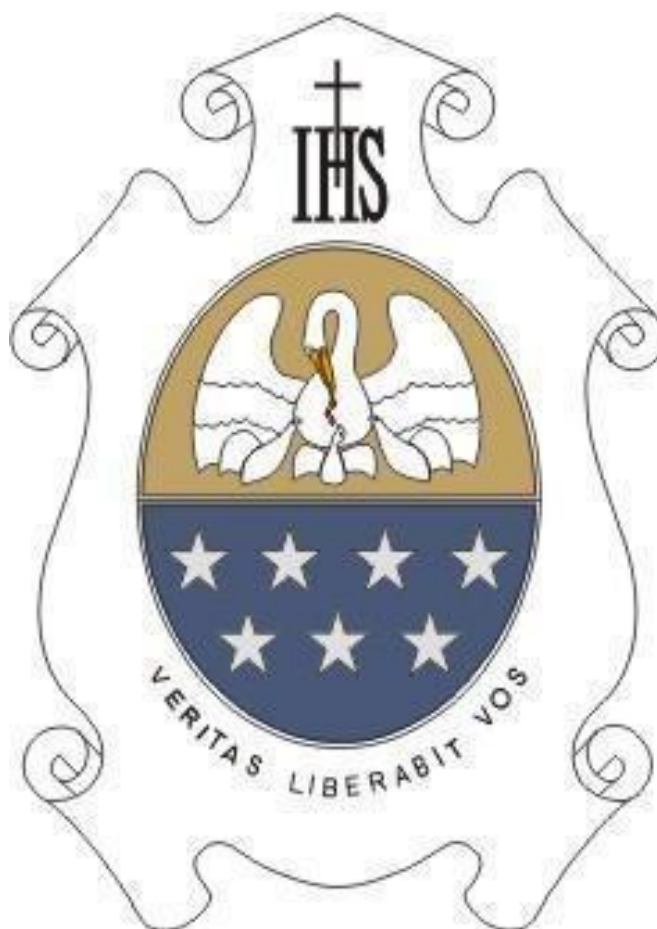


UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA
FACULTAD DE Cs. DE LA SALUD
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR
CÁTEDRA DE QUÍMICA II



GUIA DE TRABAJOS PRACTICOS
2019

TRABAJO PRÁCTICO N° 1 - BIOINFORMÁTICA

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, la investigación en Biología Molecular se ha realizado en el laboratorio experimental, pero la inmensa cantidad de datos generados en los últimos años requiere el desarrollo de herramientas computacionales que permitan extraer toda la información contenida en esos datos para generar nuevo conocimiento. Por eso, hoy en día es difícil entender la investigación en estas áreas sin la Bioinformática. Según la definición del Centro Nacional para la Información Biotecnológica *National Center for Biotechnology Information* (NCBI por sus siglas en inglés): “la Bioinformática” es un campo de la ciencia en el que confluyen varias disciplinas: la biología, la computación y las tecnologías de la información. Su fin es facilitar el descubrimiento de nuevos conocimientos y el desarrollo de perspectivas globales a partir de las cuales puedan discernirse principios unificadores en el campo de la biología. La bioinformática, por tanto, se ocupa de la adquisición, almacenamiento, procesamiento, distribución, análisis e interpretación de información biológica, mediante la aplicación de técnicas y herramientas procedentes de las matemáticas, la biología y la informática, con el propósito de comprender el significado biológico de una gran variedad de datos.

Los nuevos avances han generado que varias disciplinas de la investigación se interrelacionen, como la medicina, la genética, la biología, la bioquímica, la biotecnología y la computación, entre otras. Los grandes laboratorios cuentan con grupos multidisciplinarios, que cooperan armónicamente y retroalimentándose constantemente. Es así como, hoy por hoy, no se puede estudiar y comprender un ente fisiológico únicamente desde un solo punto de vista. Es por ello que en la actualidad es de vital importancia conocer el manejo de las herramientas bioinformáticas, con la finalidad de analizar y correlacionar la información que se obtenga en el laboratorio.

El objetivo del presente Trabajo Práctico es introducir al alumno al uso de programas de Bioinformática utilizados para realizar búsquedas y consultas en bases de datos biológicos de acceso público, integrando conceptos biológicos ya vistos en la asignatura.

Para ello, es necesario que los alumnos tengan sólidos conocimientos de los siguientes temas, los cuales pueden estudiar a partir de este apunte y buscando bibliografía tanto tradicional como online si es de su interés (ver referencias al final del apunte).

- Ácidos nucleicos: composición, funciones, tipos, código genético.
- Proteínas: composición, estructura, funciones, etc.
- Transcripción y traducción de la información genética.

- Bases de datos de secuencias biológicas
- Bases de datos especializadas
- Formatos de secuencias (FASTA, NCBI)
- Alineamiento de secuencias
- Secuencias homólogas
- Genes parálogos
- Genes ortólogos
- Utilización, e interpretación de resultados de BLAST

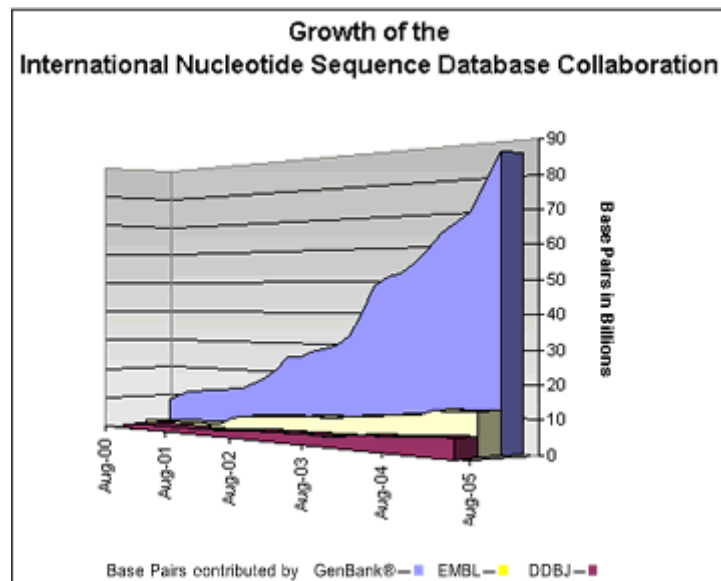
BASES DE DATOS DE SECUENCIAS BIOLÓGICAS

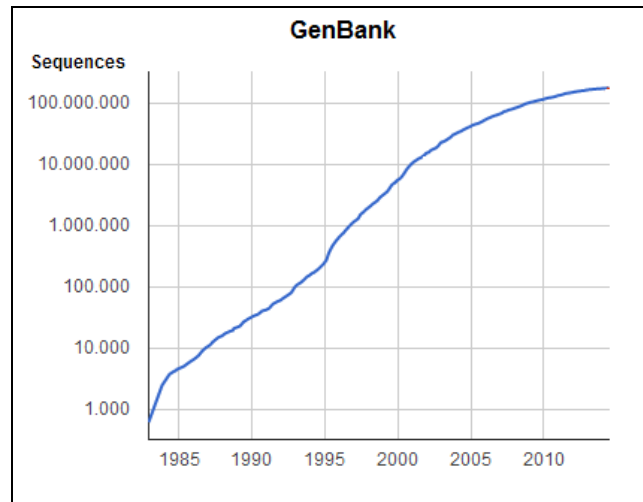
Una base de datos biológica es una biblioteca de información sobre ciencias de la vida, recogida de experimentos científicos, literatura publicada, tecnología de experimentación de alto rendimiento, y análisis computacional. Contiene información de áreas de investigación incluyendo genómica, proteómica, metabolómica, expresión génica mediante microarrays, filogenética, etc. La información contenida en bases de datos biológicas incluye funciones, estructura y localización (tanto celular como cromosómica) de genes, efectos clínicos de mutaciones, así como similitudes de secuencias y estructuras biológicas. Estas son de libre acceso, se actualizan periódicamente, son estructuradas y poseen referencias cruzadas.

Las principales bases de datos de secuencias biológicas de **nucleótidos** son:

- GenBank
- EMBL (The European Molecular Biology Laboratory)
- DDBJ (DNA DataBank of Japan).

Estas bases de datos de secuencias nucleotídicas contienen más de 170 millones de secuencias de más de 240000 organismos diferentes. Si bien son mantenidas por distintos organismos en distintos países, existe una coordinación entre las distintas bases. Una secuencia enviada a cualquiera de las bases se verá reflejada en las otras dos en aproximadamente una semana, ya que esa es la frecuencia de actualización entre las distintas bases genéticas. Por este motivo es indistinto que base se use para enviar nuevas secuencias, aunque normalmente los europeos utilizan EMBL-BANK y los americanos GenBank.





Estas bases de datos tienen un sistema por el cual se le asigna un **Accession Number** (número de acceso) a cada secuencia **única** y a través de este número es posible identificar de manera inequívoca una secuencia dada. Una típica “entrada” (hoja de datos) de cualquiera de estas bases de datos consta de un número de acceso, el nombre del gen en cuestión, una lista de publicaciones relacionadas con el gen, la secuencia propiamente dicha, y un número de “*features*” (características) o “anotaciones” que pueden ser útiles al lector; como la presencia de determinados “dominios” en la secuencia que pueden indicar una posible función para ese gen, así como observaciones experimentales con respecto a la función y estructura del gen.

Para acceder a la información de estas bases de datos, las dos herramientas principales son SRS y Entrez, dos portales web que nos permiten hacer búsquedas en estas bases de datos y encontrar secuencias que sean de interés. SRS es el buscador de EMBL y Entrez corresponde a Genbank. Otra manera de buscar en estas bases de datos es por medio de programas que permiten buscar secuencias similares a una secuencia “*Query*” que nosotros suministramos al programa.

De manera similar, las principales bases de datos de secuencias **proteicas** son tres:

- TrEMBL: por *Translation of EMBL Nucleotide Sequence Database* incluye la traducción de todas las secuencias codificantes derivadas del (EMBL-BANK) y que todavía no han podido ser anotadas en Swiss-Prot.
- PIR: por *Protein Information Resource* está dividida en cuatro sub-bases que tienen un nivel de anotación decreciente.
- SwissProt: contiene secuencias anotadas o comentadas, es decir, cada secuencia ha sido revisada, documentada y enlazada a otras bases de datos.

Las tres se combinan para formar UniProt, la cual es una base de datos central de proteínas a nivel mundial y contiene información “curada” manualmente (revisada y corregida de manera manual luego de una predicción bioinformática automatizada).

Las bases de datos proteicas suelen contener más información y predicciones bioinformáticas que las bases de datos de secuencias de ácidos nucleicos. También contienen gran cantidad de referencias cruzadas con otras bases de datos proteicas y clasificaciones de las proteínas en familias, así como referencias cruzadas con bases de datos especializadas.

También debemos nombrar las bases de datos cuyas secuencias corresponden a un solo **genoma**, y son extremadamente útiles si necesitamos realizar una búsqueda relacionada solo con un organismo. Generalmente estas bases de datos contienen mucha información adicional sobre cada secuencia genómica y proteica. Entre las más importantes y destacadas podemos nombrar a WormBase (*Caenorhabditis elegans*), PlasmDB (*Plasmodium* database), CryptoDB

(*Cryptosporidium* database), SGD (*Saccharomyces* genome database) RATBASE (*Rattus norvegicus* database).

Bases de datos especializadas

El número de bases de datos especializadas es muy grande y continúa creciendo a un ritmo cada vez más acelerado. Las principales que se pueden nombrar son las bases de datos que acumulan información sobre “dominios” proteicos (porciones de secuencia proteica que tienden a cumplir una misma función, aunque su estructura y secuencia varíen ligeramente entre diferentes proteínas que lo contengan) entre las cuales podemos nombrar a PFAM (*protein families*), PRINTS (*protein fingerprints*) y SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*).

Una base de datos que acumula la información de todas ellas en conjunto y nos permite alimentar una secuencia que será analizada por todas estas bases de datos en busca de dominios conservados es llamada Interpro (inter-protein).

Otras bases de datos especializadas importantes son las relacionadas a los RNA no codificantes como G-tRNA-DB (ARNt), miRBase (miARN), European ribosomal RNA database (ARNr), etc.

Otra sección importante de las bases de datos especializadas son aquellas que intentan clasificar y/o ubicar cada proteína en mapas bioquímicos como son los sitios de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y SCOP (Structural Classification Of Proteins).

Por último, un tipo de base de datos cuyo crecimiento es cada vez más acelerado e importante es la de estructuras tridimensionales de proteínas, resueltas por cristalografía de rayos X o por resonancia magnética nuclear. Estas bases de datos son principalmente tres: RCSB PDB (USA), MSD-EBI (Europa) y PDBj (Japón). Estas tres bases de datos están fusionadas en la llamada Worldwide Protein Data Bank (wwPDB).

Formatos de secuencias

Los principales formatos de secuencias “*flat*” o “*plain text*” (solo texto) que son necesarios conocer son el formato FASTA y el formato NCBI. El formato FASTA es uno de los formatos más útiles en los cuales podemos guardar una secuencia ya que la gran mayoría de los programas bioinformáticos pueden cargar archivos guardados en este formato.

El formato FASTA consta de una primera línea donde se observa el carácter “>” que indica el comienzo de una “entrada”, luego en esa misma primer línea se detallan el accession number, y generalmente el nombre de la secuencia. A partir de la segunda línea solo se observa secuencia. Ejemplos de una secuencia nucleotídica en formato FASTA y de una secuencia proteica en formato FASTA:

```
>embl|J00703|J00703 Rattus norvegicus pancreatic amylase mRNA, complete cds.
acaactcaaagcaaatgaagttcgttctgctgctttccctcattgggttctgctgggct
caatatgaccacacactgcgatgggaggactgctattgtccacctgttcgagtggcgc
tgggctgatattgccaaggaatgtgagcgggtacttagcacctaagggatttgaggggtg
```

>AAA40725.2

MKFVLLLSLIGFCWAQYDPHTADGRTAIVHLFEWRWADIAKECERYLAPKGFGGVQVSP
 NENIINNPSRPWWERYQPISYKICSRSGNENEFKDMVTRCANNVGVRIYVDAVINHMCGSG
 NSAGTHSTCGSYFNPNNREFSAVPYSAWYFNDNKCNGEINNYNDANQVRN

Recuerden que en las secuencias proteicas cada aminoácido esta representado por una letra de la siguiente manera:

A - Alanina (Ala)	M - Metionina (Met)
C - Cisteina (Cys)	N - Asparragina (Asn)
D - Acido Aspartico (Asp)	P - Prolina (Pro)
E - Acido Glutamico (Glu)	Q - Glutamina (Gln)
F - Fenilalanina (Phe)	R - Arginina (Arg)
G - Glicina (Gly)	S - Serina (Ser)
H - Histidina (His)	T - Treonina (Thr)
I - Isoleucina (Ile)	V - Valina (Val)
K - Lisina (Lys)	W - Triptofano (Trp)
L - Leucina (Leu)	Y - Tirosina (Tyr)

El formato NCBI es muy parecido al formato FASTA con la excepción de que al principio de cada línea se observa la posición que ocupa el primer aminoácido/nucleótido de esa línea con respecto al comienzo del gen. La otra diferencia es que los nucleótidos/aminoácidos se encuentran agrupados en columnas de a diez.

Aunque este formato puede ser mas fácil de visualizar para el ojo humano, la mayoría de los programas bioinformáticos no puede utilizar secuencias en este formato.

gi|11528628|gb|J00703.2|RATAMLS[11528628]

```
1   acaactcaa agcaaatgaa gttcgttctg ctgctttccc tcattgggtt ctgctgggct
61  caatatgacc cacacactgc ggatgggagg actgctattg tccacctgtt cgagtggcgc
121 tgggctgata ttgccaagga atgtgagcgg tacttagcac ctaagggtt tggaggggtg
```

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°1: Búsqueda de secuencias por palabras clave

En el presente trabajo práctico se dará inicio a la actividad práctica que se desarrollará durante todo el semestre. Para lograr el objetivo de obtener una proteína recombinante expresada en un sistema procariota, el primer paso es obtener en información detallada de la misma, como así también obtener la secuencia de nucleótidos que la codifica para posteriormente clonarla en un vector adecuado.

1. Abrir el explorador de internet Google Chrome y acceder a la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

2. En la página a la que se ingresó aparecen varios iconos para el acceso a diversas herramientas (Resources) sobre: literatura (PubMed, Books), proteínas, ADN & ARN, etc. Para nuestros objetivos, debemos ingresar a NUCLEOTIDE presionando el icono correspondiente.

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

NCBI National Center for Biotechnology Information

All Databases Search

Listado de todas las herramientas

NCBI Home

Resource List (A-Z)

All Resources

Chemicals & Bioassays

Data & Software

DNA & RNA

Domains & Structures

Genes & Expression

Genetics & Medicine

Genomes & Maps

Homology

Literature

Proteins

Sequence Analysis

Taxonomy

Training & Tutorials

Variation

Welcome to NCBI

The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information.

[About the NCBI](#) | [Mission](#) | [Organization](#) | [Research](#) | [NCBI News](#)

Get Started

- [Tools](#): Analyze data using NCBI software
- [Downloads](#): Get NCBI data or software
- [How To's](#): Learn how to accomplish specific tasks at NCBI
- [Submissions](#): Submit data to GenBank or other NCBI databases

Popular Resources

PubMed

Bookshelf

PubMed Central

PubMed Health

BLAST

Nucleotide

Genome

SNP

Gene

Protein

PubChem

NCBI Announcements

NCBI/CDC/FDA/USDA collaboration

External link. Please review our [privacy policy](#).

Jul 22, 2014

Major revision of the NCBI genomes FTP site this summer

Jul 18, 2014

www.youtube.com/ncbinlm

3. En el box blanco ingresar las palabras: rat pancreatic amylase y dar clic al botón search. Vamos a acceder a la base de datos Nucleotide Database, que contiene secuencias de diversas Fuentes como GenBank, RefSeq, TPA y PDB. Encontraremos datos sobre genomas, genes y transcritos.

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide

Nucleotide rat pancreatic amylase Limits Advanced Search Help

Nucleotide

The Nucleotide database is a collection of sequences from several sources, including GenBank, RefSeq, TPA and PDB. Genome, gene and transcript sequence data provide the foundation for biomedical research and discovery.

Using Nucleotide

[Quick Start Guide](#)

[FAQ](#)

[Help](#)

[GenBank FTP](#)

[RefSeq FTP](#)

Nucleotide Tools

[Submit to GenBank](#)

[LinkOut](#)

[E-Utilities](#)

[BLAST](#)

[Batch Entrez](#)

Other Resources

[GenBank Home](#)

[RefSeq Home](#)

[Gene Home](#)

[SRA Home](#)

[INSDC](#)

You are here: NCBI > DNA & RNA > Nucleotide Database

Write to the Help Desk

4. En la página se mostrará el listado de resultados, las secuencias depositadas en la base de datos que contienen las palabras “rat pancreatic amylase”, con un breve detalle sobre las mismas, como su número de acceso y largo en bp. Además se puede aplicar filtros para restringir la búsqueda.

PREGUNTA: ¿Qué filtros podría aplicar? ¿Cuál secuencia elegiría?

Elija una secuencia y acceda a la misma.

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide rat pancreatic amylase Search Save search Limits Advanced Help

Display Settings: Summary, 20 per page, Sorted by Default order Send to:

Results: 1 to 20 of 223 << First < Prev Page 1 of 12 Next > Last >>

1. [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura strain MV2-25 chromosome 3, whole genome shotgun sequence](#)
19,787,792 bp linear DNA
Accession: NC_009006.2 GI: 484912932
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

2. [Sorangium cellulosum So0157-2, complete genome](#)
14,782,125 bp circular DNA
Accession: NC_021658.1 GI: 521458881
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

3. [Rattus norvegicus amylase 2a3 \(Amy2a3\), mRNA](#)
1,574 bp linear mRNA
Accession: NM_031502.1 GI: 13928683
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [Related Sequences](#)

4. [Rattus norvegicus pancreatic amylase mRNA, complete cds](#)
1,574 bp linear mRNA
Accession: J00703.2 GI: 11528628
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [Related Sequences](#)

5. [Rattus norvegicus protease, serine, 2 \(Prss2\), mRNA](#)
741 bp linear mRNA

Filter your results:
All (223)
[Bacteria \(56\)](#)
[INSDC \(GenBank\) \(24\)](#)
[mRNA \(32\)](#)
[RefSeq \(199\)](#)
[Manage Filters](#)

Top Organisms [Tree]
[Rattus norvegicus \(22\)](#)
[Heterocephalus glaber \(13\)](#)
[Mus musculus \(11\)](#)
[Homo sapiens \(9\)](#)
[Caenorhabditis briggsae \(8\)](#)
[All other taxa \(165\)](#)
More...

Find related data
Database: Select
[Find items](#)

Permite seleccionar el organismo de origen de la secuencia

5. Analice cual es la información provista en los casilleros con números.
PREGUNTA: ¿En qué formato se encuentra la secuencia de nucleótidos?

Rattus norvegicus pancreatic amylase mRNA, complete cds

GenBank: J00703.2

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS RATAMLS 1574 bp mRNA linear ROD 04-DEC-2000
DEFINITION Rattus norvegicus pancreatic amylase mRNA, complete cds.
ACCESSION J00703 M24962 V01225
VERSION J00703.2 GI:11528628
KEYWORDS .
SOURCE Rattus norvegicus (Norway rat)
ORGANISM [Rattus norvegicus](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia;
Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Rattus.
REFERENCE 1 (bases 29 to 1546)
AUTHORS MacDonald,R.J., Crerar,M.M., Swain,W.F., Pictet,R.L., Thomas,G. and Rutter,W.J.
TITLE Structure of a family of rat amylase genes
JOURNAL Nature 287 (5778), 117-122 (1980)
PUBMED [6159531](#)
REFERENCE 2 (bases 29 to 1546)
AUTHORS MacDonald,R.J., Crerar,M.M., Swain,W.F., Pictet,R.L. and Rutter,W.J.
TITLE Pancreas-specific genes: structure and expression
JOURNAL Cancer 47 (6 Suppl), 1497-1504 (1981)
PUBMED [6168351](#)
REFERENCE 3 (bases 29 to 1546)
AUTHORS MacDonald,R.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (27-APR-1993) Department of Molecular Biology, UT Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines Blvd., Dallas, TX 75390-9148, USA
REFERENCE 4 (bases 1 to 1574)
AUTHORS MacDonald,R.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (04-DEC-2000) Department of Molecular Biology, UT Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines Blvd., Dallas, TX 75390-9148, USA
REMARK Sequence update by submitter
COMMENT On Dec 4, 2000 this sequence version replaced gi:202865.

FEATURES
source Location/Qualifiers
1..1574
/organism="Rattus norvegicus"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:10116"
/clone="pcXP100"

CDS 16..1542
/note="pancreatic amylase"
/codon_start=1
/protein_id="AAA40725.2"
/db_xref="GI:11528629"
/translation="MKFVLLSLIGFCWAQYDPHTADGRTAIVHLFEWRWADIAKECE
RYLAPKGFQVQVSPFNENI IINPSPRPWERYQPISYKICSRSGNENE FKDMVTRCN
NVGRIYVDVINHMCSSGNSAGTHSTCGSYFNPNNREFSAVPYSAWYFNDKNCNGEI
NNYNDANQVRNCRSLGLDLALDKDYVRTKVDYMNLI DIGVAGFRLLDAKHMWPGD
IKAVLTKLHNLNTKWFSSQSRPFIFQEVIDLGGGEAIKGSSEYFGNGRVTEFKYGAKLGT
VIRKWNQEKMSYLKNNWGEWGFVPTDRALVFVDNHDNQRGHGAGGASILT FWDARMYK
MAVGFMLAHPYGFTRVMSSYRTRNFQNGKVDNDWIGFPNNNGVTKEVIINPDITCGN
DNVCEHRNRQIRNMVAFRNVVNGQPFANWWDNGSNQVAFSRGNRGFIVFNDDWALS
TLQTGLPAGTYCDVISGDKVNGNCTGLKVNVDGDKAHFISISNSAEDPFIAIHADSKL

variation 1167
/note="for clone pcXP100"
/replace="a"

ORIGIN
1 acaacttcaa agcaaatgaa gttogttctg ctgctttccc tcattggggt ctgctggggt
61 caatatgacc cacacactgc ggatgggagg actgctatgt tccacctggt cgatgggggc
121 tgggctgata ttgccaagga atgtgagcgg tacttagcac ctaaggatt tggagggggt
181 caggtctctc caccocatga aaattattata attaataatc catcaaggcc ttggtgggaa
241 agatatcaac caatcagcta caaaatttgc tcaaggtctg gaaatgaaaa tgaattcaaa

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

2 Articles about the Amy2a3 gene

Hyperlipidemic versus healthy pancreases: a proteon [JUBMB Life. 2010]

Unstimulated amylase secretion is proteoglyc. [Arch Biochem Biophys. 2008]

SH3 binding sites of ZG29p mediate an interaction with amyl [Biochemistry. 2000]

See all.

3 Pathways for the Amy2a3 gene

Carbohydrate digestion and absorption

Starch and sucrose metabolism

Reference sequence information

RefSeq mRNA

See reference mRNA sequence for the Amy2a3 gene (NM_031502.1).

More about the Amy2a3 gene

Amy2a3 gene

Also Known As: Amy2

Homologs of the Amy2a3 gene

The Amy2a3 gene is conserved in human, chimpanzee, mouse, zebrafish, fruit fly, mosquito, C.elegans, and frog.

LinkOut to external resources

antibody

[ExactAntigen/Labome]

siRNA and shRNA

[ExactAntigen/Labome]

cDNA clone

[ExactAntigen/Labome]

Ambion siRNA

[Life Technologies]

TaqMan® Gene Expression Assays

[Life Technologies]

Related information

6. Como se explicó previamente, el formato más utilizado en bioinformática es el FASTA. Obtenga la secuencia en ese formato al ingresar en el ícono "FASTA" situado arriba a la izquierda. Seleccione la secuencia y cópiela a un archivo Word.

ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Un alineamiento de secuencias en bioinformática es una forma de representar y comparar dos o más secuencias o cadenas de ADN, ARN, o estructuras primarias proteicas para resaltar sus zonas de similitud, que podrían indicar relaciones funcionales o evolutivas entre los genes o proteínas consultados. Las secuencias alineadas se escriben con las letras (representando aminoácidos o nucleótidos) en filas de una matriz en las que, si es necesario, se insertan espacios o *gaps* para que las zonas con idéntica o similar estructura se alineen. Generalmente son creados por programas bioinformáticos, aunque algunos alineamientos requieren “curación” manual. Los alineamientos se representan normalmente con un formato gráfico y de texto. En casi todas las representaciones de alineamientos, las secuencias se escriben en filas de forma que los residuos alineados aparecen en columnas sucesivas. En los formatos de texto, las columnas alineadas contienen caracteres idénticos o similares, estos últimos indicados con sistema de símbolos de conservados.

Un ejemplo de un alineamiento de proteínas generado con el programa gratuito ClustalX:

```

****  *** ***** * . * *  **** * *** **  ** : :
CGSGGGAGTISTCGSYYNAGSRDFFAVPYSGWDFNDGKONTGSGEVE
CGSGNSAGTHSTCGSYFNPNNREFSAVPYSAWYFNDNKON---GEIN
CGSGGGAGTHSTCGSYFNAGSREFP-WPYSGWDFNDGKCRITGSGEIE

```

Como puede observarse, el programa está diseñado para buscar similitudes en las secuencias y agruparlas. De esta manera, un alineamiento entre dos o más secuencias nos permite comparar sus similitudes y diferencias.

Secuencias homólogas

Ya que definimos el concepto de alineamiento de secuencias, podemos introducir el concepto de secuencias homólogas. La **homología** es la relación que existe entre dos partes orgánicas diferentes cuando sus determinantes genéticos tienen el mismo origen evolutivo. Dos secuencias son homólogas cuando se evidencia una similitud entre ellas cuya presencia surge por razones evolutivas.

```

**  : : *  : : . . . . . : : *  * : : *  : : : :
AFKGFGGVQVSPFNENIIVNNPF-RPWWERYQPISYKLCITRSGSESEFRDM
AFKGFGGVQVSPFNENIINNPS-RPWWERYQPISYKICSRSGNENEFKDM
GFNGFGVQISPPNENIIVNPFY-RPWWERYQPISYKLCITRSGNEQOFRDM
QGMGFTAIWITPFTAQLFQITAYGDAYHGYWQDIYSLNENYGTADDLKAL
QGMGFTAIWITPFTAQLFQITAYGDAYHGYWQDIYSLNENYGTADDLKAL

```

Como podemos observar en este alineamiento parcial, las tres secuencias superiores son altamente homólogas entre sí. Las dos secuencias inferiores tienen cierta homología con las tres secuencias superiores pero tienen mucha mayor homología entre sí.

Genes ortólogos

Llamamos **genes ortólogos** a dos genes homólogos presentes en diferentes especies debido a que ambos genes provienen de un mismo gen presente en un antepasado común de ambas especies. Es decir, que son semejantes por pertenecer a dos especies que tienen un antepasado común. Generalmente los genes ortólogos cumplen funciones equivalentes. Podemos decir, entonces que los genes ortólogos son producto de la especiación. Un ejemplo de genes ortólogos serían el gen de la hemoglobina humana, y el gen de la hemoglobina de rata.

Genes parálogos

Los **genes parálogos** son aquellos que se encuentran en el mismo organismo, y cuya semejanza revela que ambos proceden de la duplicación de un gen ancestral. Generalmente uno de los genes parálogos sufre una fuerte presión evolutiva para mutar y cambiar su función. Entonces, el origen de los genes parálogos es la duplicación génica. Un ejemplo de genes parálogos son la hemoglobina humana y la mioglobina humana.

BLAST

BLAST: Basic Local Alignment and Search Tool es un programa que utiliza algoritmos matemáticos para buscar de manera rápida y eficiente alineamientos entre la secuencia “Query” que nosotros suministramos al programa y una base de datos de secuencias (por ej. La base de datos nr contiene prácticamente todas las secuencias de Genbank, EMBL y DDBJ).

Es decir, que BLAST es un programa que nos permite buscar secuencias homólogas a la secuencia que le ingresamos al programa. Es muy útil para encontrar tanto genes parálogos como para encontrar genes ortólogos. Esto NO significa que todas las secuencias que obtenemos como resultado de un BLAST son ortólogos o parálogos a la secuencia ingresada.

El programa funciona tanto con secuencias nucleotídicas como con secuencias proteicas. Para ejecutar búsquedas proteicas utiliza el subprograma blastp, mientras que para búsquedas nucleotídicas utiliza el programa blastn. Por regla general, utilizar Blastp es de mayor utilidad y mas fácil interpretación excepto para ejecutar finos análisis genéticos.

Además, al comparar organismos distantes en el sentido evolutivo, siempre se debe utilizar blastp ya que las mutaciones sin sentido (aquellas que ocurren en el tercer nucleótido de un codón, y no cambian el aminoácido codificado por ese codón) disminuyen las similitudes a nivel nucleotídico pero no afectan el nivel de homología proteico.

Es fundamental a la hora de utilizar BLAST el saber interpretar los resultados. Observamos un ejemplo de un resultado de BLASTp a continuación:

```
>[ref|XP_001265888.1] [G] alpha-amylase AmyA [Neosartorya fischeri NRRL 181]
gb|EAW23991.1| [G] alpha-amylase AmyA [Neosartorya fischeri NRRL 181]
Length=311

Score = 298 bits (763), Expect = 5e-79, Method: Composition-based stats.
Identities = 143/300 (47%), Positives = 192/300 (64%), Gaps = 6/300 (2%)

Query 36  LTRDFARTDGGSTTATCNTADRKYCGGTWQGIIDKLDYIQGMGFATAIWITPVTAQLPQTTA 95
+TRDFARTDGGSTT CNT + CGG+W+G I LDYIQGMGF AI I+P+ +
Sbjct 1  MTRDFARTDGGSTTHPCNMTTEGLRCGGSWRGTIQHLDYIQGMGFDAIMISPIVQNVGRVQ 60

Query 96  YGDAYHGYWQDDIYSLNENYGTADDLKLSSALHERGMYLMVDVYVANHMGYDAG---S 151
YG+AYHGYW QD+Y+LN ++GT D+ LS A+H+RGMVLMVD V N++ Y G +
Sbjct 61  YGEAYHGYWQDMYALNPHFGTHQDMLDLKAVHDRGMVLMVDVYVNNLAYITNGRNPAT 120

Query 152  SWDYSVFKPFSSQDYFHPFCLIQNYEDQTQVEDCWLGDNTVSLPDLDTTKDVKNEWYDW 211
S+DYS PF+ +FHP+C I +Y++ + CW GD+ V LPDL T V++ DW
Sbjct 121  SIDYSTLSPFMDPVFFHPYCKITDYDNYPLAQTCTGTGDDVVPLPDLKTEDSQVQSMMLDW 180

Query 212  VGSLSVSNYSIDGLRIDTVKHVQKDFWPGYNKAAGVYVCIGEVLDGDPAYTCPPYQNVMDGVL 271
+ +++ YSIDGLR+D KH+ F P ++ A+G + GEV + C YQN + V
Sbjct 181  IRKMMTTYSIDGLRLDAARKHITPSFLPLFDNASGAFITGEVFEPSVKTKICGYQNDLPSVP 240

Query 272  NYPIIYPLLNAFKSTSGSMDDLNMINTVKSDCPDSTLLGTFVENHNDNPRFASVTNDIAL 331
NYPIIY +L AF T G+ L N + +K C D T L +F ENHD RFAS+ +DIA+
Sbjct 241  NYPIIYSILEAF--TKGNTSSLTNQVEVMKQTCSDVTALTSFSENHDFARFASFKDDIAV 298
```

En la línea superior observamos el “*accession number*” de uno de los genes pertenecientes al resultado de Blastp que fue alimentado con la secuencia “*Query*” alfa amilasa de un hongo aspergillus. A continuación del accession number observamos el nombre del gen que obtuvimos como resultado del BLAST y a continuación el organismo al que pertenece esa secuencia.

