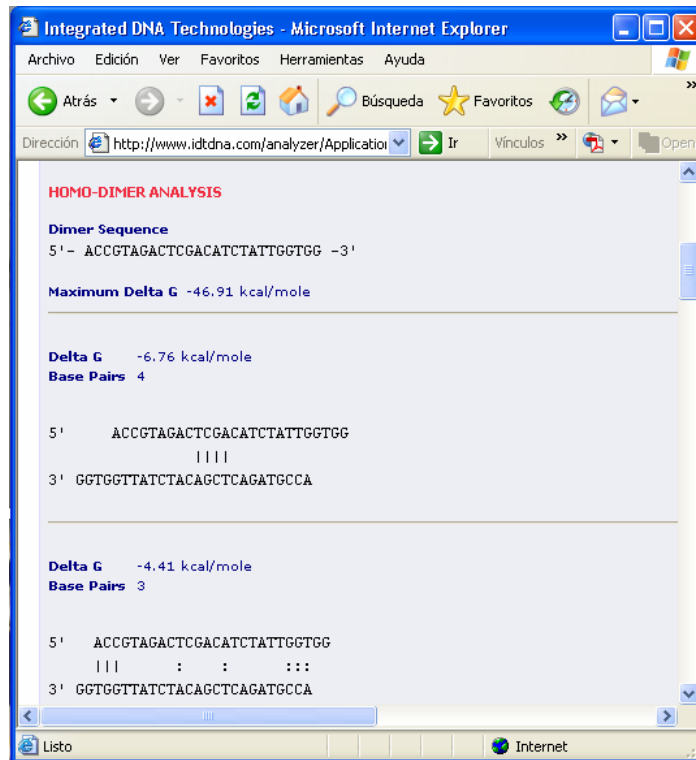


Figura 18: Pagina WEB de IDTNA, resultados prueba de primers con self-dimer

- 14) Luego presionar donde dice "*HETERO-DIMER*", en el cual tenemos que insertar las dos secuencias en los cuadros en blanco y presionar "CALCULAR", en el cual aparecerá toda la información para ver la posibilidad de que el un primer forward se una a un primer reverse. Verificar que no sean complementarios unos con otros, verificar que la cantidad de energía Delta G máxima no se aproxime a ninguna Delta G de las posibilidades de unión.

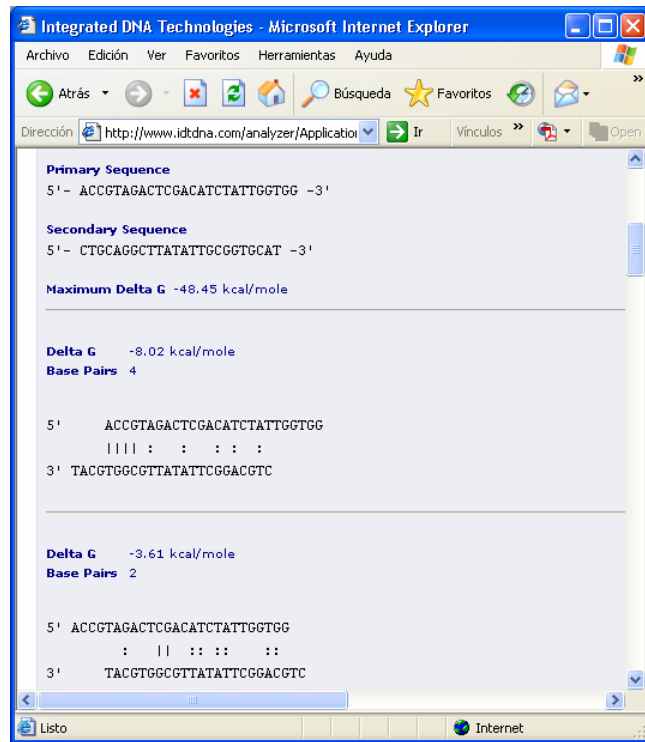


Figura 19: Pagina WEB de IDTNA, resultados prueba de primers con hetero-dimer

- 15) Después de haber revisado ambos primers, y ninguno se asocian con ellos mismos, con otros iguales a ellos o con el otro primer, quiere decir que nuestros primers son buenos y eficaces para usarlos en una misma reacción para PCR.

4.3 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

4.3.1 Introducción

En los años setenta se desarrollaron los métodos que permitieron de manera simple y relativamente rápida para determinar la secuencia nucleotídica de cualquier fragmento de DNA. Estos primeros intentos de secuenciar los ácidos nucleicos siguieron los pasos empleados en la secuenciación de proteínas: romper las moléculas en pequeños fragmentos, determinar su composición de bases y deducir la secuencia a partir de fragmentos solapantes. Este método resulta más o menos sencillo para proteínas que resultan de la combinación de hasta veinte aminoácidos distintos, pero constituye un problema en el caso de los ácidos nucleicos donde la secuencia resulta de la combinación de únicamente cuatro nucleótidos diferentes.

4.3.2 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

En Abril de 1983, Kary Mullis dio a conocer la Técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR que es una técnica para la síntesis "in Vitro" de secuencias específicas de DNA con la cual la insuficiente cantidad de ADN ya no es un problema en los procedimientos de Biología Molecular ni en los procedimientos de diagnóstico basados en el estudio de DNA.

La técnica se basa en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5' → 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA que se desea amplificar.

Partiendo de este principio, la reacción en cadena de la polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1ª Desnaturalización del ADN doble cadena

2ª Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras

3ª Extensión del iniciador por actuación de la DNA polimerasa

En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.

En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50-65° C).

En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5'→ 3' mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde.

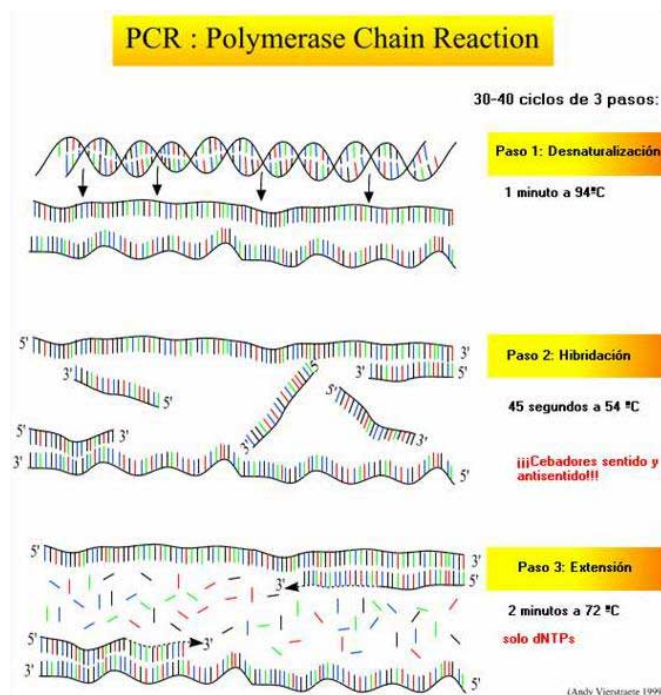


Figura 20: Pasos de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR

Este proceso se lleva a cabo en un equipo llamado termociclador. Este aparato realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta.



Figura 21: Termociclador

Observemos en las figura 21, observamos que una vez completado el primer ciclo, disponemos de 2 copias de la muestra original, al final del segundo ciclo tenemos 4, al final del tercero 8...Si los ciclos se producen un número "n" de veces y suponiendo que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo, obtenemos una cantidad de ADN de 2^n , por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica.

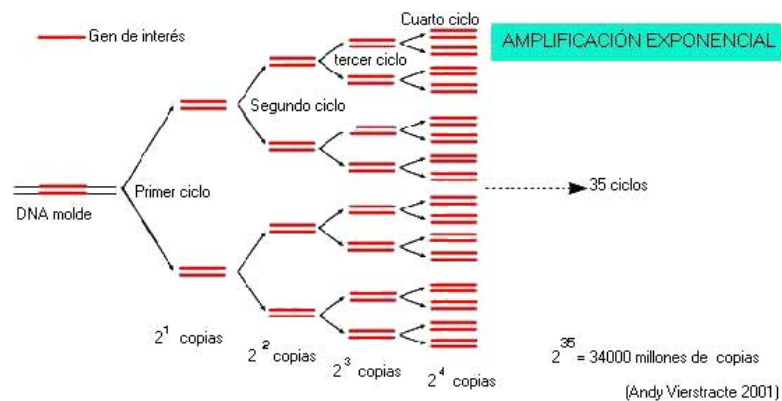


Figura 22: Amplificación exponencial del PCR

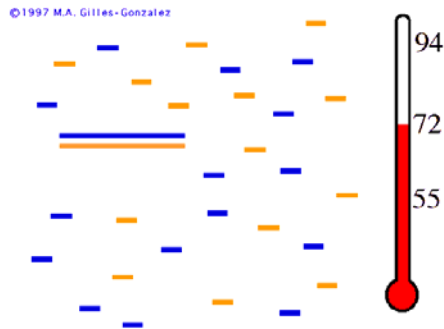


Figura 23: Temperaturas para amplificación exponencial del PCR

Es importante recalcar que los productos obtenidos tras la tercera etapa son de dos tipos: "producto corto" y "producto largo". El producto corto tiene una longitud perfectamente definida por los extremos 5' de los cebadores y contiene exactamente la secuencia que se desea amplificar. Es el fragmento que se almacena de manera exponencial durante la reacción. El producto largo es el que incorpora las cadenas de ADN originales de la muestra y cuyos extremos 3' no están definidos. Sin embargo, es importante aclarar que al final de la PCR, la cantidad del producto corto sintetizado es muy superior en comparación con el producto largo, por lo general para posteriores estudios, a partir del producto de la PCR, se desestima.

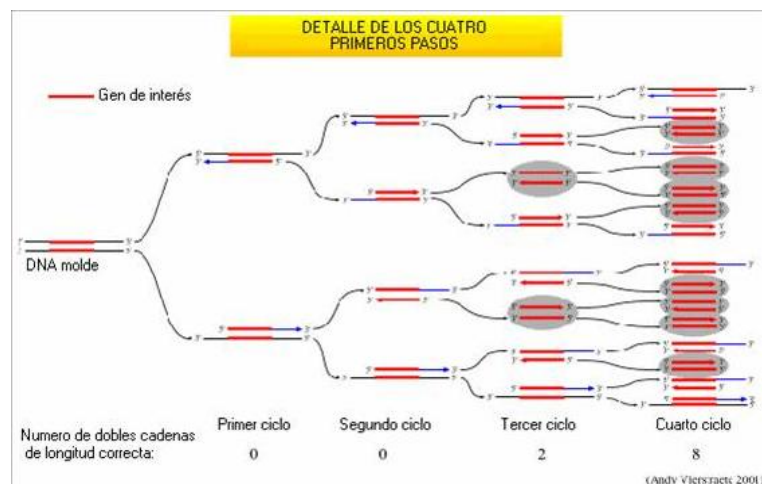


Figura 24: Primeros 4 pasos de la amplificación de PCR

4.3.3 Preparación de muestras para PCR

Materiales:

- Buffer 10x (buffer de la polimerasa)
- $MgCl_2$
- dNTP's (Nucleotidos)
- Primer 1 (el complementario a la cadena 5' a 3')
- Primer 2 (el complementario a la cadena 3' a 5')
- ADN Molde (el ADN muestra)
- H_2O mQ Estéril o bidestilada Estéril
- Enzima para la polimerización (Taq Polimarasa)

Métodos: (preparación para una reacción total de 50 μ L)

1. Seleccionar la muestra que se quiere amplificar.
2. Tomar 35 μ L de la muestra de ADN. Esta servirá de ADN molde.
3. Montar la reacción en tubos eppendorf de 200 μ L para PCR en el siguiente orden:

Cuadro 1: Componentes y concentraciones de la reacción para la PCR

Componentes	Concentración deseada	Ejemplo para un total de 50 μ L
Buffer 10x	10 x	5.0 μ L
$MgCl_2$	25 μ M	4.0 μ L
dTP's	0.4 mM	1.0 μ L
Primer 1	2 μ M	1.0 μ L
Primer 2	2 μ M	1.0 μ L
ADN molde		35.0 μ L
Agua bidestilada		2.5 μ L
Enzima (Taq)	2.5 unidades	0.5 μ L
Total		50 μ L