Abajo observamos el largo del alineamiento, mas abajo el Score (puntaje), el Expect value (valor de probabilidad), y mas abajo Identities (identidades), Positives (positivos), y Gaps (espacios vacíos).

SCORE: El score de un resultado BLAST nos dice cuan “bueno” es ese alineamiento. La gran ventaja es que es un valor normalizado y comparable.

EXPECT: Es la probabilidad de que el alineamiento sea solamente producto del azar, y no de una verdadera homología entre las dos secuencias.

Es un valor muy importante y valioso ya que nos indica si el resultado matemático del programa blast que determinó un alineamiento entre una secuencia “*Query*” y una “*subject*” (resultado) tiene valor biológico y genético. **Nos indica cuan significativo es el resultado.**

Un *Expect* de 0.01 nos indica que hay una probabilidad en cien (1/100) de que no haya verdadera homología y que el resultado es puramente azaroso. Por regla general un resultado se considera significativo si el valor de *Expect* es igual o menor a 0.001. Es decir, mientras menor es el valor de *expect*, mas significativa es la homología entre la secuencia ingresada y la secuencia resultado.

Identities: Identidades, porcentaje de aminoácidos o nucleótidos exactamente iguales en la secuencia “*Query*” y en la secuencia “*subject*”, que es la secuencia que nos arroja como resultado el blastp.

Positives: Porcentaje de aminoácidos exactamente iguales en ambas secuencias sumados a los aminoácidos de características fisicoquímicas similares.

Gaps: Mientras mayor es el número de *gaps* y mientras más largos sean, menor es la significancia biológica del resultado.

ACTIVIDAD PRÁCTICA N°2: Comparación entre secuencias

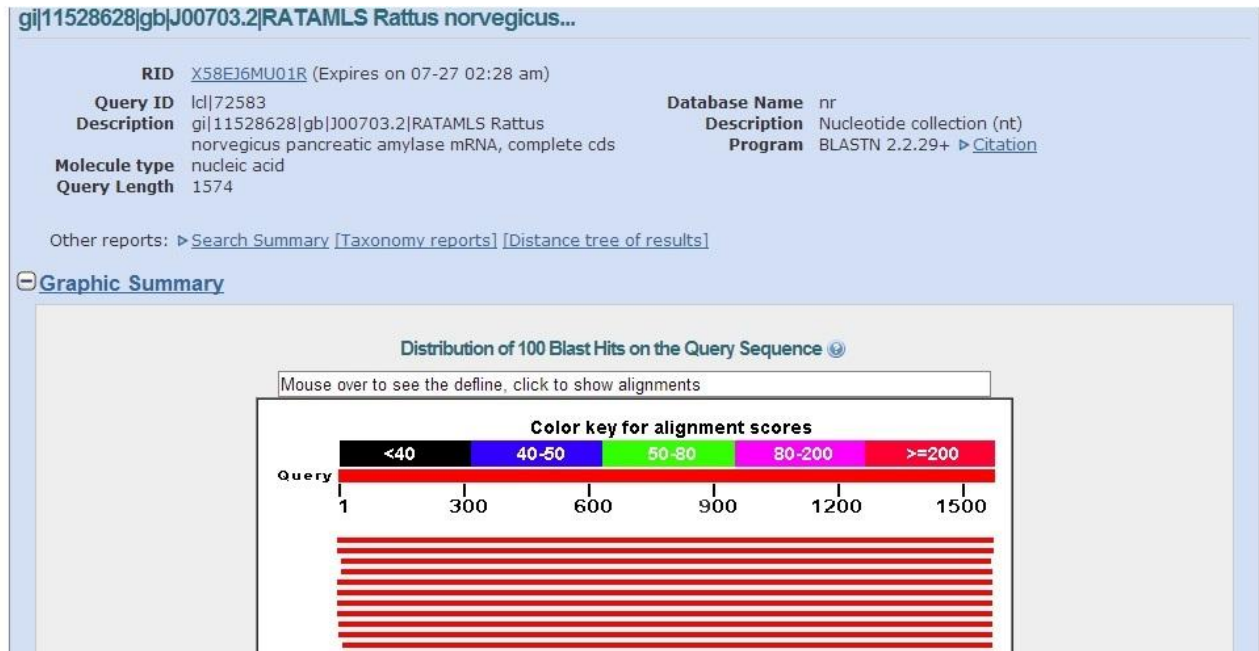
1. Abrir el explorador de internet Google Chrome y acceder a la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
2. En la página que se abrió debemos ingresar a BLAST presionando el ícono correspondiente.
3. Ingresado a la página, ir al programa nucleotide blast.

4. Aparte, abrir el archivo Word que contiene la secuencia de la amilasa y copiar dicha información. Pegarla en el box blanco de la página de BLAST (la secuencia a analizar se denomina “Query”). En la sección Choose Search Set → Database, seleccionar la opción Others y dentro de ella, “nucleotide collection (nr/nt)”.

PREGUNTA: ¿Podría utilizar la base de datos “Human genomic plus transcript”? ¿Por qué?

5. En la sección “Program selection” podemos seleccionar el algoritmo que utilizaremos en nuestra búsqueda. Seleccionar “megablast”. Al finalizar el ingreso de la información presione BLAST para que el programa de inicio a la búsqueda.

6. A continuación aparecerá en pantalla los resultados de los alineamientos de la secuencia que le suministramos con aquellas de la base de datos que seleccionamos. Primero se muestra un resumen gráfico de los resultados, ordenados en forma descendente según el grado de similitud entre la secuencia “Query” y las del banco de datos. Luego se muestran los mismos resultados en una tabla y por último aparecen los alineamientos en más detalle. Elija un resultado y analice y discuta los valores SCORE, E-Value, IDENTITIES, GAPS.



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Rattus norvegicus amylase 2a3 (Amy2a3), mRNA	2907	2907	100%	0.0	100%	NM_031502.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Rattus norvegicus pancreatic alpha-amylase-like (LOC100911494), mRNA	2880	2880	100%	0.0	99%	XM_006233259.1
<input type="checkbox"/>	Rattus norvegicus TL0AEA62YC18 mRNA sequence	2793	2793	99%	0.0	99%	FQ233367.1
<input type="checkbox"/>	Rattus norvegicus TL0ABA20YA06 mRNA sequence	2739	2739	99%	0.0	98%	FQ210907.1
<input type="checkbox"/>	Mus musculus amylase 2a4 (Amy2a4), mRNA	2374	2374	99%	0.0	94%	NM_001160150.1

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

Rattus norvegicus amylase 2a3 (Amy2a3), mRNA

Sequence ID: [reflNM_031502.1](#) Length: 1574 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 1 to 1574 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2907 bits(1574)	0.0	1574/1574(100%)	0/1574(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACAACTTCAAAGCAAATGAAGTTCGTTCTGCTGCTTTCCCTCATTGGGTTCTGCTGGGCT			60
Sbjct 1	ACAACTTCAAAGCAAATGAAGTTCGTTCTGCTGCTTTCCCTCATTGGGTTCTGCTGGGCT			60
Query 61	CAATATGACCCACACACTGCGGATGGGAGGACTGCTATTGTCCACCTGTTTCGAGTGGCGC			120
Sbjct 61	CAATATGACCCACACACTGCGGATGGGAGGACTGCTATTGTCCACCTGTTTCGAGTGGCGC			120
Query 121	TGGGCTGATATTGCCAAGGAATGTGAGCGGTTACTTAGCACCTAAGGGATTGGAGGGGTG			180
Sbjct 121	TGGGCTGATATTGCCAAGGAATGTGAGCGGTTACTTAGCACCTAAGGGATTGGAGGGGTG			180

Related Information

[Gene](#) - associated gene details
[UniGene](#) - clustered expressed sequence tags
[GEO Profiles](#) - microarray expression data
[Map Viewer](#) - aligned genomic context

PREGUNTA: En los resultados ¿aparece algún gen ortólogo?

¿A qué animal pertenece la secuencia de amilasa con mayor similitud a la de rata?

¿Cómo cambian los valores de SCORE, E-Value, IDENTITIES, GAPS si comparamos con la secuencia correspondiente a la amilasa humana?

7. Presionando sobre el ícono “Gene” de las secuencias del banco de datos que presenten similitud con la introducida, podremos acceder al contexto genómico de este gen y observar la ocurrencia de exones e intrones en su secuencia genómica ¿En qué cromosoma se encuentra el gen de la amilasa de rata?

8. Podemos acceder desde aquí a la secuencia genómica que corresponde a este gen (ADN), a la secuencia de mRNA y a la secuencia de aminoácidos. Vamos a copiar y guardar la secuencia de aminoácidos del gen de referencia de Amilasa. Para eso hacer click en el icono correspondiente al número de acceso de la amilasa: **NP_113690.1**, obteniendo de esta manera la secuencia de aminoácidos de la proteína. Para descargar la secuencia proteica en formato FASTA, hacer click en FASTA, copiar a partir del símbolo “>” hasta el final, pegar en un archivo de texto. Observar e investigar la información y los links disponibles para este gen.

BANCOS DE PUBLICACIONES.

Los grandes avances en el campo de la genómica, la proteómica y la biotecnología han catapultado a la bioinformática como una herramienta de análisis de los grandes proyectos de secuencias, y de la innumerable cantidad de datos biológicos que se están generando. Por ello es necesario documentarse acerca de las diferentes investigaciones y avances por medio de las publicaciones científicas que se encuentran en Internet.

Las diferentes revistas científicas se han agrupado en varios bancos que facilitan encontrar la información que cada investigador necesite, y en ellos se encuentran clasificadas por temática, tipo de revista, o autor entre otros, lo que unido a poderosos buscadores facilita enormemente su manejo. Algunos permiten acceder a sus publicaciones después de 6 meses sin restricción, pero otros solicitan un pago por artículo.

PUBMED (www.pubmed.org): Este es el banco de publicaciones del NCBI. La página tiene, en la parte superior, una barra de búsqueda marcada por la palabra SEARCH, donde se coloca el tema a investigar, luego de lo cual se da clic en GO, con lo que se cargará una página presentando los artículos que poseen la información que se busca. Los artículos marcados con un logo, que consiste en varias páginas de colores, son de acceso libre; los que tienen un logo de una sola página con líneas indica que solo el resumen está disponible (si se desea el artículo completo se debe ingresar a la página de la revista y hacer el pago correspondiente); los artículos marcados con el logo de una página en blanco no están disponibles (ni siquiera el resumen).

Cuando una publicación es de acceso libre se accede dando click en el nombre de los autores, o en el logo (páginas de colores), luego de lo cual se cargará una página con el resumen y un link para acceder a la revista, o a la base de datos de Pubmed.

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

PubMed.gov
US National Library of Medicine
National Institutes of Health

PubMed Search

RSS Save search Advanced Help

Show additional filters

Display Settings: Summary, 20 per page, Sorted by Recently Added Send to: Filters: [Manage Filters](#)

Article types
Clinical Trial
Review
More ...

Text availability
Abstract
Free full text
Full text

Publication dates
5 years
10 years
Custom range...

Species
Humans
Other Animals

Clear all

Show additional filters


Results: 1 to 20 of 9486 << First < Prev Page 1 of 475 Next > Last >>

[Molecular Imaging of Peroxynitrite with HKGreen-4 in Live Cells and Tissues.](#)
1. Peng T, Wong NK, Chen X, Chan YK, Ho DH, Sun Z, Hu JJ, Shen J, El-Nezami H, Yang D.
J Am Chem Soc. 2014 Jul 24. [Epub ahead of print]
PMID: 25058034 [PubMed - as supplied by publisher]


[Evidence for an exclusive association of matrix metalloproteinase-9 with dysfunctional high-density lipoprotein: A novel finding.](#)
2. Sini S, Deepa D, Harikrishnan S, Jayakumari N.
Atherosclerosis. 2014 Jun 24;236(1):162-168. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.06.007. [Epub ahead of print]
PMID: 25055059 [PubMed - as supplied by publisher]
[Related citations](#)

[Periaortic Brown Adipose Tissue as a Major Determinant of \[18F\]-Fluorodeoxyglucose Vascular Uptake in Atherosclerosis-Prone ApoE-/- Mice.](#)
3. Toczek J, Broisat A, Perret P, Desruet MD, Fagret D, Riou LM, Ghezzi C.
PLoS One. 2014 Jul 23;9(7):e99441. doi: 10.1371/journal.pone.0099441. eCollection 2014.
PMID: 25054923 [PubMed - in process] Free Article
[Related citations](#)

New feature
Try the new Display Settings option - Sort by Relevance

Results by year

Download CSV

PMC Images search for
macrophage and atherosclerosis



www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25054923 [tein-Containing Circulating Immune Complexes: Role in](#)

REFERENCIAS

- http://www.genomenewsnetwork.org/articles/06_00/sequence_primer.shtml
- <http://www.illumina.com/pages.ilmn?ID=201>
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, ... Rothberg JM. **Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors.** Nature. 2005 Sep 15;437(7057):376-80. Epub 2005 Jul 31.
- **Genbank**, Nucleic Acids Res. 2007 Jan;35(Database issue):D21-5.
- Mulder NJ, Apweiler R, Attwood TK, ..., Yeats C. **New developments in the InterPro database.** Nucleic Acids Res. 2007 Jan;35(Database issue):D224-8.
- **Pfam: clans, web tools and services** Robert D. Finn, Jaina Mistry, Benjamin Schuster-Böckler, Sam Griffiths-Jones, Volker Hollich, Timo Lassmann, Simon Moxon, Mhairi Marshall, Ajay Khanna, Richard Durbin, Sean R. Eddy, Erik L. L. Sonnhammer and Alex Bateman. Nucleic Acids Research (2006) Database Issue 34:D247-D251
- <http://lowelab.ucsc.edu/GtRNAdb/>
- <http://microrna.sanger.ac.uk/>
- <http://www.psb.ugent.be/rRNA/>
- <http://www.genome.jp/kegg/>
- <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>
- Wagner (1989) "**The Biological Homology Concept**" *Annual Review of Ecology and Systematics*, Vol. 20, pp. 51-69
- **Basic local alignment search tool.** Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-10.
- http://www.ch.embnet.org/software/blast_help.html

VECTORES Y SISTEMAS DE EXPRESIÓN

Discusión N° 1- Guía Teórica

Introducción

Una serie de descubrimientos realizados en los años 70 permitió el desarrollo del campo de análisis y manipulación de genes para el estudio funcional de los mismos. El advenimiento de dos tipos de enzimas permitió el desarrollo de la **técnica de clonación** de ADN.

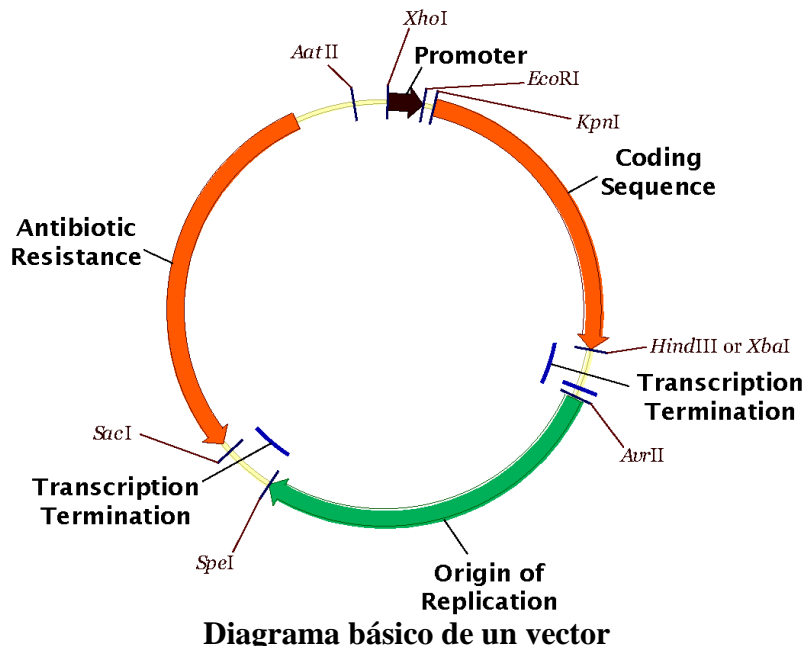
Estos dos grupos enzimáticos incluyen, por un lado, catalizadores que realizan cortes en secuencias específicas del ADN y se las denomina **enzimas de restricción** y, por otro lado, las enzimas denominadas **ADN ligasas**, las cuales catalizan la formación de puentes fosfodiéster entre dos fragmentos independientes de ADN. Estas dos enzimas constituyen herramientas fundamentales en el campo del ADN recombinante, ya que su uso permite la construcción de pequeñas moléculas de ADN recombinante mediante un proceso de “corte y ensamble”.

Luego de obtenidas las secuencias recombinantes, las mismas son introducidas en vehículos denominados **vectores**, los cuales permiten la internalización de la secuencia de interés en el organismo de estudio, su replicación y el análisis del producto de expresión de la misma.

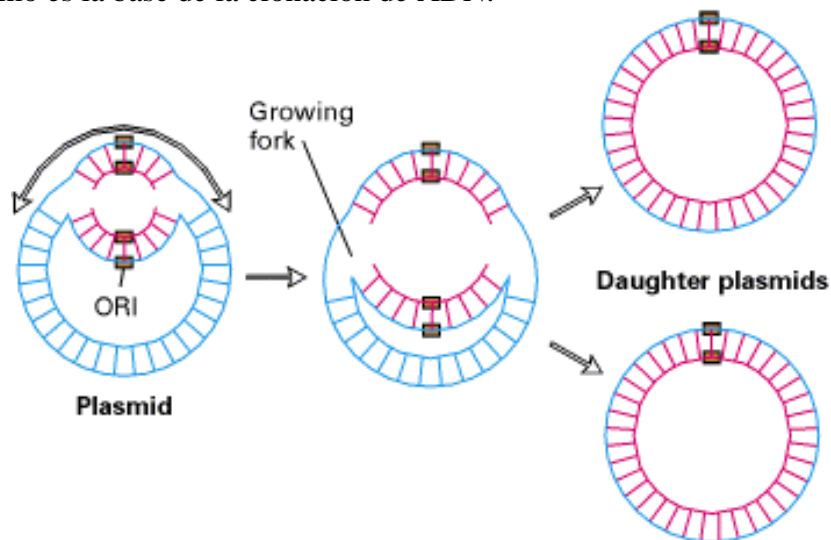
Hoy es posible crear moléculas recombinantes entre segmentos de ADN que no presentan homología y que pueden proceder de organismos diversos. Con el uso coordinado de las enzimas de restricción y de estos vectores moleculares, es posible aislar una secuencia de ADN de cualquier organismo e insertarla en otro. Las formas vivas que han sufrido tal transformación y que contienen un ADN foráneo son llamadas transgénicas.

Vectores:

Los vectores constituyen una herramienta indispensable para la posible manipulación y transporte del ADN de interés. Estas moléculas transportadoras (*carriers*) poseen ciertas características que las definen como tales, entre ellas se encuentran:



- **Capacidad de replicación autónoma:** los vectores poseen secuencias que permiten la replicación de los mismos utilizando la maquinaria de replicación propia de la célula huésped. Estas secuencias, denominadas origen de replicación (ori), son secuencias de 50-100 pb y *deben* estar presentes para asegurar la perpetuación del vector dentro de la célula. Las enzimas de la célula huésped se fijan al origen de replicación del vector y realizan la replicación del mismo independientemente de la secuencia que este vector contenga, de esta manera, la secuencia de ADN insertada se replica junto con el resto. Esto último es la base de la clonación de ADN.



Proceso de autorreplicación de un vector

- **Marcador de selección:** los marcadores de selección hacen referencia a la porción del vector que codifica para un carácter seleccionable y facilita el reconocimiento y/o selección de los organismos que poseen el vector de interés en su interior. Generalmente, los marcadores están representados por una secuencia que codifica para enzimas que otorgan resistencia a ciertos antibióticos (ampicilina, kanamicina, neomicina) o para ciertas enzimas que nos permiten seleccionar visualmente las células transgénicas (por ej. β -galactosidasa). Un sistema ampliamente utilizado para la selección de bacterias transformadas es el de la *alfa complementación*. Algunos vectores contienen en su secuencia un pequeño segmento de ADN que codifica para los primeros 146 aminoácidos de la enzima β -galactosidasa (*lacZ*). Este tipo de vectores es utilizado para transformar células que son capaces de sintetizar la porción carboxilo terminal de dicha enzima. De esta manera, solo las bacterias que poseen el plásmido son capaces de obtener la enzima activa. Las bacterias resultantes de la α -complementación son fácilmente reconocibles ya que forman colonias azules en medios de cultivo que presenten adición del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactosido (X-Gal). Sin embargo, la inserción de un fragmento foráneo de ADN dentro del sitio de clonado presente en el vector conduce a la producción de una porción amino terminal que no es capaz de α -complementarse con la porción carboxilo terminal producida por la bacteria huésped. Es por eso que las bacterias que poseen el plásmido que contiene la secuencia de interés clonada dentro de ella formaran colonias blancas ya que las mismas no son capaces de degradar el sustrato X-Gal. Este sistema acoplado a la selección por antibióticos permite reconocer los clones que contienen el plásmido (bacterias que crecen en presencia de antibiótico), y cuáles de esos clones presentan el vector con el inserto (colonias blancas) y el vector sin él (colonias azules).

- **Sitio de clonación:** esta secuencia codifica para múltiples sitios de restricción *únicos* reconocidos por diferentes enzimas de restricción. Este fragmento es de gran importancia ya que es el sitio donde luego se insertará la secuencia a clonar y/o expresar.

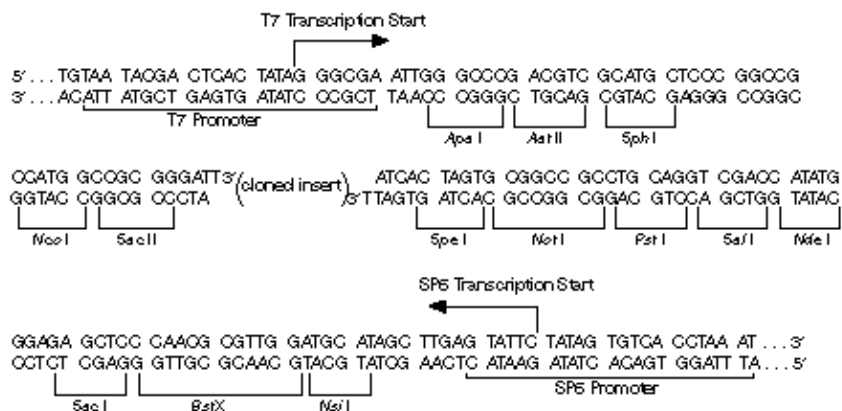


Figure 80. pGEM-T Vector promoter and multiple cloning site sequence.

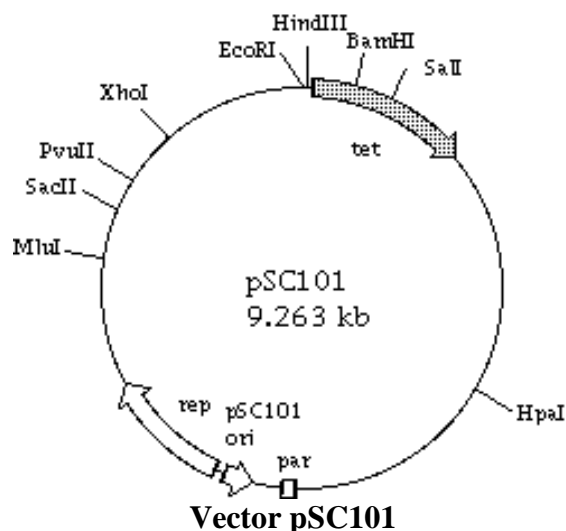
Sitio de múltiple clonado. Sistema de expresión basado en promotor T7

Clasificación de vectores:

Existen cuatro tipos principales de vectores:

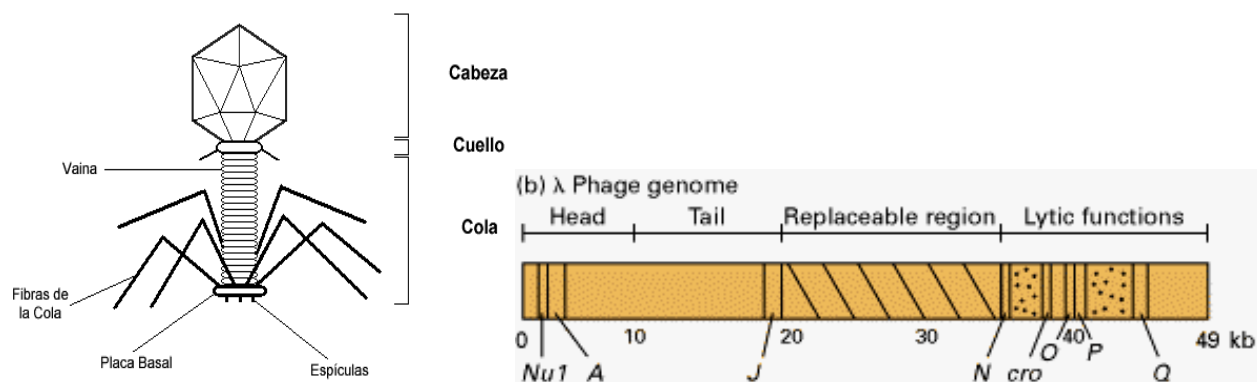
Plásmidos

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN bicatenario (ADNdc) y las mismas se mantienen de manera extracromosomal (no se integran al material genético de la célula huésped). Naturalmente, estos elementos genéticos se encuentran en bacterias y algunas células eucariotas y su tamaño varía desde algunos miles de pares de bases a más de 100 Kb de tamaño. Tienen un máximo de capacidad de transporte que ronda los 5 Kb aproximadamente. Este tipo de vector es el más utilizado en procesos de clonación y de expresión heteróloga de proteínas. Luego del descubrimiento de la enzima de restricción Eco RI, Cohen y colaboradores lograron aislar de una cepa de *E. coli*, un pequeño plásmido denominado pSC101. Este plásmido codifica para una enzima que confiere resistencia a la bacteria frente al antibiótico tetraciclina. pSC101 posee sólo un sitio de reconocimiento para la enzima EcoRI y, en consecuencia, se escindirá en un solo sitio en presencia de esta enzima, dejando libres dos extremos “pegajosos”. Utilizando un segmento de ADN que contenga extremos pegajosos complementarios a los originados por esta enzima, el mismo podrá ser insertado y ligado al plásmido anteriormente cortado. El resultado de este proceso es un plásmido recombinante. El descubrimiento del pSC101 y su utilidad en el proceso de clonación de secuencias de ADN dio lugar a la generación y manipulación de otros plásmidos para su uso en ingeniería genética.



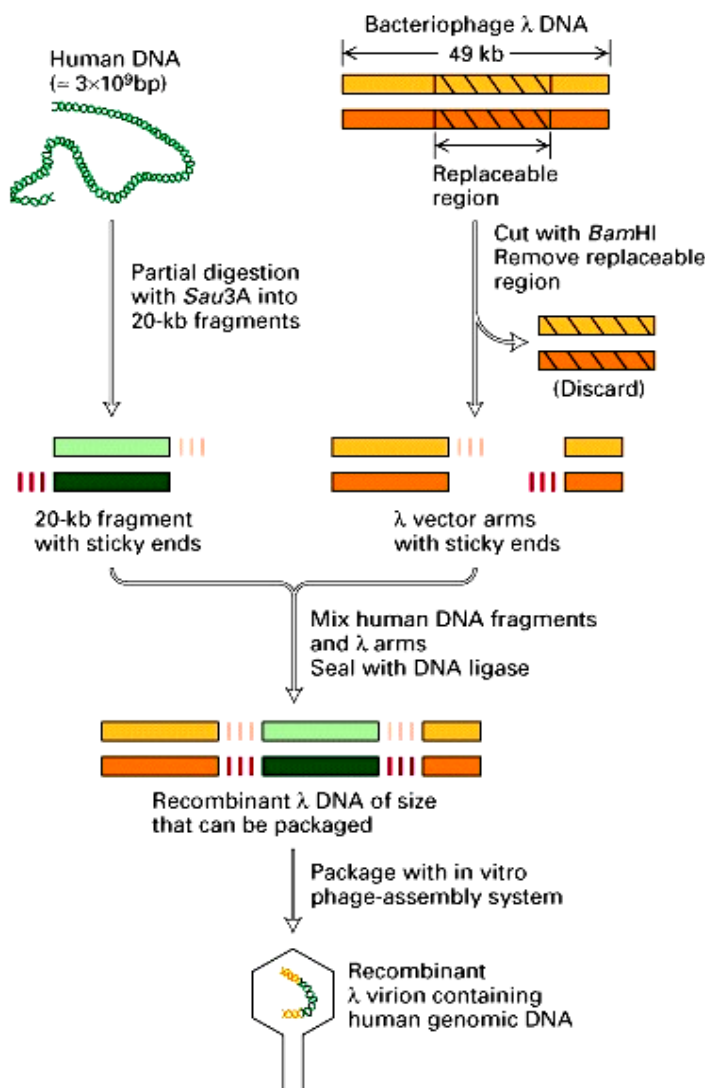
Bacteriófagos

El bacteriófago λ es uno de los virus bacterianos más estudiados, y se conoce gran parte de su biología molecular y su genética. Estos virus pueden ser utilizados como vehículos de clonación y su capacidad de transporte es de alrededor de 40 Kb. Ciertas cepas de bacteriófagos λ poseen sitios de reconocimiento para ciertas enzimas de restricción que liberan la secuencia central del genoma de este bacteriófago. Esta secuencia, codifica para las enzimas que intervienen en el proceso de integración al genoma bacteriano y las mismas no son indispensables para el proceso de infección ni de multiplicación en la bacteria hospedadora. Cuando se usa este bacteriófago como vector de clonación, este debe ser capaz de llevar a cabo el ciclo lítico, siendo esta la vía de generación de innumerables copias del ADN clonado dentro de su genoma. Además, utilizando este vector como herramienta de clonación, se pueden generar bibliotecas genómicas completas de organismos superiores y ser utilizadas para el escrutinio de genes.



Etapas de clonación utilizando el fago lambda:

- Aislamiento del ADN vector a partir de partículas víricas y digestión con enzimas de restricción apropiadas (IMPORTANTE: tanto el ADN a clonar como el vector deben ser escindidos utilizando las mismas enzimas de restricción).
- Ligación del vector al ADN a clonar utilizando la enzima Ligasa que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster.
- Reacción de encapsulación de los vectores recombinantes, lo cual permite la formación de partículas víricas capaces de ser utilizadas en proceso de infección de la célula huésped.
- Infección de un cultivo bacteriano y consecuente selección por formación de halos de lisis en placa.
- Procedimiento de comprobación de la presencia de la secuencia de ADN de interés mediante técnicas de hibridación con sondas complementarias o reacciones de amplificación mediante PCR.

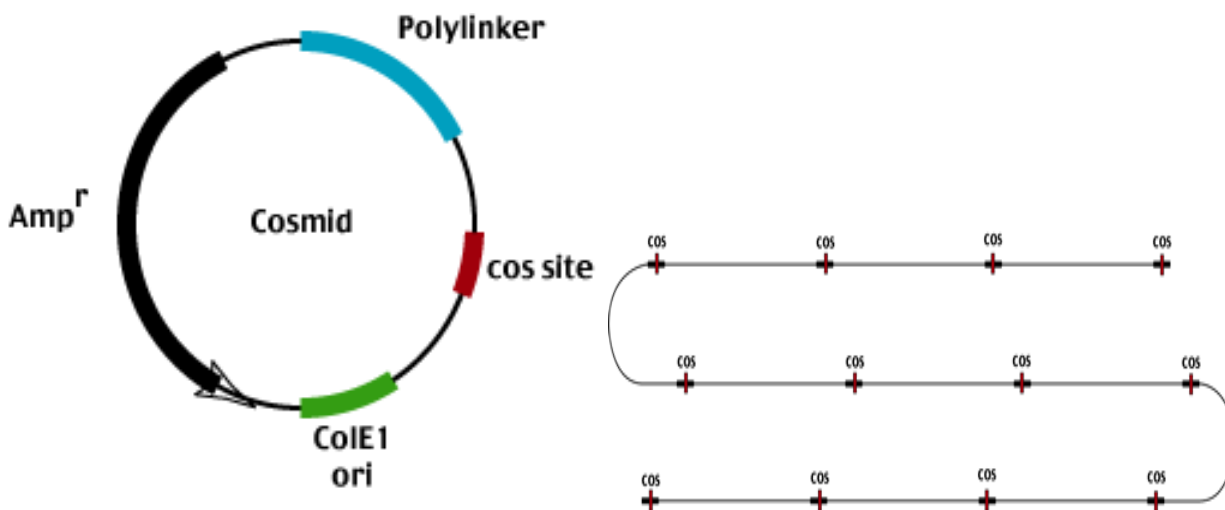


Proceso de clonación utilizando el fago λ como vector

La necesidad de obtener y manipular grandes fragmentos de ADN ha conducido al desarrollo de un tipo de vectores que permiten esto y son denominados **cósmidos** y **cromosomas artificiales**.