Las mezclas son colocadas en un termociclador con las siguientes condiciones: 94°C / 5 min. para desnaturalizar el ADN. Posteriormente se darán 5 ciclos de 94° C / 1 min. (desnaturalización); 60°C / 1 min. (alineamiento) y 72°C / 1 min. (polimerización), después se dan 25 ciclos de 94°C / 5 min., 60°C / 1 min. y 72°C / 1 min. Al final, un ciclo de 10 min. a 72°C para completar la polimerización. Y luego la temperatura baja a 4°C en la cual se mantiene hasta sacar las muestras. Como se muestra en la figura:

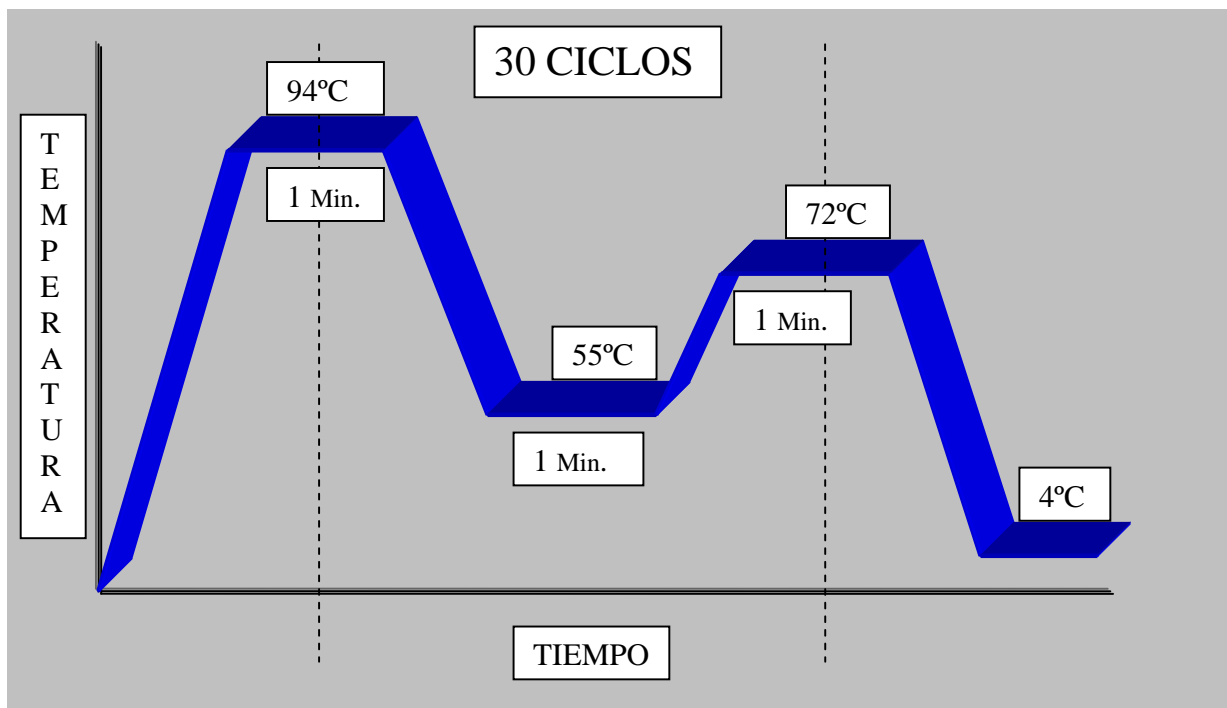


Figura 25: Grafica de ciclos del Termociclador

El tiempo que se debe dejar la polimerización depende de el tamaño de fragmento que se desea amplificar, dejando 1 min. por cada 1000 pares de bases.

El producto de la amplificación o PCR es visualizado por medio de la electroforesis, para poder analizar el resultado de la reacción.

4.3.4 Variantes de PCR

a) RAPD PCR

RAPD está parado para el Random amplification polymorphic DNA, o amplificación aleatoria de ADN polimorfo.

Las reacciones de RAPD son reacciones de PCR, pero amplifican los segmentos de la DNA que son esencialmente desconocido al científico (al azar).

A menudo, PCR se utiliza para amplificar una secuencia sabida de la DNA. Así, los científicos eligen la secuencia él o ella desea amplificar, entonces los diseñan y hace las cartillas que recocerán a las secuencias que flanquean la secuencia del interés. Así, PCR conduce a la amplificación de un segmento particular de la DNA.

This DNA fragment contains 3 genes. A scientist is interested in amplifying only *gene B*:



The scientist prepares 2 primers which will anneal to each end of *gene B*:



↓ PCR reaction



Only *gene B* is amplified, and can then be purified for further analysis.

Figura 26: PCR Estándar RAPD's

Sin embargo, en análisis de RAPD, el sequence(s) de la blanco (ser amplificado) es desconocido. El científico diseñará una cartilla con una secuencia **arbitraria**. Es decir el científico simplemente hace para arriba 10 secuencia baja del par (o puede hacer que una computadora aleatoriamente genere una secuencia de 10 puntos de ebullición), después sintetiza la cartilla. El científico después realiza una reacción de PCR y funciona un gel del agarose para ver si algunos segmentos de la DNA fueron amplificados en la presencia de la cartilla arbitraria.

- Las cartillas deben recocer en una orientación particular (tal que señalan hacia uno a).
- Las cartillas deben recocer a una distancia razonable de una otra.

Si otra plantilla de la DNA (genoma) fuera obtenida de una diversa (con todo relacionada) fuente, habría probablemente algunas diferencias en la secuencia de la DNA de las dos plantillas.

Suponga que había un cambio en secuencia en sitio superelegante del recocido # 2:

Reacción de RAPD # 2:

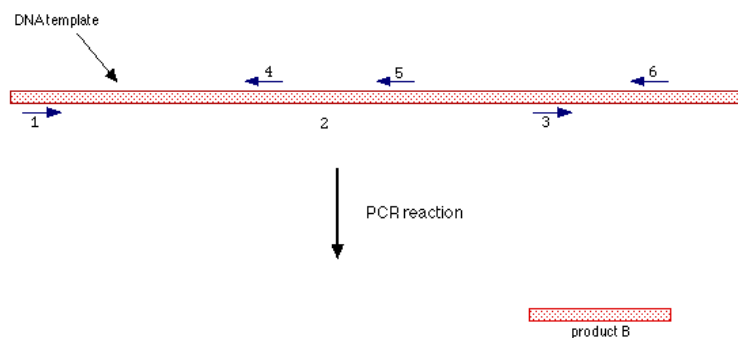


Figura 28: Reacción de RAPD's #2

Según lo demostrado en esta figura, la cartilla puede una no más largo recocer para localizar # 2, y el producto A de PCR no se produce así. Solamente se produce el producto B.

Si usted funcionara las 2 reacciones de RAPD PCR diagramado arriba en un gel del agarosa, éste son lo que usted vería:

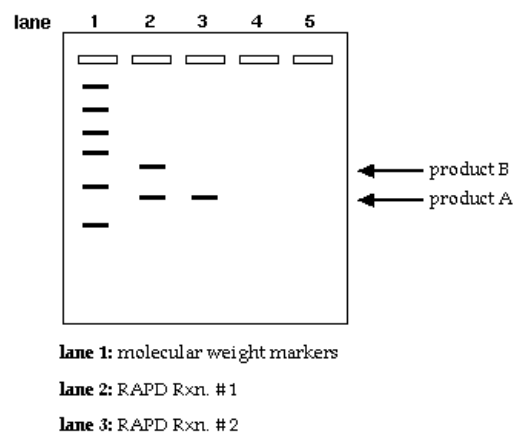


Figura 29: Visualización de resultados de RAPD's en un gel de agarosa en agarosa

b) Multiplex PCR

- Describe una PCR en la cual hay presentes múltiples pares de primers (hasta 8) lo que da una serie de productos. Los mismos pueden verse como múltiples bandas en un gel de agarosa
- Multiplex PCR es frecuentemente usada en diagnóstico médico
- Ahorra templado, tiempo y gastos
- Requiere una cuidadosa optimización

c) PCR Anidada

- A veces 1 ronda de PCR no da un producto único producto a partir de un templado complejo, apareciendo un “chorreado”
- Se puede resolver utilizando un segundo par de primers que hibriden un poco mas internamente que los primeros
- Realizar una segunda ronda de PCR usando el producto de la primera (chorreado)
- Rinde un producto único porque solo el fragmento correcto de ADN posee los sitios correctos de hibridización para el segundo par de primers

d) RT-PCR

- Donde el molde inicial es ARN y se requiere de una transcriptasa inversa, como Tth, para realizar la conversión del ARN a un tipo de ADN llamado ADNc (ADN complementario).
- La transcriptasa inversa o retrotranscriptasa es una enzima de tipo ADN-polimerasa presente en los retrovirus, que tiene como función sintetizar ADN utilizando como plantilla el ARN viral, es decir catalizar la retrotranscripción o transcripción inversa. Su nombre obedece a que el proceso normal de la transcripción, la que se puede llamar directa, parte del ADN para determinar la secuencia del ARN durante su síntesis, y no al revés.

4.4 ELECTROFORESIS

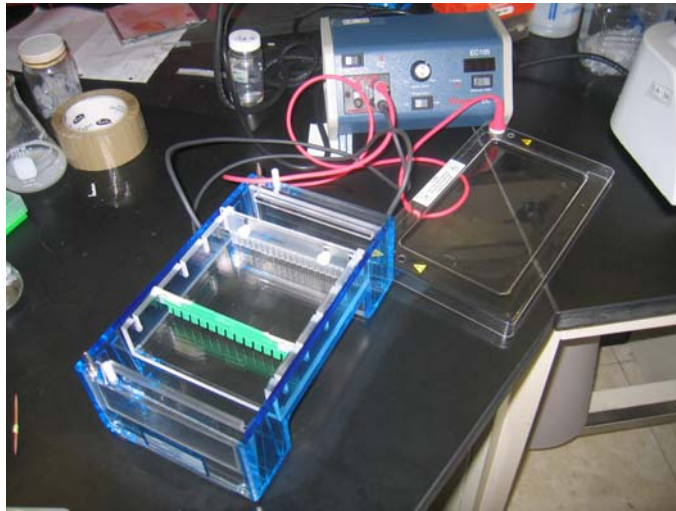


Figura 30: Cámara de Electroforesis

La electroforesis es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz semisólida.

Fue empleado por primera vez por en el año 1937, pero su importancia vino a incrementarse cuando en los años cincuenta E. L. Durrum y Arne W.K. Tiselius, impulsaron la electroforesis de zona, nombre que se asignó a la separación de materiales en un campo eléctrico en presencia de algún tipo de soporte; aunque este término se limitó originalmente al análisis de coloides y partículas submicroscópicas, se ha convertido en estos últimos años en una metodología aplicada a sustancias de bajo peso molecular.

4.4.1 Fundamento.

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas positivamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo).



Figura 31: Fundamento de la Electroforesis

El movimiento de las moléculas está gobernado también por dos fuerzas adicionales; inicialmente la fricción con el solvente dificultará este movimiento originando una fuerza que se opone, por otro lado las moléculas tienen que moverse en forma aleatoria o movimiento browniano debido a que poseen energía cinética propia denominada difusión. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión.

La suma de todas estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, de tal manera que, si las moléculas son colocadas en un cierto lugar de solución, los iones comenzarán a moverse formando un frente cuya anchura aumentará con el tiempo.

Para reducir la anchura de este frente podemos reducir el movimiento de las moléculas empleando un medio que oponga más resistencia a dicho movimiento. Una forma común de hacer esto es formar un gel. El gel consiste de un polímero soluble de muy alto peso molecular que atrapa moléculas de agua y forma un tamiz que dificulta el movimiento de los solutos, consecuentemente, la migración electroforética de las moléculas será más lenta, pero el ensanchamiento del frente se verá reducido también.

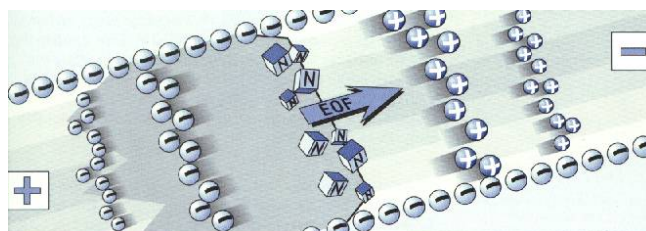


Figura 32: Corrimiento de la Electroforesis

Métodos electroforeticos zonales.

Son los más comunes, dada su alta aplicabilidad en diferentes campos. Son útiles para lograr la separación de mezclas complejas. Se aplican pequeñas cantidades de la disolución de proteínas a un soporte sólido, que se impregna con una solución tampón. Los soportes son en general polímeros y forman un gel poroso que restringe el movimiento de las moléculas a través del medio durante la electroforesis y disminuyen los flujos de convección del solvente.

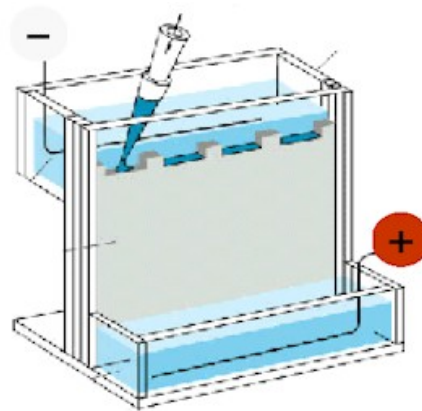


Figura 33: Deposito de muestras en la cámara de Electroforesis

Como soporte han sido utilizados papel (celulosa), almidón, poliacrilamida, agarosa y acetato de celulosa, entre otros. Este método tiene gran poder resolutivo por que se aplica una cantidad pequeña de proteína a una zona estrecha, mientras que la longitud del trayecto es mucho mayor que la zona de aplicación. El equipamiento requerido es simple, fuente de poder, cubeta vertical u horizontal donde se colocan el soporte y dos electrodos. Los más utilizados son:

- a) Electroforesis en gel de poliacrilamida.
- b) Electroforesis en geles de gradientes.
- c) Electroforesis en geles de agarosa.

a) Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida se forman por polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante un tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada en el tamaño del poro, lamentablemente cada vez se emplea menos en diagnóstico debido a su neurotoxicidad.

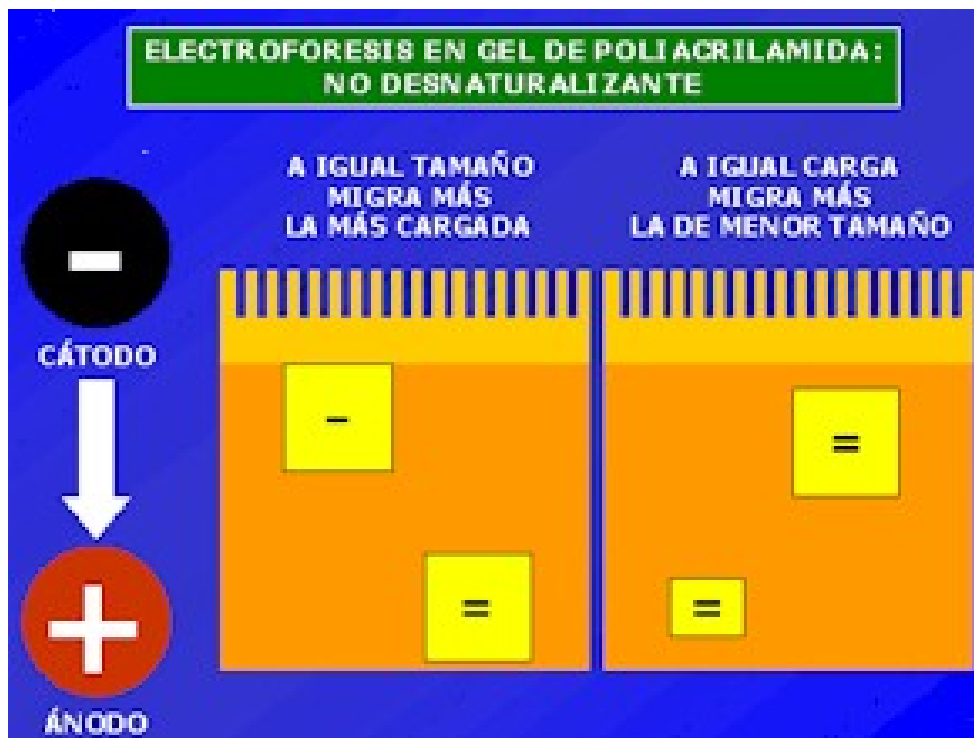


Figura 34: Electroforesis en Gel de poliacrilamida

b) Electroforesis en geles de gradientes.

El uso de geles de poliacrilamida que tienen un gradiente creciente de concentración de acrilamida + bisacrilamida, y en consecuencia un gradiente decreciente en el tamaño del poro, pueden tener ventajas sobre los geles de concentraciones uniformes de acrilamida. En un gel en gradiente la proteína migra hasta alcanzar una zona donde el tamaño de poro impida cualquier avance. Una vez se alcanza el límite del poro no se produce una migración apreciable aunque no se detiene completamente. Una de las ventajas de este tipo de geles es que resuelve mejor las bandas pues las concentra en regiones más estrechas, además de incrementar el rango de pesos moleculares que se pueden resolver en un mismo gel comparado con los de una concentración fija.

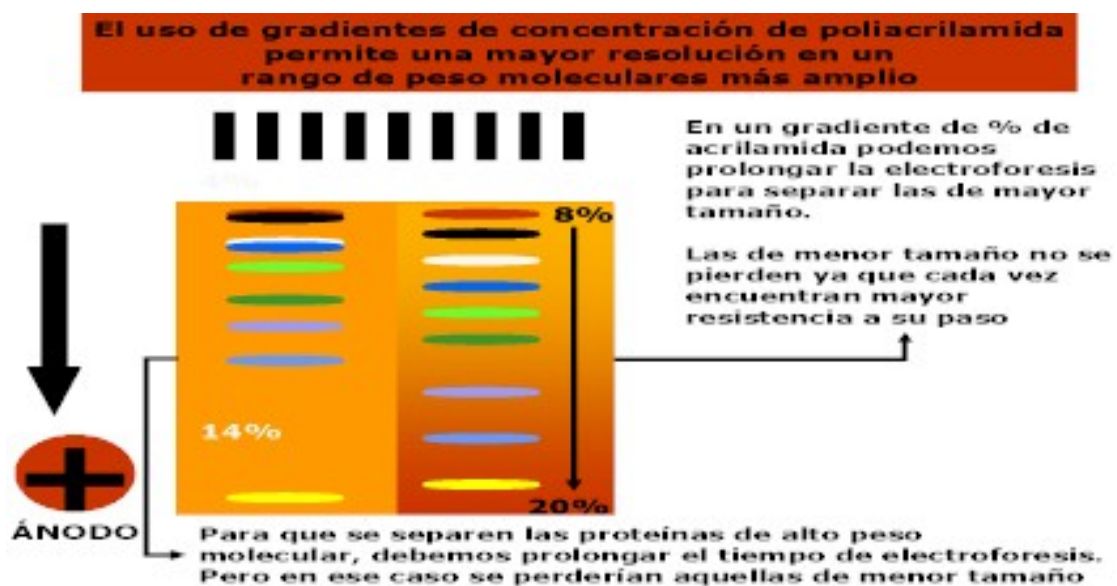


Figura 35: Electroforesis en Geles de gradiente

c) Electroforesis en geles de agarosa.

La agarosa es un polisacárido (originalmente obtenido de algas, como el agar-agar, pero de composición homogénea), cuyas disoluciones (típicamente de 0.5 a 2 %) poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50 grados C y formar un gel, semisólido al enfriarse. Este gel está constituido por una matriz o trama

tridimensional de fibras poliméricas embebida en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas, se usa usualmente para separar moléculas grandes de alrededor 20.000 nucleótidos.

4.4.2 Definiciones y materiales:

Solución Iónica: Solución preparada con iones que permitan el paso de cargas eléctricas y a la vez sea una solución buffer o amortiguadora del pH.

- TBE (Tris Borato EDTA): este sirve para separar fragmentos pequeños, que sea menor a 1000 pares de bases púricas o pirimidicas.
- TAE (Tris Acido acetico EDTA): este sirve para fragmentos mas grandes, mayores a 1000 pares de bases púricas o pirimidicas.

Matriz semisólida: Es un gel preparada con la misma solución iónica para evitar el cambio de iones entre el gel u la solución ionica que lo cubrirá, la función del gel es el paso de las bases púricas o pirimidicas a través de cargas eléctricas por medio de los poros que se forman, separándolas por tamaños debido a los tamaños de las pares de bases ya que las mas grandes pasan mas lento que las mas pequeñas por lo tanto quedan separadas por tamaños. Tipos de Matrices:

- Poliacrilamida: Gel en el cual se pueden controlar los poros para determinar la cantidad de bases, puede diferenciar de una en una (secuenciación). Se utiliza en electroforesis en vertical.
- Agarosa: Gel que se puede controlar el tamaño de los poros según la concentración que tenga, puede diferenciar entre 10-20 pares de bases, mientras mas el porcentaje menor el poro y se ven mas marcadas las bandas de diferenciación (mas tardado).

Colorantes indicadores de velocidad del ADN: son colorantes que se le agregan a las muestras de ADN o a los marcadores de peso molecular, para poder observar el estado o distancian en la que se encuentra el ADN durante le proceso de la electroforesis.

- Naranja G: corre aproximadamente 20 pares de bases en TBE.
- Azul de bromuro fenol: corre aproximadamente 200-300 pares de bases en TBE.
- Xilencianol: corre aproximadamente 500-600 pares de bases en TBE.

Marcadores de peso molecular: Sirve como testigo y este deja marcas y distancias entre los diferentes tamaños de las bases.

Materiales:

- Solución iónica (TBE)
- Matriz semisólida (Agarosa)
- Muestra de ADN
- Glicreol
- Colorantes indicadores de velocidad de ADN
- Marcador de peso molecular
- Cámara de electroforesis
- Bromuro de Etidio
- Luz ultra violeta
- Filtro de carbono activado
- Cloro

4.4.3 Procedimiento:

1. Se debe de preparar la solución iónica a la concentración deseada
2. Preparar la Agarosa, este se debe de preparar según la separación de las bases deseada, por ejemplo en este caso que se quieren de 50 en 50 se debe obtener el 1.5% de Agarosa. Por lo que el Agarosa se encuentra al 100% por lo tanto que

si se quieren preparar 30 ml (depende del molde) se deben aplicar 0.45gr. de Agarosa en 30 ml de la solución iónica (se hace en la solución iónica debido a que de esta forma se evita el intercambio de iones entre el Gel y la solución iónica). Se aplica los 0.45gr. de agarosa en los 30 ml de la solución iónica y luego se pone al calor en un calentador y calentarlo hasta que quede una solución transparente si ninguna partícula en suspensión (agitarlo durante el proceso de calentamiento).

3. Se debe aplicar la agarosa en el molde de la cámara dejándole una capa aproximadamente de 5 mm de espesor, dejarlo hasta que se endurezca y se torne levemente de color blanco.
4. Se debe eliminar los moldes de la cámara.
5. Agregar la solución iónica a la cámara, hasta cubrir toda la matriz semisólida.
6. La muestra de ADN se debe de mezclar con glicerol para que el ADN se precipite cuando sea introducido a la camara y no se disuelva en la solicion iónica.
7. Se toman 5 microlitros de marcados de peso molecular y se le aplica 1 microlitro de el colorante deseado.
8. Se aplican las muestras de ADN en los agujeros formados en el gel por un peine del molde. Tambien aplicar el marcador de peso molecular.
9. Se cubre la camara con su cobertor, colocando los eletrodos de modo que del lado de las muestras este el negativo y el otro extremo el positivo, ya que el ADN posee una carga negativa.
10. Esperar que corra el ADN sobre la matriz.
11. Se saca el gel y se coloca en una solución de bromuro de tidio, la cual lo colorara para poder verlo en la luz ultra violeta.
12. Se observa en la luz ultra violeta y se le toma una foto, para luego analizarla.
13. descontaminar todo lo que estuvo en contacto con el bromuro de tidio ya que es altamente cancerigeno para el hombre.
14. La solución se pasa por un filtro de carbono activado el cual atrapa todo el bromuro de tidio y deja pasar solo el agua.
15. los recipientes y la matriz debe de ser descontaminada con clora el cual desnaturaliza al bromuro de tidio y lo convierte en una sustancia no tan toxica.