Cósmidos

Para el proceso de clonación de fragmentos mayores de ADN se ha desarrollado y empleado las propiedades del fago λ en la construcción de un nuevo tipo de vector. Los cósmidos son vectores que se obtienen luego de la adición de una secuencia COS perteneciente al genoma del fago λ a un plásmido de clonación para *E. coli*, el cual luego es insertado dentro de la bacteria y de esa forma se obtienen innumerables copias de plásmidos cuando la bacteria se divide. La capacidad de transporte de los cósmidos es de aproximadamente 45 Kb. Los cósmidos, contienen un origen de replicación, una secuencia que confiere resistencia a antibióticos (selección) y dos secuencias COS flanqueando el sitio de clonación donde pueden ser insertados fragmentos de un tamaño que varía entre 35 a 45 Kb. Luego de la construcción de estos vectores, los mismos son debidamente empaquetados en una reacción *in vitro* utilizando la enzima viral encargada de este proceso y las cubiertas víricas vacías. Una vez empaquetados, estos vectores son introducidos en la célula bacteriana por un proceso de infección. Ya en el interior de la bacteria, el cósmido, adopta una forma circular y comienza a multiplicarse al igual que un plásmido.

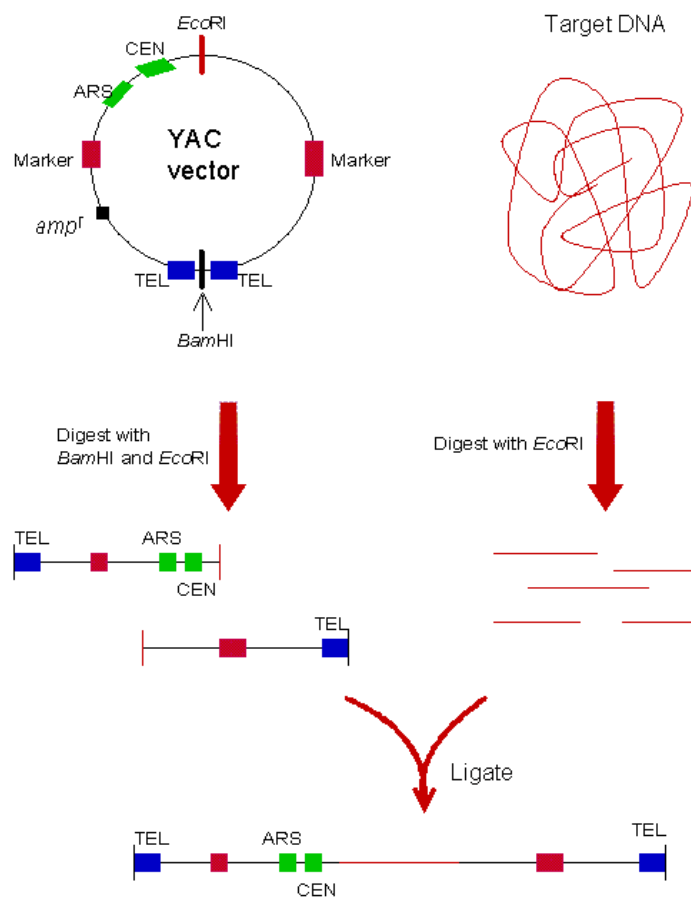


Estructura de un vector cósmido

Cromosomas Artificiales

Este tipo de vector posee la capacidad de poder llevar en su interior una gran cantidad de información genética (secuencia de ADN). Este tipo de vector es de gran utilidad cuando es necesario el proceso de clonación de grandes fragmentos de ácidos desoxirribonucleicos. Los cromosomas artificiales más utilizados son:

YAC: este tipo de vector se denomina cromosoma artificial de levadura. (YAC: *yeast artificial chromosome*). Es uno de los vectores de alta capacidad de clonado más utilizados en los laboratorios.



Para el desarrollo de este tipo de vectores fue necesario un minucioso estudio de los componentes presentes en los cromosomas de estos organismos, entre ellos los que se detallan a continuación:

- El centrómero, el cual es requerido para una correcta distribución hacia cada una de las células hijas luego de la división celular.
- Telómeros, estructuras presentes en los finales de los cromosomas necesarios para una correcta finalización de la replicación y para prevenir la acción de exonucleasas.
- Origen de replicación, las cuales constituyen posiciones a lo largo del cromosoma en donde se da lugar al inicio del proceso de replicación. Este es similar al origen de replicación presentes en plásmidos.

Resumiendo, las partes esenciales de los vectores YAC son:

- Secuencias Centroméricas (CEN), teloméricas (TEL) y de autorreplicación (ARS).
- *amp^r* como marcador selectivo de bacterias como así también TRP1 y URA3 para la identificación de células eucariotas (levaduras) que han sido transfectadas con el plásmido.

BAC: este vector de clonación, denominado cromosoma artificial de bacterias (BAC: *bacterial artificial chromosome*) es un vector basado en el plásmido de fertilidad de la bacteria *E. coli*. Los BAC han sido particularmente útiles en el proceso de secuenciación del genoma humano.

Otros vectores de uso en el laboratorio de biología molecular e ingeniería genética

Shuttle vectors o vectores lanzadera

Este tipo de vectores es de gran utilidad cuando se quiere realizar la transferencia de genes entre dos organismos diferentes: por ejemplo entre bacterias Gram+ y Gram-. Una característica esencial de este tipo de vectores es la presencia de sitios de replicación para cada uno de los organismos huéspedes donde el vector será insertado.

YEP

Este vector es capaz de replicar tanto en levaduras como en *E. coli*. Ya que además de presentar secuencias de reconocimientos para células de levadura, presenta secuencias que constituyen orígenes de replicación para procariontes, como es la secuencia pBR322, la cual es reconocida por la cepa de *E. coli*.

Plásmido Ti

Este tipo de vector es muy importante ya que el mismo es utilizado en el campo de la biología molecular de plantas. El mismo deriva de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, y puede ser utilizado para el proceso de expresión de genes foráneos en organismos vegetales. *A. tumefaciens* es un microorganismo de suelo que causa una reconocida patología en plantas dicotiledóneas. Luego de que se da lugar a la infección de la planta por esta bacteria, las células indiferenciadas de la misma comienzan a proliferar de manera no controlada dando a lugar al desarrollo de tumores. Este proceso está asociado a la presencia de un plásmido en la bacteria denominado plásmido Ti (el cual presenta un tamaño muchas veces superior a 200 Kb). Una característica interesante de este plásmido es que luego de llevada a cabo la infección, parte de él se integra al genoma de la planta y luego se transmite a cada una de las células hijas concluida cada división celular. Es debido a esta propiedad que luego de que se reemplaza la secuencia necesaria para el desarrollo de la patología por una secuencia de interés para un estudio determinado la bacteria puede servir como vector de infección para la internalización del plásmido recombinante y consecutiva integración al genoma de nuestra secuencia de interés al genoma de la célula hospedadora.

Virus y retrovirus

Este tipo de vectores es de gran utilidad para la introducción y estudio de diferentes genes y sus productos proteicos en células de eucariotas superiores. Los **baculovirus** son virus utilizados para la infección de células de insectos y pueden ser usados ya que no son capaces de infectar otro tipo de célula eucariota (Bioseguridad).

El primer experimento en el cual se llevo a cabo la clonación en células de mamíferos se remonta al año 1979 donde se utilizó un vector de clonado basado en el virus de simio 40 (SV40: *simian virus 40*). El mismo es capaz de infectar muchas especies de mamíferos, llevando a cabo tanto ciclos lisogénicos como así también ciclos líticos. El clonado molecular basado en este tipo de vector se fundamenta en el reemplazo de uno o más genes existentes previamente en el vector por la secuencia de interés a ser clonada. Más tarde, se desarrollaron otros vectores basados en diferentes virus, entre ellos **Adenovirus**, **Papilomavirus**, **Adenovirus asociados (AAV)** y los **Retrovirus**. Un detalle importante a tener en cuenta a la hora del uso de un vector viral es el de asegurar que el mismo no lise la célula infectada sino que asegure el desarrollo de un ciclo lisogénico.

Capacidad máxima de ADN que puede ser clonada en los diferentes vectores	
Tipo de vector	ADN clonado (Kb)
Plásmidos	5-10
Fago lambda	25
Cósmidos	45
BAC	300
YAC	1000

Tabla 1. Capacidad de transporte de los diferentes vectores

Las descripciones anteriores hacen referencia a las características que poseen los vectores que son utilizados normalmente el proceso de *clonación molecular*, el cual persigue como objetivo la obtención de numerosas copias de una porción de ADN. Por otro lado, cuando es necesario estudiar el producto del gen que se ha clonado, es necesaria la utilización de *vectores de expresión*. Estos últimos comparten las características básicas presentes en todos los vectores clonación (capacidad de replicación autónoma, marcador de selección, etc.) pero además, poseen ciertas secuencias en su interior que permiten el proceso de expresión de productos proteicos codificados por el gen que se encuentra clonado (secuencias promotoras, etc.).

Elección del sistema de expresión

Los sistemas de expresión pueden ser clasificados en dos grandes categorías: sistemas de expresión procariotas y sistemas de expresión eucariotas. El uso del sistema de expresión adecuado requiere evaluar previamente tópicos críticos como son: rendimiento, modificaciones postraduccionales necesarias, etc.

Los sistemas de expresión procariota se caracterizan por ser fáciles de utilizar, y son útiles en la mayoría de las aplicaciones. Sin embargo, ciertos estudios funcionales no pueden ser realizados utilizando vectores de expresión en células procariotas. Esto es debido a que este tipo de células no es capaz de llevar a cabo las modificaciones postraduccionales características de organismos eucariotas como son, por ejemplo, la glicosilación y la formación de puentes disulfuro en las proteínas. Es por esto último que se han desarrollado sistemas de expresión para su utilización en células eucariotas.

Sistema de expresión en procariotas: Escherichia coli

En el año 1977, Itakura y colaboradores lograron expresar la hormona somatostatina en células de *E. coli*. Este hecho fue muy importante ya que fue la primera vez que un gen heterólogo correspondiente a células eucariotas superiores fue expresado en células procariotas.

E. coli constituye el sistema de expresión más ampliamente utilizado ya que esta bacteria ha sido muy estudiada, tanto a nivel bioquímico como a nivel genético. A su vez presenta una alta tasa de crecimiento, capacidad de cultivo continuo y bajo costo de producción.

Basándose en los diferentes sistemas de expresión, en *E. coli*, las proteínas heterólogas pueden ser expresadas en tres formas:

- Proteínas de fusión: este sistema se caracteriza por la producción de proteínas quiméricas a las cuales se les ha adicionado secuencias específicas o “tags”. Esto último se logra mediante la fusión del gen de interés a otras secuencias que codifican para péptidos cortos o proteínas. Estos tags facilitan tanto la purificación como también permiten determinar la localización intracelular de la proteína en estudio mediante su detección específica por anticuerpos o moléculas pequeñas. De ser necesario un estudio funcional de la proteína que esta siendo expresada como así también un estudio dinámico dentro de la célula, es muy importante saber en que extremo de la proteína se le añade el tag.

Tag	Residuos	Tamaño (KDa)	Uso	Matriz/elusión	Comentarios
Polihistidinas	2-10	0.84	Purificación	Metales divalentes Ni/ Imidazol o Bajo pH	Puede afectar a las propiedades de la proteína, tanto el tag como la elusión.
Proteína de unión a la maltosa	396	40	Purificación y solubilización	Resina de amilasa/ maltosa	Purificación en un solo paso.
Proteína CBD	51	5.59	Purificación	Chitin	Compatible con detergentes de alta fuerza iónica y no iónicos. Purificación en ausencia de agentes reductores.
Glutation S-transferasa (GST)	211	26	Purificación	Glutation agarosa/ Glutation	Dimerización de GST y la elusión pueden afectar a la proteína.
Strep-Tag II	8	1.2	Purificación	Streptactin/ Biotina	
FLAG	DYKDDDDK	1.01	Detección y purificación	Anticuerpos anti FLAG/ Péptido Flag	Muy buena purificación. No afecta a la proteína
3 x FLAG	3 x(DYKDDDDK)	3.03	Detección y purificación	Anticuerpos anti FLAG/ Péptido Flag	Mejora el nivel de detección.

GFP (proteína verde fluorescente) y variantes	239	27	Detección		Permite la visualización “in vivo” de la proteína. Requiere oxígeno
HA	YPYDVDPYA	1.102	Detección/ Purificación	Anticuerpo anti HA	Muy buena detección.

Tabla 2. Diferentes tags presentes en vectores para expresar proteínas de fusión

- Proteínas secretadas que se acumulan en el periplasma o en el medio extracelular: Utilizando este sistema, se reduce notablemente la degradación de la proteína por parte de proteasas propias del organismo que se está utilizando como célula huésped del vector de expresión en estudio. Por otro lado, se simplifica el proceso de purificación y el sistema contribuye a la correcta conformación de la proteína. La mayoría de los casos constituyen proteínas que son exportadas al exterior de la célula y estas son recuperadas desde el medio de cultivo donde la célula es cultivada. Es muy importante considerar en estos sistemas, que la proteína debe poseer una *secuencia señal* que la conduzca hacia el exterior de la célula, una secuencia que indique que la proteína que esta siendo producida debe ser secretada hacia el exterior celular. De la misma manera, a los fines de evitar la degradación de la proteína heteróloga producida, se utilizan como células hospedadoras cepas que presentan mutaciones o deficiencias en la producción de proteasas.
- Cuerpos de inclusión: En este caso, las proteínas son depositadas en los cuerpos de inclusión de bacterias y de esta forma, se protegen del ataque por proteasas del hospedador. Este sistema tiene la desventaja de presentar un largo proceso de purificación de la proteína a partir de estos cuerpos intracelulares.

Estos sistemas presentan una gran variedad de ventajas que los hacen muy atractivos para su uso en el laboratorio de biología molecular, pero como todo sistema, también presenta desventajas. Las limitaciones en los sistemas de expresión para *E. coli* son:

- Imposibilidad de realizar modificaciones postraduccionales, las cuales son necesarias para la correcta conformación y/o actividad de algunas proteínas. Estas modificaciones afectan su solubilidad, estructura, estabilidad, vida media, resistencia a proteasas, etc.
- Retención del aminoácido metionina amino terminal en proteínas recombinantes que no se encuentra en su forma nativa. Afecta a la estabilidad de la proteína, éstas se caracterizan por ser inmunogénicas.
- Ausencia de chaperonas apropiadas para algunas proteínas, lo que conduce a un plegamiento inadecuado. Una posible solución es la expresión paralela de chaperonas.
- Problemas de “*codon bias*” (preferencia de codones). El código genético se caracteriza por ser degenerado, lo que da a lugar a que varios tripletes codifiquen para un mismo aminoácido, cada especie posee una producción propia de tripletes en una proporción determinada, siendo unos más frecuentes que otros. Cuando el “*codon bias*” del gen que se quiere expresar es diferente al de *E. coli*, la eficiencia de traducción y por ende el rendimiento es bajo. Para solventar este problema, se han desarrollado cepas de *E. coli* que se caracterizan por ser capaces de responder a codones menos frecuentes.
- Por último, el gran problema de la producción y purificación de proteínas en bacterias es la presencia de proteasas. El alto contenido de estas enzimas reduce considerablemente el rendimiento de producción. Para evitar este problema, se han modificado genéticamente

algunas cepas de *E. coli* para que estas sean deficientes en proteasas. (Cepa BL21 y derivados. Esta última será la utilizada durante el desarrollo del trabajo práctico.)

Normalmente, en el laboratorio de biología molecular, se debe tener en cuenta el organismo que va a ser el hospedador del vector en estudio, ya que las diferencias que se presentan entre las diferentes cepas de *E. coli* definen su uso tanto para clonar como para expresar proteínas heterólogas.

La cepa de mayor uso para ensayos de clonación es *E. coli* DH5 α . Las características de la misma se presentan a continuación: Esta cepa posee una gran eficiencia de transformación comparada con la cepa DH1 (progenitora). Por otro lado, esta cepa es deficiente en las enzimas del proceso de recombinación génica, lo que asegura que el material genético clonado en estas bacterias no sufre modificaciones en su secuencia. Además, una mutación presente en esta bacteria (θ 80 lacZ Δ M15) permite la α -complementación, la cual es utilizada como marcador de selección de bacterias transformadas.

Por otro lado, para ensayos donde se debe expresar un gen de interés y obtener el producto proteico codificado por el mismo, la cepa bacteriana de gran utilidad para estos ensayos es *E. coli* BL21.

BL21 es una cepa que se caracteriza por presentar un alto nivel de expresión de genes clonados en plásmidos que presentan promotor T7 perteneciente al bacteriófago T7. El gen que codifica para la polimerasa T7 del bacteriófago se encuentra en el fago λ DE3, el cual se encuentra integrado al cromosoma de la bacteria perteneciente a esta cepa. Además, esta, es una cepa que es deficiente en la producción de proteasas intracelulares.

Como se aclaró anteriormente, los sistemas de expresión que utilizan como organismo hospedador un procarionta presenta un gran número de ventajas pero así también limitaciones, siendo una de las principales, la incapacidad de estos organismos de realizar modificaciones postraduccionales características de organismos eucariotas. Es por esto que en los últimos años se ha dado lugar al un gran desarrollo de sistemas de expresión que utilizan como hospedador un organismo eucariota.

Sistemas de expresión en células eucariotas

La utilización de vectores mixtos o híbridos facilita la transfección de organismos eucariotas, siendo el más usado la levadura. Los vectores mixtos se pueden replicar tanto en organismos eucariotas como así también en organismos procariontas debido a que poseen secuencias de autorreplicación características de cada organismo. El procedimiento típico que involucra un vector mixto implica la transformación de bacterias (*E. coli*) con el producto de ligación entre el vector y el inserto de ADN a clonar. Luego de obtenido los clones que poseen el vector recombinante, estos son purificados en grandes cantidades y utilizados en el proceso de transfección del organismo eucariota hospedador donde se dará lugar a la producción de la proteína codificada por el gen de interés, el cual se encuentra bajo el control de promotores “fuertes” (por ejemplo: SV40, tubulina, etc.) que aseguran un alto nivel de expresión. En muchas ocasiones, la expresión necesita ser regulada, por lo que se han desarrollado vectores de expresión que presentan secuencias promotoras reguladas por proteínas represoras o activadoras. Entre los más conocidos se encuentra el sistema TET, en donde al adicionar Tetraciclina al medio de cultivo, el sistema se activa y comienza el proceso de transcripción y subsiguiente traducción del ARN mensajero codificado por el gen de interés.

Entre los organismos eucariotas más utilizados como hospedadores para vectores de expresión se encuentra la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Cepas pertenecientes a este organismo han sido modificadas para su uso como célula hospedadora y productora de proteínas heterólogas. Debido

a que es un organismo que cumple con todas las regulaciones de bioseguridad para aplicación en humanos, *S. cerevisiae* ha sido utilizada para la producción de medicinas como la vacuna de la hepatitis B. En la actualidad, este organismo está siendo utilizado en la producción de la vacuna contra el Hantavirus.

Ventajas del uso de *S. cerevisiae*:

- Simplicidad de cultivo, crecimiento rápido y bajo costo.
- El sistema de endomembranas de las levaduras permite que algunas proteínas sintetizadas intracelularmente sean secretadas al espacio extracelular.
- Como organismos eucariotas unicelulares, las levaduras son capaces de producir proteínas recombinantes que han sufrido todas las modificaciones postraduccionales necesarias para su correcto funcionamiento.
- La seguridad del sistema está garantizada, incluyendo la ausencia de endotoxinas y oncogenes. Además, las células de levadura son más fáciles de cultivar y manipular que las células de mamíferos, y estas pueden ser cultivadas a altas densidades.

Las células de mamíferos pueden ser utilizadas como células hospedadoras y productoras de proteínas recombinantes. Estos sistemas poseen una serie de ventajas sobre los sistemas anteriormente descritos debido a que organizan la síntesis, procesamiento y secreción de las proteínas producidas.

Un sistema de expresión que puede ser utilizado para la producción transitoria o estable de proteínas recombinantes involucra células COS (sistemas COS-TEs) o células CHO (CHO-SES) respectivamente. COS-TEs consiste en un sistema que involucra células COS derivadas de una línea celular de mono verde africano y plásmidos de expresión que contienen el origen de replicación del virus 40 de simios (SV40 ori) el gran antígeno T que es capaz de reconocer y unirse a la secuencia ori de SV40 y conducir la replicación del vector cuando las células son transfectadas con el mismo. De la misma manera que se producen copias del vector, también se da lugar a la producción de la proteína codificada por el gen que ha sido clonado dentro del mismo. Debido a que se da lugar a una replicación ilimitada del vector, la célula transfectada eventualmente morirá.

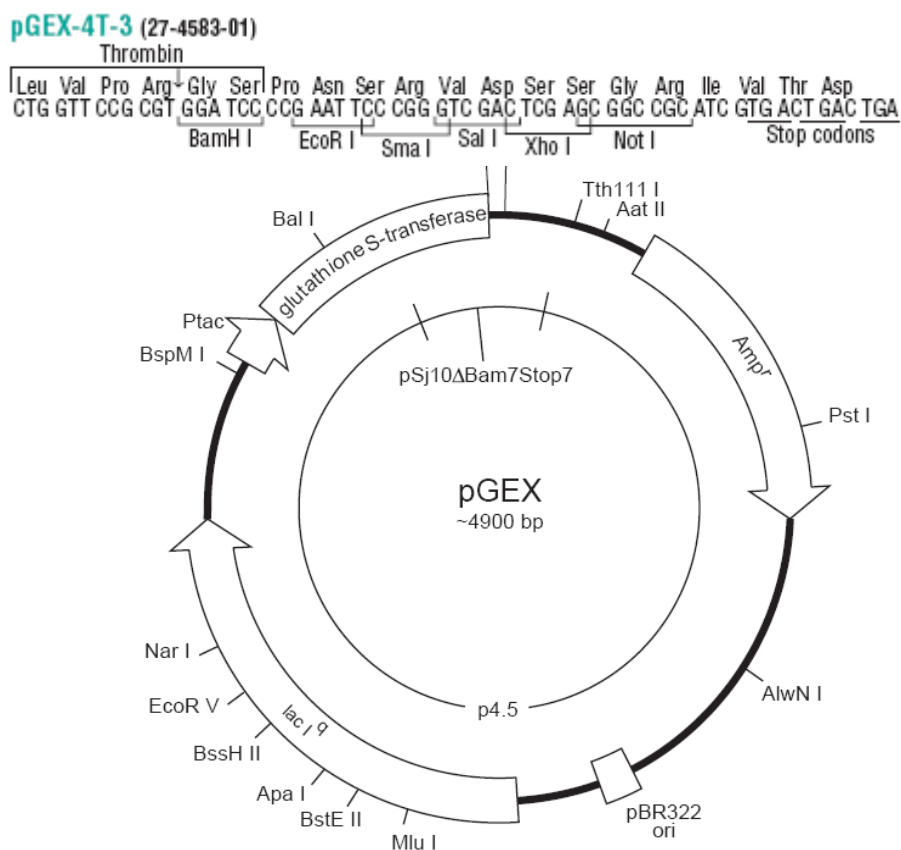
De ser necesaria una expresión constitutiva de un gen foráneo en una célula eucariota, el gen debe integrarse al cromosoma de la misma y es de utilidad la línea celular COS-SES que permite la efectiva expresión de la proteína de interés. Otras líneas celulares que son comúnmente utilizadas para la producción de proteínas recombinantes son: células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñones de embriones humanos (HEK), mielomas como J558L y Sp2/0.

Por último, otros sistemas de expresión en eucariotas involucran virus de insectos (baculovirus), hongos filamentosos, etc.

Sistema de expresión a utilizar durante el trabajo práctico

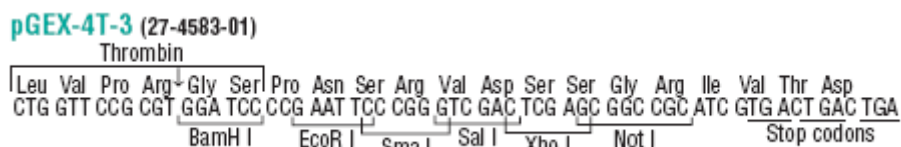
En el presente trabajo práctico de biología molecular, se procederá al clonado y expresión de proteínas recombinantes en células procariotas. Como se aclaró anteriormente, es muy importante estudiar el sistema de expresión que va a ser utilizado ya que este debe cumplimentar con los requerimientos del estudio a realizar.

En el presente práctico, utilizaremos como vector de clonado y expresión al vector pGEX-4T3. Es muy importante estudiar el vector a utilizar y sus características. A continuación, se presenta el diagrama del vector pGEX-4T3.



Como puede observarse en la gráfica, el vector presenta un sitio de origen de autoreplicación denominado **pBR332**. Este sitio asegura que el plásmido se replicará en el interior de la célula y el mismo no se perderá en las subsecuentes divisiones celulares.

Por otro lado se observa una porción del vector denominada **Amp^r**, esta secuencia es la encargada de conferir a las bacterias que poseen el plásmido resistencia al antibiótico Ampicilina (naturalmente las bacterias son sensibles a este antibiótico). Otra característica de este sistemas de expresión que debemos observar es el sitio de clonado múltiple. Este sitio, como se aclaró anteriormente presenta una serie de secuencias de ADN que son reconocidas por diferentes enzimas de restricción. Estas enzimas deben ser utilizadas para cortar tanto el inserto de ADN a clonar como así también el vector, no así el fragmento a clonar.

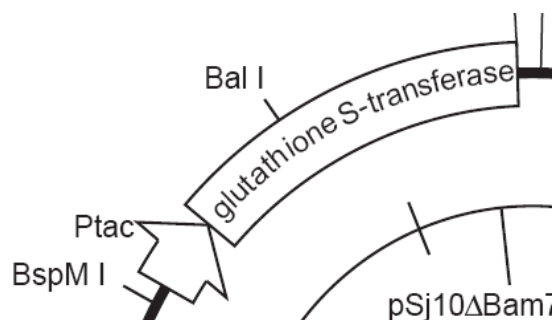


Sitio de múltiple clonado. Vector pGEX-4T3

Previo a la secuencia de clonado múltiple se encuentra una secuencia que codifica para un tag denominado GST (*glutathione-S-transferase*). El resultado de clonar nuestro gen río abajo de esta secuencia (es muy importante notar que el sitio de comienzo de transcripción/traducción esta codificado en esta secuencia) es un gen híbrido que codifica para una proteína quimérica que presenta en el extremo amino terminal un péptido GST. Este péptido es de gran utilidad en el proceso de purificación.

Para el proceso de purificación de la proteína quimérica se utilizará una columna de glutatión-sefarosa que es capaz de unir el extremo GST de la proteína (unión enzima-sustrato). Luego de purificada la misma, se liberará la proteína de interés utilizando trombina, una proteína que es capaz de escindir la secuencia de aminoácidos que unen nuestra proteína con el tag GST. Si observamos la secuencia de múltiples sitios de clonado observaremos que se encuentra demarcada la secuencia que luego codificará para los aminoácidos reconocidos por la trombina.

Las proteínas resultantes de la fusión a GST se obtienen de la clonación de la secuencia de ADN de interés en alguno de los sitios de inserción codificados en el sitio de múltiple clonado. La expresión del mismo es controlada por el promotor *tac*, el cual es inducido por el análogo de lactosa isopropil β -D tiogalactósido (IPTG). Todos los vectores pertenecientes a la familia pGEX han sido modificados y presentan un gen denominado *lacIq*. El producto de este gen es una proteína represora que se une a la secuencia promotora *tac* e impide la producción del producto del gen clonado. Entonces, sólo en presencia del inductor de expresión (IPTG), se logrará la producción de la proteína de interés fusionada a GST.



Promotor *Ptac* río arriba de la secuencia que codifica para el tag GST

Es importante también tener en cuenta que organismo utilizaremos como hospedador y productor de nuestra proteína de interés. Si observamos la secuencia del vector, notaremos que el mismo no posee secuencias de replicación propias de organismos eucariotas por lo que nuestra búsqueda queda reducida a organismos procariontas, las bacterias.

Aunque una gran variedad de cepas pueden ser utilizadas para el proceso de clonado y expresión de vectores pGEX, existen cepas especialmente modificadas que son más adecuadas a tal proceso y aseguran un alto nivel de expresión de las proteínas de fusión. Es de gran importancia que las cepas a utilizar sean deficientes en genes que codifican para proteínas con acción proteolítica, como son OmpT, Lon, DegP o HtpR. De no utilizar dichas cepas, los resultados de purificación de proteínas recombinantes evidenciarían degradación por proteasas cuando estas son observadas por la técnica de Western blotting y/o corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida (múltiples bandas resultado de la degradación).

Como se aclaró anteriormente, la cepa BL21 de *E. coli* es de gran utilidad en estos casos ya que presenta deficiencias en la producción de proteasas OmpT y Lon. Esta cepa es recomendada para su uso en sistemas de expresión de proteínas recombinantes fusionadas a GST.

Ya seleccionada la bacteria que funcionará como hospedadora del vector recombinante, debemos analizar el mecanismo por el cual seleccionaremos las bacterias que han adquirido el vector luego del proceso de transformación. Como se explicó más arriba, este vector presenta un “*cassette*” que codifica para una enzima que confiere resistencia al antibiótico Ampicilina. La utilización de

una placa de cultivo conteniendo este antibiótico permitirá el reconocimiento de las bacterias portadoras de nuestro vector de interés

Resumiendo: el vector de clonado y expresión pGEX-4T3 nos permite

- Clonar secuencias génicas en su interior (presencia de sitios de múltiple clonado)
- Obtener innumerables copias del gen de interés (plásmido autorreplicable, secuencia ori pBR322)
- Producción controlada de proteína recombinante fusionada a GST (sistema promotor *Ptac* – represor *lacIq* – Inductor IPTG).
- Fácil purificación de la proteína recombinantes. (Tag GST. Purificación mediante columnas de sefarosa. Corte con trombina.)

Bibliografía utilizada

Molecular Cell Biology. 4th ed. Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. New York: W. H. Freeman & Co.; c2000.

Introduction to Genetic Analysis. 7th ed. Griffiths, Anthony J.F.; Miller, Jeffrey H.; Suzuki, David T.; Lewontin, Richard C.; Gelbart, William M. New York: W. H. Freeman & Co.; c1999.

Molecular Biology of the Cell 4th ed. Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter New York and London: Garland Science; c2002

A practical Guide to Molecular cloning. Perbal, Bernard.. A wiley-Interscience Publication. New York. 1984

Molecular Cloning. A laboratory manual. Third edition. Sambrook, Joseph y Russell, David D. CSHL press. New York. 2001

Understanding DNA and gene cloning. A guide for the curious. Karl Drlica. John Wiley & Sons. New York. 1984

MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

ACTIVIDAD PRACTICA N° 2 - PURIFICACIÓN DE ARN

La clave de la purificación de RNA radica en evitar su degradación por acción de las ribonucleasas. De manera que todos los protocolos existentes se basan en la rápida inactivación de dichas enzimas. En esta práctica hemos elegido el método “TRIZOL o TRI-REAGENT” (INVITROGEN) que optimiza el método de paso único (*single-step method*), desarrollado por Chomczynski & Sacchi en 1987. Dicho método purifica RNA total: rRNAs (~80-85%), tRNAs (~10%) y mRNAs (~1-5%).

TRIZOL: Este producto es una mezcla de tiocianato de guanidinio (potente agente caotrópico, desnaturizante) y fenol. En su presencia, las células se lisan rápidamente, se solubilizan sus componentes y se inactivan las ribonucleasas. La adición posterior de cloroformo genera una fase acuosa (con el ARN) y una fase orgánica (con proteínas desnaturizadas); el ADN se deposita en la interfase.

LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

Todo el material utilizado para la purificación de ARN se esteriliza dos veces.

Incubador

Micropipetas automáticas.

Microfuga.

Microfuga refrigerada.

Cubetas de electroforesis horizontal.

Fuente de alimentación.

Baño termostático.

Agitador vortex.

Transiluminador UV.

Tubos de ensayo estériles.

Tubos Eppendorf de 1,5 mL.

Hielo picado.

Guantes.

Purificación de ARN

1. Se homogeniza la muestra en 500 μ L de TRI-REAGENT, aspirando y soltando el líquido varias veces con ayuda de la micropipeta. Se añaden 500 μ L más de TRI-REAGENT y se vuelve a mezclar todo con ayuda de la micropipeta. Se incuba 5 min a temperatura ambiente.

2. Se añaden 200 μ L de cloroformo (frío). Se cierra bien el tubo y se agita vigorosamente a mano su contenido (~30 s). Se incuba 5 min a temperatura ambiente.

3. Se separan las fases por centrifugación (15 min a 12.000 g y 4° C).

Fases: Fase superior acuosa donde se encuentra nuestro ARN

Fase intermedia (interfase) de color blanco donde se encuentra nuestro ADN

Fase inferior orgánica (rojo) donde se encuentran las proteínas.

4. Se retira (3 x 175 μ L) con sumo cuidado (sin tocar la interfase) la **fase superior acuosa** (incolora) y se dispensa **en un tubo Eppendorf** limpio (previamente rotulado).