16. Dejar todo por 24 horas para asegurar la descontaminación.
17. Verificar con la luz ultra violeta que no queden residuos de bromuro de tideo, al no quedar nada brillante a la luz UV.

4.5 Enzimas de Restricción

Las enzimas de restricción son endonucleasas que reconocen una secuencia entre 4-8 bp en DNAs. El sitio de reconocimiento se llama sitio de restricción, y la enzima rompe un enlace fosfodiéster en la hebra de arriba y otro enlace fosfodiéster en la hebra complementaria.

Estas enzimas se encuentran en muchas especies de bacterias, donde funcionan *in vivo* como parte de un sistema de restricción y modificación (sistema R/M). Este sistema es análogo a un sistema inmune, y le permite distinguir a la bacteria entre su propio DNA y el DNA exógeno, siendo este último degradado por la enzima de restricción. El DNA propio no es reconocido por sus enzimas de restricción, puesto que previamente lo ha modificado por metilación a través de la acción de una metiltransferasa (enzima que transfiere grupos metilo desde S-adenosilmetionina a bases específicas).

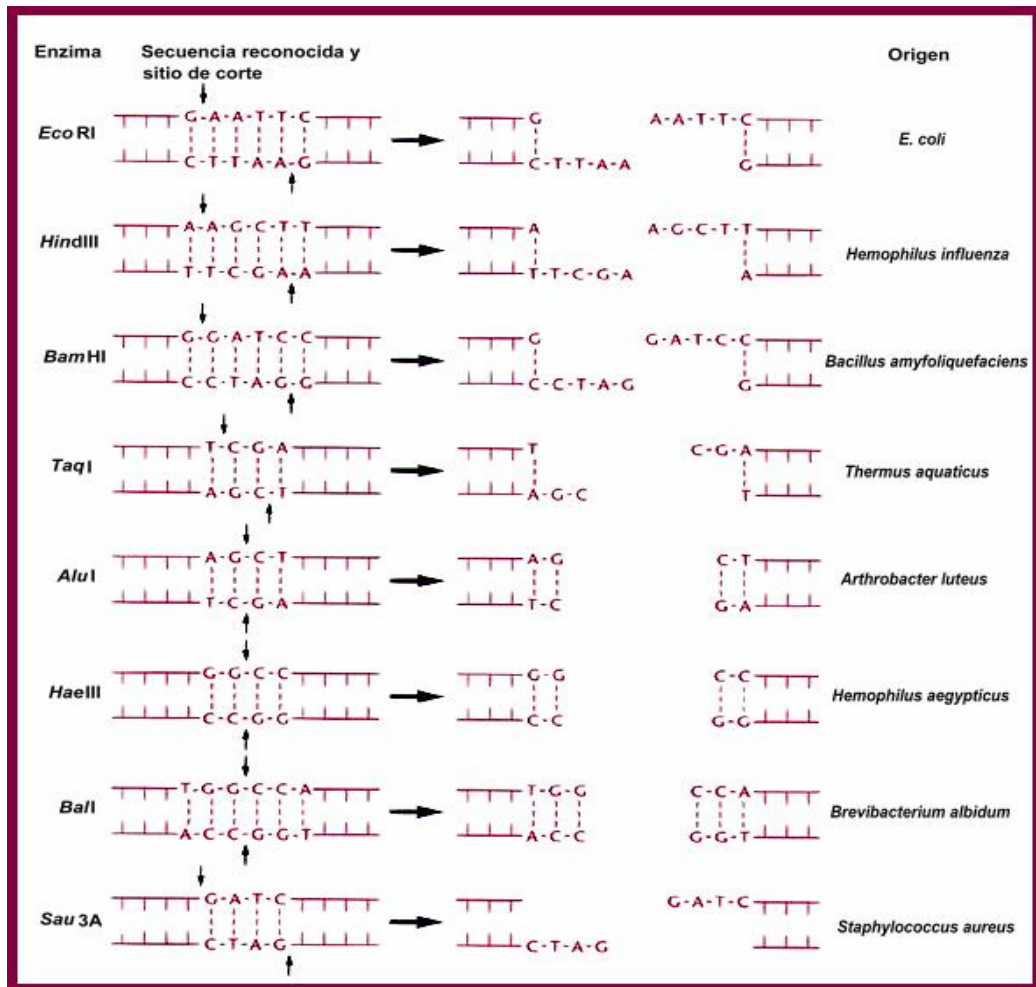


Figura 36: Ejemplos de cortes con enzimas de restricción

Restriction Enzyme Action of EcoRI

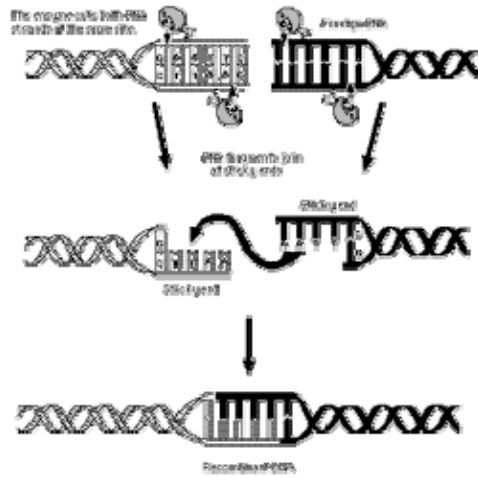


Figura 37: Cortes con la enzima *Eco RI*

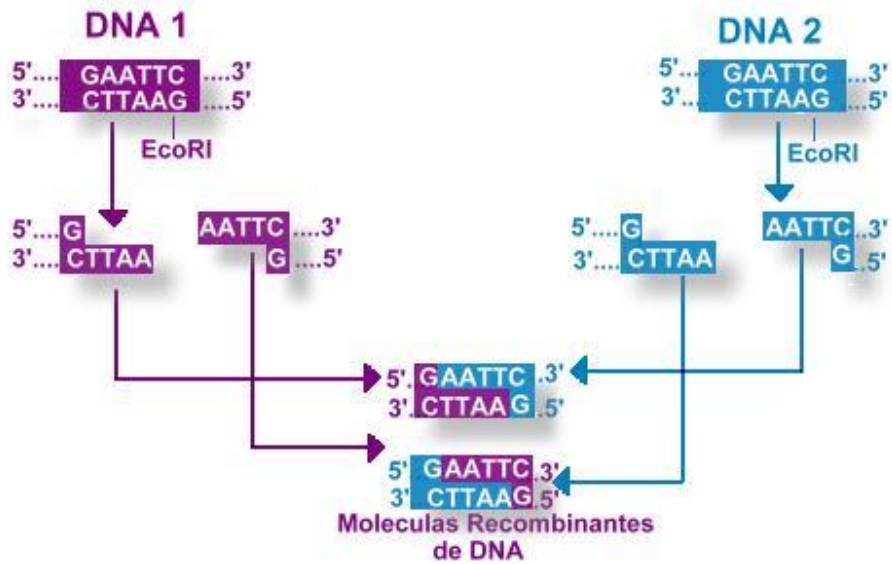


Figura 38: Unión entre fragmentos de DNA con extremos cohesivos

4.5.1 Tipos de enzimas de restricción

Sistemas tipo I

Una sola enzima (multimérica, posee 3 subunidades) reconoce la secuencia específica de DNA, metila y restringe. Pero la restricción no ocurre en el sitio de reconocimiento, sino que es al azar y en sitios distantes al de reconocimiento.

Sistemas tipo II

Enzimas diferentes realizan la restricción y modificación. La restricción ocurre en el sitio de reconocimiento ó adyacente. Estas enzimas tipo II son las utilizadas en el clonamiento de genes, puesto que permiten romper el DNA en sitios específicos, y así, recuperar secuencias conocidas.

Sistemas tipo III

Es similar al sistema tipo I, utilizan una enzima oligomérica que realiza todas las actividades enzimáticas, y rompen el DNA 25-27 bp más allá del sitio de reconocimiento.

Se han identificado más de 2300 endonucleasas de restricción tipo II. Se denominan isoquizómeros a aquellas enzimas que han sido obtenidas de diferentes especies de bacterias, pero que reconocen la misma secuencia de DNA.

Las enzimas tipo II, dependiendo de su especificidad, al romper el DNA provocan 2 tipos de cortes:

- Cortes escalonados, dejando productos con extremos complementarios (cohesivos) Ej: Eco RI
- Cortes simétricos, dejando productos con extremos ciegos Ej: Alu I

Aunque se utilizan ambas clases de fragmentos (con extremos ciegos y con extremos escalonados), en ingeniería genética se prefieren aquellos con extremos complementarios, puesto que permiten la unión espontánea del gen a clonar con el

vector. Si las moléculas a utilizar presentan extremos ciegos, hay que conferirles extremos cohesivos, por ejemplo utilizando la enzima transferasa terminal.

Ejemplos de enzimas de restricción tipo II:

Cuadro 2: Ejemplos de cortes con enzimas de restricción

MICROORGANISMO	ENZIMA	SECUENCIA
<i>Arthrobacter luteus</i>	Alu I	AG· CT TC· GA
<i>Escherichia coli RY13</i>	Eco RI	G· AATTC CTTAA· G
<i>Escherichia coli J62</i>	Eco RV	GAT· ATC CTA· TAG
<i>Klebsiella neumoniae</i>	Kpn I	GGTAC· C C· CATGG
<i>Nocardia otitis-caviarum</i>	Not I	GC· GGCCGC CG CCGG· CG
<i>Haemophilus aegyptus</i>	Hae III	RGCGC· Y Y· CGCGR
<i>Haemophilus influenzae</i>	Hinf I	G· ANTC CTNA· G

R: significa base púrica (A ó G)

Y: significa pirimidina (C ó T)

N : significa cualquier nucleótido

* : indica ruptura enlace fosfodiester

Las secuencias de reconocimiento de las enzimas tipo II son de tipo palíndrome (se leen igual de izquierda a derecha que de derecha a izquierda).

4.5.2 Nomenclatura de las enzimas de restricción

El nombre de cada enzima de restricción se deriva del organismo del cual fue hallada. La primera letra del género, más las 2 primeras letras de la especie forman las tres primeras letras. En ciertas ocasiones, una letra que designa la cepa a la que pertenece se añade, y finalmente se especifica un número que indica el orden en el cual la enzima que fue descubierta en cada organismo. Por ejemplo, *hindIII* es el nombre de una enzima que fue aislada de la bacteria *Haemophilus influenzae* cepa d, y fue la tercera enzima de restricción identificada en ese organismo; la *EcoRI* pertenece a la bacteria *Escherichia coli* cepa R y fue la primera identificada en ese microorganismo.

La nomenclatura que se sigue para designar las enzimas de restricción es la siguiente:

Eco RI

E = *Escherichia*, género

co = *coli*, especie

R = indica cepa

I = número de enzima identificada de ese organismo

4.5.3 Procedimiento de cortes con enzimas de restricción

Materiales:

- ADN se desea cortar
- Buffer (de la enzima)
- Enzima (enzima de restricción utilizada)
- Agua bidestilada estéril
- Tubos eppendorf de 0.5 ml
- Incubadora en baño de agua o sustituto

Métodos:

1. Prepara en un tubo eppendorf de 0.5 ml las siguientes mezclas de reacción para la digestión con enzimas de restricción:

Cuadro 3: Componentes y concentraciones para la preparación de la reacción de cortes con enzimas

Componentes	Concentración deseada	Cantidad para 30 μ L	Cantidad para 15.5 μ L
DNA		20 μ L	0 μ L
Buffer	10 x	3 μ L	1.5 μ L
Enzima	5 U	1 μ L	1 μ L
Agua bidestilada		6 μ L	3 μ L
Total		30 μ L	15.5 μ L

2. Agitar suavemente los tubos para mezclar los componentes, y centrifugar por 3 seg. A 10,000 rpm para que la mezcla este en el fondo del tubo.
3. Incubar, en baño de agua, 1 hora a 37°C (T° optima de la enzima).
4. Luego tomar una alícuota de 10 μ L, adicionar 3 μ L de buffer de carga, y mezclarlo con la micropipeta.
5. Luego se corren la muestras en un gel para ver los fragmentos en los que el ADN fue cortado.
6. Analizar los resultados.

4.5.4 Elaboración de un marcador de peso molecular

Un marcador de peso molecular se puede realizar por medio de enzimas de restricción, únicamente si se conoce el genoma completo del ADN que se va a cortar, por lo tanto se conoce los puntos en los que las enzimas cortaran el ADN por lo tanto se puede utilizar como marcadores de peso molecular. Un ejemplo de estos puede ser:

ADN de LAMBDA cortado con *EcoRI*+*HindIII*

DNA de lambda completamente digerido con *EcoRI* y *HindIII*, extraído con fenol, precipitado con alcohol, y redisuelto en 10 mM de Tris-HCl (pH=7,6) y 1 mM de EDTA.

El marcador contiene 13 fragmentos discretos (en pares de bases): 21.226*, 5.148, 4.973, 4.268, 3.530*, 2.027, 1.904, 1.584, 1.375, 947, 831, 564, 125.

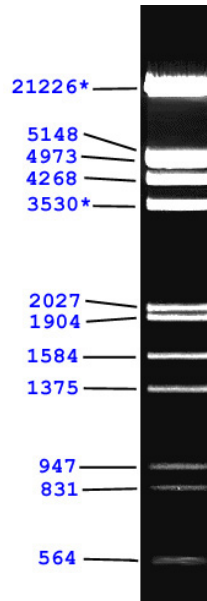


Figura 39: ADN de Lambda, cortado con *EcoRI* y *HindIII*

Buffer de almacenamiento

10mM de Tris- HCl (pH=7,6) y 1 mM de EDTA.

Solución de carga teñida 6X

0,2 % de Azul de Bromofenol, 0,2% de cianol de xileno, 60 % de glicerol y 60 mM de EDTA.

Observaciones

Los extremos cohesivos del sitio cos 12 nt del bacteriófago ϕ en los fragmentos 21.226 pb y 3.530 pb (indicados con *) pueden anillarse y formar una banda adicional a 24.576 pb. Estos fragmentos pueden separarse calentando a 65°C durante 5 minutos y posteriormente enfriando en hielo durante 3 minutos.

Buffer de almacenamiento

10 mM de Tris-HCl (pH=7,6) y 10 mM de EDTA, 0,03 % de Azul de Bromofenol, 0,03 % de cianol de xileno, 10 % de glicerol.

Observaciones

Aplicar 1 μ l de marcador por 1 mm de ancho de la calle de gel.

4.6 Clonación

Si se refiere al ámbito de la Ingeniería Genética, clonar es aislar y multiplicar en tubo de ensayo un determinado gen o, en general, un trozo de ADN. Sin embargo, Dolly no es producto de Ingeniería Genética. En el contexto a que se refiere, clonar significa obtener un individuo a partir de una célula o de un núcleo de otro individuo.

En los animales superiores, la única forma de reproducción es la sexual, por la que dos células germinales (óvulo y espermatozoide) se unen, formando un cigoto (o huevo), que se desarrollará hasta dar el individuo adulto. La reproducción sexual fue un invento evolutivo (del que quedaron excluidas las bacterias y muchos organismos unicelulares), que garantiza que en cada generación de una especie van a aparecer nuevas combinaciones de genes en la descendencia, que posteriormente será sometida a la dura prueba de la selección y otros mecanismos evolutivos. Las células de un animal proceden en última instancia de la división repetida y diferenciación del cigoto. Las células somáticas, que constituyen los tejidos del animal adulto, han recorrido un largo camino "sin retorno", de modo que, a diferencia de las células de las primeras fases del embrión, han perdido la capacidad de generar nuevos individuos y cada tipo se ha especializado en una función distinta (a pesar de que, salvo excepciones, contienen el mismo material genético).

En los años 70, Gurdon logró colecciones de ranas idénticas a base de insertar núcleos de células de fases larvarias tempranas en ovocitos (óvulos) a los que se había despojado de sus correspondientes núcleos. Pero el experimento fracasa si se usan como donadoras células de ranas adultas.

Desde hace unos años se vienen obteniendo mamíferos clónicos, pero sólo a partir de células embrionarias muy tempranas, debido a que aún no han entrado en diferenciación (a esta propiedad se la suele llamar totipotencia). No es extraño pues el revuelo científico cuando el equipo de Ian Wilmut, del Instituto Roslin de Edimburgo comunicó que habían logrado una oveja por clonación a partir de una célula diferenciada de un adulto.

Esencialmente el método (que aún presenta una alta tasa de fracasos) consiste en obtener un óvulo de oveja, eliminarle su núcleo, sustituirlo por un núcleo de célula de oveja adulta (en este caso, de las mamas), e implantarlo en una tercera oveja que sirve como "madre de alquiler" para llevar el embarazo. Así pues, *Dolly* carece de padre y es el producto de tres "madres": la donadora del óvulo contribuye con el citoplasma (que contiene, además mitocondrias que llevan un poco de material genético), la donadora del núcleo (que es la que aporta la inmensa mayoría del ADN), y la que parió, que genéticamente no aporta nada.

Científicamente se trata de un logro muy interesante, ya que demuestra que, al menos bajo determinadas circunstancias es posible "reprogramar" el material genético nuclear de una célula diferenciada (algo así como volver a poner a cero su reloj, de modo que se comporta como el de un cigoto). De este modo, este núcleo comienza a "dialogar" adecuadamente con el citoplasma del óvulo y desencadena todo el complejo proceso del desarrollo intrauterino.

Dolly no es una copia idéntica de la "madre" que donó el núcleo (no se olvide que el óvulo contiene ese pequeño ADN de la mitocondria). Aunque ambas comparten el mismo ADN nuclear, las instrucciones genéticas de *Dolly* no experimentaron exactamente el mismo tipo y combinación de estímulos que los de su "madre nuclear". Esto se debe a los fenómenos de epigénesis, complejas series de interacciones entre los genes y el entorno, y aquí entendemos por entorno desde los factores presentes en el citoplasma del óvulo, pasando por los procesos de formación del embrión/feto, a su vez sometidos al peculiar ambiente uterino, y alcanzando a la vida extrauterina (estímulos al nacer, periodo de lactancia, relaciones con la madre, interacciones "sociales" con otros individuos de la especie, etc). En resumidas cuentas, el ADN no contiene un programa unívoco de instrucciones, sino que es flexible, y la expresión genética en cada individuo queda matizada por multitud de factores, quedando "abierta" con una finalidad adaptativa clara.



Figura 40: Dolly, primer organismo clonado

Como suele ocurrir con muchos avances científicos de vanguardia, aquí puede que también se hayan exagerado las posibles derivaciones prácticas inmediatas, aunque no cabe duda que a medio y largo plazo, cuando la técnica se vaya perfeccionando, podría encontrar numerosos campos de aplicación. (Dejamos aparte el ámbito de la biología fundamental, que tendrá que "hincar el diente" en los fascinantes interrogantes básicos abiertos, sobre todo relativos al ciclo celular y al control de la diferenciación).

Como suele ocurrir con muchos avances científicos de vanguardia, aquí puede que también se hayan exagerado las posibles derivaciones prácticas inmediatas, aunque no cabe duda que a medio y largo plazo, cuando la técnica se vaya perfeccionando, podría encontrar numerosos campos de aplicación.

Uno de los objetivos buscados por el grupo de Wilmut (en alianza con una empresa) es unir la técnica de la clonación con la de Ingeniería genética de mamíferos con objeto de producir medicamentos o sustancias útiles comercialmente.

La idea es que una vez que se haya obtenido un animal transgénico interesante (por ejemplo, ovejas o vacas que en su leche secretan sustancias terapéuticas

determinadas por un gen introducido previamente), ese individuo serviría de "molde" para generar varios ejemplares clónicos.

Otra aplicación (más en la línea de la ganadería tradicional) sería asegurar copias de un ejemplar que haya mostrado buenos rendimientos (en carne, en leche, etc.). La clonación evitaría que su buena combinación de genes (su genotipo) se "diluyera" al cruzarlo sexualmente con otro. Sin embargo, mientras el coste de la técnica sea elevado, no estará al alcance de las explotaciones ganaderas convencionales. Pero además habría que tener mucha precaución con la amenaza de pérdida de diversidad genética de la cabaña ganadera, ya que si se impusiera este método, se tendería a la uniformidad (una tendencia ya presente en la agricultura y ganadería actuales).

Se ha hablado igualmente de que la clonación podría representar la salvación "in extremis" de ciertas especies silvestres amenazadas de extinción y difíciles de criar en cautividad. Pero si se llega a este caso, sería el triste reconocimiento de nuestro fracaso de conservarlas por medios más simples y naturales. Además, lo más probable es que, debido a que la clonación no aporta diversidad genética, la especie estuviera abocada de todas formas a la "muerte genética", condenada quizás a vivir en zoológicos o en condiciones altamente artificiales, casi como piezas de un museo viviente.

4.6.1 Vectores de transformación

Uno de los pasos más importantes en el clonaje molecular es el unir el ADN pasajero (fragmento a clonar) con un vehículo de clonaje o vector, apropiado. Estos vectores deben de ser capaces de replicarse a si mismos y al ADN pasajero, y eventualmente deben ser aislados. Los vectores más utilizados para el clonaje molecular pueden ser:

- a) Plásmidos
- b) Bacteriófagos
- c) Cósmidos
- d) YAC's

a) Plásmidos

Los plásmidos son pequeñas moléculas circulares de cadena doble de ADN que se encuentran en las bacterias y las levaduras (hongos unicelulares). Estas moléculas circulares son capaces de autorreplicarse de forma independiente del cromosoma bacteriano. Es decir, que los plásmidos se multiplican varias veces, sin necesidad de que la célula bacteriana lo haga. Los plásmidos pueden tener uno o más genes, alguno de los cuales puede conferir resistencia a antibióticos a las bacterias que lo poseen. Además, estas moléculas tienen una secuencia de ADN llamada “origen de replicación”, que le permite al plásmido multiplicarse independientemente en la bacteria. Si secuencias extrañas son unidas al plásmido, esto no afectará al mismo, sin importar su origen (pueden ser plantas, animales, humanos o cualquier secuencia en particular). El plásmido se replicará de todas maneras, produciendo varias copias de sí mismo y de su pasajero.

En un experimento de clonaje típico, el plásmido circular es cortado con una enzima de restricción, lo cual produce una molécula lineal. Luego un fragmento de ADN que tenga terminaciones compatibles es insertado, produciendo nuevamente una molécula circular que contiene al plásmido y a un pasajero.

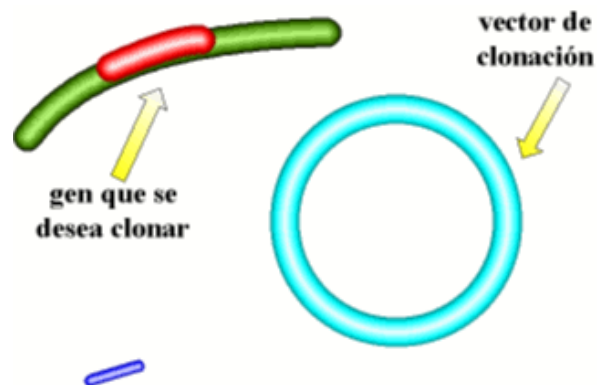


Figura 41: Inserción de un gen en un plásmido.

En la figura a tenemos un gen (color rojo) que interesa insertar en un plásmido (color turquesa)



Figura 42: enzima de restricción ha cortado el gen y el plásmido, quedando unos bordes cohesivos o pegajosos.



Figura 43: Unión de un plásmido con el gen

La unión del ADN que contiene el gen que se desea clonar con el **vector de clonación**, se realiza por medio de otras enzimas, denominadas **ADN-ligasas**, que unen ambos trozos de ADN. El resultado es una molécula de ADN recombinante, ya que contiene fragmentos de ADN de distinta procedencia.

El paso siguiente es la transformación, la introducción de la molécula de ADN recombinante en el interior de una bacteria. La bacteria mas utilizada como hospedero en ingeniería genética es la *Escherichia coli*. Para la introducción de los plásmidos recombinantes, las bacterias deben primero ser tratadas con cloruro de calcio que vuelve a la pared celular mas débil por un instante. Sin embargo, la transformación inducida por cloruro de calcio no es un proceso de alta eficiencia y no muchas bacterias pueden ser transformadas a la vez, con esta técnica. Una vez en el interior, el plásmido se replica mientras que las bacterias crecen y se multiplican.