5. Se añaden al mismo tubo, 500 μL de isopropanol para precipitar el ARN y se agita vigorosamente a mano su contenido (~ 30 s). Se incuba 10 min a temperatura ambiente. Se centrifuga (15 min a 12.000 g y 4°C).
6. Se retira el **sobrenadante** con sumo cuidado, evitando tocar el precipitado, y se **descarta en un recipiente debidamente rotulado**.
7. Se añaden al mismo tubo, 1000 μL de alcohol etílico 70% para lavar el ARN. Se centrifuga (10 min a 12.000 g y 4°C).
8. Se retira el **sobrenadante** con sumo cuidado, evitando tocar el precipitado, y se **descarta en un recipiente debidamente rotulado**.
9. Se da un pulso de centrífuga, se retira cuidadosamente el **sobrenadante** que aún quede y se **descarta**.
10. Se disuelve el precipitado con el RNA en 75 μL de agua, aspirando y soltando el líquido varias veces con ayuda de la micropipeta. Se calienta 10 min a $55\text{-}60^\circ\text{C}$, se enfría rápidamente y se da un pulso de centrífuga. Mantener la muestra a -20°C .

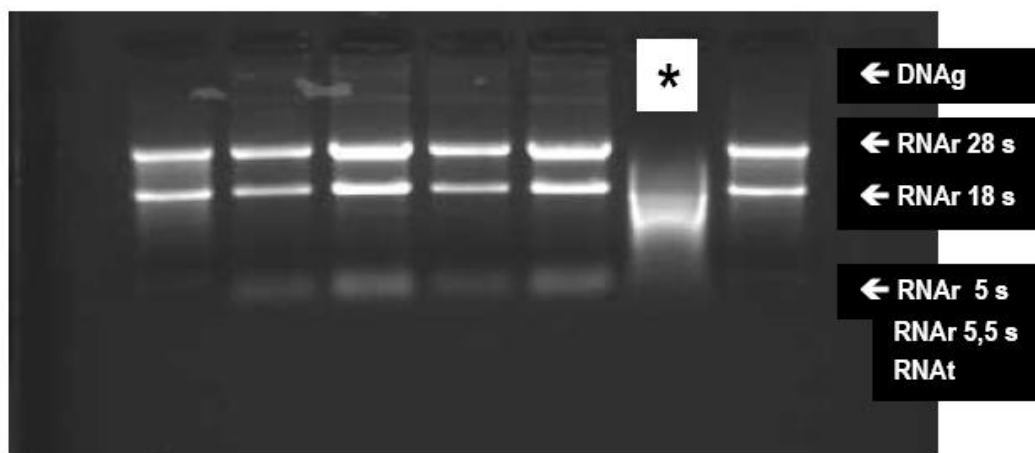
ADVERTENCIAS:

- (a) Se usarán guantes durante toda la práctica para evitar el contacto con productos tóxicos y la degradación de las muestras.
- (b) Cada punta de micropipeta se usará una sola vez, para evitar la contaminación de las muestras.
- (c) Los alumnos que purifiquen ARN utilizarán un material especialmente tratado para evitar la presencia de ribonucleasas (DEPC, diethylpyrocarbonate).
- (d) El TRI-REAGENTTM, el cloroformo y el bromuro de etidio son compuestos muy tóxicos que bajo ningún concepto se deben tocar y/o inhalar.
- (e) La luz UV puede dañar los ojos. Antes de conectar la lámpara de luz UV hay que disponer de una pantalla protectora.

En caso de dudas, *preguntar a los profesores*.

RESULTADOS ESPERADOS

Purificación de RNA



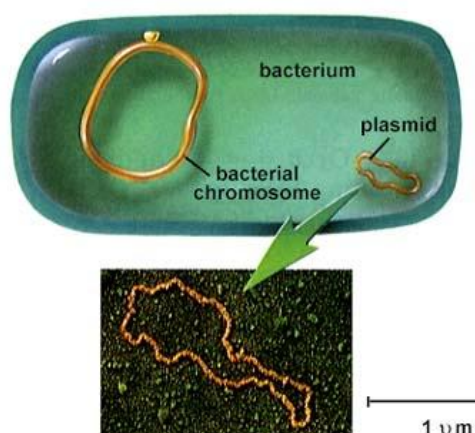
* Preparación RNA degradado

ANEXO 1: LISTADO DE MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

- Medio LB: 10 g Bactotripton, 5 g extracto de levadura, 5 g de NaCl, 1 L de agua. Disolver y autoclavar. Ampicilina 50 mg/mL.
- Solución isotónica GTE: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0.
- Solución de lisis: 0,2 N NaOH, 1% SDS, preparar fresca antes de cada extracción de DNA plamídico.
- Solución de neutralización: Acetato potásico 3M, pH 4,8.
- Etanol absoluto 100%
- Etanol 70%
- TE pH 8,0 con Ribonucleasa A: Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM pH 8,0, Ribonucleasa A 0,5 µg/µL.
- TRIZOL
- Cloroformo
- Isopropanol
- Agua tratada con dietilpirocarbonato.
- TAE: Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM.
- Tampón de carga DNA: Glicerol 30%, Naranja G 0,35%, TAE 10x.
- Tampón de carga RNA: Sacarosa 10%, formamida desionizada 90%, azul de bromofenol 0,05%.
- Material biológico: Bacterias DH5α/pC7 y células HepG2.

PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

El genoma bacteriano se organiza en un único cromosoma circular con un sólo origen de replicación. Las bacterias pueden contener información genética adicional en forma de plásmidos. Los plásmidos son moléculas circulares de ADN extracromosómico que se replican de forma autónoma, a partir de su propio origen de replicación. La información genética que portan los plásmidos no es generalmente vital para la supervivencia celular. No obstante, dicha información puede resultar imprescindible en determinadas circunstancias ambientales, ej. Plásmidos portadores de genes de resistencia a antibióticos. Las bacterias pueden llegar a tener un gran número de copias de un mismo plásmido (plásmidos multicopia), facilitando enormemente su purificación.



Hay distintos procedimientos para la purificación de ADN plasmídico, aunque todos incluyen los siguientes tres pasos:

1. Crecimiento de las bacterias en un medio selectivo, lo cual solo permite la división de aquellas células que llevan el plásmido.
2. Lisis de las bacterias para la liberación del plásmido.
3. Purificación del DNA plasmídico.

El principal problema de la técnica de purificación es la separación del ADN plasmídico del ADN cromosómico. En esta práctica hemos elegido el método de “lisis alcalina”, por su simplicidad, bajo costo y reproducibilidad.

Lisis alcalina: Este método se basa en las diferencias de las propiedades de desnaturalización y renaturalización entre el ADN plasmídico (pequeños círculos de DNA cerrados covalentemente) y el ADN cromosómico (fragmentado). La alcalinización con NaOH en presencia de un detergente fuertemente aniónico (SDS), provoca la lisis celular, la desnaturalización del DNA cromosómico y de las proteínas; y la liberación de los plásmidos. Los plásmidos se ven menos afectados por su pequeño tamaño y estructura superenrollada. La neutralización del medio en presencia de una concentración alta de sal (acetato potásico), provoca la precipitación de las proteínas (por el tratamiento con el detergente y la insolubilidad de la sal potásica del dodecil sulfato) y la del DNA cromosómico (por reasociaciones aleatorias intracatenarias). Los agregados insolubles de proteínas y DNA cromosómico se separan por centrifugación

del DNA plasmídico que queda en el sobrenadante y conserva mayoritariamente su estructura nativa.

PROCEDIMIENTO

Purificación de ADN plasmídico

Recolección de las bacterias

1. Se toma 1,5 mL de un cultivo estacionario de una bacteria portadora de un plásmido con un gen de resistencia a un antibiótico. Este cultivo se creció durante toda la noche a 37° C en medio con el antibiótico (ampicilina).
2. Se dispensan en un tubo tipo Eppendorf (previamente rotulado) y se centrifuga a temperatura ambiente, durante 3 min a 12.000 g.
3. Se retira el sobrenadante con mucho cuidado y SE DESCARTA EN UN RECIPIENTE DEBIDAMENTE ROTULADO.
4. Se da un pulso de centrifuga, se retira cuidadosamente el sobrenadante que aún quede y se descarta. Solo conservaremos el precipitado de las bacterias.

Lisis alcalina

5. Se resuspende (agitando vigorosamente) el sedimento de bacterias en 100 µL de una solución isotónica (GTE: Glucosa, Tris y EDTA) a 4° C. Se deja a temperatura ambiente durante 5 min.
6. Se añaden al mismo tubo, 200 µL de la solución de lisis (NaOH, SDS) que se encuentra a temperatura ambiente y recién preparada. Se agita suavemente con la mano por inversión del tubo (unas 10 veces). Se incuba 5 min a 4°C.

Neutralización

7. Se añaden al mismo tubo, 150 µL de la solución de neutralización (acetato potásico 3 M, pH 4,8). Se agita con la mano por inversión del tubo (unas 10 veces). Se incuba 5 min a 4°C.

Aislamiento de los plásmidos

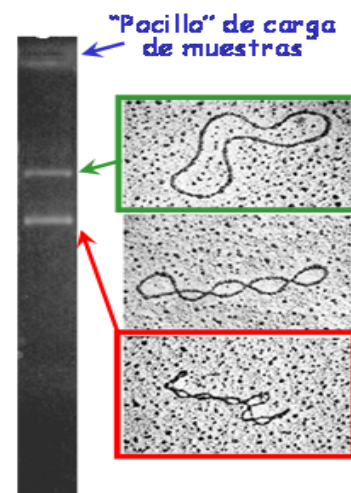
8. Los agregados macromoleculares se precipitan por centrifugación (15 min a 12.000 g y 4° C), formándose un sedimento blanco de aspecto lechoso. El tubo se traslada con cuidado a la mesa de trabajo.
9. Se retira con cuidado el sobrenadante con el ADN plasmídico y se dispensa en un tubo limpio (previamente rotulado).

10. Se añade 1 mL de etanol absoluto (4° C) al tubo en el que hemos dispuesto la solución con el ADN plasmídico. Se mezcla con la mano por inversión del tubo (unas 10 veces). Se incuba 15 min a 4° C.
11. Se precipitan los plásmidos por centrifugación (15 min a 12.000 g y 4° C), se retira cuidadosamente el sobrenadante y se descarta.
12. Se añaden al mismo tubo, 900 µL de etanol al 70% (4° C). Se mezcla suavemente con la mano por inversión del tubo (unas 10 veces).
13. Se vuelven a precipitar los plásmidos por centrifugación (10 min a 12.000 g y 4° C), se retira cuidadosamente el sobrenadante y se descarta.
14. Se da un pulso de centrífuga, se retira cuidadosamente el sobrenadante que aún quede y se descarta. Solo conservaremos el precipitado de los plásmidos.
15. Se disuelve el precipitado de los plásmidos (aspirando y soltando el líquido varias veces con ayuda de la micropipeta) en 50 µL de tampón TE (pH 8,0), con ribonucleasa A.
16. Se incuba a temperatura ambiente 5 min. Mantener la muestra a 4° C.

RESULTADOS ESPERADOS

Purificación de DNA plasmídico (Gel de Agarosa).

- **Son moléculas circulares:** la movilidad no depende sólo del n° de pb, sino de la conformación.
- **Conformación superenrollada:** más compacta, menor tamaño: avance más rápido
- **Conformación relajada:** mayor tamaño: avance más lento
- **Un plásmido purificado suele dar 2 bandas en la electroforesis**



BIBLIOGRAFÍA

1. Química Biológica; Antonio Blanco; Octava Edición; Editorial El Ateneo; 2006.
2. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Sambrook, J., Rusell DW,. (2001)
3. Benjamin Lewin *Genes VIII* – Pearson Prentice Hall, 2003.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. *Biología Molecular de la célula*- 4ª Ed. Garland Science, 2002.
5. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523. Artículo original que describe el método de “lisis alcalina”.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y RT-PCR

DISCUSIÓN N°2 Y ACTIVIDAD PRACTICA N°3 - PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Introducción:

La **reacción en cadena de la polimerasa**, conocida como **PCR** por su sigla en inglés, fue descrita por Kary Mullis en la década del `70. Esta técnica se basa en la síntesis "*in vitro*" de secuencias específicas de ADN 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 ADN, ya que permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de pocas o hasta una única copia de ese fragmento.

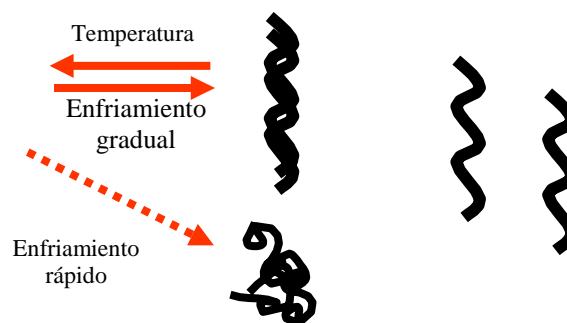
Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, y en especial en la capacidad de las polimerasas aisladas de organismos termoresistentes (ej. *Thermus aquaticus* o *Pyrococcus furiosus*) a mantener su actividad a altas temperaturas. Gracias a esta capacidad la técnica utiliza ciclos de alta y baja temperatura para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, permitir una nueva ronda de polimerización.

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

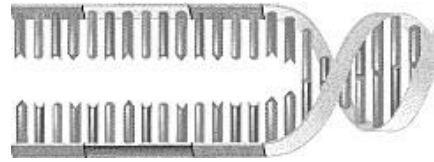
1. **Desnaturalización del ADN doble cadena (aprox. 94° C)**
2. **Hibridación de los primers (iniciadores o cebadores) a la zona 3' específica de cada una de las hebras (50-60° C)**
3. **Extensión del cebador por acción de la DNA polimerasa (68 o 72° C)**

A continuación describiremos de forma más detallada el tiempo y la temperatura de cada una de las etapas de un ciclo.

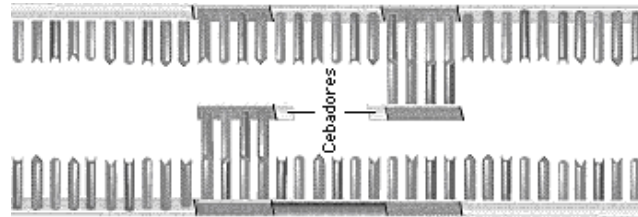
1- Desnaturalización: Es la primera etapa y permite que el ADN molde (doble hélice) se desnaturalice completamente logrando la separación de las dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97° C) durante 30 segundos a 1 minuto. La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya, pero si el ADN no se desnaturaliza por completo, este tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los primers en el paso posterior.



En la práctica se suele añadir un período de desnaturalización antes de comenzar los ciclos para asegurarnos que se produce a lo largo de toda la muestra de ADN. Esta etapa suele ser de 5' a 94° C.

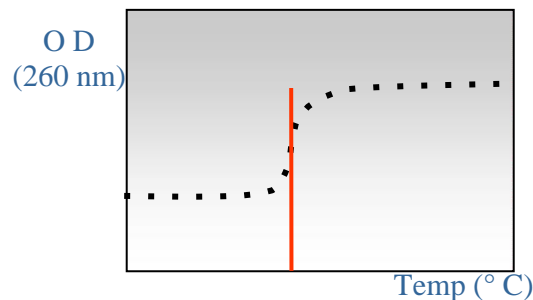


2- Hibridación: En esta etapa los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar, gracias a la disminución de la temperatura (50-65° C). Estos cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.



La temperatura óptima de hibridación (T° *annealing*) depende de varios factores y es específica para cada primer. La temperatura de hibridación debe ser aproximadamente 5° C menor que la temperatura de fusión (T_m ; *melting temperature*) calculada para los primers. La longitud de los primers y la secuencia son los parámetros que determinan la T_m de un primer. Una fórmula simple y aproximada para calcular la T_m es la siguiente:

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



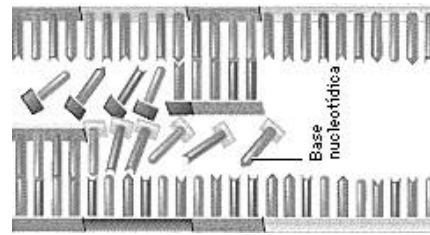
T_m (*Melting Temperature*): Temperatura de desnaturalización.
Temperatura en la cual el 50% del DNA se encuentra desnaturalizado

En la práctica, la temperatura de hibridación oscila entre 50° C y 60° C, durante un tiempo comprendido entre 30 segundos y 1 minuto. Un aumento de temperatura o del tiempo favorece la especificidad ya que disminuye las uniones incorrectas de los iniciadores con la hebra molde.

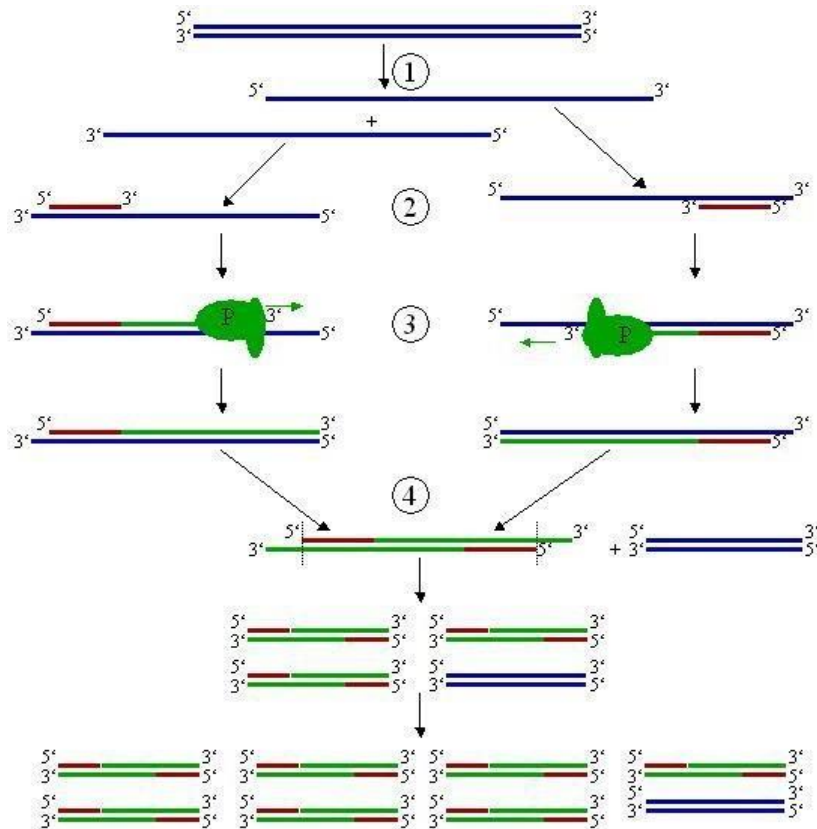
3- Elongación: Es la tercera etapa donde se lleva a cabo la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5' -> 3' mediante un aumento de temperatura hasta 72° C, temperatura a la cual la enzima ADN polimerasa actúa, incorporando los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde.

El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación. Se puede estimar un tiempo de 1 minuto por cada 1 Kb de ADN a polimerizar.

En la práctica es normal que **al final de todos los ciclos** (25-50 ciclos) se realice una última elongación de 5 min a 72° C para asegurar que no queden cadenas incompletas (a medio polimerizar).



Todos estos pasos (desnaturalización-hibridación-extensión) se repetirán un número de veces dependiente de la cantidad de fragmentos amplificados que se requieran. Estos pasos se pueden apreciar gráficamente en la siguiente figura.



Pasos básicos de la PCR (de Andy Vierstracte 1999)

Número de ciclos: A la hora de optimizar una PCR adquiere gran relevancia el número de ciclos que se va a utilizar. Este número depende de la cantidad de ADN que existe en la muestra una vez que el resto de los factores han sido optimizados (normalmente de manera empírica).

Es importante no realizar un número alto de ciclos ya que puede dar lugar a la amplificación de productos no deseados originados por hibridaciones no específicas de los primers.

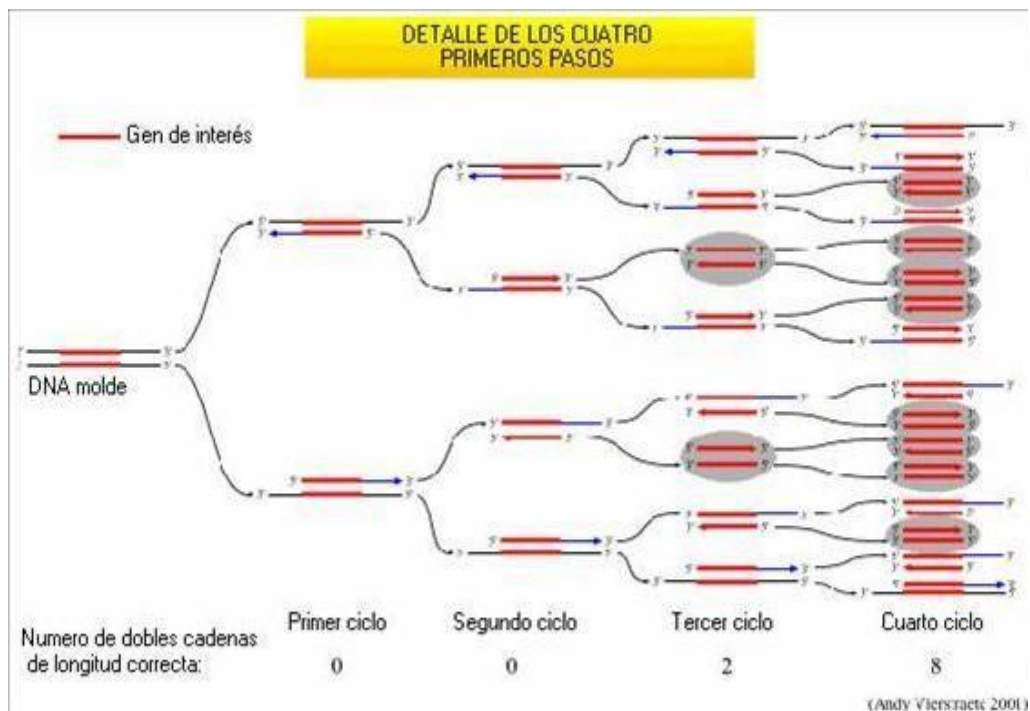
Hay que tener en cuenta que la reacción está producida por una enzima que sufre el efecto meseta que describe la atenuación en la tasa de la acumulación del producto.

Después de un número determinado de ciclos la amplificación deja de producirse de manera exponencial debido a que disminuye la concentración de dNTPs y llega a una fase estacionaria. Generalmente, cuando el efecto meseta se produce, la cantidad de ADN sintetizado es suficiente para su posterior utilización.

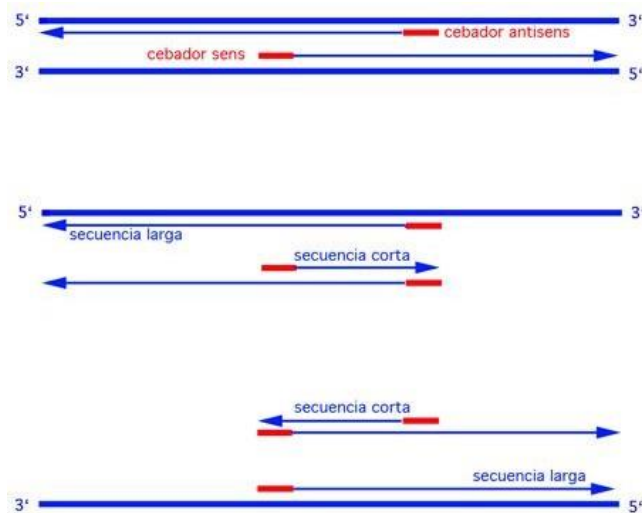
Amplificación de productos: El **primer ciclo** de síntesis producirá nuevas cadenas de longitud indeterminada, las cuales, a su vez, son capaces de hibridar con los primers. Este tipo de "productos largos" se irá acumulando de forma geométrica (2 cadenas por ciclo), con cada ciclo de síntesis, utilizando como moldes las moléculas de ADN parental de la reacción.

Durante el segundo ciclo de síntesis, estas cadenas hijas servirán a su vez como moldes, generándose en este caso fragmentos cuyo tamaño será el del fragmento que engloba los extremos de ambos primers. Estas nuevas cadenas hijas servirán de molde a su vez para sucesivos ciclos de síntesis. La cantidad de estos "productos cortos" se duplica con cada ciclo, por lo que se van acumulando de forma exponencial. Al cabo de 30 ciclos, habrán aparecido 270 millones de estas moléculas, por cada una de ADN original que hubiese.

Es importante recalcar que los productos obtenidos luego de 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, por lo que el producto corto sintetizado es muy superior en comparación con el producto largo, por lo que, para posteriores estudios a partir del producto de la PCR, se desestima.



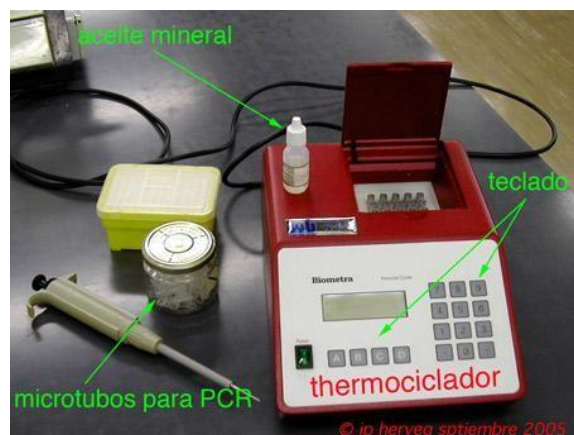
Detalle de los cuatro primeros pasos de la PCR (de Andy Vierstraete 2001)



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, por lo que el tiempo, la temperatura y el número de ciclos son factores determinantes en los resultados de la PCR, que pueden ser modificados para optimizar la reacción.

Antes, las primeras reacciones se realizaban manualmente cambiando continuamente los tubos de un Baño María a otro de diferente temperatura (la T° de desnaturalización, la de hibridación y la de elongación). El proceso resultaba demasiado tedioso y era difícil alcanzar las temperaturas y los tiempos correctos, por lo que se desarrolló el termociclador que lo hacía de manera automática, ya que una vez que los reactivos son introducidos, la reacción se desarrolla sin ninguna intervención manual. El desarrollo del termociclador junto con el descubrimiento de polimerasas de organismos termófilos simplificó el proceso ya que se podía pasar de un ciclo a otro sin necesidad de realizar la reposición de las polimerasas, las cuales se desnaturalizaban al alcanzar las temperaturas necesarias para desnaturalizar el ADN.

Existen termocicladores que presentan tapas calientes que en los diferentes ciclos evitan la evaporación de la mezcla. Otros, requieren la colocación de una gota de aceite mineral sobre la mezcla de los reactivos para evitar la evaporación. Hay también termocicladores que permiten realizar varios programas al mismo tiempo.



Termociclador para reacciones de PCR

Detección de productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa: La detección del producto de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se realiza normalmente mediante una corrida electroforética dependiendo del tamaño de la amplificación y la resolución que deseemos utilizaremos diferentes medios (agarosa, poliacrilamida) a distintas concentraciones. La posterior visualización se puede realizar con bromuro de etidio y expansión a lámpara de luz UV, tinción de plata, fluorescencia o radioactividad.



Preparación del corrido electroforético

A continuación trataremos de profundizar en los componentes y parámetros más importantes para obtener una amplificación óptima.

Muestra de ADN a utilizar en una reacción de PCR

Se deben tener en cuenta algunas consideraciones:

- Puede ser ADNss o ADNds.
- ADN circular y cerrado es levemente menos efectivo que el ADN lineal.
- Usualmente se utilizan varios miles de copias, ej: 1 μg de humano, 10 ng de levadura, 1 ng de bacteriano o 1 pg de plasmídico, pero se puede amplificar a partir de una sola molécula de ADN molde, para lo cual las condiciones deben ser optimizadas.

Existen una serie de reglas sencillas para que el DNA molde no sea un problema en la reacción:

- Integridad del ADN: no debe estar degradado.
- Origen de la muestra y proceso de extracción: la muestra no debe llevar agentes quelantes (EDTA) que reducen la concentración de iones de Mg en la solución (la polimerasa necesita de Mg^{2+} como cofactor). Tampoco debe haber determinados factores sanguíneos, fenol, detergentes, etc., que inhiben la actividad de la polimerasa.
- Los solventes orgánicos tales como DMSO (dimetil sulfóxido) y formamida rompen los puentes H entre las hebras de ADN. Estas sustancias desnaturizantes pueden utilizarse para optimizar una reacción de PCR en la cual los primers tienen fuertes estructuras secundarias.
- Cantidad de la muestra: si se dispone de suficiente cantidad para la amplificación de ADN genómico de copia única se usan cantidades de 50-100 ng.
- Calidad del ADN: cuando el ADN es de óptima calidad no hay problemas en la amplificación pero el problema aparece cuando la calidad del ADN obtenido no es la idónea, bien porque este degradado o porque dicho ADN esté contaminado.

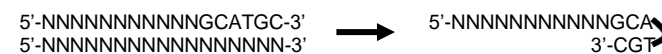
Iniciadores, cebadores o primers

- Se conoce su secuencia.
- Es el factor más importante para la eficiencia y la especificidad del proceso.

- Deben estar presentes en exceso.
- Requieren de un cuidadoso diseño.

A la hora de elegir los primers para la amplificación de un determinado fragmento de ADN hay una serie de reglas a seguir, aunque también existen programas de computación que nos facilitan esta tarea (DNAsis, Primer3, etc.).

- Longitud de los primers: debe estar comprendida entre 18 y 24 bases. Se ha comprobado que los primers de mayor longitud (30 a 35 bases) no aumentan su rendimiento y los primers muy cortos carecen de especificidad.
- La temperatura de hibridación de los cebadores debe ser similar en ambos y será variable en función de la secuencia de los mismos. Generalmente oscila entre los 50 y 60 ° C.
- La relación bases puricas-bases pirimídicas debe ser cercana a 1:1 (o como mucho 40-60%). Es decir, el contenido en G + C debe ser aproximadamente del 50%. Se recomienda que en los extremos las últimas bases sean G o C. El contenido de G+C afecta la T_m ya que un alto porcentaje de G+C significa que la doble hebra es estabilizada por 3 puentes H vs 2 para A+T.
- No seleccionar cebadores que en su extremo 3' tenga una importante estructura secundaria (por ejemplo horquillas).

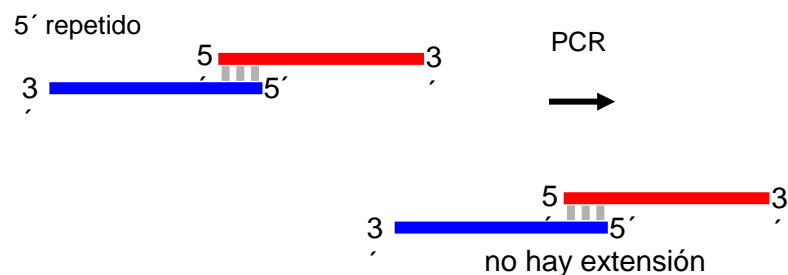
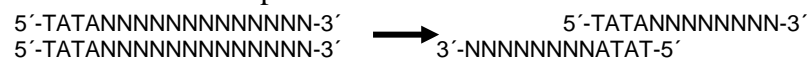


Formación de horquillas

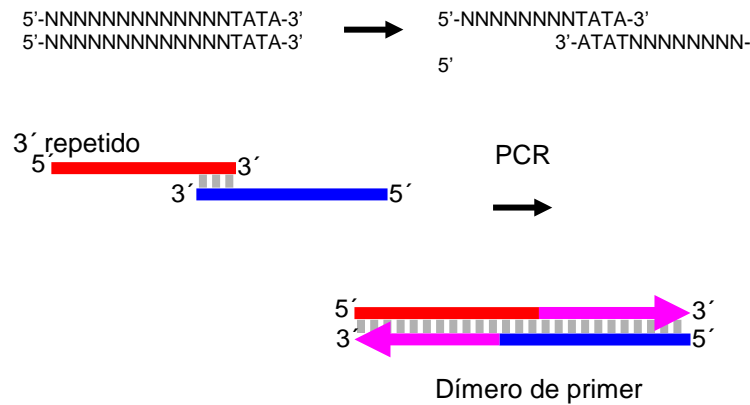


Productos de PCR no deseados

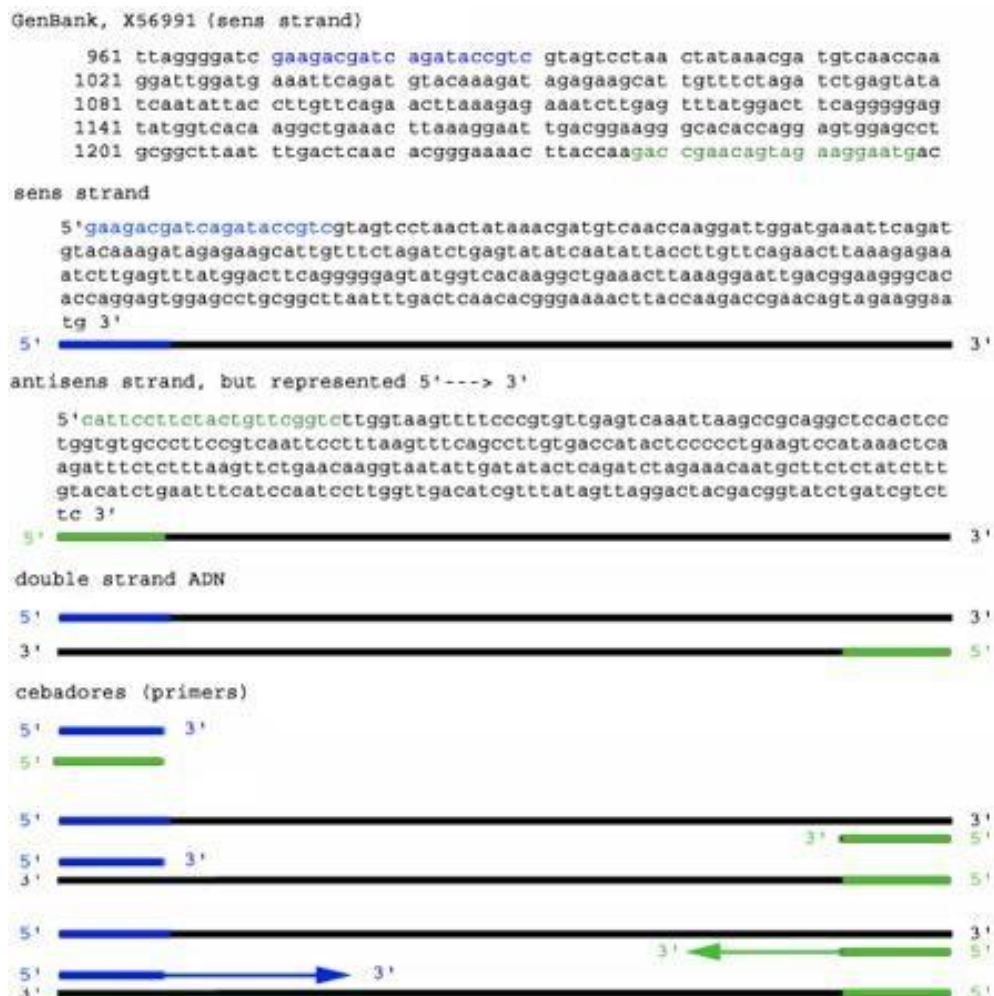
- Deben evitarse las secuencias repetidas.