Las bacterias que tienen plásmidos no necesariamente se ven o actúan de forma diferente de aquellas que no lo tienen. Para poder identificar aquellas bacterias que han recibido el plasmido recombinante (que han sido transformadas), es necesario que el plasmido tenga alguna característica que lo haga fácil de reconocer, es decir, que tenga un marcador genético. La resistencia a antibióticos es uno de los marcadores o características que se utilizan para reconocer bacterias que han sido transformadas, y entre otros, los genes de resistencia a la ampicilina y tetraciclina son comúnmente empleados.

b) Bacteriófagos

Los bacteriófagos (también llamados fagos) son virus que infectan a las bacterias. Ciertos bacteriófagos luego de infectar a las bacterias hacen que estas se destruyan (lisis bacteriana), liberando al que los rodea nuevos bacteriófagos que infectan a su vez a las bacterias que se encuentran alrededor, repitiéndose el ciclo (ciclo lítico del bacteriófago). El bacteriófago más utilizado como vector en ingeniería genética es el bacteriófago λ (lambda), cuyo genoma entero es conocido.

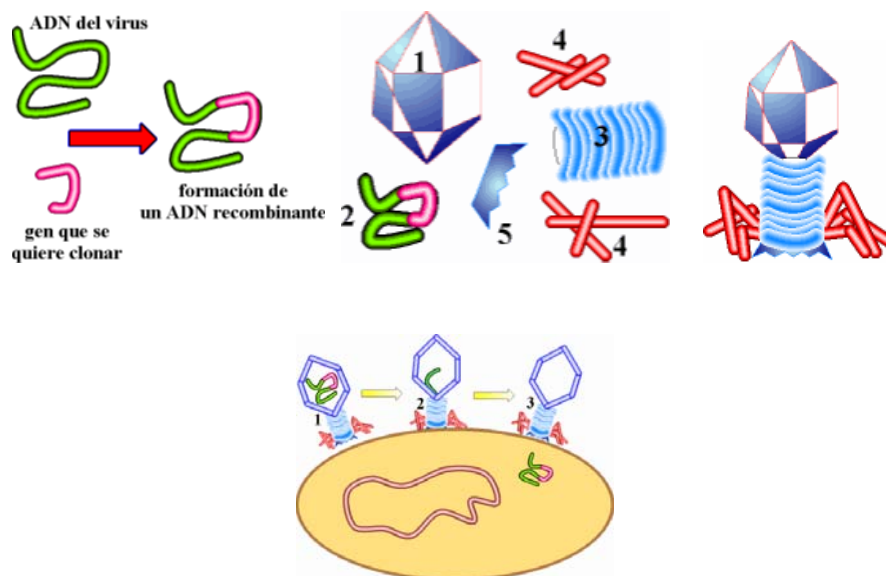


Figura 44: Ciclo de Inserción de un gen al bacteriófago lambda

El bacteriófago λ es colocado en la parte superior de un cultivo bacteriano, en el cual se han dispuesto las colonias de las bacterias de forma continua, tapizando toda la extensión del medio de cultivo. Si el fago λ infecta una de las células y entra en el ciclo lítico, se multiplicara rápidamente y lizará dicha célula, liberando mas fagos λ . Luego de un tiempo, un hueco (una placa) se observará sobre el tapiz bacteriano, representando la lisis de varias células bacterianas y también señalado la entrada de un virus único a una sola bacteria.

La principal ventaja que ofrecen los bacteriófagos sobre los plásmidos es que los primeros aceptan una mayor cantidad de ADN pasajero, alrededor de 20,000 pares de bases o 20 Kb (kilobases), en cambio los plásmidos pueden aceptar alrededor de 5 Kb, de tal manera que podremos clonar fragmentos de mayor tamaño utilizando el fago λ como vector.

C) Cósmidos

Los cósmidos son moléculas de ADN que han sido elaboradas artificialmente en el laboratorio. Estas moléculas de ADN contienen secuencias tanto del bacteriófago como de plasmido, de tal manera que puedan actuar como ambos. De forma típica, los cósmidos infectan a la bacteria, pero en lugar de destruirla, la bacteria reconoce estas secuencias como plásmidos, los cuales se multiplican en su interior.

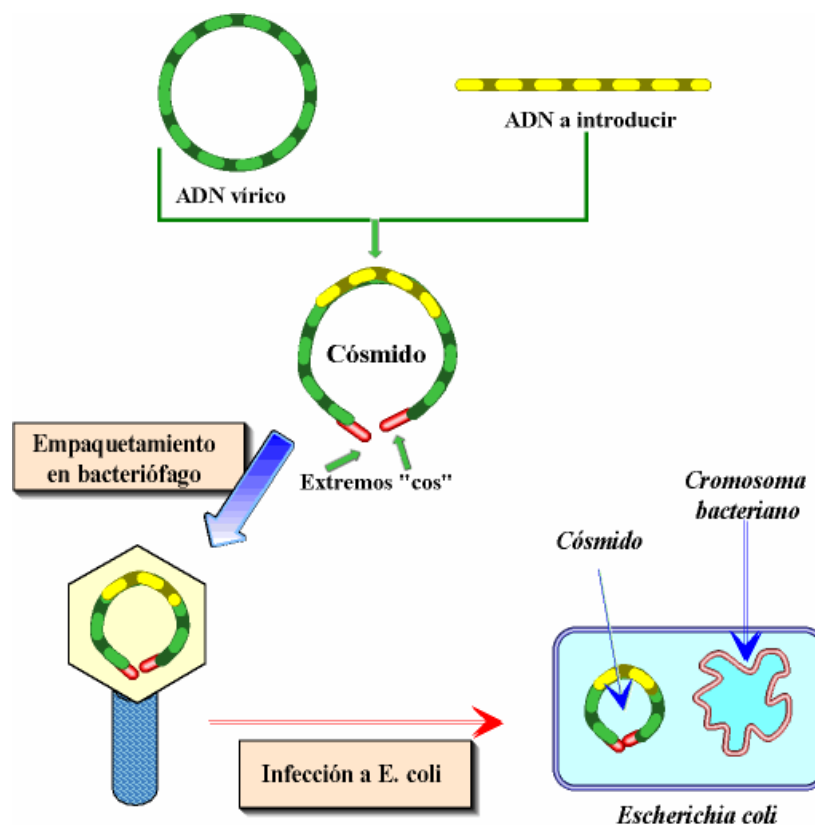


Figura 45: Ciclo de Inserción de un gen a un Cósmido

La ventaja que ofrece este vector es que acepta una cantidad aun mayor de ADN, alrededor de 45 Kb.

A diferencia de lo que ocurre en la transformación, el ADN de bacteriófagos y cósmidos recombinantes pueden ser inyectados al interior de las bacterias por los fagos, y debido a que estos han sido diseñados por la naturaleza para insertar ADN en las bacterias, el proceso es mucho mas eficiente que la transformación.

D) YAC's "Yeast Artificial Chromosomes" (Cromosomas Artificiales de Levadura)

La levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*) esta cumpliendo una función cada vez mas importante en genética molecular. Una razón es que las levaduras tienen varias de las características de los organismos superiores. Las levaduras tienen, por ejemplo, un núcleo verdadero y por lo tanto pertenecen al grupo de los eucariotas. Al

igual que los mamíferos, tienen varios cromosomas lineales, y pasan por mitosis y meiosis, a pesar de ser organismos unicelulares. Además, al tener organelas, las proteínas que son sintetizadas en la levadura sufren modificaciones post-traduccionales (que no es lo mismo que las modificaciones post-trnscripcionales que ocurren e nivel del ARN) en compartimientos como el retículo endoplasmático o aparato de golgi, lo cual no ocurre en las bacterias, que son organismos procariotas.

Sin embargo, quizás la mayor ventaja que tiene este vector es la de ser capaz de aceptar segmentos de ADN mucho mayores a los demás vectores, este puede aceptar hasta 500 Kb.

Los YAC's son plásmidos circulares, construidos en laboratorio, que al ser cortados con una enzima de restricción, se linearizan y tienen todas las características de un cromosoma, como son un centrómero y dos telómeros. En un segmento, este vector tiene una secuencia que puede ser controlada con una enzima de restricción específica. En ese sitio se puede introducir un fragmento de ADN pasajero y producir un YAC recombinante. Al ser transformadas las levaduras, el YAC se comporta exactamente como un cromosoma más.

4.6.3 Transformación de vectores

Transformación

La transformación es la transferencia genética que resulta de la incorporación de DNA desnudo por una célula receptora desde una célula donadora. Ciertas bacterias (ej. *Bacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pneumococcus*) son capaces de tomar DNA del medio ambiente y ese DNA que es introducido puede llegar a ser incorporado al cromosoma de la célula bacteriana receptora.

1. Factores que afectan la transformación.

a. **Tamaño del DNA:** Funciona mejor el DNA de doble cadena de al menos 5×10^5 daltones. Por tanto, la transformación es sensible a las nucleasas del medio ambiente.

b. **Competencia de la célula receptora:** Algunas bacterias son capaces de incorporar DNA en forma natural. Sin embargo, estas bacterias solo toman al DNA en una etapa particular de su ciclo celular, cuando producen una proteína específica llamada *factor de competencia*. Cuando la bacteria se encuentra en este estadio se dice que es *competente*. Otras bacterias no son capaces de incorporar el DNA naturalmente, sin embargo en estas bacterias la competencia puede ser inducida *in vitro* mediante tratamiento con sustancias químicas (ej. CaCl_2).

2. Pasos de la transformación.

a. **Incorporación del DNA:** La incorporación del DNA por las bacterias Gram+ y Gram- es diferente. En las bacterias Gram+ el DNA se introduce en forma de moléculas de cadena sencilla y la cadena complementaria se sintetiza dentro de la célula receptora. En contraste, las bacterias Gram- incorporan DNA de doble cadena.

b. **Recombinación General/Legítima/Homóloga:** Luego de que el DNA de la célula donadora se ha incorporado, ocurre un evento de recombinación recíproca entre el cromosoma y el DNA de la célula donadora. Esta recombinación requiere de que exista homología entre el DNA del donador y el cromosoma receptor, lo que finalmente resulta en la sustitución de DNA entre la receptora y la donadora, como se.

Esta recombinación requiere de los genes de la recombinación bacteriana y de que exista homología entre los DNAs involucrados. Este tipo de recombinación se denomina recombinación general, legítima u homóloga. Debido al

requerimiento de homología entre las células donadora y huésped, solo el DNA de una bacteria cercanamente relacionada se esperaría que transformara exitosamente, aunque en raras ocasiones se ha demostrado que sí ocurre transferencia genética de este tipo entre bacterias relacionadas de forma más bien distante.

3. **Importancia:** La transformación ocurre en la naturaleza de manera normal y es un mecanismo que puede conducir al incremento de la virulencia bacteriana. Por otra parte, la transformación *in vitro* ha sido ampliamente utilizada en la tecnología del DNA recombinante.

Transducción

La transducción es la transferencia de información genética desde un donador a un receptor y está mediada por un bacteriófago (*fago*). La cubierta del fago protege al DNA del medio ambiente, así es que la transducción, a diferencia de la transformación, no se ve afectada por las nucleasas en el medio ambiente. No todos los fagos pueden mediar la transducción. En la mayoría de los casos la transferencia genética se realiza entre miembros de las mismas especies bacterianas. Sin embargo, si un fago en particular posee un amplio rango de huéspedes que él es capaz de infectar, entonces la transferencia entre las especies puede ocurrir. La capacidad del fago para mediar la transducción, está relacionada con el ciclo de vida del mismo.

1. Tipos de Transducción

a. **Transducción Generalizada:** La transducción generalizada es el mecanismo por el cual potencialmente cualquier gene bacteriano de la donadora puede ser transferido a la célula receptora. El mecanismo de la transducción generalizada se ilustra en la Figura 3.

Los fagos que median la transducción generalizada, normalmente cortan el DNA de la célula huésped en pequeñas piezas y empacan ambos DNAs al interior de la partícula fágica mediante un mecanismo llamado "*head full*" o llenado de las

cabezas del fago. Ocasionalmente una de las piezas del DNA de la bacteria huésped resulta empacada al azar dentro de una cubierta de fago. Por lo tanto cualquier gene de la bacteria donadora puede ser potencialmente transferido, pero solamente se transferirá tanto DNA como pueda caber en una sola cápside. Cuando la célula receptora se infecta con un fago que contiene DNA de una donadora, el DNA de la donadora puede entrar a la receptora. Ya dentro de la célula receptora puede ocurrir el evento de la recombinación generalizada, en el cual se substituye el DNA de la célula donadora por el de la receptora.

b. Transducción especializada: La transducción especializada es la transducción en la cual solo ciertos genes del donador pueden ser transferidos al receptor. Diferentes fagos pueden transferir diferentes genes pero un fago individual solamente puede transferir unos pocos genes. La transducción especializada está mediada por fagos lisogénicos o fagos temperados y los genes que se llegan a transferir dependerán del lugar donde el profago queda insertado en el cromosoma.

Durante la *escisión* (separación) del profago, un error llega a ocurrir ocasionalmente en el cual un poco del DNA del huésped *escinde* (se separa del cromosoma) junto con el DNA del fago. Solo puede ser transferido el DNA del huésped que esté flanqueando cada lado del sitio donde el profago se ha insertado, (*ej.* transducción especializada). Después de la replicación y la liberación del fago y a través de la infección de la célula receptora, puede ocurrir una *lisogenización* de la receptora dando como resultado la transferencia estable de los genes de la donadora. La receptora ahora tendrá dos copias de los genes que le fueron transferidos. También es posible que se lleve a cabo una recombinación legítima entre los genes de la donadora y de la receptora.

2. Importancia: La conversión lisogénica (mediada por fago) ocurre en la naturaleza y es la fuente de donde proceden las cepas virulentas.

a) Transformación química o física

La transformación es un proceso por el cual las células captan DNA libre presente en el medio. Es un fenómeno que ocurre de forma natural en muchas bacterias, pero la eficacia del proceso varía enormemente de unas especies a otras. Para que la transformación tenga lugar, la bacteria tiene que encontrarse en el llamado *estado de competencia*, que ocurre en determinadas condiciones fisiológicas; en este estado, la bacteria presenta alteraciones en su pared y membrana celulares, que permiten la entrada de ácidos nucleicos en la célula.

En el laboratorio se ha conseguido poner a punto técnicas que inducen el estado de competencia en bacterias que no lo presentan de forma natural, como es el caso de *E. coli*. Estas técnicas se basan en diversos tratamientos químicos o físicos que producen microporos en la célula, lo que permite la introducción del DNA exógeno (transformación) de modo bastante eficiente. Uno de los métodos físicos es la electroporación, consistente en inducir la competencia mediante la aplicación de un pulso eléctrico muy breve e intenso. Dicha competencia se puede inducir con tratamientos químicos utilizando compuestos como el cloruro cálcico. Hay que tener en cuenta sin embargo que tras estos tratamientos no todas las células del cultivo se hacen competentes.

La transformación en el laboratorio es una técnica rutinaria de enorme utilidad, que nos permite introducir prácticamente cualquier plásmido en su forma circular o superenrollada en casi cualquier tipo de bacteria. El método que se describe a continuación es, por su simplicidad, uno de los más utilizados para transformar *E. coli*. Para detectar la transformación, el DNA introducido llevará un marcador seleccionable en el medio adecuado.

b) Procedimiento de la transformación química

Transformación de *E.coli* por shock térmico.

(¡¡¡¡¡Importante!!!!: trabajar siempre con las muestras en hielo y en condiciones de esterilidad).

- 1) Sacar las bacterias competentes del -80°C y esperar que se descongelen en el hielo (aproximadamente 15 min.). Colocar un eppendorf cerrado y vacío en el hielo.
- 2) Una vez que las células estén descongeladas, añadir 100 μL de células competentes al tubo que tenemos vacío en el hielo. Rotular los eppendorf con el nombre del plásmido con el que se van a transformar las bacterias.
- 3) Añadir 2 μL de DNA plasmídico en cada uno de los tubos eppendorf. Resuspendemos la muestra, dando ligeros golpecitos con el dedo y lo dejamos 30 min. en hielo. Se debe hacer un control negativo y un control positivo por grupo.
- 4) Transcurrido este tiempo, dar un shock térmico a las muestras dejándolas 1min en el baño a 42°C . Rápidamente volver a ponerlas en hielo y dejarlas durante 5 min.
- 5) Añadir 1 ml de medio líquido LB a cada muestra.
- 6) Incubar las muestras 30 min. a 37°C con agitación (este paso es opcional ya que la Sembrar las bacterias transformadas en una placa de LB+Ampicilina, añadiendo ampicilina es un antibiótico bacteriostático)
- 7) 100ul de muestra.
- 8) Incubar las placas a 37°C toda la noche

c) Otros tipos de transformación

El problema que tiene la transmisión de genes a células eucariotas se debe a que la membrana de estas células es poco permeable y en las células vegetales la pared celular es un obstáculo para introducir genes.

Para transferir genes, se utilizan tres procedimientos (microinyección, microbalística, plásmidos tumorales).

- Microinyección: inyecta el gen mediante una micropipeta, este gen puede haber sido creado artificialmente u obtenido en un banco de genes.
- Microbalística: se utilizan unos proyectiles, que está rodeado de material genético, y con un mecanismo parecido a una pistola, el proyectil es disparado al núcleo donde el material genético se une al resto y el cuerpo metálico es eliminado.
- Plásmidos tumorales: a través de bacterias con plásmidos.

5. CONCLUSIONES:

- El ácido desoxiribonucleico o ADN (DNA) es la molécula que guarda el código genético de todas las células. Sin importar que el organismo sea multicelular o unicelular, eucariota o procariota, todos tienen el DNA como vehículo de su código genético.
- Muchas de las técnicas de biología molecular incluyen algún tipo de manipulación del material genético. Estos procedimientos han logrado adelantar hasta tal grado el conocimiento del código genético, que ya es posible clonar organismos enteros.
- Es esencial un buen diseño de oligonucleótidos para tener éxito en la PCR. Los parámetros más importantes y que es necesario optimizar son el tamaño del oligonucleótido, el contenido (%) en GC y la secuencia del extremo 3'. Alguno de estos parámetros pueden optimizarse fácilmente a mano pero otros es mejor hacerlo con herramientas informáticas.
- La técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR que es una técnica para la síntesis "in Vitro" de secuencias específicas de DNA con la cual la insuficiente cantidad de ADN ya no es un problema en los procedimientos de Biología Molecular ni en los procedimientos de diagnóstico basados en el estudio de DNA.
- En la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR se pueden dar algunas variantes que pueden facilitar nuestros resultados según el fin de nuestra prueba.
- La electroforesis es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz semisólida.
- Las enzimas de restricción son endonucleasas que reconocen una secuencia entre 4-8 bp en DNAs. El sitio de reconocimiento se llama sitio de restricción, y la enzima rompe un enlace fosfodiéster en la hebra de arriba y otro enlace fosfodiéster en la hebra complementaria.

- Si nos referimos al ámbito de la Ingeniería Genética, clonar es aislar y multiplicar en tubo de ensayo un determinado gen o, en general, un trozo de ADN.
- Uno de los pasos más importantes en el clonaje molecular es el unir el ADN pasajero (fragmento a clonar) con un vehículo de clonaje o vector, apropiado. Estos vectores deben de ser capaces de replicarse a si mismos y al ADN pasajero, y eventualmente deben ser aislados. Los vectores más utilizados para el clonaje molecular pueden ser: Plasmidos, bacteriófagos, cosmidos y YAC's.
- La transformación es la transferencia genética que resulta de la incorporación de DNA desnudo por una célula receptora desde una célula donadora. Ciertas bacterias (ej. *Bacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pneumococcus*) son capaces de tomar DNA del medio ambiente y ese DNA que es introducido puede llegar a ser incorporado al cromosoma de la célula bacteriana receptora.

6. RECOMENDACIONES:

- Antes de trabajar cualquier cosa es necesario realizar un plan de trabajo en donde especifica todo lo que se debe hacer y en que tiempo, para no cometer errores, ya que en estos procesos en algunos casos se necesita precisión, por lo tanto se debe estar concentrado en el trabajo. También se debe anotar cualquier cambio que se realice al diagrama de flujo durante el proceso, ya que a veces surgen imprevistos que cambian algunas cosas, esto para que al final por si algo sale mal, se pueda comprobar con los apuntes que etapa se realizó mal.
- Al manipular los ácidos nucleicos, se deben encontrar en áreas completamente estériles para evitar contaminaciones, por lo mismo se debe utilizar bata y guantes durante todo el proceso.
- Cuando se trabaja con ARN, se debe trabajar siempre en hielo y en **unas áreas** completamente estéril, ya que el ARN se desnaturaliza muy fácil, en este los guantes y bata son necesarios debido a que la piel produce unas enzimas que degradan el ARN.
- Para realizar una reacción en cadena de la polimerasa o PCR eficaz, es importante el buen diseño de los primers o iniciadores, ya que si los primers no son específicos, se amplifican fragmentos no deseados que invalidan nuestros resultados.
- En la transformación se recomienda que todo se realice lo más rápido posible en áreas estériles, para evitar la contaminación de bacterias no deseadas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Griffiths, AJ; Gelbart, WM; Miller, JH. 2000. Genética moderna. España, McGraw-Hill. 670 p.
2. Integrated DNA Technologies, Estados Unidos. 2006. Homepage (en línea). US. Consultado 28 sep. 2006. Disponible en <http://www.idtdna.com/Scitools/>
3. Lewin, B. 2004. Genes VII. 7ª ed. US, Pearson Prentice Hall. 550 p.
4. Madigan, MT; Martinko, JM; Parker, J. 2004. Biología de los microorganismos. 10ª ed. España, Pearson Prentice Hall. 500 p.
5. Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª ed. US, CSHL Press. Vol. No.1, No. 2, No. 3.
6. Snustad, P; Simmons, MJ. 2003. Principles of genetics. 3ª ed. US, Wiley. 430 p.
7. Universidad Autónoma de Nuevo León, MX. 2006. Antecedentes: la historia de la UANL (en línea). Nuevo León, MX. Consultado 10 sep. 2006. Disponible en <http://www.uanl.mx/acerca/antecedentes>
8. Universidad Autónoma de Nuevo León, MX. 2006. Ubicación de la UANL (en línea). Nuevo León, MX. Consultado 10 sep. 2006. Disponible en <http://www.uanl.mx/acerca/ubicacion>
9. Universidad Autónoma de Nuevo León, MX. 2006. Escuelas y Facultades de la UANL (en línea). Nuevo León, MX. Consultado 10 sep. 2006. Disponible en http://www.uanl.mx/acerca/escuelas_y_facultades

10. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, MX. 2006. Localización de la Facultad de Ciencias Biológicas (en línea). Nuevo León, MX. Consultado 10 sep. 2006. Disponible en <http://www.fcb.uanl.mx/www/localizacion.html>
11. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, MX. 2006. Carrera de biólogo (en línea). Nuevo León, MX. Consultado 10 sep. 2006. Disponible en <http://www.fcb.uanl.mx/www/biologo.html>
12. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, MX. 2006. Carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo (en línea). Nuevo León, MX. Consultado 10 sep. 2006. Disponible en http://www.fcb.uanl.mx/www/quimico_bacteriologo_parasitologo.html
13. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, MX. 2006. Licenciatura en Ciencias de Alimentos (en línea). Nuevo León, MX. Consultado 10 sep. 2006. Disponible en http://www.fcb.uanl.mx/www/licenciado_en_ciencias_de_alimentos.html
14. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, MX, 2006, Licenciatura en Biotecnología Genómica (en línea), Nuevo León, MX. Consultado 10 sep. 2006. Disponible en http://www.fcb.uanl.mx/www/licenciado_en_biotecnologia_genomica.html
15. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, MX, 2006. Profesional Asociado en biotecnología Genómica (en línea). Nuevo León, MX. Consultado 10 sep. 2006. Disponible en http://www.fcb.uanl.mx/www/profesional_asociado_en_biotecnologia_genomica.html