- Se debe evitar la complementariedad entre la pareja de iniciadores. Si esta existe entre los extremos 3' existe la posibilidad de que se formen dímeros.



Los dímeros de primer son fragmentos de doble cadena cuya longitud es muy próxima a la suma de los primers y se producen cuando un primer es extendido a continuación del otro.



ADN Polimerasa

La ADN polimerasa agrega dNTPs desde 5` a 3`, leyendo el templado desde 3` a 5`, con la consiguiente formación de dos cadenas complementarias dando lugar a dobles cadenas de ADN.

Existen diferentes tipos de ADN polimerasas que llevan a cabo la replicación del ADN, siguiendo el mismo método de síntesis. Se pueden clasificar en:

- Termolábiles: Temperatura óptima de 37-42° C. Se desnaturalizan con el calor.
- Termoestables: Temperatura óptima de 72 °C. Resiste durante 40-50 min a 96° C. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de ADN en el

sentido 5' → 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región de 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 ADN que se desea amplificar.

Tanto la hibridación como la síntesis de ADN se efectúan a temperaturas elevadas para evitar la formación de secuencias que no son complementarias. Actualmente la polimerasa que se utiliza es la Taq polimerasa (Estivil, 1991). Es una enzima termoestable aislada de *Thermus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas y ha simplificado enormemente la técnica de la PCR, ya que ha permitido su automatización (desarrollo del termociclador). Esta enzima posee una actividad 5' → 3' polimerasa y 5' → 3' exonucleasa, pero no tiene actividad exonucleasa 3' → 5'. También posee una **actividad terminal transferasa** que ajusta un sólo nucleótido, con frecuencia una A, a las dos extremidades 3'-OH del fragmento amplificado, la cual es a menudo utilizada en los métodos de clonaje. La Taq I ADN polimerasa no tiene actividad exonucleasa 3' → 5', es decir, no es capaz de eliminar los nucleótidos que no están correctamente insertados en la cadena que se forma. La importancia de esta actividad radica en que aumenta la fidelidad de la replicación del ADN original. La actividad de esta enzima se ve influenciada por la concentración de dNTPs, de Mg²⁺ y de algunos iones monovalentes.

Por todo ello hay que intentar conseguir las mejores condiciones para que ésta aumente. Podemos citar:

- Normalmente el número de ciclos utilizado es de 25-30.
- La concentración de los deoxinucleótidos (dNTPs) debe ser igual para los 4 y debe ser la más baja posible para que nos permita conseguir la cantidad de ADN necesaria.
- Disminuir en lo posible el tiempo de cada etapa.
- La concentración de Mg²⁺ en la reacción oscila entre 0,50 y 2,5 mM. Se trata de un ión necesario, pero su exceso hace que disminuya la especificidad de la PCR.

La Taq ADN pol es capaz de incorporar un nucleótido no apareado con una frecuencia de 2/10.000 nucleótidos por ciclo. Esto no constituye un verdadero problema cuando se efectúa un análisis global del producto de PCR. De otra manera, la incorporación equivocada de nucleótidos sí es importante, especialmente si los fragmentos van a ser utilizados para clonar el gen en un vector para su posterior expresión. Una manera de mejorar la técnica de PCR es la de utilizar la Pfu ADN polimerasa purificada a partir de la archea *Pyrococcus furiosus* que habita a 100° C en sedimentos marinos geotérmicos. Esta enzima posee no solamente una actividad 5' → 3' polimerasa, sino también actividad 3' → 5' exonucleasa. La tasa de error es 4 veces más baja que la de la Taq ADN polimerasa (1/20000 nucleótidos por ciclo).

Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)

Son cuatro: dATP, dGTP, dCTP y dTTP. Como hemos señalado anteriormente se deben añadir en la solución de la reacción en concentraciones iguales que normalmente oscila entre los 20 y los 200 µM. Los dNTPs pueden captar Mg²⁺, por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación.

No debemos variar ninguno de ellos de manera independiente. Se aconseja (Bradley, 1991) que la concentración de Mg²⁺ sea de 0,5 – 1,0 mM veces superior a la concentración de dNTPs.

Buffer de la reacción

Por lo general está formado por: 10 mM Tris-HCl (pH=8,4 a temperatura ambiente), 50 mM KCl, 0.1% w/v gelatina y 1.5 mM MgCl₂. El MgCl₂, es el componente mas influyente

ya que actúa como coenzima, la Taq polimerasa necesita los iones Mg^{2+} liberados por este en la reacción para su actividad, rendimiento y especificidad.

Algunos autores recomiendan el uso de adyuvantes, los cuales ayudarían en la práctica a aumentar la especificidad y fidelidad de la reacción en cadena de la polimerasa. Aunque algunos autores han recomendado el uso del D.M.S.O. y del Glicerol, el adyuvante más usado es el B.S.A, a concentraciones por encima de $0.8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ el B.S.A incrementa la eficiencia de la PCR ya que actúa como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la taq polimerasa. El dimetilsulfóxido (DMSO) añadido al buffer de la reacción en un 10% contribuye a la disminución de la estructura secundaria del ADN (Anderson, 1990). También se pueden usar detergentes como el Tween 20, Laureth 12 (0.1%) o Tritón X10, que ayudan a estabilizar la enzima. Existen también protocolos que incorporan polietilenglicol (PEG), glicerol, formamida, etc, aunque no son en ningún caso imprescindibles.

Sales

Es de gran importancia la concentración de dos cationes que son añadidos en forma de sales.

- Cloruro potásico (KCl). Influye en la desnaturalización del ADN.
 - -Elevadas concentraciones del ión K^+ favorece la desnaturalización de secuencias cortas de ADN.
 - -Bajas concentraciones de K^+ ayudan a la desnaturalización de secuencias largas de ADN.
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$). Aumenta la temperatura de hibridación del ADN. La concentración de este ion resulta fundamental para la optimización de la reacción.
 - -Altas concentraciones de Mg^{++} disminuyen la especificidad de la reacción.
 - -Bajas concentraciones de Mg^{++} aumentan la especificidad de la reacción

Aplicaciones de la secuenciación de ADN

- Huella genética: La determinación de las "huellas dactilares" genéticas constituye una de las aplicaciones más interesantes de la PCR. Mediante esta técnica es posible comparar muestras diferentes de ADN para comprobar si pertenecen al mismo individuo o no, o si existe parentesco entre ellas. Esta técnica se aplica actualmente en **Medicina Forense e Investigaciones Policiales**, con el fin de identificar individuos a partir de muestras biológicas, como sangre, semen, piel o cabellos. También se utiliza en las pruebas de paternidad.
- Test de Paternidad.
- Diagnóstico de enfermedades hereditarias: La técnica de PCR nos permite localizar mutaciones previamente descritas. Se emplea así en la secuenciación de ADN como un método de diagnóstico: Una vez que se ha caracterizado la relación con una enfermedad de una determinada mutación puntual (mutaciones en el gen de la galactosa 1-P uridiltransferasa en la galactosemia, mutaciones en c-Ras y cáncer, etc.) o de una pequeña delección (delección de tres bases en el gen CFTR de fibrosis quística) puede desarrollarse un método de detección rutinario, la secuenciación automática puede implementarse como método de screening para la localización de nuevas mutaciones.
- Clonación de genes.
- Mutagénesis.
- Análisis de ADN fósil: El uso del PCR ha abierto la posibilidad de aislar secuencias de ADN a partir de unas pocas copias intactas presentes en especímenes de museo y descubrimientos arqueológicos en los cuales la mayoría de las moléculas están dañadas o degradadas, para proceder posteriormente a su estudio mediante secuenciación.
- Genotipo de mutaciones específicas

- **Genoma Humano:** El proyecto genoma humano fue un proyecto Internacional cuyo objetivo final fue obtener una descripción completa del genoma humano a través de la secuenciación del ADN. El genoma que se investiga es el genoma nuclear. Desde su inicio el proyecto ha sido justificado especialmente por los beneficios médicos que se espera obtener del conocimiento de la estructura de cada gen humano. Esta información proporciona una capacidad de diagnóstico en individuos con riesgo de ser portadores del gen de alguna enfermedad además de proporcionar un marco de trabajo para el desarrollo de nuevas terapias, además de nuevas estrategias para la terapia génica.

Contaminación en la PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica muy sensible, por lo que es de gran importancia evitar contaminaciones, ya que es posible que el ADN no deseado (aunque se encuentre en una cantidad muy pequeña) se amplifique y obtengamos un resultado que no es real. Vemos que una de sus mayores ventajas, se convierte a la vez en el principal inconveniente (Kwok y Higuchi, 1989).

Existen una serie de normas que ayudan a evitar las contaminaciones. En el caso de trabajar con muestras de ARN las precauciones se deben extremar al máximo:

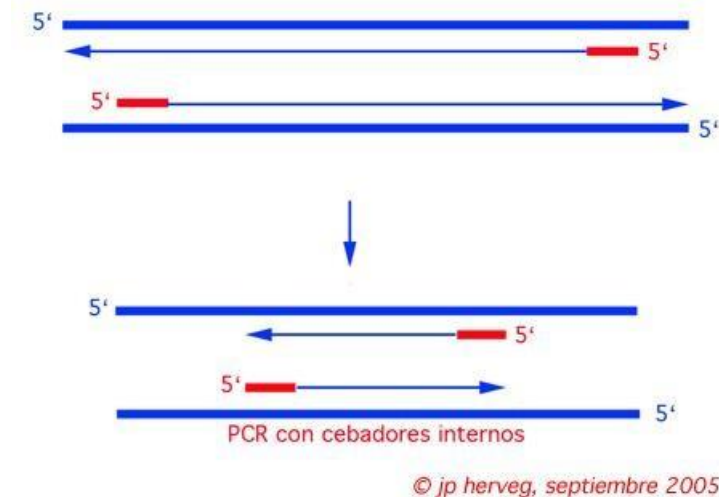
- Lugar físico exclusivo para realizar la PCR.
- Uso de instrumental exclusivo para la PCR.
- Utilización de reactivos y tubos estériles.
- Uso de guantes por el manipulador.
- Realización de controles de blanco (se añade agua en lugar de ADN, no debe existir amplificación).

VARIANTES DE LA PCR:

PCR anidada o Nested PCR:

Es una Técnica muy sensible de PCR en la que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación. Su objetivo es disminuir la contaminación de los productos por amplificación producida por unión de los primers de manera inespecífica. Comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de iniciadores o primers en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad de detección. Primero se realiza una reacción con los iniciadores externos para amplificar una región de ADN mas extensa, que contiene el segmento diana (esta primera reacción, a veces, no da un producto único a partir de un templado complejo, apareciendo mas de una banda). Después, con este producto de amplificación, se ejecuta una segunda PCR con los iniciadores internos para amplificar la región específica.

Esta técnica nos permite obtener un producto único porque solo el fragmento correcto de ADN posee los sitios correctos de hibridización para el segundo par de primers.



PCR múltiplex:

Es una variante de la PCR que permite la amplificación simultánea de varias secuencias de interés en una misma reacción, mediante el uso de más de un par de primers (hasta 8). Las secuencias a detectar han de estar lo suficientemente lejos unas de otras para que las amplificaciones no interfieran entre sí. Las mismas pueden verse como múltiples bandas en un gel de agarosa. Este método se ha aplicado en muchas áreas de estudio del ADN, incluyendo análisis de deleciones, mutaciones y polimorfismos, o ensayos cuantitativos y RT-PCR. Se usa típicamente para genotipificar cuando se requieren análisis simultáneos de múltiples marcadores, detección de patógenos o organismos modificados genéticamente (GMOs). La realización de múltiples ensayos puede resultar tediosa y consumir demasiado tiempo, requiriendo una optimización prolongada de los procedimientos. También es muy utilizada para identificar una mutación particular en un gen que produce enfermedades autosómicas como la fibrosis quística.

RT-PCR:

La RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*; Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa), permite la amplificación de una cantidad pequeña de moléculas diana de ARN (mRNA o ARN total) con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del ARN a cDNA, que es posteriormente amplificado. La presencia de ARN o ADN contaminante, tanto en las muestras, como en el laboratorio y reactivos, debe ser evitada con el fin de impedir la aparición de productos inespecíficos.

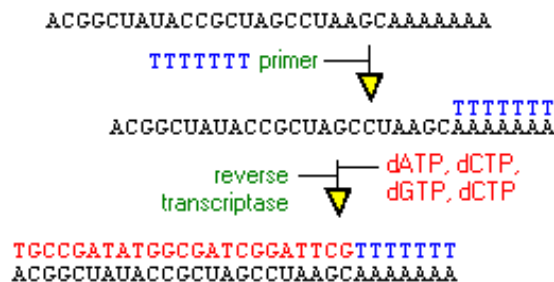
- Es especialmente útil cuando solo se dispone de pequeñas cantidades de ARN.
- Frecuentemente usada para amplificar genes específicos (como cDNAs) si su secuencia es conocida.
- Puede ser usada para construir bibliotecas de cDNA.

Hay dos partes diferenciadas en cualquier RT-PCR: la transcripción reversa y la amplificación (por medio de PCR).

Transcripción reversa (RT)

La transcripción reversa, tanto utilizando ARN total como ARNm, es la etapa clave en una RT-PCR. Existen varios factores que influyen la eficiencia del proceso, tales como la procesividad del enzima, la presencia de estructuras secundarias en el ARN, etc. Las retrotranscriptasas virales, tales como M-MLV y AMV, han sido las enzimas de elección durante muchos años. Estas enzimas, sin embargo, son termolábiles, y no pueden llevar a cabo la transcripción reversa cuando existen estructuras secundarias en el ARN.

En este caso, se suelen utilizar transcriptasas reversas termoestables, que pueden llevar a cabo la reacción a 55-70° C, permitiendo la desnaturalización de las estructuras secundarias, y aumentando la eficiencia global de la reacción.



Primers

La elección de los primers ha de ser cuidadosamente realizada. Habitualmente, los primers utilizados en RT-PCR son complementarios a regiones intrónicas. De esta forma, los productos originarios de un proceso de RT-PCR a partir de mRNA serán menores que los productos obtenidos a partir de PCR de ADN genómico contaminante. Este principio no es aplicable a organismos procariontas.

La selección del primer depende del tamaño del ARN molde. En la mayoría de los casos, se utilizan primers específicos de secuencia. Para análisis de mRNAs, pueden utilizarse primers oligo (dT), que se unen a las colas de poli(A) presentes en los mRNAs eucarióticos.

La concentración de los primers suele estar alrededor de 50 pmol / 50 µl volumen final reacción, aunque esta concentración puede variar y debe ser optimizada.

RNA molde

El ARN molde debe estar puro e íntegro. Debe comprobarse la ausencia de actividades DNasa y RNasa, así como de contaminaciones de ADN y/o ARN exógenos. Deben observarse claramente las bandas correspondientes a rRNA (18-16S y 28-23S), con una mancha difusa entre ellas, que corresponde al mRNA. Si aparecen manchas por debajo de la banda 18-16S, significa que parte del mRNA está degradado, y por tanto podría ser inútil para el análisis posterior. Además, es necesario comprobar que no quedan restos del proceso de purificación (fenol, NaCl, tiocianato de guanidina, etc.), que inhiben fuertemente la actividad enzimática. En este caso, se recomienda realizar varios lavados con etanol al 70 %.

Deben calcularse, asimismo, las cantidades de ARN molde añadidas a la reacción, ya que un exceso puede provocar inespecificidad e incluso inhibición de la reacción. En general, es suficiente con 10 pg a 1 µg.

En general, la transcripción reversa se logra en unos 30 minutos a 60° C. Sin embargo, en algunos experimentos, este tiempo puede ser alargado hasta 1 hora, y la temperatura disminuida a 42° C, o bien aumentada hasta 70° C, con el fin de lograr un rendimiento óptimo de la reacción.

PCR	RT-PCR
Consiste en un solo paso	Consiste en dos pasos: una RT primero, y luego una PCR.
Se utiliza una sola enzima: DNA polimerasa	Se utilizan dos enzimas: para la RT una DNA polimerasa dependiente de RNA y para la PCR la DNA polimerasa.
Se parte de DNAss o DNAds	Se parte de RNA
El DNA puede extraerse de cualquier célula u órgano.	El RNA se debe extraer de un sitio particular donde se expresa ese gen o proteína.

ACTIVIDAD PRÁCTICA:

El presente TP tiene como objetivo realizar una RT-PCR con el fin de amplificar el gen que codifica para la α -amilasa pancreática (1528 pb), utilizando como template el ARN extraído previamente. El producto de PCR será purificado del gel de agarosa para luego ser clonado en el vector pGEX-4T3.

MATERIALES Y EQUIPOS

- Micropipeta de 10, 100 y 1.000 μ l.
- Tips para micropipetas.
- Termociclador.
- Tubos Eppendorf.
- Agua miliQ.

Secuencia de los primers a utilizar:

Nombre	Secuencia	Enzima
ratAMY2- F	cgc GGATCC ATG AAG TTC GTT CTG CTG CTT TCC	BamHI
ratAMY2- R	ataagaat GCGGCCGC TTA CAA CTT TGA GTC GGC ATG GAT T	NotI

PROCEDIMIENTO:**Transcripción Reversa:**

NOTA: antes de comenzar a trabajar con ARN, se deben tener algunos cuidados.

- Limpiar la mesada y material de trabajo (como pipetas, caja de tips, botella de agua, etc) con solución que degrada RNasa, las cuales pueden degradar nuestro ARN.
- Usar GUANTES!! Esto evita la degradación del ARN por las RNasas presentes en la piel y la contaminación de la reacción con material genético foráneo.

En un tubo Eppendorf colocar:

- Transcriptasa Reversa 0,5 μ L
- Primer Poly-T o antisentido (reverso)..... 1,5 μ L
- Agua destilada-DEPC 4,0 μ L
- Buffer 5X 2,5 μ L
- dNTPs 250 μ M..... 0,5 μ L
- ARN... 1,0 μ L

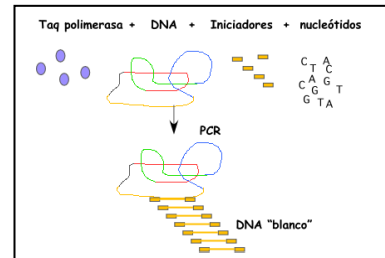
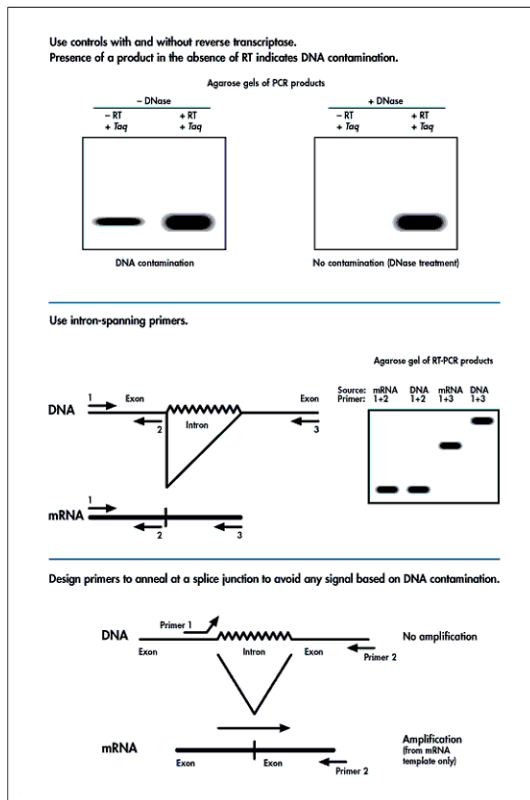
10 μ L

Colocar el tubo en el termociclador en las condiciones especificadas a continuación:

Condiciones de ciclado de la RT:

50° C30 minutos
 4° Cfor ever
 End

Se realiza un control negativo, para descartar cualquier tipo de contaminación que pueda ocurrir, ya que la mínima presencia de ADN puede dar falsos positivos. Este control se prepara colocando todos los reactivos de la mezcla de reacción utilizada para la RT menos la Transcriptasa reversa. Posteriormente, se guarda el tubo en heladera y se realiza una PCR. Sin embargo por proceder el ARN de un organismo eucariota, la presencia contaminante de ADN se observará claramente por diferencias en el tamaño de los productos de amplificación a partir de ARN o ADN.



Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Materiales:

- Buffer 10X
- MgCl₂
- dNTPs 25 μM
- Taq polimerasa
- Primer sense (Forward)
- Primer antisense (Reverse)
- Agua miliQ
- cDNA (también llamado DNA blanco o templado)

Procedimiento:

Se prepara la Master Mix en las siguientes proporciones:

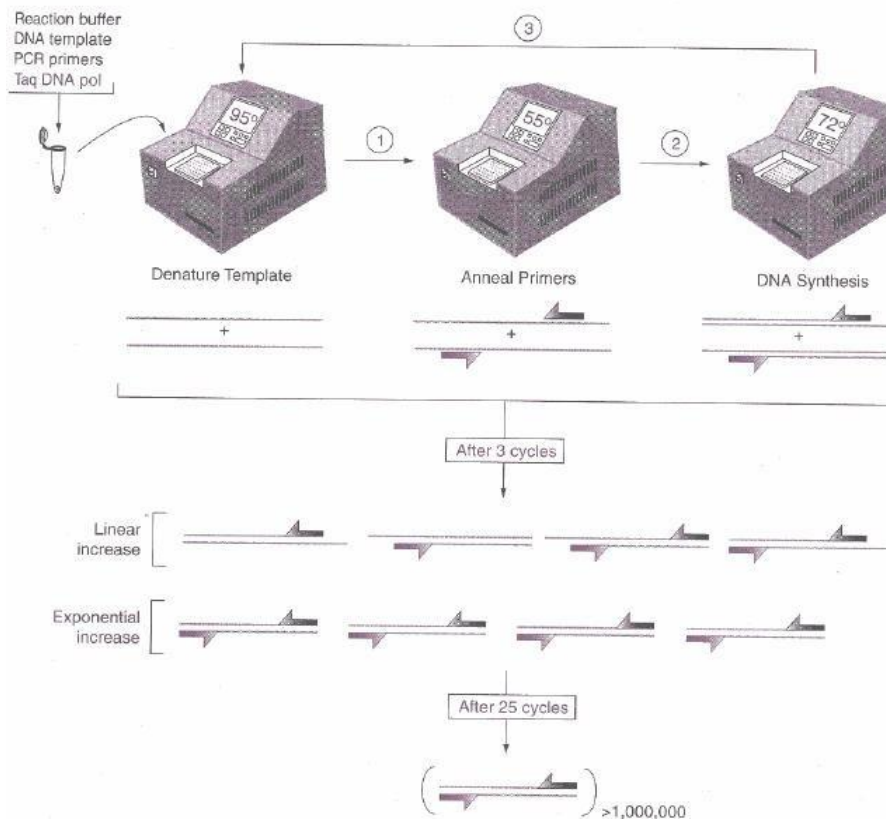
Buffer	2.5 μ l
Primer (1.5 c/u)	3.0 μ l
dNTP	0.5 μ l
MgCl ₂	0.8 μ l
Polimerasa	0.2 μ l
<u>H₂O</u>	<u>15.5 μl</u>
Total	22.5 μ l

Al ADN problema a amplificar se le agrega la master mix

Master Mix	22.5 μ l
<u>ADN problema</u>	<u>2.5 μl +</u>
Total	25 μ l

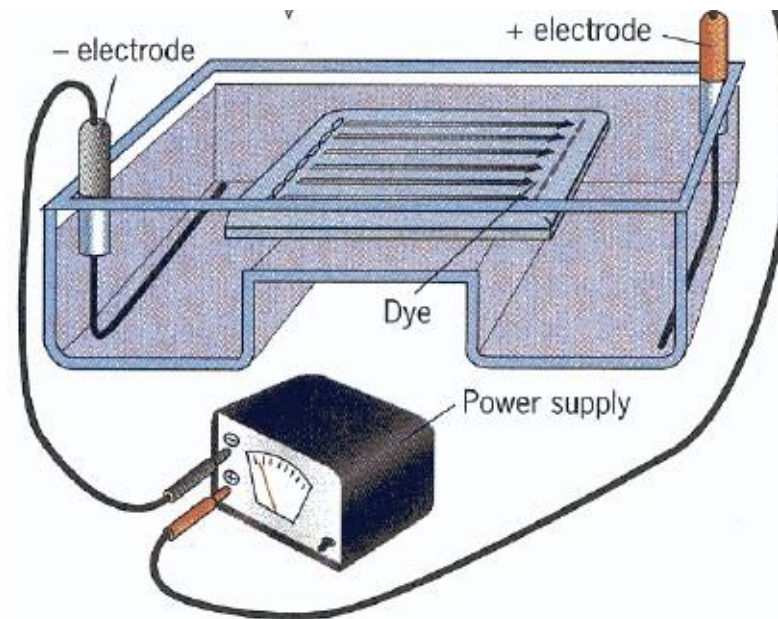
Colocar la muestra en el termociclador y cargar el programa de PCR.

CICLOS	TEMPERATURA(°C)	TIEMPO
1	94	2 min
35	94	20 seg
	55	30 seg
	72	2 min
1	72	5 min



Electroforesis:

Se realiza una corrida electroforética en gel de agarosa 1% para purificar del mismo la banda correspondiente al gen que codifica para la α -amilasa pancreática. Para ello, se siembran 5 μ L del producto purificado y se corre a 120 mV durante 20 minutos.



Purificación de ADN del gel de agarosa :

Fundamento:

Los productos de PCR son comúnmente purificados con el fin de remover el exceso de nucleótido y primers además de permitir seleccionar y purificar la banda correspondiente al fragmento de interés de una mezcla de fragmentos.

Materiales:

- Membrane Binding Solution.
- Membrane Wash Solution.
- Columnas de Purificación.
- Tubo colector.
- Eppendorf de 1,5 mL.
- Agua miliQ estéril.
- Centrifuga.

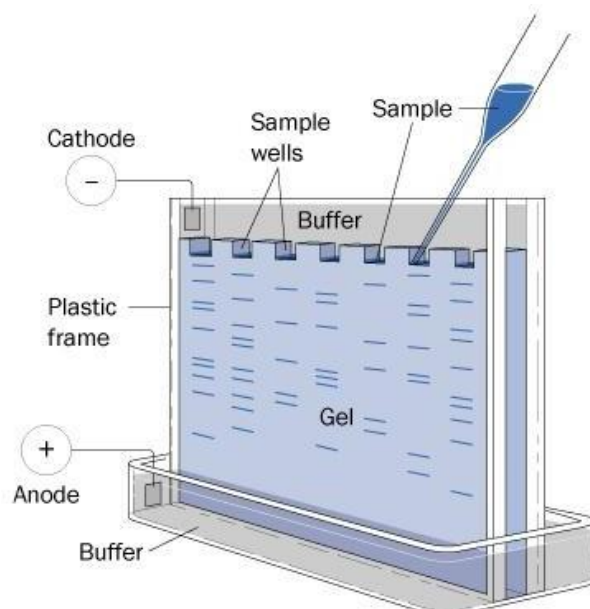
Protocolo de purificación:

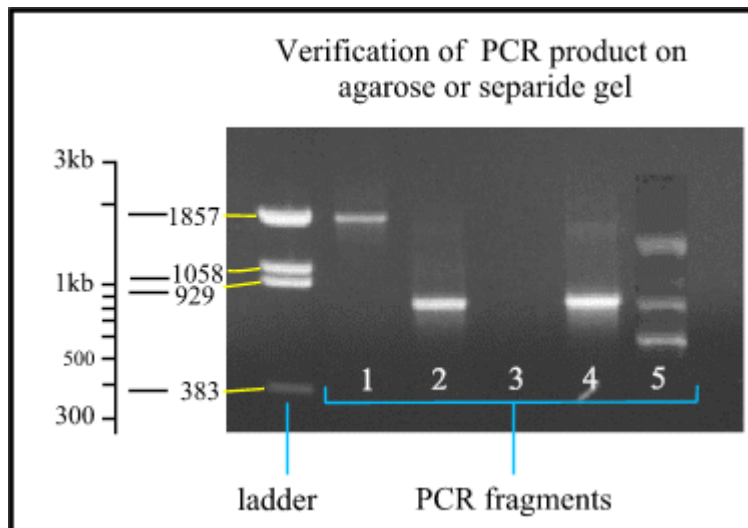
1. Visualizar la banda del peso molecular correspondiente al gen de la alfa-amilasa pancreática utilizando el transiluminador UV.
2. Cortar la banda del gel de agarosa y colocarla en un eppendorf. Anteriormente pesar un eppendorf vacío para restar el peso del mismo a la masa total del producto cortado.

3. Agregar Membrane Binding Solution (isotiocianato de guanidina) en una razón de 10 μ L de solución por cada 10 mg de banda de gel de agarosa. Vorterear la mezcla e incubarla durante 10 minutos a 50-65°C (cada 2 minutos hacer un vortex a la mix para que actúe la solución disolviendo el gel)
4. Centrifugar el eppendorf (spin) para asegurarnos que toda la mezcla este en el fondo del tubo.
5. Colocar la mezcla en una minicolumna (que debe colocarse dentro del tubo colector) e incubar 1 minuto a T° ambiente.
6. Centrifugar a 16.000 rpm durante 1 minuto. Descartar el líquido del tubo colector y colocar nuevamente la columna dentro del mismo.
7. Lavar la columna con 700 μ L de Membrane Wash Solution.
8. Centrifugar 1 minuto a 16.000 rpm. Descartar el líquido del tubo colector y repetir un lavado agregando 500 μ L de Membrane Wash Solution, centrifugando 5 minutos a 16000 rpm.
9. Transferir cuidadosamente la columna a un tubo Eppendorf de 1,5 mL.
10. Agregar 50 μ L de agua miliQ ESTÉRIL.
11. Incubar a T° ambiente 1 minuto.
12. Centrifugar 1 minuto a 16000 rpm.
13. Descartar la columna y guardar el Eppendorf a 4° C o -20° C.

BIBLIOGRAFIA:

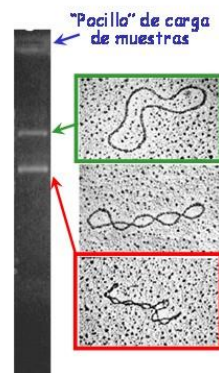
- MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, Russell, David and Sambrook, Joseph, CSHL PRESS Edit. 3ª edición. Volumen I, II, III.
- Universidad católica de Louvain, Facultad de Medicina biología molecular, Cochabamba, Bolivia.
- NCBI (www.pubmed.com).
- www.promega.com. Technical Bulletin: wizard SV Gel and PCR Clean-Up System.





Comportamiento de los plásmidos en electroforesis

- Son moléculas circulares: la movilidad no depende sólo del nº de pb, sino de la conformación.
- **Conformación superenrollada: más compacta, menor tamaño: avance más rápido**
- **Conformación relajada: mayor tamaño: avance más lento**
- Un plásmido purificado suele dar 2 bandas en la electroforesis



TRABAJO PRACTICO N°4 - DIGESTIÓN DEL GEN DE LA AMILASA Y VECTOR pGEX 4T3

OBJETIVOS:

- Realizaremos la purificación del producto de la reacción de PCR a partir de una corrida electroforética en geles de agarosa.
- Realizaremos la digestión con enzimas de restricción del gen amplificado de la α -amilasa pancreática de rata y del plásmido PGEX 4T3 utilizado como vector.