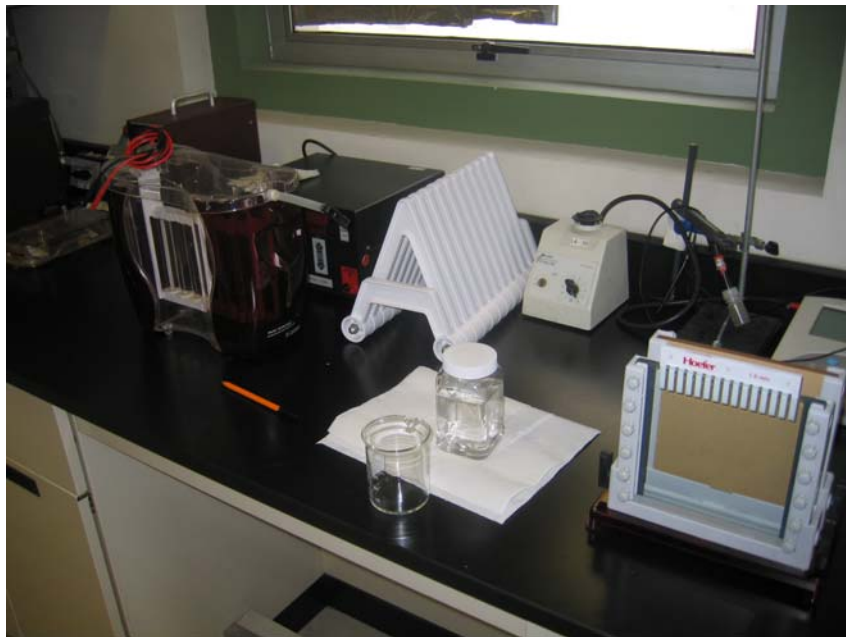
16. Universidad Autónoma de Nuevo León, Instituto de Biotecnología, MX. 2006. Misión y Visión del Instituto de biotecnología (en línea). Nuevo León, MX. Consultado 10 sep. 2006. Disponible en http://www.fcb.uanl.mx/Mis_Webs/misionvision.htm
17. Universidad Autónoma de Nuevo León, Instituto de Biotecnología, MX. 2006. Antecedentes del Instituto de biotecnología (en línea). Nuevo León, MX. Consultado 10 sep. 2006. Disponible en http://www.fcb.uanl.mx/Mis_Webs/Antecedentes.htm
18. Universidad Autónoma de Nuevo León, Instituto de Biotecnología, MX. 2006. Proyectos Agrícolas del Instituto de biotecnología (en línea). Nuevo León, MX. Consultado 10 sep. 2006. Disponible en http://www.fcb.uanl.mx/Mis_Webs/ProyectosInv1.htm
19. Universidad Autónoma de Nuevo León, Instituto de Biotecnología, MX. 2006. Proyectos Industriales del Instituto de biotecnología (en línea). Nuevo León, MX. Consultado 10 sep. 2006. Disponible en http://www.fcb.uanl.mx/Mis_Webs/ProyectosInv2.htm
20. Universidad Autónoma de Nuevo León, Instituto de Biotecnología, MX. 2006. Proyectos inorgánicos del Instituto de biotecnología (en línea). Nuevo León, MX. Consultado 10 sep. 2006. Disponible en http://www.fcb.uanl.mx/Mis_Webs/ProyectosInv3.htm
21. Universidad Autónoma de Nuevo León, Instituto de Biotecnología, MX. 2006. Proyectos Animal y Humano del Instituto de biotecnología (en línea). Nuevo León, MX. Consultado 10 sep. 2006. Disponible en http://www.fcb.uanl.mx/Mis_Webs/ProyectosInv4.htm

22. National Center for Biotechnology Information, Estados Unidos. 2006. Homepage (en línea). Estados Unidos. Consultado 25 sep. 2006. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

8. ANEXO



Anexo 1: Área de trabajo Laboratorio de Genética y Biología Molecular



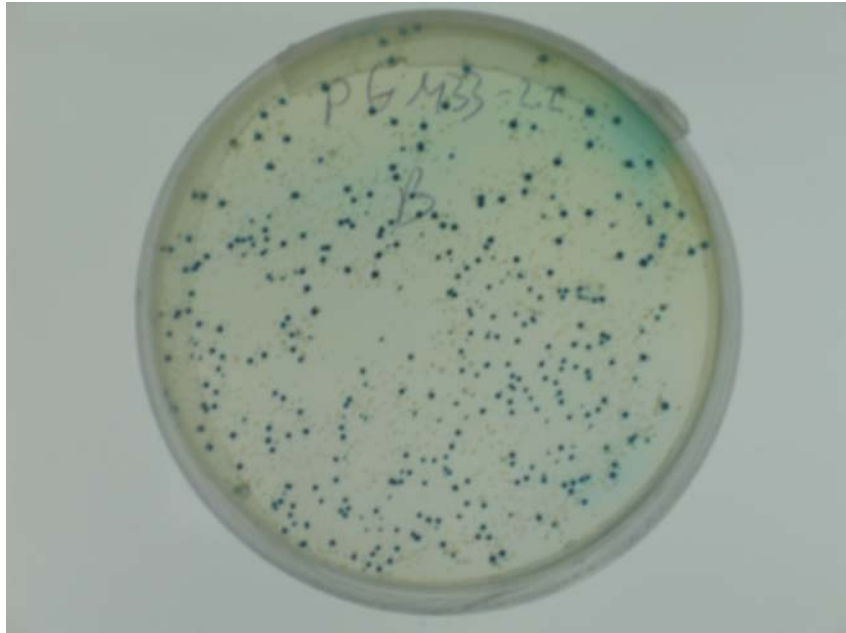
Anexo 2: Cámaras de Electroforesis verticales Laboratorio de Genética y Biología Molecular



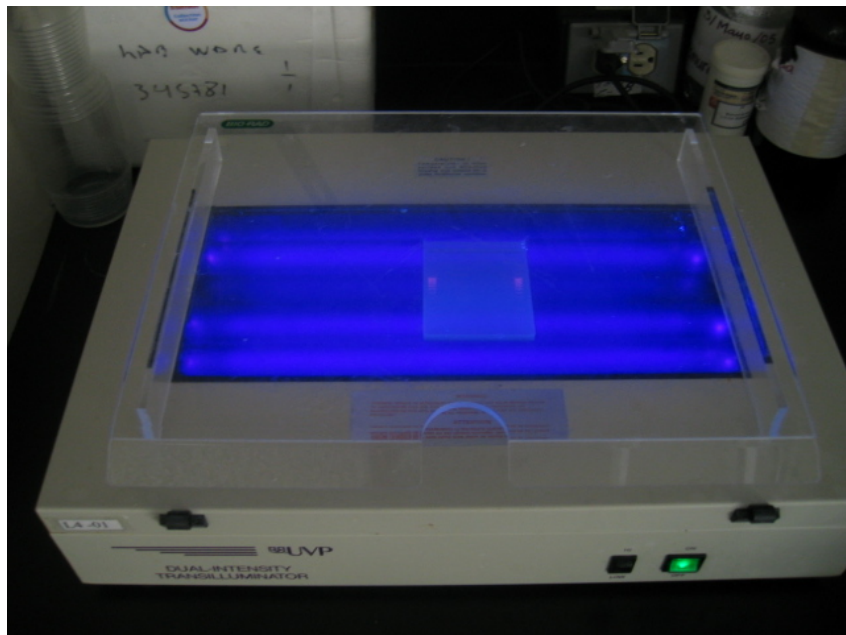
Anexo 3: Entrada al Instituto de Biotecnología



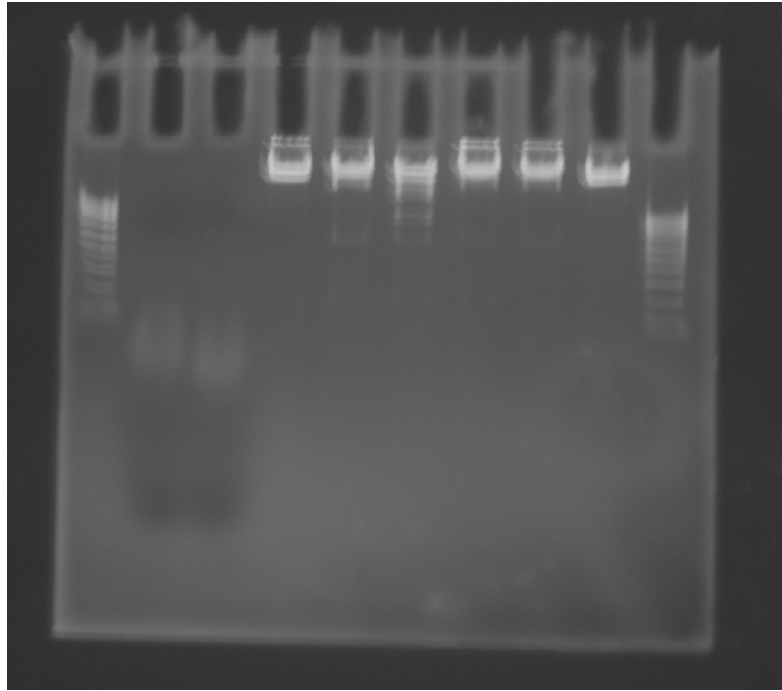
Anexo 4: Compañeros de trabajo Laboratorio de Genética y Biología Molecular



Anexo 5: Bacterias de *E. coli* transformadas



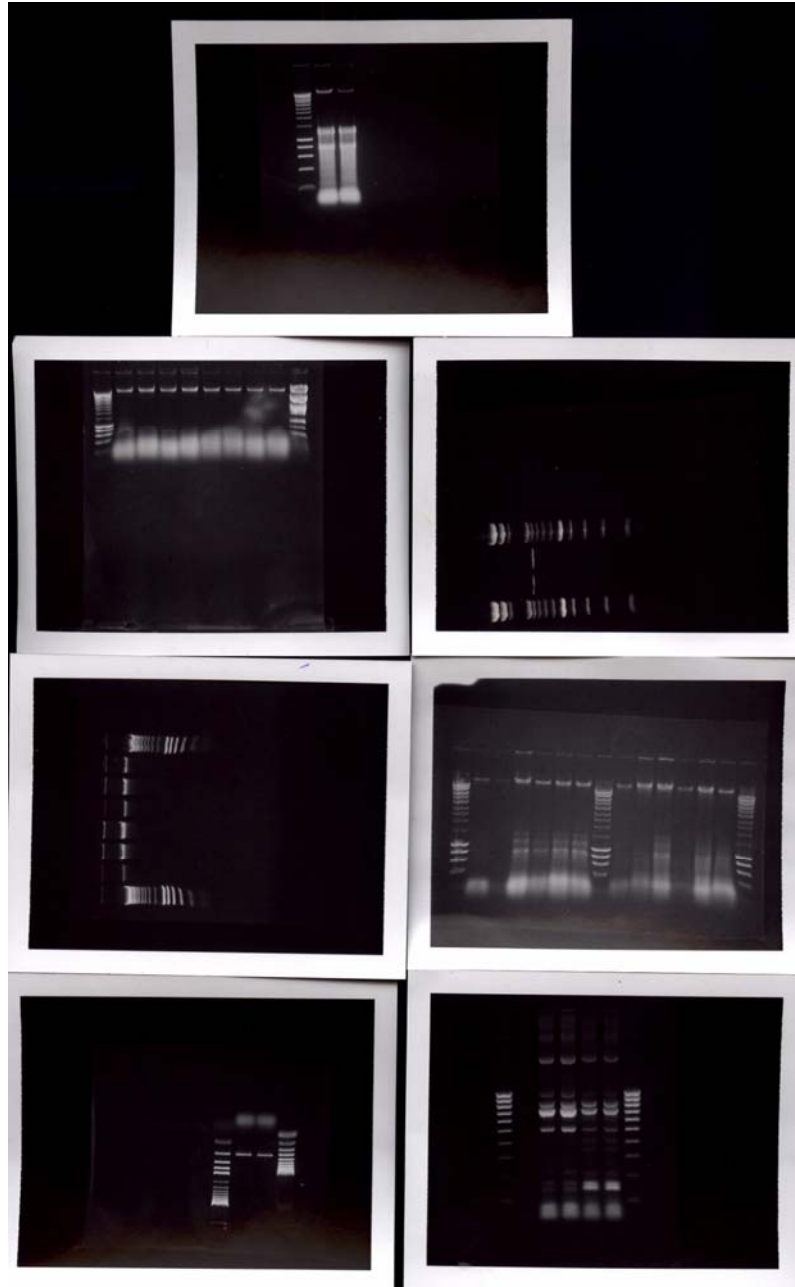
Anexo 6: Cámara de luz ultra violeta



Anexo 7: Extracción de ADN en gel de Agarosa 1.5%



Anexo 8: Edificio de el Instituto de biotecnología



Anexo 9: Fotos de distintos resultados de PCR