FUNDAMENTO: Purificación de ADN a partir del gel de agarosa

Los productos de PCR son comúnmente purificados con el fin de remover el exceso de nucleótidos y primers además de permitir seleccionar y purificar la banda correspondiente al fragmento de interés de una mezcla de fragmentos.

Materiales:

- Membrane Binding solution
- Membrane Wash solution
- Columnas de purificación
- Tubo colector
- Eppendorf de 1,5 mL
- Agua miliQ estéril
- Centrífuga

Protocolo de purificación:

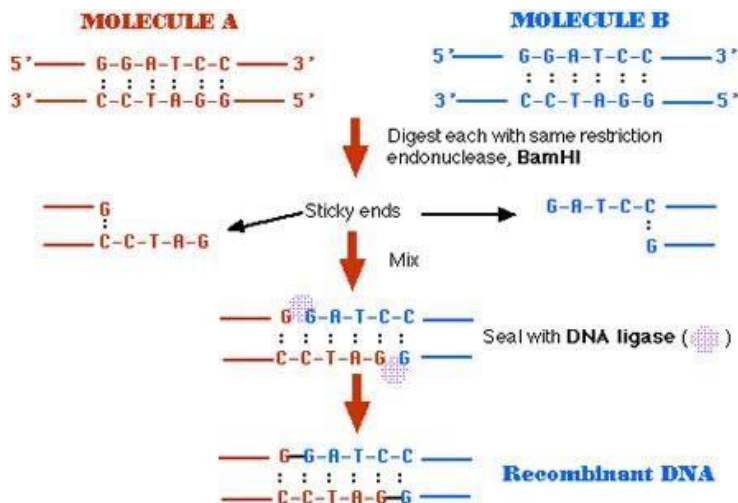
1. Sembrar en el gel de agarosa 1% (suministrado por el JTP) las muestras correspondientes a los productos de PCR y el marcador de tamaño molecular correspondiente (1 Kb), encender la fuente y correr a 100 V durante 45 min.
2. Visualizar la banda del peso molecular correspondiente al gen de la α -amilasa pancreática utilizando el transiluminador UV.
3. Cortar la banda del gel de agarosa y colocarla en un tubo Eppendorf. Anteriormente pesar un tubo Eppendorf vacío para restar el peso del mismo a la masa total del producto cortado.
4. Agregar Membrane Binding Solution (isotiocianato de guanidina) en una proporción de 10 μ L de solución por cada 10 mg de banda de gel de agarosa. Agitar la mezcla e incubarla durante 10 min a 50-65° C (cada 2 minutos hacer un vortex a la mix para que actúe la solución disolviendo el gel).
5. Centrifugar el tubo Eppendorf (spin) para asegurarnos que toda la mezcla este en el fondo del tubo.
6. Colocar la mezcla en una minicolumna (que debe colocarse dentro del tubo colector) e incubar 1 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 16.000 rpm durante 1 min. Descartar el líquido del tubo colector y colocar nuevamente la columna dentro del mismo.
8. Lavar la columna con 700 μ L de Membrane Wash Solution.
9. Centrifugar 1 min a 16.000 rpm. Descartar el líquido del tubo colector y repetir un lavado agregando 500 μ L de Membrane Wash Solution, centrifugando 5 minutos a 16.000 rpm.
10. Transferir cuidadosamente la columna a un tubo Eppendorf de 1,5 mL.

11. Agregar 50 μ L de agua miliQ ESTÉRIL (agua destilada y filtrada).
12. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
13. Centrifugar 1 min a 16.000 rpm.
14. Descartar la columna y guardar el tubo Eppendorf a 4° C o -20° C.

FUNDAMENTO: Corte con enzimas de restricción:

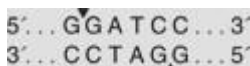
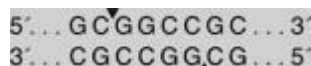
Como se aclaró anteriormente, las enzimas de restricción son endonucleasas que reconocen secuencias específicas del ADN y realizan cortes entre las dos hebras de la molécula de ácido nucleico. Estudios funcionales y el aislamiento de estos catalizadores biológicos junto con la enzima denominada ligasa ha permitido la manipulación del ADN generando moléculas recombinantes que son de gran utilidad en el campo de la biología molecular y la ingeniería genética.

A la hora de diseñar primers para amplificar la secuencia de interés para ser clonada y/o expresada utilizando un vector apropiado, el investigador debe tener presente que el proceso de selección de las enzimas de restricción a utilizar debe ser cuidadoso. En una primera instancia, las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción para realizar los cortes en los fragmentos a clonar y en el vector deben estar presentes solo una vez en cada una de las moléculas de ADN. De esta manera, se asegura que el corte se dará lugar solo en la secuencia requerida. Como se recordará, en el diseño de los primers para realizar la reacción de RT-PCR, fueron añadidos en ambos extremos las secuencias que son reconocidas por las enzimas de restricción, las cuales también son utilizadas en el corte del vector a usar. De esta manera, se asegura que luego del proceso de ligación, la secuencia se insertara en el vector de manera direccional.



La reacción de digestión involucra la participación de la enzima propiamente dicha, la cual actuara en presencia de un buffer, el cual provee el ambiente químico óptimo para la actividad de este catalizador. A su vez, la adición de BSA (*Bovine Serum Albumin*) aumenta notablemente la acción de la enzima de restricción.

Las enzimas a utilizar en el presente práctico son: **Bam HI**, la cual es producida por *Bacillus amyloliquefaciens* H, y **Not I**, producida por *Nocardia otitidis-caviarum*. Ambas enzimas poseen actividad máxima a 37° C y utilizan el mismo buffer de reacción. Los sitios reconocidos por las enzimas a utilizar son los que se presentan a continuación:

**Bam HI****Not I****PROCEDIMIENTO: Reacción de digestión**

A continuación, se presenta el protocolo para la realización de una reacción de restricción con volumen final de 20 μ L:

- 1) Cada grupo tomara dos tubos Eppendorf de 0,5 mL esteriles y los colocara en hielo molido para trabajar durante todo el procedimiento a una temperatura de aproximadamente 4° C.
- 2) En el tubo 1 se realizará la digestión del gen de la amilasa pancreática y en el tubo 2 el del plásmido utilizado como vector (pGEX-4T3) que sera entregado por el Jefe de Trabajos Prácticos. Agregar cada uno de los componentes como lo indica la tabla, comenzando por el agua y finalizando con las enzimas. *¡¡¡Cambiar de tip cada vez que se tome un componente diferente de la mezcla!!!*

Tubo 1:

Componente	Cantidad
Buffer 10 X	2,0 μ L
Not I (10 U/ μ L)	0,5 μ L
BamHI (10U/ μ L)	0,5 μ L
ADN (gen amilasa)	10 μ L (aprox. 1 μ g)
BSA (10 μ g/ μ L)	0,2 μ L
H ₂ O csp 20 μ L	6,8 μ L

Tubo 2:

Componente	Cantidad
Buffer 10 X	2,0 μ L
Not I (10 U/ μ L)	0,5 μ L
BamHI (10 U/ μ L)	0,5 μ L
Plásmido (PGEX 4T3)	10 μ L (aprox. 1 μ g)
BSA (10 μ g/ μ L)	0,2 μ L
H ₂ O csp 20 μ L	6,8 μ L

Composición del buffer 10X: 60 mM Tris-HCl (pH 7,9), 1,5 M ClNa, 60 mM Cl₂Mg, 10 mM DTT a 37° C.

- 3) Incubar la mezcla por 1 hora a 37° C y luego 15 min a 70° C para realizar la inactivación de las enzimas.
- 4) Rotular y guardar los tubos a -20° C para ser utilizados en el práctico N°6.

LIGACIÓN

- Realizaremos la purificación del producto de la reacción de digestión enzimática realizado en el trabajo práctico anterior a partir de una corrida electroforética en geles de agarosa.
- Una vez purificado dichos productos se procederá a la ligación de los mismos para obtener la molécula de ADN recombinante a usar en la transformación de bacterias competentes.

FUNDAMENTO: Purificación de ADN digerido

Los productos de digestión enzimática son purificados con el fin de remover el buffer de reacción y las enzimas inactivadas, además nos permite seleccionar y purificar la banda correspondiente al fragmento de interés de una mezcla de fragmentos.

Materiales:

- Membrane Binding solution
- Membrane Wash solution
- Columnas de purificación
- Tubo colector
- Eppendorf de 1,5 mL
- Agua miliQ estéril
- Centrífuga

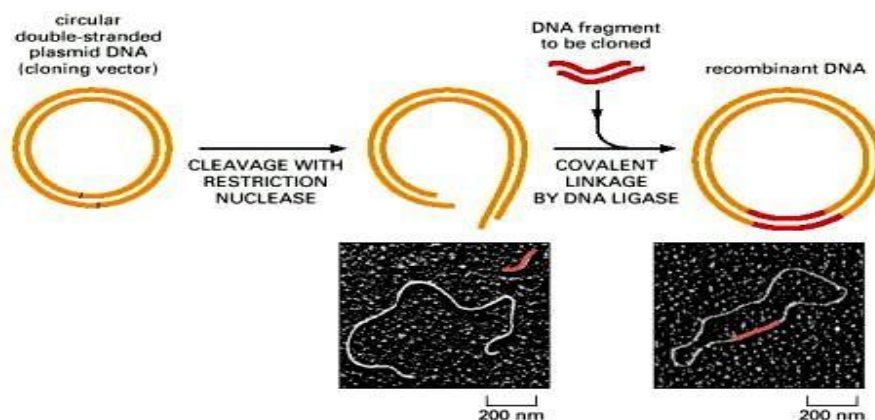
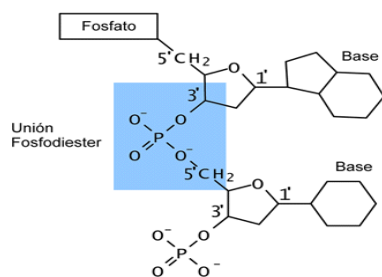
Protocolo de purificación:

1. Sembrar en el gel de agarosa 1% (suministrado por el JTP) las muestras correspondientes a los productos de digestión, tanto del gen de la amilasa pancreática como del vector pGEX-4T3 y el marcador de tamaño molecular correspondiente (1 Kb). Encender la fuente y correr a 100 V durante 45 min.
2. Visualizar las bandas de los pesos moleculares correspondientes al gen de la α -amilasa pancreática y al plásmido abierto utilizando el transiluminador UV. Recordar que el plásmido no digerido puede interferir en los experimentos futuros generando resultados falsos positivos.
3. Cortar las bandas del gel de agarosa y colocarlas en dos tubos Eppendorf. Anteriormente pesar un Eppendorf vacío para restar el peso del mismo a la masa total del producto cortado.
4. Agregar Membrane Binding Solution (isotiocianato de guanidina) en una razón de 10 μ L de solución por cada 10 mg de banda de gel de agarosa. Agitar la mezcla e incubarla durante 10 min a 50-65° C (cada 2 minutos hacer un vortex a la mix para que actúe la solución disolviendo el gel)
5. Centrifugar los tubos Eppendorf (spin) para asegurarnos que toda la mezcla este en el fondo del tubo.
6. Colocar la mezcla en una mini columna (que debe colocarse dentro del tubo colector) e incubarla 1 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 16.000 rpm durante 1 min. Descartar el líquido del tubo colector y colocar nuevamente la columna dentro del mismo.
8. Lavar la columna con 700 μ L de Membrane Wash Solution.

9. Centrifugar 1 min a 16.000 rpm. Descartar el líquido del tubo colector y repetir un lavado agregando 500 μL de Membrane Wash Solution, centrifugando 5 min a 16.000 rpm.
10. Transferir cuidadosamente la columna a un tubo Eppendorf de 1,5 mL.
11. Agregar 50 μL de agua miliQ ESTÉRIL.
12. Incubar a temperatura ambiente 1 min.
13. Centrifugar 1 min a 16.000 rpm.
14. Descartar la columna y guardar el tubo Eppendorf con el producto digerido a 4°C o -20°C .

FUNDAMENTO: Reacción de Ligación

Dos procedimientos cruciales en el proceso de clonación son la ligación de los segmentos de ADN y la transformación de las bacterias con la molécula de ADN recombinante obtenida. El proceso de ligación se logra utilizando la enzima ligasa de ADN (usualmente obtenida a partir del bacteriófago T4). Esta reacción requiere de ATP y iones magnesio, dando lugar a la formación de un enlace fosfodiéster entre el grupo fosfato presente en el extremo 5' y el extremo 3', donde se encuentra expuesto un grupo hidroxilo.



Los fragmentos de ADN pueden presentar extremos cohesivos u extremos romos dependiendo del corte realizado por la enzima de restricción. La ligación entre extremos cohesivos es de mayor eficiencia que aquella que se da lugar entre extremos romos. Debido a esto, cuando es necesario ligar dos extremos romos, la concentración de enzima utilizada y el tiempo de incubación aumentan en comparación a la primera reacción (en nuestro caso, los extremos generados luego de la actividad de las enzimas de restricción son cohesivos).

Muchas impurezas inhiben notablemente la reacción de ligación. Una de ellas es la presencia de ADP, el cual es producto de la hidrólisis de ATP, que normalmente se encuentra en el buffer de reacción de la enzima ligasa. Por otro lado, impurezas obtenidas en el proceso de purificación a partir de geles de agarosa pueden disminuir notablemente la eficiencia de ligación. Es por eso de gran importancia tener sumo cuidado con los fragmentos de ácidos nucleicos a utilizar en la presente reacción. Por último, la relación entre vector e inserto presente en la mezcla de reacción dependerá de cada inserto y de la eficiencia de la enzima a utilizar. Generalmente la relación vector: inserto es de 1:3. Luego de llevada a cabo esta reacción, se obtendrán moléculas recombinantes formadas por nuestro vector (PGEX 4T3) y nuestro gen (alfa amilasa). Estas moléculas recombinantes serán luego utilizadas para transformar bacterias competentes.

PROTOCOLO: Reacción de Ligación

- 1) Tomar un tubo eppendorf de 0,5 mL estéril, colocar en hielo molido para trabajar durante todo el procedimiento a una temperatura de aprox. 4° C.
- 2) Agregar cada uno de los componentes indicados en la tabla comenzando por el agua y buffer, dejando para el final la enzima ligasa T4. *¡¡¡Cambiar de tip cada vez que se tome un componente diferente de la mezcla!!!*

Componente	Cantidad
Ligasa Buffer 10X	1,0 µL
ADN vector	1,0 µL
ADN inserto	3,0 µL
T4 ligasa (3 U/µL)	0,3 µL
H ₂ O csp	4,7 µL

Composición del buffer 10X: 300 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM ATP, 100 mM Cl₂Mg, 100 mM DTT. ***Nota: La eficiencia de este buffer disminuye notablemente con la degradación de ATP a ADP.***

- 3) Incubar la mezcla a 16° C durante 16 horas.
- 4) Incubar la mezcla a 70° C durante 15 min para producir la inactivación de la enzima.
- 5) Guardar el tubo a -20° C hasta su utilización.

En esta etapa obtendremos ya nuestro gen inserto y ligado en el vector, el paso siguiente consiste en realizar la transformación de bacterias, la cual tiene como objetivo la introducción de dicha molécula recombinante en bacterias competentes.

DISCUSIÓN N° 3 Y TRABAJO PRÁCTICO N° 5

TRANSFORMACIÓN-TRANSFECCIÓN

INTRODUCCIÓN

Una vez obtenida la molécula recombinante *in vitro*, ésta debe ser introducida en la célula huésped. La introducción de ADN en células procariotas y levaduras se denomina **transformación**. La transformación de células eucariotas superiores se refiere a cambios en las características del cultivo celular, por ello se utiliza el término **transfección** para denominar la entrada de ADN foráneo a la célula.

Las células son capaces de tomar ADN desnudo del ambiente exterior y expresarlo como proteínas funcionales. Sin embargo, dado el tamaño y la carga de las moléculas de ADN, y las múltiples barreras enzimáticas y de membrana existentes, la entrada espontánea de material genético a las células y su subsecuente expresión es un proceso muy poco eficiente, por lo tanto, se han desarrollado un gran número de métodos para facilitarlos.

Las técnicas de transfección se han desarrollado fundamentalmente para permitir la introducción de ácidos nucleicos en el interior de las células, permitiendo en gran medida ampliar los conocimientos acerca de la regulación génica y de la función de las proteínas en los sistemas celulares. Actualmente se emplean en un gran número de aproximaciones experimentales:

- Expresión de proteínas para su purificación.
- Expresión de proteínas para estudiar su efecto sobre el fenotipo celular.
- Estudio de promotores y elementos regulatorios.
- Estudio de mecanismos involucrados en el procesamiento del ARN, modificaciones postraduccionales, etc.
- Interacción de proteínas.
- Clonado.
- Terapia génica.

La introducción de una construcción de ADN recombinante en la que se ha situado la secuencia codificante (CDS) de un gen reportero (luciferasa, green fluorescent protein GFP, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa -CAT-, etc.) bajo una secuencia de regulación que se desea estudiar, permite medir con facilidad tasas de expresión génica en diferentes situaciones experimentales. Por el contrario, la introducción de un plásmido que contiene la CDS de una proteína de interés bajo el control de un promotor (constitutivo, regulado, etc.) permite la producción de la proteína deseada que puede estar o no etiquetada (tagged). En este caso se emplea la célula como una factoría de proteínas a la que se le introduce en forma de plásmido la información de la proteína que se desea sintetizar.

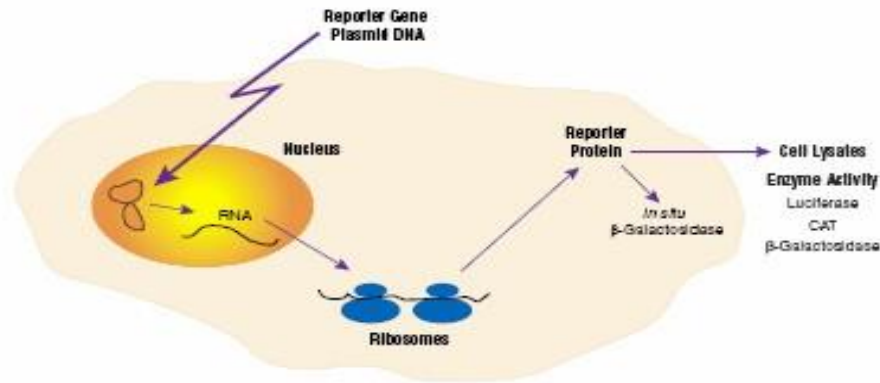
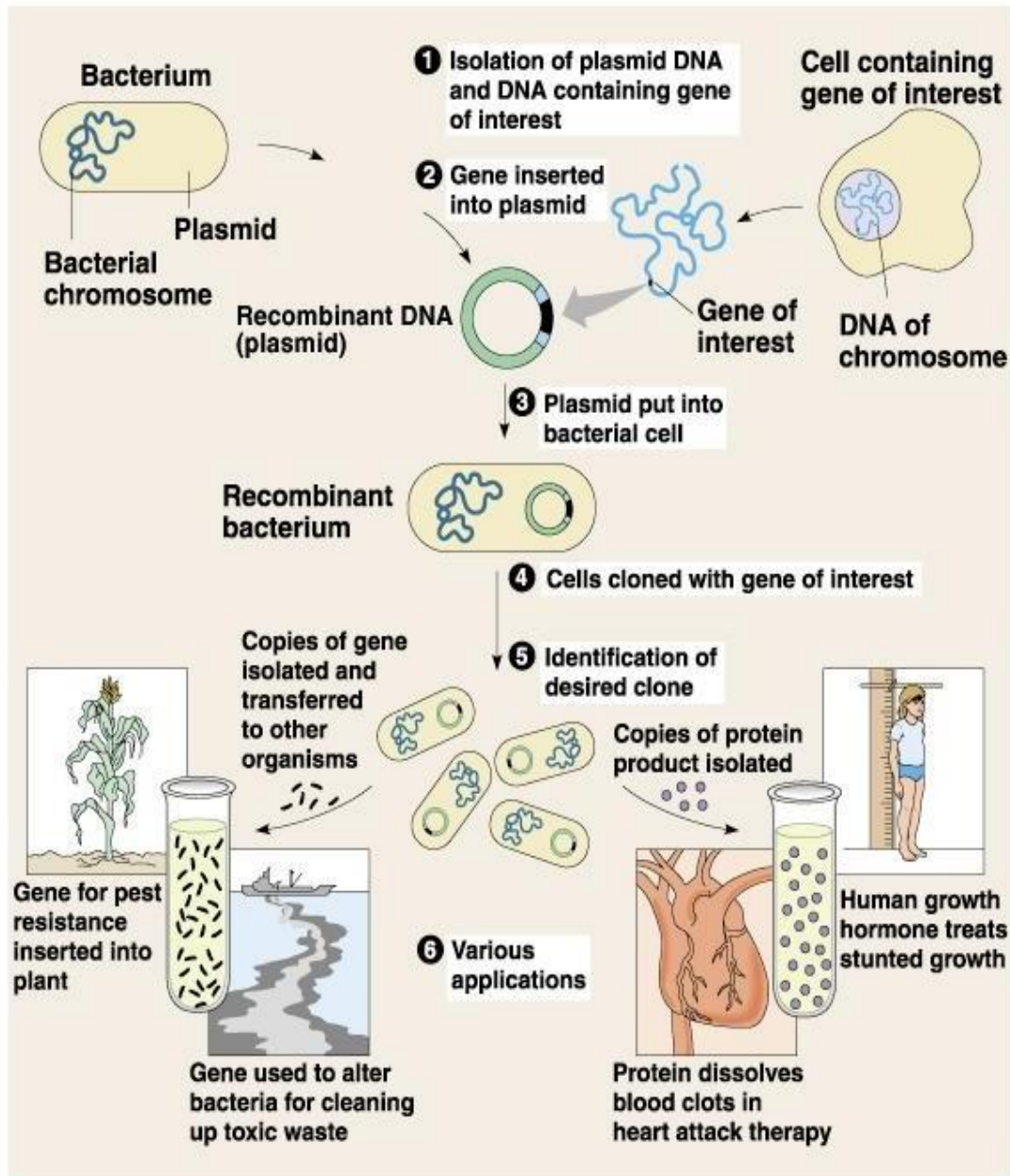


Figure 1.1. Reporter Gene Systems.

Podemos diferenciar dos tipos de transfección, de acuerdo a la integración en el genoma de la célula huésped o no. En la **transfección transiente**, el ADN recombinante es introducido en una línea celular receptora con el propósito de obtener un nivel alto de expresión del gen blanco, pero de manera temporal. El ADN transfectado, no necesariamente es integrado en el cromosoma huésped. Este tipo de transfección es elegido cuando se necesita analizar gran cantidad de muestras en un corto período de tiempo. Típicamente, las muestras son cosechadas de 1 a 4 días después de la transfección, y los lisados resultantes son analizados para la expresión del gen blanco. Por otra parte, la **transfección estable** es utilizada para establecer clones de líneas celulares en el cual el gen blanco transfectado es integrado al ADN cromosómico, desde donde dirige la síntesis de la proteína blanco en cantidades moderadas.

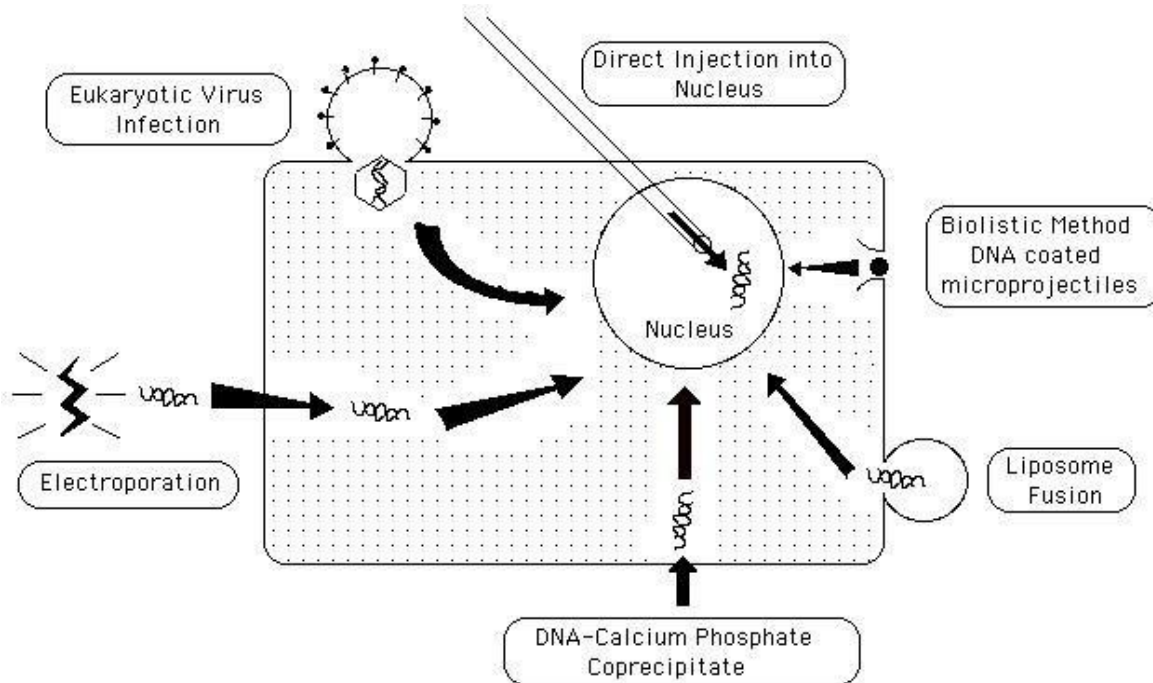
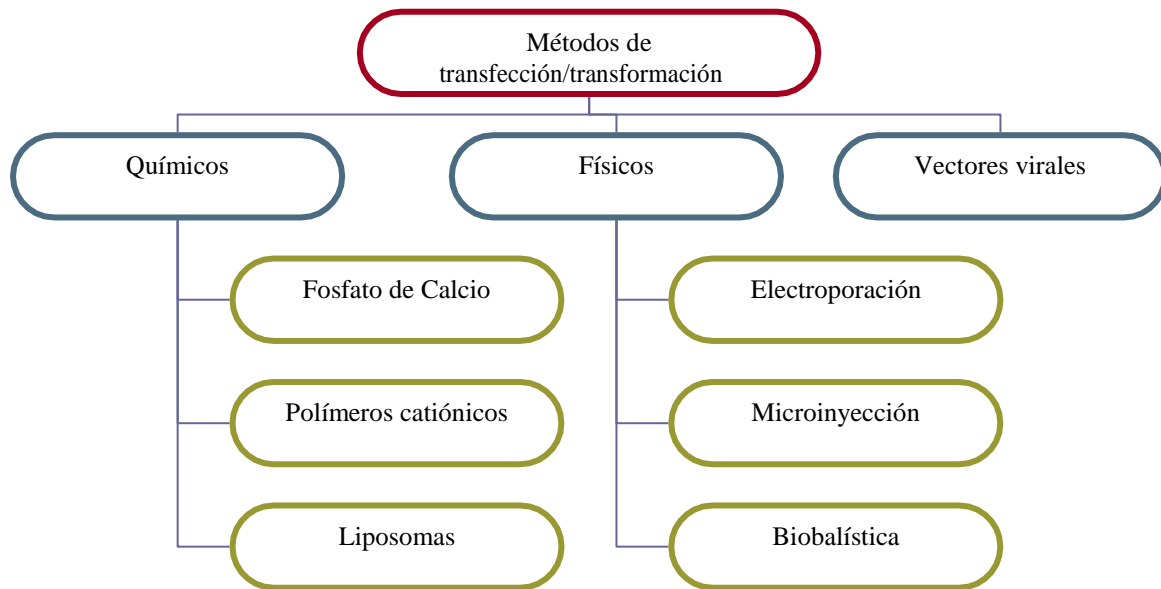


©1999 Addison Wesley Longman, Inc.

MÉTODOS DE TRANSFORMACION-TRANSECCIÓN

En cuanto a las células **eucariotas**, podemos considerar tres grandes grupos de técnicas de transformación-transfección: los llamados métodos físicos (se basan en el uso de sistemas mecánicos, no biológicos, para lograr la inserción de material genético en las células), los métodos químicos y los vectores virales. Las diferencias entre estos métodos se encuentran a nivel metodológico, ya que el conjunto de métodos físicos no se basa en

ningún sistema biológico, sino que pretende una inserción a “la fuerza”, de ese material genético. También hay que decir que este conjunto de técnicas sólo es funcional *in vitro*, ya que es necesaria la exposición de las células a medios extremos.



MÉTODOS QUÍMICOS

El ADN desnudo es incapaz de entrar en una célula y aun consiguiendo entrar en ellas es rápidamente degradado. Los problemas que encontramos son que el ADN por ser una molécula polar (rica en cargas negativas) tiene muchas dificultades para cruzar la

membrana plasmática. La línea de investigación busca incorporar esas secuencias de ADN a un transportador, que lo encierre y lo lleve hasta la célula blanco en donde a través de interacciones de membrana se asocie con ella para entregar el material al interior.

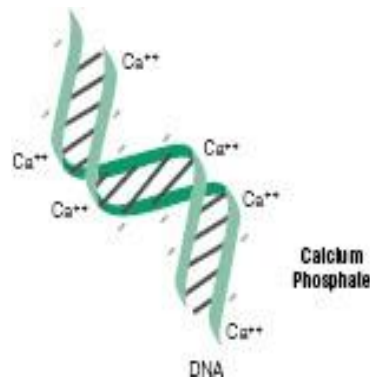
Los métodos químicos se basan en la formación de complejos que las células sean capaces de adquirir e incorporar, bien sea directamente mediante la ruta endocítica (fosfato cálcico, DEAE dextrano) o a las membranas (lipofección).

✓ **TRANSFECCIÓN MEDIADA POR AGREGADOS INORGÁNICOS (FOSFATO DE CALCIO)**

Los coprecipitados de fosfato de calcio (hidroxiapatita) y de ADN purificado se han empleado por más de 20 años para la transferencia y expresión de información genética en células de mamíferos en cultivo. Esta técnica ha devenido como una de las más populares para la transfección estable o transiente de células de mamíferos.

La precipitación por fosfato de calcio se ha empleado para el análisis de la replicación del ADN y la funcionabilidad de los promotores en experimentos transientes en los cuales las células son procesadas 48 a 60 h después de la transfección. Su superioridad en ese sentido con respecto a la transfección mediada por DEAE-dextrano es reconocida. Se cree que una célula transfectada por fosfato de calcio captura más ADN que una transfectada por DEAE-dextrano.

El principio de precipitación del ADN por el fosfato de calcio es simple, pero la formación de un coprecipitado óptimo de ADN y fosfato de calcio es difícil de repetir debido fundamentalmente a una serie de parámetros que afectan la solubilidad del calcio y del fosfato.



Factores que afectan la formación del precipitado calcio-fosfato-ADN

Hay tres aspectos esenciales que afectan la formación del precipitado, a saber, la concentración de ADN, la temperatura y el tiempo de la reacción de precipitación.

Un exceso de ADN soluble en la solución sobresaturada de calcio y fosfato puede prolongar el período durante el cual se forma el precipitado. Se ha demostrado que a altas

concentraciones, el ADN puede incluso evitar la formación de dicho precipitado. Es por esto que reviste especial importancia la preparación del ADN a transfectarse, ya que errores en la determinación de la concentración de los plásmidos o contaminantes presentes en la preparación, que absorban a 260 nm, van a influir sustancialmente en la naturaleza del precipitado. Es de vital importancia por ende el disponer de una preparación de ADN de alta pureza y con concentración minuciosamente corroborada para las transfecciones.

La solubilidad de la hidroxiapatita es mayor a bajas temperaturas y este parámetro influye decisivamente en la eficiencia de la transfección de células. A pesar de que la hidroxiapatita es considerada insoluble en agua, se ha notado la ausencia de precipitado en soluciones a temperaturas cercanas a los cero grados. La mayoría de los protocolos sugieren trabajar a temperatura ambiente, pero la práctica ha demostrado que es imprescindible un estricto control sobre la temperatura de la reacción.

La formación del precipitado es un proceso dinámico, por ende, el tiempo durante el cual se permite la formación del precipitado es un parámetro clave y depende del tipo celular con el que se trabaje. Estudios recientes, demostraron que la asociación óptima del ADN con el fosfato y el calcio ocurría en una ventana de tiempo extremadamente estrecha entre 0,5 y 1 min. El fundamento para disminuir los tiempos de reacción se basa en el hecho de que, con el tiempo, los precipitados tienden a crecer. El precipitado formado en un minuto tiene la apariencia de un polvillo compuesto por múltiples partículas pequeñas, muy fino y cubre homogéneamente las células, a los cinco minutos se observan menos partículas, pero más grandes y a los 40 min el precipitado es grosero y mayor incluso que la propia célula.

Factores que afectan la eficiencia de la transfección en las células

Asumiendo la formación de un precipitado óptimo, aún quedan otros parámetros de vital importancia para una eficiente transfección, aquellos relacionados con el comportamiento de las células y las condiciones de incubación de estas con el precipitado. La causa más común de fallos en las transfecciones se cree está en la estabilidad del pH de la solución de sales. El rango de pH óptimo para la transfección es de entre 7,02-7,1. El ajuste del pH en rangos tan estrechos cae prácticamente dentro de los límites de error de la mayoría de los equipos de determinación de pH disponibles comercialmente.

Un segundo problema comúnmente encontrado es que el medio celular se torna en extremo ácido inmediatamente que se añade el cóctel de la transfección, esto pudiera conllevar a la formación de un precipitado muy grosero y a la muerte celular. Es este el caso para las transfecciones realizadas en medio RPMI-1640, se ha encontrado que es imprescindible cambiar las células a medios menos ácidos como el DMEM-alpha antes de la transfección, lo cual garantiza la sobrevivencia de las mismas.

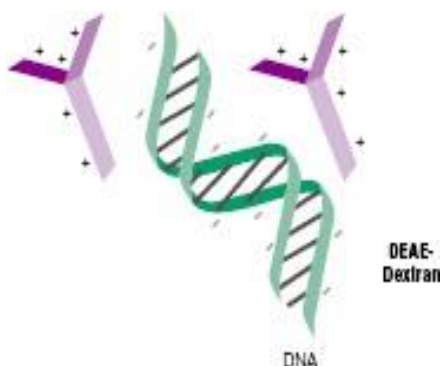
El tiempo que las células son incubadas con el precipitado varía de acuerdo con la línea celular, así por ejemplo, células HeLa, NIH 3T3, CHO son transfectadas rutinariamente dejando el precipitado actuar por 16 h; otras células como COS-7 no pueden sobrevivir tan largos tiempos de exposición.

✓ TRANSFECCIÓN MEDIADA POR POLÍMETROS CATIONICOS

Transfección por DEAE-dextrano

El diethyl aminoethyl dextrano (DEAE-dextrano) fue empleado originalmente para facilitar la entrada de ARN de poliovirus a células y posteriormente para introducir ADN de virus SV40 y poliovirus. El método, sujeto a modificaciones menores, se emplea aun en la actualidad para la transfección de genomas virales y plásmidos a células eucariotas.

De forma general esta técnica difiere de la de fosfato de calcio en tres aspectos: **1)** se emplea solo para la transfección transiente de células, **2)** trabaja de forma eficiente para algunas líneas celulares tales como BSC-1, CV-1 y COS-7, pero no para otras, debido a su toxicidad y **3)** se emplean menores cantidades de ADN.



El mecanismo por el cual el DEAE-dextrano permite la entrada del ADN a la célula y su transporte hasta el núcleo es poco conocido. Convencionalmente se asume que grandes complejos que contienen tanto ADN como DEAE-dextrano se adhieren a la superficie de la célula y de alguna forma entran mediante endocitosis. A pesar del poco conocimiento existente sobre este mecanismo, está probado que las transfecciones por este método son más reproducibles que aquellas con fosfato de calcio y que son además un instrumento eficaz en el estudio de la expresión génica de varios tipos de células.

La gran desventaja de esta metodología comparada con las de fosfato de calcio y como se verá más adelante también con el resto de los métodos, radica en que con DEAE-dextrano solo se logran transfecciones transientes del ADN en la célula huésped. No está claro por qué esa diferencia en el destino final del ADN introducido a las células por métodos distintos.

Por otra parte, se determinó que una vez dentro de la célula, el ADN añadido por DEAE-dextrano se ensamblaba rápidamente en los nucleosomas y que prácticamente todo el ADN exógeno quedaba atrapado en esas estructuras a diferencia del mismo ADN introducido por el método de fosfato de calcio, donde se encontraba que al menos parte del ADN estaba en forma de agregados o precipitados.

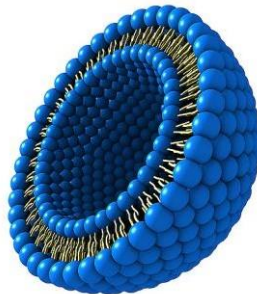
Otros policationes se han empleado para la transfección de células eucariotas, entre ellos el más popular es el polibreno. Este polication se ha empleado para facilitar la transfección en células con demostrada resistencia a la transformación por métodos convencionales, fundamentalmente por fosfato de calcio. Por ejemplo, en células CHO, se logra hasta 15 veces mayor eficiencia en transfecciones estables utilizando polibreno que con fosfato de calcio.

El advenimiento de la terapia génica basada en vectores no virales ha despertado el interés por la búsqueda de nuevos vectores sintéticos u orgánicos. Entre estos destacan el diseño de estructuras catiónicas de carga neta altamente positiva para que interactúen con el esqueleto fosforado de la molécula de ADN. De los polímeros catiónicos empleados en la actualidad, los que mejores resultados ofrecen en términos de transfecciones eficientes y estables son: los polímeros de la cascada de las poliamidoaminas y las lipopoliaminas. Estas familias de polímeros, aunque muy distintas en su estructura química, conservan una similitud adicional a su alta eficiencia de transferencia de ADN a las células: ambas contienen residuos protonables aun a pH fisiológico. Esta propiedad es clave pues permite el control de pH en el endosoma y en teoría puede proteger al ADN de la acción de degradación del sistema lisosoma.

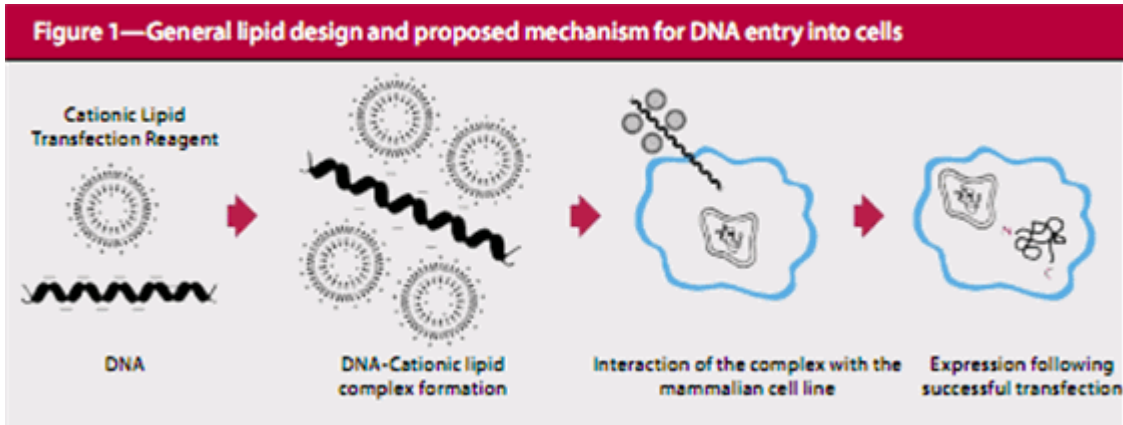
✓ MÉTODO DE LIPOFECCIÓN

La lipofección o transfección con liposomas es una técnica que se utiliza para introducir material genético en una célula mediante el uso de liposomas. Los liposomas están formados por el auto-ensamblaje de moléculas lipídicas disueltas en un solvente acuoso, dichos lípidos adoptan estructuras estables que resultan en una disposición termodinámicamente favorable. Por lo general, se emplean lípidos cargados positivamente para formar complejos con el ADN de carga negativa (lipoplex). El complejo tiene afinidad por la membrana y permite la entrada del ADN en el citosol. Los lípidos catiónicos obtienen su carga positiva a partir de la presencia de uno o más grupos amina presentes en la cabeza polar. Estos grupos gobiernan la interacción con el esqueleto fosfatado de los ácidos nucleicos y además facilitan la asociación con la membrana celular, permitiendo el ingreso del ADN. Existen un gran número de lípidos que se emplean en lipofección (por ej.: DOTMA (N[1-(2-3- dioleiloxi)propil]-N, N, N-trimetilamonio y DOPE (L-dioleoil phosphatidilethanolamina), aunque muchas variantes se han desarrollado a partir de una estructura consenso de un lípido catiónico sintético.

LIPOSOMA



La interacción inicial lipoplex-membrana plasmática es de tipo electrostática, luego, la entrada del complejo se completa por endocitosis. Una vez adentro de la célula, el complejo debe escapar la vía endocítica, difundir a través del citoplasma e ingresar al núcleo para dar comienzo a la expresión génica. Estos atributos contribuyen a una transfección sencilla, repetible y eficiente en una amplia variedad de células y para un amplio rango de moléculas tales como ADN, ARN, ARN de doble cadena y oligonucleótidos.



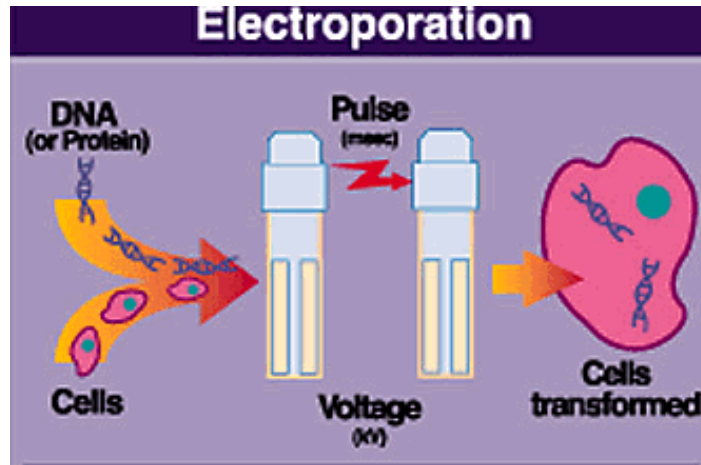
Algunos de los problemas asociados a los métodos de transfección tradicionales, como electroporación, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, incluyen baja reproducibilidad, toxicidad celular y baja eficiencia de entrega del ADN. Sin embargo, la lipofección es técnicamente simple, genera baja toxicidad y alta reproducibilidad, alcanza altas eficiencias (70 – 90%) en una amplia variedad de células eucariotas, y es adecuada para transfección de manera transiente o estable. Las desventajas del método son el elevado precio de los lípidos, el hecho de que no todos los lípidos funcionan en todos los tipos celulares, y que hay que optimizar el ensayo para cada tipo celular. Los parámetros a optimizar son la relación entre lípido y ADN (relación de cargas), la cantidad de ADN empleado, el tiempo que se exponen las células al complejo y la presencia o ausencia de suero.

MÉTODOS FÍSICOS

Basados en la introducción mecánica de las moléculas en el interior de la célula.

✓ **ELECTROPORACION**

La electroporación es una técnica de introducción de ADN a células en cultivo y se lleva a cabo mediante la aplicación de pulsos eléctricos a las células, lo que provoca la apertura de poros en la membrana de estas con la consiguiente penetración del ADN presente en el medio de electroporación.



La electroporación se ha empleado para introducir ADN en una amplia variedad de células animales, de plantas y también en bacterias y levaduras. La electroporación puede ser usada indistintamente para expresión transiente o estable. La eficiencia de la transfección por electroporación esta influida por una serie de factores, entre los cuales destacan:

1. Magnitud del campo eléctrico aplicado. A bajos voltajes, la membrana plasmática de las células en cultivo no es afectada lo suficiente, como para permitir el paso de moléculas de ADN al interior de las células. A altos voltajes las células pueden ser irreversiblemente dañadas. Para la mayoría de las células los mayores niveles de expresión transiente se alcanzan con voltajes entre 250 y 750 V/cm.

2. Duración del pulso eléctrico. Por lo general, el tiempo óptimo de electroporación es entre 0,2-10 ms. Normalmente se deja pasar un pulso único a través de la suspensión celular. En el caso de los pulsos cuadrados, se ha hallado que la descarga de varias réplicas de estos aumenta la eficiencia de transfección para algunas líneas celulares.

3. Temperatura. Algunos autores reportan que los niveles máximos de transfección se logran cuando las células son mantenidas a temperatura ambiente durante la electroporación; otros indican que es mejor mantener las células a cero grados. Esas discrepancias pueden resultar de las diferencias en la respuesta de distintas líneas celulares al paso de la corriente, o en la cantidad de calor generado durante la electroporación.

4. Concentración y tipo de ADN. Si bien se puede transfectar mediante electroporación tanto ADN circular como lineal, los mayores niveles de expresión tanto transientes como estables, se obtienen cuando se usa ADN lineal. La concentración óptima de ADN para las transfecciones se encuentra en el rango de 1 a 40 ug/mL.

5. Composición iónica del medio. La constante de tiempo de pulso (τ) es afectada dramáticamente por la composición del medio de electroporación, así las células resuspendidas en soluciones salinas tamponadas tales como: PBS, Buffer-Hepes salino, o medios de cultivo celulares permiten una menor duración del pulso eléctrico. El empleo de sustancias no iónicas (manitol, sacarosa, etc.) en soluciones tamponadas aumenta la constante de tiempo de pulso.

La optimización de estos parámetros es un requisito necesario para cada línea celular y hace de la electroporación una técnica de gran versatilidad para la mayoría de las líneas

celulares con una ventaja obvia sobre el resto de los procedimientos: permite la transfección de líneas celulares recalcitrantes a otros métodos.

A diferencia de la transfección por fosfato de calcio o de la fusión de protoplastos, la electroporación por lo general conlleva a la formación de líneas celulares establemente transformadas con la integración de una sola copia del ADN foráneo.

En términos generales la mayor desventaja de la electroporación es su costo, ya que la mayoría de los equipos comercialmente disponibles son caros, en el orden de los miles de dólares, además de los accesorios como cubetas y adaptadores que también lo son.

ELECTROPORADOR



CUBETAS DE ELECTROPORACION



✓ MICROINYECCIÓN DIRECTA DE ADN EN EL NÚCLEO DE CÉLULAS

Este método consiste en introducir el ADN mediante una inyección en el núcleo de las células. Al introducirlo directamente allí, evitamos la degradación citoplasmática y

lisosomal. Se realiza mediante un micromanipulador, microscopio invertido que permite la visualización.

Las células que sobreviven y han insertado el material genético presentan una alta eficacia de expresión del mismo. La técnica es muy laboriosa, de alta complejidad y necesita células aisladas para su realización. Este sistema se suele utilizar "ex vivo". En el caso de inyección en embriones se denomina terapia génica germinal siendo un método "in vivo". Las tecnologías desarrolladas por Capecchi para células fueron adaptadas exitosamente a embriones de una gran cantidad de especies, para abrir paso a la modificación genética de animales o transgénesis.

✓ **BIOBALÍSTICA**

Pequeñas partículas de tungsteno u oro son utilizadas para unir ADN, preparándolas para dirigir las al interior de las células, tejidos u organelas por medio de un sistema acelerador de partículas. Este método ha sido llamado de varias maneras, por ejemplo: método de bombardeo por microproyectiles, método de pistola génica o método de aceleración de partículas. La biolística es utilizada para aquellos tipos de células que son imposibles o dificultosas transformar por medio de otros métodos, tales como las células vegetales, tejidos, órganos y líneas celulares primarias.

La eficiencia con la que el ADN extraño es introducido al interior de las células por esta metodología depende de distintas variables, entre ellas, el tipo de celular (bacteria, planta o tejido), la densidad del cultivo, medio de cultivo, los parámetros de la pistola génica y el tipo de munición (el tamaño óptimo de partículas para cada aplicación depende del tipo celular).

Las partículas de tungsteno son de tamaño irregular pero algunas células son sensibles a los efectos tóxicos de este metal de transición. Este metal es además susceptible a la oxidación, lo cual promueve la degradación del ADN. El oro es menos tóxico y más maleable. Sin embargo, el oro une ADN con menor eficiencia y es más caro que el tungsteno.

VECTORES VIRALES

Esta metodología comienza en 1968 cuando se demuestra que los virus son capaces de infectar células de mamífero. El desarrollo en 1989 de las células empaquetadoras (aportan la composición proteica que necesitan los virus para su funcionalidad ya que ésta ha sido eliminada del genoma viral) supuso un avance importante en esta metodología al aumentar la titulación en virus no patógenos. En todos los casos vamos a eliminar el mayor número de genes y secuencias al virus para que pueda captar el DNA exógeno. Los vectores virales pueden ser utilizados tanto "in vivo" como "ex vivo". Hasta el momento los virus más utilizados en terapia génica son los siguientes:

Retrovirus

Son virus ARN que tienen capacidad para integrar genes terapéuticos relativamente grandes (un máximo de 8 Kb). Necesitan de células empaquetadoras para su obtención.

Se transfiere el ADN del virus mediante la técnica del fosfato de calcio a las células empaquetadoras. Posteriormente se realiza una segunda transducción en la cual introducimos la construcción génica de interés.

Los virus inyectados en el huésped integran su ADN en el genoma del huésped expresando así el gen que le hemos añadido. Como las proteínas del virus no son expresadas por el huésped, no tenemos una respuesta inmunitaria. Tienen una alta eficacia de transducción y también de expresión, siendo un sistema bien estudiado. Sin embargo, únicamente sirven para infectar células del huésped que se encuentran en división. Además, los títulos de virus obtenidos hasta ahora son bajos y la integración en el genoma es al azar.

Adenovirus

Son una familia de virus ADN que causan infecciones en el tracto respiratorio humano. Se pueden llegar a insertar en ellos hasta 7,5 Kb de ADN exógeno.

En este caso no se necesita la integración del material hereditario del virus en el del huésped para su replicación, por lo tanto, tampoco el transgén será introducido en el genoma de la célula. Y por tanto tampoco necesitan que las células infectadas estén dividiéndose para su replicación.

La gran ventaja de usar un adenovirus como vector es la alta eficacia de transducción, al igual que la expresión de la construcción génica introducida, sin embargo, ésta es transitoria (pocas semanas). Esto último obligaría a tratamientos periódicos lo cual es un inconveniente ya que los adenovirus producen respuesta inmune celular e inflamatoria.

Virus adenoasociados (VAA)

Son parvovirus, contienen ADN como material genético, y requieren la coinfección con un adenovirus para multiplicarse. Son vectores que combinan las ventajas de los retrovirales y los adenovirales. Su capacidad de integrar ADN exógeno es pequeña, sólo de 5 Kb.

Las principales ventajas son que los virus adenoasociados integran su ADN en la célula durante la replicación, por lo que la transducción (la cual es altamente eficaz) es estable en la célula diana. Además, pueden infectar tanto a células en división como a las que no lo están (de gran importancia para la terapia génica "in vivo"). Los vectores AAV no están implicados en ningún tipo de enfermedad humana. Además, el riesgo de una respuesta inmune está minimizado ya que no produce proteínas víricas.

Sin embargo, existen también una serie de inconvenientes como que este tipo de vectores todavía no ha sido tan bien estudiado como los retrovirus y los adenovirus.

Herpesvirus

Son virus ADN cuyas células diana son las neuronas. Su complejidad y lo poco que todavía conocemos de esta familia de virus dificulta su utilización. La gran ventaja es el gran tamaño de su ADN, que les permite aceptar varios genes terapéuticos, incluso podrían ir con sus propias regiones reguladoras. Uno de los inconvenientes es que habría que eliminar las secuencias que codifican para las proteínas líticas del virus que causan la muerte de las células a las que infectan.

CONCLUSIÓN

La elección de un método de transfección en particular, depende del objetivo del experimento (por ejemplo, el tipo de ensayo a ser utilizado para el rastreo, la habilidad de la línea celular para sobrevivir el estrés de la transfección y la eficiencia requerida por el sistema).

La siguiente tabla nos ayudara a elegir el método apropiado para nuestro experimento.

Método	Expresión		Eficiencia	Tipo celular
	Transiente	Estable		
Liposomas	Si	Si	Alta	Células adherentes, líneas celulares primarias, cultivos en suspensión
Fosfato de calcio	Si	Si	Baja	Células adherentes (CHO, 293), cultivos en suspensión
DEAE-dextrano	Si	No	Alta	BSC-1, CV-1 y COS
Electroporación	Si	Si	Alta	Muchas
Biobalística	Si	Si	Alta	Líneas primarias celulares, tejidos y células vegetales
Microinyección	Si	Si	Alta	Células embrionarias

OBJETIVO

El objetivo de este Trabajo Práctico de Biología Molecular consiste en incorporar el gen de la α -amilasa pancreática de rata a bacterias competentes.

Las bacterias son capaces de tomar ADN desnudo del ambiente exterior y expresarlo como proteínas funcionales. Este es un proceso que ocurre naturalmente y es uno de los medios por el cual las bacterias incorporan genotipos ventajosos, como la resistencia a antibióticos. Sin embargo, dado el tamaño y la carga de las moléculas de ADN, y las múltiples barreras enzimáticas y de membrana existentes, la entrada espontánea de material genético a las células y su subsecuente expresión es un proceso muy poco eficiente, por lo tanto, se han desarrollado un gran número de métodos para facilitarlos.

Es posible inducir químicamente a bacterias a incorporar más eficientemente esta nueva información que de manera natural. Estas bacterias se denominan *competentes* y las copias replicadas de un plásmido arreglado genéticamente se denominan rutinariamente *clones*. Las técnicas que inducen el estado de competencia de las bacterias se basan en diversos tratamientos químicos o físicos que producen poros en la pared, lo que permite una transformación bastante eficiente.

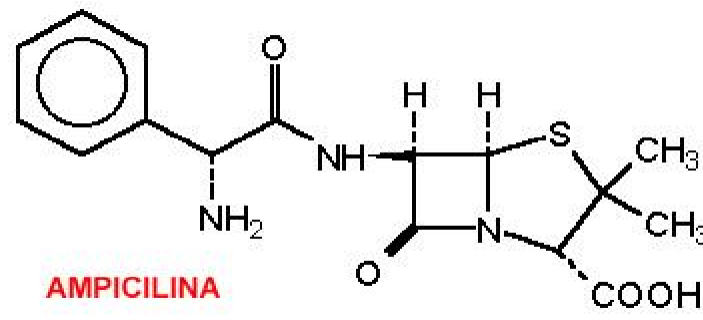
Dos formas distintas de competencia deben ser distinguidas: natural y artificial. Algunas bacterias son capaces de incorporar de manera natural ADN bajo condiciones de laboratorio y muchas más pueden ser capaces de hacerlo en sus ambientes naturales. Estas especies traen un conjunto de maquinaria genética específica para llevar el ADN a través de la membrana al interior celular. Por otra parte, la competencia artificial no está codificada en el genoma procariota, sino que es inducida por procedimientos en el laboratorio, en donde las células son convertidas en permeables a través de condiciones que normalmente no ocurren en la naturaleza.

Un método de generación de bacterias competentes es el tratamiento con CaCl_2 . El fundamento de la técnica es que la membrana bacteriana resulta permeable a los iones cloruro, pero no lo es a los iones calcio. A medida que los iones cloruro entran al interior celular, estos son acompañados de agua. El influjo de agua hace que la bacteria se hinche y es necesario para el posterior ingreso del ADN. Además, las cargas positivas del calcio neutralizan las cargas negativas del ADN y de la pared celular disminuyendo su repulsión electrostática. Las bacterias hinchadas son denominadas *competentes*. A continuación, el ADN de interés es mezclado con las células y al ser expuestas a un aumento brusco de temperatura, o choque térmico, se genera una diferencia de presión entre el medio extra e intracelular lo cual induce la formación de poros a través de los cuales pueden ingresar las moléculas del plásmido. Al retornar las células a una temperatura normal la pared celular se vuelve a cerrar.

Existe además otra metodología que se puede aplicar para la transformación bacteriana. La electroporación consiste en inducir la competencia mediante la aplicación de un pulso eléctrico muy breve e intenso. Los fundamentos, ventajas y desventajas de la técnica fueron discutidos previamente.

Durante una transformación, solamente un pequeño porcentaje de las bacterias es transformado y la presencia del *reporter* de antibiótico en el plásmido permite un rápido chequeo de las transformantes exitosas. Solamente las bacterias transformadas, que poseen el gen de resistencia a antibiótico, pueden sobrevivir y crecer en presencia de un

medio de cultivo conteniendo el antibiótico. Existen diversos antibióticos que pueden ser utilizados, uno de los más comunes es la ampicilina. Otros plásmidos poseen un segundo nivel de selección, por ejemplo la alfa-complementación, que permite seleccionar las bacterias que poseen el plásmido con el fragmento de interés de las que tienen solo el plásmido.



Mecanismo de acción de ampicilina: los antibióticos beta-lactámicos como la ampicilina son bactericidas. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose a unas proteínas específicas llamadas PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*) localizadas en la pared celular. Al impedir que la pared celular se construya correctamente, la ampicilina ocasiona, en último término, la lisis de la bacteria y su muerte.

PROCEDIMIENTO

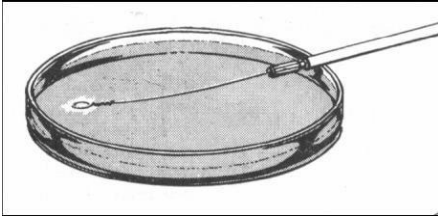
Preparación de bacterias competentes por CaCl₂ (lo harán los docentes previamente al práctico):

- 1- Crecer la cepa bacteriana adecuada (cepa *E. coli* DH5 α) en una placa de LB/agar a 37° C 16-20 h.
- 2- Transferir una colonia a 100 ml de LB líquido e incubar aproximadamente 3 h a 37° C en agitación (300 rpm). No exceder DO: 0,4. (densidad óptica)
- 3- Transferir a tubos de 50 ml y enfriar a 0° C durante 15 min.
- 4- Centrifugar a 4000 rpm, 10 min a 4°C. Eliminar completamente el sobrenadante
- 5- Resuspender el pellet celular en 10 ml de CaCl₂ 0,1 M enfriado y colocar en hielo durante 15 min. Centrifugar a 4000 rpm 10 min a 4°C. Eliminar completamente el sobrenadante.
- 6- Resuspender el pellet en 2 ml de CaCl₂ 0,1 M frío cada 50 ml originales. Guardar hasta 8h a 4°C o alicuotar en eppendorfs y agregar glicerol (15% en volumen final) y congelar a -70° C el tiempo que se desee.

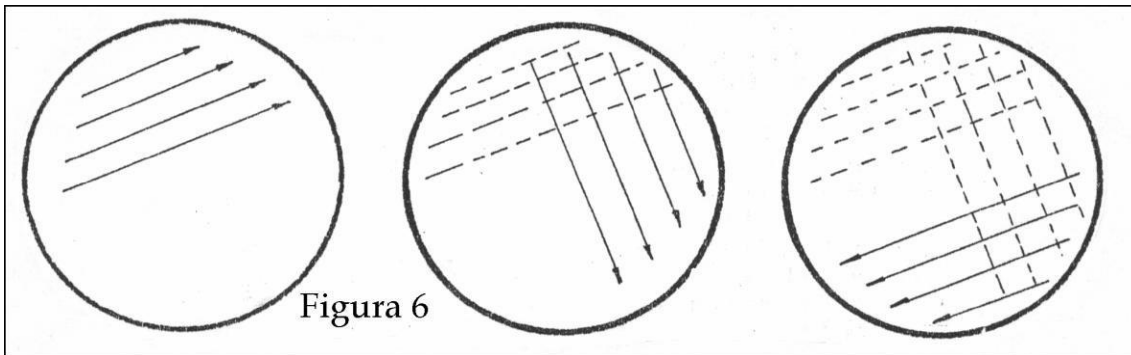
Transformación de bacterias (los alumnos se separarán en 2 grupos):

a) Cultivo de *E. coli* en LB-agar:

- 1- Previo a encender el mechero, desinfectar la zona utilizando alcohol al 70%.
- 2- Calentar el ansa hasta que se ponga roja. Enfriar el ansa en el medio con agar.



3- Tomar un inóculo de bacteria y sembrar en la placa por agotamiento de la siguiente manera:



4- Colocar en estufa a 37°C con la tapa hacia abajo.

5- Repetir desde el punto 2 para cultivo en LB-agar-ampicilina.

Procedimiento:

1- Colocar 50 µl de bacterias competentes en tubo eppendorf de 1,5 ml estéril y agregar 20 ng de ADN plasmídico o H₂O según el caso. Mezclar suavemente e incubar en hielo 10 min.

Grupo A (problema): Plásmido con fragmento

(Control 1): H₂O

Grupo B (Control 2): Plásmido digerido

(Control 3): Plásmido ligado sin fragmento con concentración conocida para calcular la eficiencia de transformación

2- Transferir a baño a 42° C durante 2 min.

3- Rápidamente transferir a hielo 5 min.

4- Agregar 400 µl de LB estéril e incubar 30 min a 37° en agitación para expresar resistencia a ampicilina.

5- Centrifugar las bacterias transformadas y resuspender en 100 µl. Sembrar en placa con LB/agar/amp. Dispersar con espátula y dejar a T° ambiente para absorber líquido.

6- Incubar la placa a 37°C invertida hasta aparición de colonias 12-16 h.

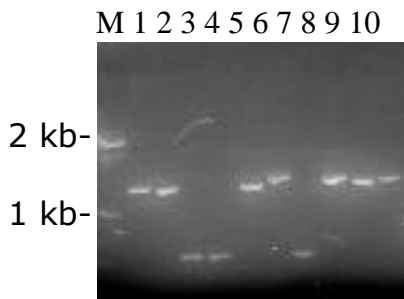
Ejercicios:

1) <A partir de los siguientes esquemas interpretar los posibles resultados de la transformación de las bacterias:



2) El chequeo de las colonias obtenidas es un hábito de rutina para diferenciar las colonias que contienen el plásmido sin fragmento de las que tienen el plásmido con el fragmento. Si bien un vector como el pBluescript II KS- posee el sistema de selección de colonias positivas por α -complementación, la efectividad del método no siempre es del 100 %, y el chequeo de colonias es necesario para confirmar la positividad de las colonias. ¿Qué técnicas utilizaría para chequear las colonias positivas?

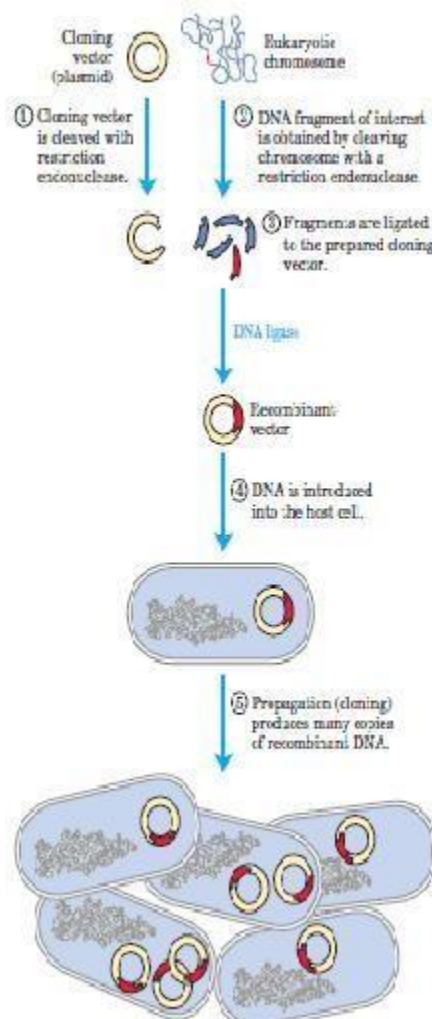
3) Interpretar el siguiente gel. Este corresponde a PCR de bacterias que fueron clonadas con un plásmido pBluescript conteniendo el fragmento α -amilasa (1522 pares de bases). La PCR se realizó con los primers T3 y T7 (ver esquema del plásmido en la guía de TP 7). ¿Cuáles bacterias poseen el inserto?



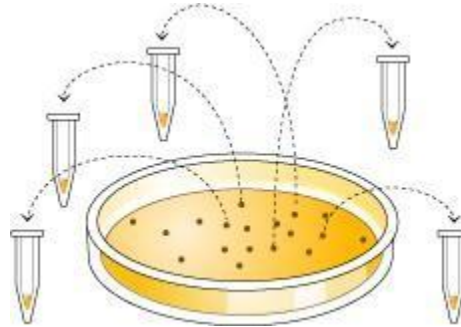
TRABAJO PRACTICO N°6

CHEQUEO POR PCR DE BACTERIAS TRANSFORMADAS

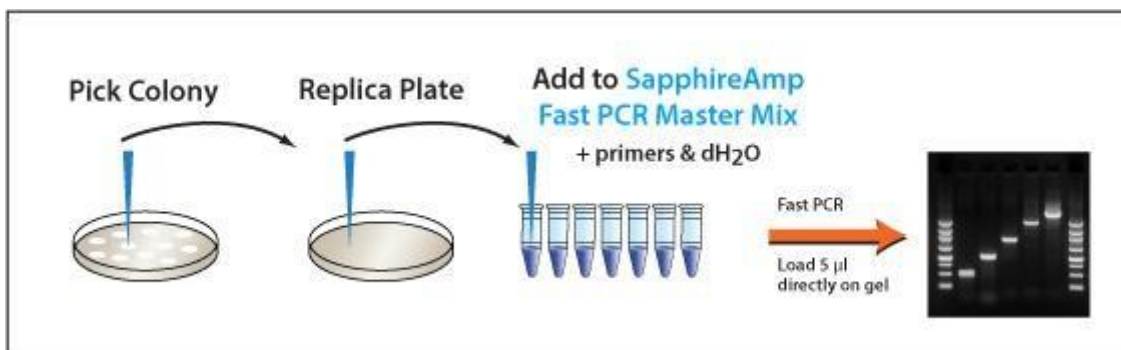
En el práctico anterior se realizó una *transformación* de bacterias competentes, es decir la inserción de una molécula recombinante (plásmido con inserto del gen de α -amilasa) en una célula procarionta.



En el trabajo práctico de hoy realizaremos la técnica de *Colony PCR*, ésta es una de las variantes de la PCR convencional (se recomienda repasar conceptos básicos de PCR en el práctico N°3). Consiste en una reacción de PCR de cada colonia bacteriana analizada, con el fin de rastrear las colonias que contienen la secuencia nucleotídica deseada. El DNA de las colonias no ha tenido que ser aislado previamente, sino que se usan las bacterias directamente ya que muchas de ellas se lisan durante el primer paso de desnaturalización, haciendo su DNA accesible al cebado de la PCR.



Mediante esta metodología, de un conjunto de colonias puede determinarse, usando los cebadores del fragmento de DNA deseado, las que contienen o no el inserto de interés. De esta forma solamente las colonias positivas que se obtengan se cultivarán y se aislará suficiente DNA para su análisis posterior.



Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Materiales:

- Buffer 10X
- MgCl₂
- dNTPs 25uM
- Taq polimerasa
- Primer sense (Forward)
- Primer antisense (Reverse)
- Agua miliQ

Procedimiento:

Se prepara la Master Mix en las siguientes proporciones:

Buffer	2,5 μ l
Primer (1,5 c/u)	3,0 μ l
dNTP	0,5 μ l
MgCl ₂	0,8 μ l
Polimerasa	0,2 μ l
<u>H₂O</u>	18 μ l
Total	25 μ l

Se selecciona la colonia que se desea chequear si posee el inserto y con un tip estéril se la toca para retirar suficiente material para la reacción, pero teniendo la precaución de dejar suficiente material para que siga creciendo la colonia. La misma deberá ser debidamente identificada. Luego se sumerge el tip en el tubo con la mezcla de reacción, se lleva al termociclador y se corre el siguiente programa de PCR.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	2 min
35	94	20seg
	55	30seg
	72	2min
1	72	5min

TRABAJO PRÁCTICO N°7

INDUCCIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

OBJETIVOS

El presente trabajo práctico tiene como objetivo culminar con el experimento de clonación y expresión de genes heterólogos para su futuro análisis funcional. Durante el mismo se procederá a la inducción de la expresión de moléculas recombinantes de la enzima alfa amilasa pancreática en bacterias para su posterior análisis. El práctico se constituye de tres partes: primera parte, inducción de expresión y preparación de muestras; segunda parte, electroforesis de proteínas totales y tinción para visualización de proteínas inducidas y tercera parte (por cuestiones de tiempo se realizará en el trabajo práctico N°8), purificación y análisis funcional de proteínas recombinantes.

INTRODUCCIÓN

La expresión de proteínas heterólogas se ha constituido como una herramienta de mucho uso en el laboratorio de investigación en biología molecular, como así también para las industrias alimenticias, farmacéuticas y biotecnológicas. La incorporación de la tecnología del ADN recombinante se ha constituido como una estrategia reproducible para sintetizar grandes cantidades de proteínas que presentan una utilidad en medicina o de otro tipo, siendo un ejemplo típico la producción de la insulina humana recombinante.

La secuencia codificante de ADN para la proteína en cuestión se incorpora mediante un vector apropiadamente seleccionado en células procariontes y/o eucariontes, donde se transcribe y traduce el gen de interés utilizando la maquinaria biosintética de la célula huésped. El investigador debe tener en cuenta los siguientes puntos críticos a los fines de poder asegurar la efectividad y reproducibilidad de los resultados:

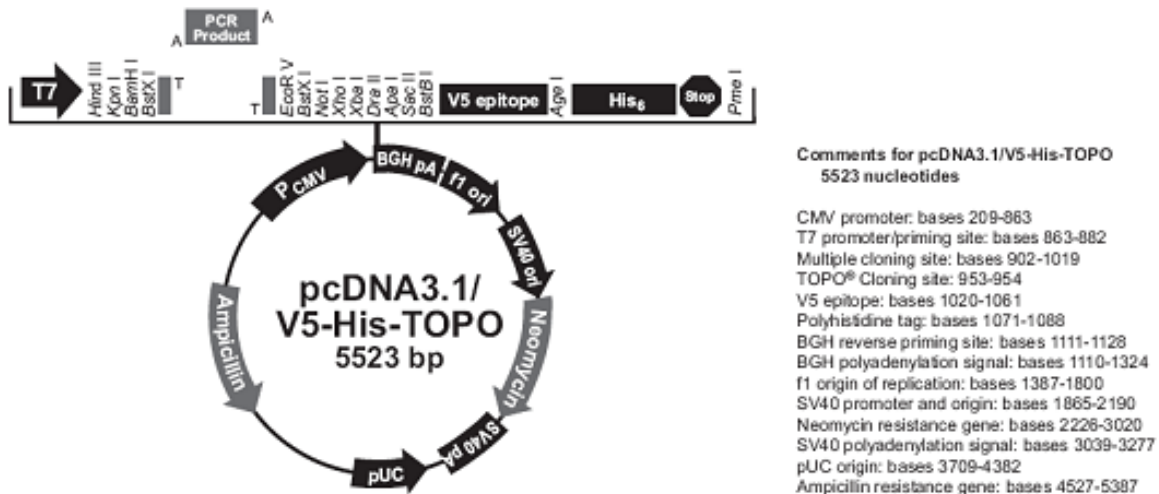
1. Seleccionar adecuadamente el vector a utilizar para incorporar la secuencia del ADN a la célula huésped.
2. Elegir el tipo de célula huésped a utilizar.
3. Seleccionar los clones que contenga la secuencia del ADN, amplificarlos y conservarlos para su posterior uso en la producción de proteínas recombinantes de interés.

Una vez seleccionado el vector, y la célula huésped de interés, los pasos a seguir en el laboratorio se basan en el diseño y construcción del vector recombinante para la posterior internalización del mismo en la célula huésped (previa selección del método óptimo para el proceso de transformación o transfección).

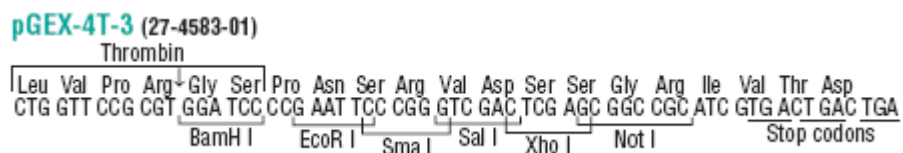
Como se discutió con anterioridad, ciertos vectores de expresión presentan componentes que aseguran la expresión de manera continua de los productos génicos en ellos clonados, los mismos se basan en la presencia de promotores “fuertes” localizados río arriba de la secuencia codificante clonada. Estos vectores, denominados **vectores de expresión constitutiva**, son de gran utilidad para la expresión a gran escala y de manera rápida de proteínas recombinantes. Sin embargo, la expresión de las proteínas recombinantes puede ser regulada mediante la exposición a diversos estímulos controlados por el investigador en

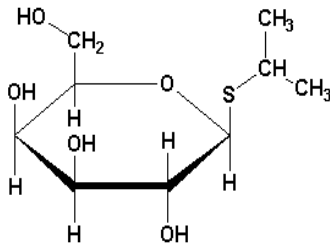
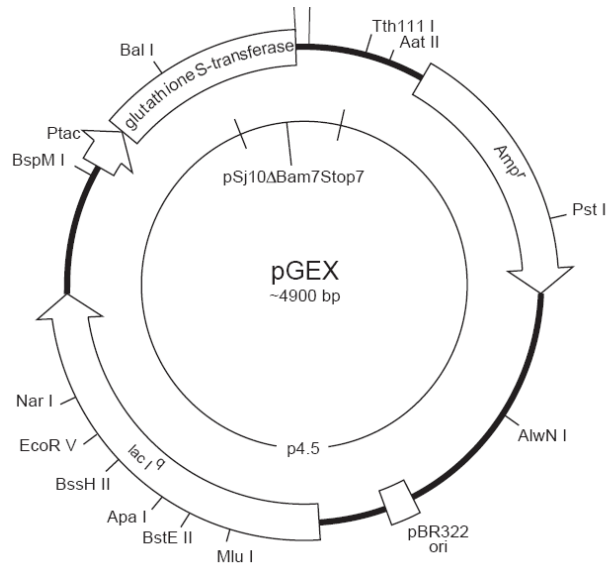
el laboratorio. Comúnmente, se efectúa la adición de ciertos compuestos químicos, denominados **inductores**, los cuales desencadenan el mecanismo de expresión de los genes clonados en estos **vectores de expresión regulada**. La **inducción** de la expresión permite la obtención controlada de las proteínas recombinantes.

Por ejemplo, el vector utilizado para expresión heteróloga en *eucariotas* (pcDNA 3.1) asegura la expresión constitutiva de los productos proteicos clonados, por lo que, luego de que se lleva a cabo el proceso de transformación y selección por antibióticos, las células ya expresarán la proteína de interés, por lo que serán cosechadas y utilizadas en estudios bioquímicos para la determinación de actividad biológica y funcionalidad.



Sin embargo, el vector utilizado en el proceso de transfección y generación de *bacterias* recombinantes se corresponde con un vector de expresión regulada. El mismo, pGEX 4T3, se caracteriza por asegurar una expresión regulada del producto génico clonado, gracias a que el gen de interés se encuentra bajo un tipo de regulación negativa, donde los genes pueden transcribirse siempre, salvo cuando la proteína represora **Lac I** (codificada por el propio vector, lacI^q) se encuentra unida a la región promotora (Ptac), por la cual presenta una elevada afinidad. En este caso, el promotor del gen Lac I es constitutivo, por lo que la proteína Lac I se expresa permanentemente y permanece unida en forma de tetrámero a la zona del promotor, impidiendo que la ARN polimerasa transcriba ese gen. La expresión de la proteína recombinante permanece “apagada” hasta el momento de la inducción por adición de isopropil tiogalactosido (IPTG, inductor). El compuesto IPTG es capaz de unirse a la proteína represora Lac I y generar un cambio conformacional que disminuye su afinidad por la región promotora. De esta forma, se desplaza el represor, el promotor queda libre y la ARN polimerasa puede transcribir libremente el gen.





IPTG: isopropil tiogalactosido

Primera parte: Inducción de expresión mediante IPTG y preparación de muestras

Debido a que se necesita un cultivo bacteriano en gran escala (500 a 1000 mL), que el proceso de inducción se realiza durante 4 horas aproximadamente y que el límite de tiempo en el laboratorio se reduce a dos horas, los JTP comenzarán el proceso de inducción y le suministrarán a los alumnos las muestras celulares para que los mismos lleven a cabo la preparación de las muestras para la caracterización biológica de las proteínas recombinantes.

Materiales necesarios

- . Medio de cultivo LB con adición de ampicilina (5 ug/mL)
- . Solución de IPTG 1 M (IPTG PM: 238,3 g/mol)
- . Tubos eppendorfs

Protocolo

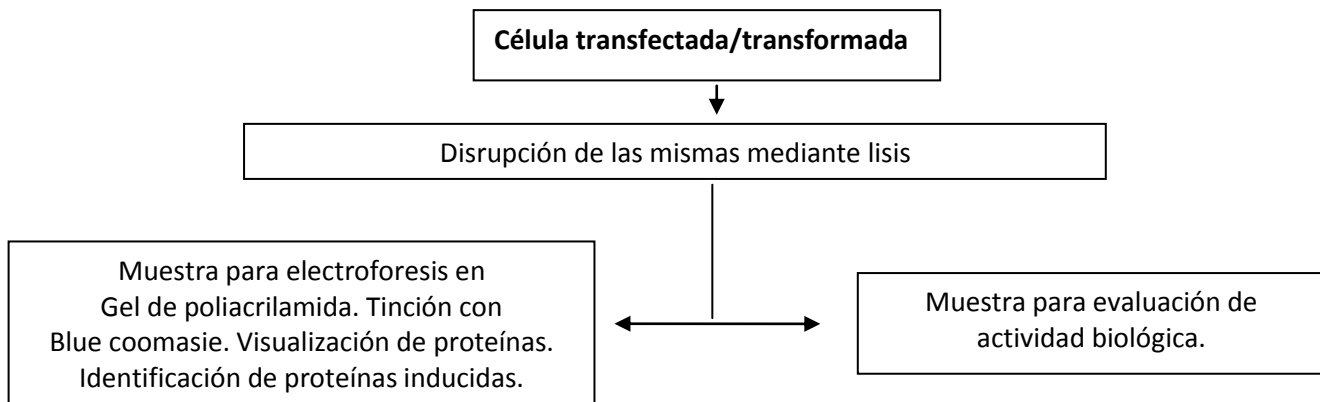
1. Cultivar overnight en LB-amp un inóculo de bacterias transformadas a 37°C en agitación continua (200 rpm).

2. Inocular 1 mL de bacterias en 200 mL de medio LB-amp fresco e incubar durante 1 a 2 horas hasta alcanzar una DO (600 nm) de un valor de entre 0.1 y 0.3, lo cual representa un cultivo en fase exponencial de crecimiento.
3. Previo a la adición del inductor, se toma una muestra de bacterias, las cuales constituyen el control previo a la inducción por IPTG (muestra T0).
4. Adicionar 200 uL de una solución de IPTG 1 M. Incubar en agitación durante 3-4 horas.
5. Tomar muestras a distintos tiempos luego de la inducción (T1: 1 hora post inducción, T2: 2 horas post inducción y T3: 3 horas post inducción).
6. Todas las muestras son centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos y se conserva el pellet a -70 °C hasta el momento de utilizarse.

Procesamiento y preparación de muestras para análisis y caracterización

Debido a que los vectores utilizados en el presente práctico no promueven la liberación de las proteínas recombinantes fuera de la célula, una disrupción mecánica de las mismas es un requisito necesario para la liberación de estas y su posterior estudio.

Mediante sonicación, se puede lograr la homogenización de muestras para ser utilizadas en estudios bioquímicos de cualquier tipo, entre ellos los funcionales que llevaremos a cabo en el presente trabajo práctico. Siguiendo el presente esquema, los alumnos llevaran a cabo la preparación de las muestras a analizar.



Muestras de bacterias: T0: bacterias previas a la inducción
 T1: bacterias 1 hora post inducción
 T2: bacterias 2 horas post inducción
 T3: bacterias 3 horas post inducción

Los distintos pellets se deben de resuspender en 100 uL de buffer de lisis conteniendo inhibidores de proteasas. Este buffer consiste en una preparación con alto porcentaje de detergentes que sirven para romper las células y homogeneizar su contenido. **Nota: todo el procedimiento debe de ser realizado en hielo para evitar la degradación de las proteínas.**

Luego de realizado el proceso de homogenización de la muestra, la misma debe ser fraccionada en dos partes, una de ellas se constituirá en la muestra a utilizar para la separación electroforética de proteínas en geles de poliacrilamida y la fracción restante se

utilizará para la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad (conservar dicha muestra a -70°C hasta el momento de uso).

Segunda parte: electroforesis de proteínas totales y tinción para visualización de proteínas inducidas

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis es una técnica que permite la separación de una muestra de componentes en función de su tamaño, forma y carga cuando la misma es sometida a la acción de un campo eléctrico.

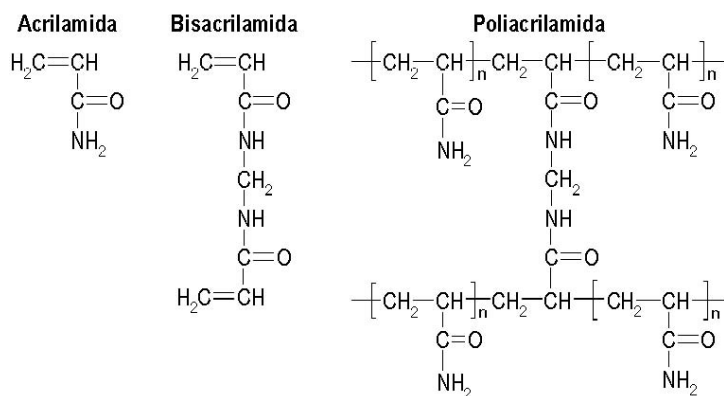
La electroforesis de proteínas realizada sobre un soporte de poliacrilamida (PAGE) permite la separación de los componentes de una mezcla de proteínas en función de su tamaño, peso y conformación, existiendo variantes como la electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), la cual permite la separación en función sólo del tamaño, ya que todas las proteínas de una muestra se cargan negativamente debido a la presencia de un detergente aniónico.

Preparación del soporte.

El soporte se prepara a partir de monómeros de acrilamida, los cuales forman largas cadenas lineales, con abundantes grupos polares que las hace solubles en medios acuosos. Para proveer el entrecruzamiento entre cadenas de poliacrilamida, se utiliza otro monómero, la N,N'-metilen-bisacrilamida que forma parte de dos cadenas que quedan así unidas covalentemente.

La concentración de acrilamida determina el tamaño del poro, mientras que la cantidad de bisacrilamida condiciona el grado de entrecruzamiento de las cadenas. Ambos componentes determinan, en conjunto, las características físicas del gel resultante: su resistencia mecánica, fragilidad, elasticidad, grado de reticulación (tamaño de poro), etc.

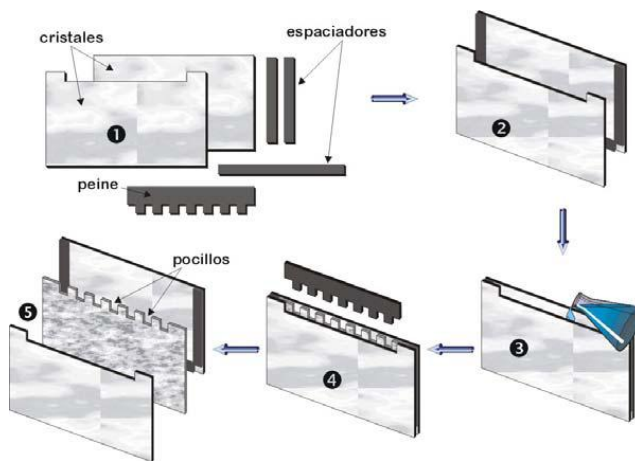
Los monómeros (ya sea en polvo o en disolución) son **neurotóxicos** por absorción a través de la piel o por inhalación. Por ello, deben manejarse en una campana extractora con guantes y mascarilla. Una vez realizada la polimerización, la toxicidad se reduce al mínimo, pero es recomendable continuar manipulando el gel con guantes, debido a la posible presencia de radicales libres.



Estructura química de monómeros de acrilamida- bis acrilamida.

Gel de poliacrilamida

Preparación del soporte para electroforesis

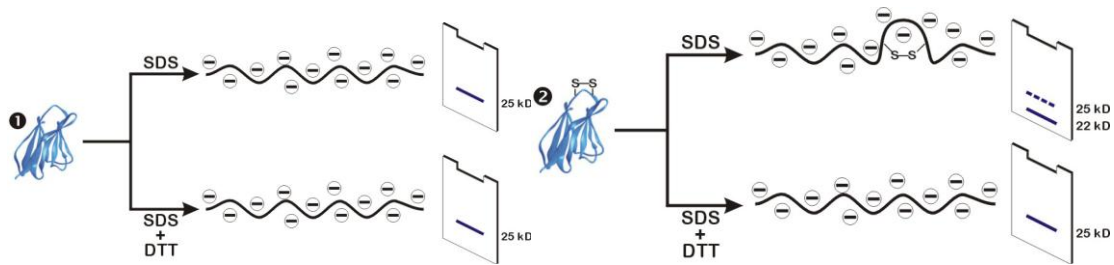


Como se aclaró más arriba, la adición de SDS (detergente aniónico) a los geles y buffers donde se llevara a cabo la electroforesis permite que la separación de las proteínas se realice en función del *tamaño* y no de la carga, permitiendo el cálculo de parámetros moleculares. El SDS interacciona con las proteínas formando complejos de características comunes independientemente de las de cada proteína. Las proteínas unen una molécula de SDS por cada dos aminoácidos, lo que implica que las cargas propias de las proteínas quedan enmascaradas; asimismo, la molécula de SDS proporciona una carga negativa, por lo que los complejos SDS-proteína están cargados negativamente de forma uniforme (la carga por unidad de masa es prácticamente constante para todos los complejos). Como ya se ha comentado, la movilidad electroforética en una PAGE es función del tamaño, por ende, cuanto menor sea la masa molecular de la proteína, mayor será la movilidad de la misma y viceversa.

En resumen, la SDS-PAGE es la electroforesis más utilizada para el análisis de proteínas debido a:

- La gran mayoría de las proteínas son solubles en SDS.
- Todos los complejos SDS-proteína tienen carga negativa y migran, por lo tanto, en el mismo sentido.
- Su densidad de carga es muy elevada, por lo que su velocidad de migración también lo es y las electroforesis son muy rápidas.
- La separación depende de un parámetro físico-químico, como es la masa molecular, la cual puede ser calculada.
- Los complejos SDS-proteína se tiñen fácilmente.

La SDS-PAGE puede realizarse en condiciones reductoras o no reductoras; la ausencia de reductores se traduce en que si las proteínas poseen puentes disulfuro, el SDS sólo producirá una desorganización *parcial* de la estructura. Es por esto que la adición de agentes reductores (β mercaptoetanol, DTT-ditiotereitol) al buffer de carga promueve la desnaturalización y pérdida de estructuras en las proteínas presentes en la muestra.

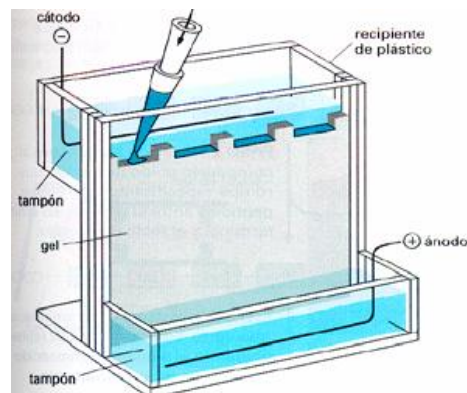


Efecto de la presencia de agentes reductores en electroforesis reductoras de proteínas con estructuras terciarias.

Preparación de muestras para electroforesis de proteínas totales extraídas de bacterias inducidas

Nota: debido a que debemos evitar la degradación de las proteínas presentes en la muestras las mismas serán manipuladas utilizando guantes y en hielo.

1. Trabajar en hielo, y separar 30 uL de cada una de las muestras obtenidas en el proceso de homogenización.
2. Traspasar este volumen a un nuevo eppendorf y añadir 30 uL de buffer de carga 2X
3. Hervir la muestra durante 5-10 minutos
4. Poner la muestra nuevamente en hielo y sembrar en un gel SDS-PAGE. Añadir en una de las calles del gel una muestra de patrón de peso molecular.
5. Encender la fuente de poder. Correr a 100 voltios constantes durante 15 minutos.
6. Subir la potencia a 200 voltios constantes y dejar correr durante aproximadamente 1 hora.
7. Desmontar el soporte y someter la muestra a tinción con colorante azul Coomassie para la detección de las proteínas inducidas.



Tinción de proteínas con Solución de Azul de Coomassie

Esta técnica nos permite la visualización de proteínas que han sido previamente separadas en un soporte gelatinoso. El colorante Azul de Coomassie se une de manera no específica a todas las proteínas presentes en el soporte que se encuentra en contacto con él. La intensidad del azul resultante es proporcional a la cantidad de proteína presente.

TRABAJO PRÁCTICO N°8

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS MISMAS

Una vez que la proteína recombinante ha sido expresada por nuestro sistema y su presencia se ha corroborado por SDS-PAGE, para su uso, la misma deberá ser aislada de una mezcla compleja de diferentes proteínas bacterianas, dicho proceso es denominado purificación. En una primera instancia, para lograr obtener una proteína pura, ésta deberá contar con una característica única que la distinga del resto, como por ejemplo, su tamaño, capacidad de unir un ligando, interacción con un sustrato, etc. Una técnica ampliamente utilizada para este propósito es la cromatografía de afinidad.

La cromatografía de afinidad es un método muy difundido para la purificación de una molécula específica de un grupo de moléculas de una mezcla compleja. Se basa en la interacción biológica específica entre dos moléculas, estas interacciones son típicamente reversibles y se les saca provecho al ubicar una de las moléculas interactuantes sobre una matriz sólida creando una fase estacionaria, mientras que la molécula blanco se encuentra en la fase móvil. Es decir, que un soporte presenta un sustrato de unión o un anticuerpo que reconozca parte de la proteína recombinante y de esta manera, la misma queda secuestrada y retenida en ese soporte mientras que el resto de las proteínas pasan por la columna sin ser retenidas.

Existen diversos sistemas de purificación disponibles comercialmente. El vector utilizado durante el presente trabajo práctico permite la generación de proteínas de fusión a tags o “etiquetas”. La proteína recombinante producida en bacterias mediante la utilización del vector pGEX4T3 es una proteína de fusión a un tag de Glutación S-Transferasa (GST), mientras que la proteína recombinante producida en células CHO mediante el uso del vector pcDNA 3.1 presenta un tag de 6xHis (6 residuos de histidinas). Ambas proteínas recombinantes pueden ser purificadas de una mezcla de proteínas totales mediante la utilización de columnas de cromatografía de afinidad. En el primer caso, la fase estacionaria posee el sustrato de GST, glutatión, unido covalentemente.

Purificación de proteínas de fusión a GST (expresión en bacterias)

Para la purificación de proteínas de fusión a GST, generadas por inducción de bacterias transformadas con el vector pGEX4T3, se realizará utilizando columnas de cromatografía de afinidad con una resina unida a glutatión (sustrato de unión a GST).

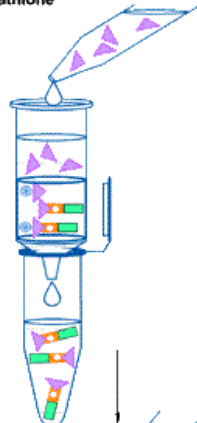
Column Method: RediPack Purification Module

■ Add cell lysate to prepacked
Glutathione Sepharose 4B

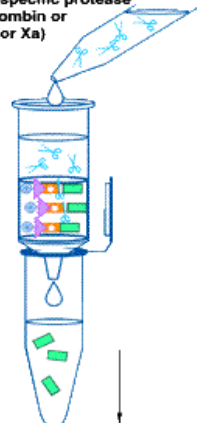


■ Wash

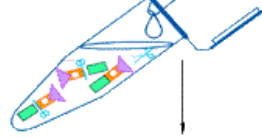
■ Elute with Reduced
Glutathione



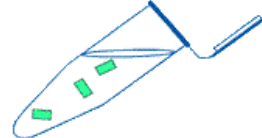
■ Cleave fusion protein with
site-specific protease
(Thrombin or
Factor Xa)



■ Cleave fusion protein
with site-specific
protease
(Thrombin or
Factor Xa)



■ Collect eluate



■ Analyze protein on SDS-PAGE

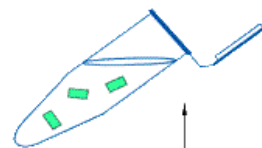


■ Dialyze

■ Add sample to prepacked
Glutathione Sepharose 4B



■ Analyze protein on SDS-PAGE



■ Collect eluate

Protocolo de purificación

Las bacterias previamente cosechadas y homogenizadas mediante el uso de buffer de lisis son sometidas ahora al paso por una columna de afinidad que presenta glutatión como agente que “secuestra” proteínas de fusión a GST. El protocolo a seguir es el siguiente:

1. Armar un dispositivo de purificación por cada una de las muestras a analizar. Cada dispositivo consta de una columna que presenta la resina junto con el glutatión y un eppendorf donde se recogerá el eluido del proceso.
2. Depositar en la columna el volumen de lisado a purificar y dejar asentar 1 minuto
3. Centrifugar cada dispositivo durante 5 minutos a 2500 rpm (es aquí cuando los tags de GST se unen a la resina con glutatión)
4. Lavar 2 veces la columna con buffer de lavado. Agregar un volumen de buffer de lavado y centrifugar a 2500 rpm durante 5 min.
5. Agregar un volumen de buffer de elusión (conteniendo trombina). Dejar actuar 2 minutos y centrifugar 5 min a 2500 rpm. Los eluidos obtenidos contienen la proteína ya purificada. Si se necesita una purificación fraccionada se agregan varios volúmenes de buffer de elusión y se obtienen diferentes fracciones con distintas concentraciones de proteína recombinante.
6. Conservar las muestras a -70°C hasta el momento de su uso.

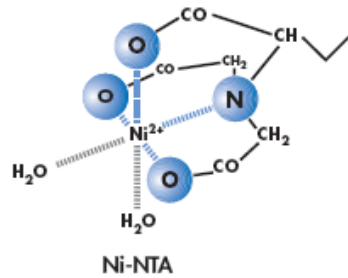
Materiales necesarios:

- Columnas de glutatión sefarosa 4B
- Buffer de lavado: 250 mM Tris-HCl pH 8.5, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA.
- Buffer de elusión: buffer de lavado con el agregado de trombina

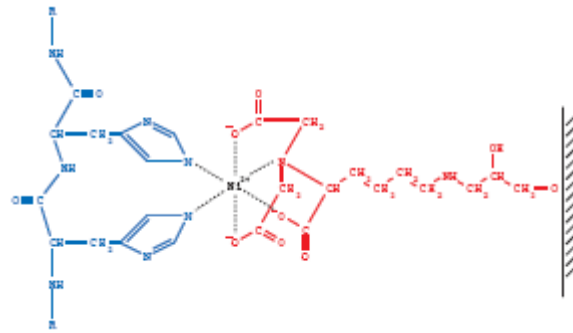
Purificación de proteínas de fusión a 6xHis (expresión en células CHO)

La cromatografía de afinidad por unión a metales para la purificación de proteínas fue utilizada por primera vez en 1975. En la actualidad, se utilizan resinas que unen metales como níquel (Ni) para la purificación de proteínas recombinantes que contengan una secuencia específica de seis residuos histidinas (6xHis tag). De esta manera, las proteínas que se encuentren fusionadas a 6xHis se unirán fuertemente a los iones de Ni inmovilizados permitiendo así la purificación de la proteína.

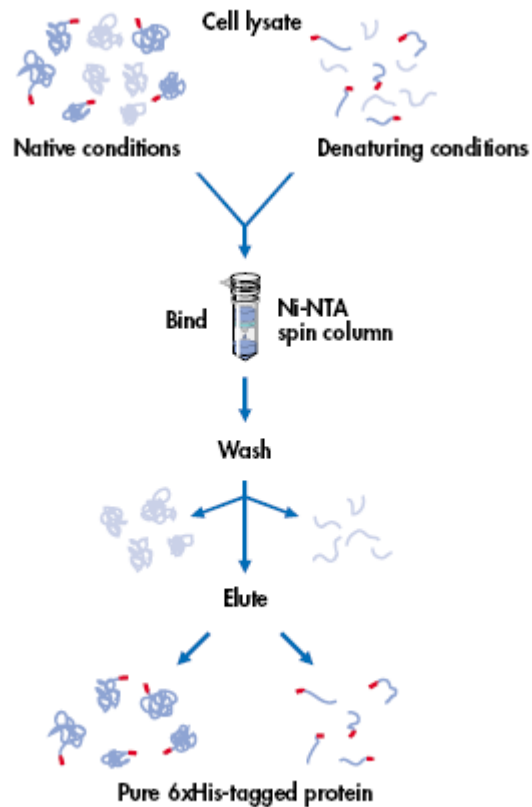
A



B



A) Interacción de la resina (NTA) con iones níquel. B) Interacción entre los residuos de histidina y la matriz Ni-resina.



Procedimiento de purificación utilizando columnas de Ni-NTA.

Protocolo de purificación

1. Agregar el sobrenadante obtenido del procesamiento de las células transfectadas a las columnas conteniendo resina Ni-NTA e incubar por 3 minutos.

2. Centrifugar 5 minutos a 2500 rpm. En este paso la enzima recombinante quedara adherida a la resina.
3. Remover contaminantes mediante el agregado de 500 ul de solución de lavado conteniendo 8 M de urea, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M de Trizma-HCl, pH 6.3 y centrifugar nuevamente 5 minutos a 2500 rpm.
4. Recuperar la proteína en tubos nuevos que contienen buffer PBS pH 7 mediante un proceso de elusión usando 100 ul de una solución conteniendo 8 M de urea, 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.01 M de Trizma-HCl, pH 4.5, 1mM de Imidazol (el imidazol compete por los residuos de Ni y promueven la elusión de la proteína recombinante).
5. Conservar las proteínas a -70°c hasta el momento de su utilización

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA α - AMILASA RECOMBINANTE PURIFICADA

Fundamento del método:

La actividad de una enzima se mide determinando la velocidad de desaparición de un sustrato o la velocidad de formación de un producto. Se puede medir la concentración de producto o sustrato después de haber sido detenida la reacción por inactivación de la enzima o medir el cambio de concentración de producto o sustrato mientras está transcurriendo la reacción. En este caso podremos reconocer la acción de la amilasa salival sobre el almidón estudiando el sustrato que no ha sido hidrolizado, lo cual se hace evidente por la disminución de la formación del complejo almidón-yodo.

Materiales necesarios:

Sustrato de la enzima: Solución de Almidón
Enzima: Amilasa salival
Tubos de ensayo
Gradillas
Pipetas
Baño termostatzado
Espectrofotómetro
Papel indicador de pH
Solución de Yodo.

Protocolo:

1. Tomar 4 tubos de ensayo y rotularlos (control -; control +; Bacteria, CHO) y colocar en cada uno de ellos 200 uL de solución de almidón.
2. Poner los tubos a 37° C y esperar unos minutos a que tomen temperatura.
3. Agregar en cada uno de ellos lo siguiente, mezclar y llevar nuevamente al baño termostatzado:
 - control -: 10 uL de agua destilada
 - control +: 10 uL de saliva
 - Bacteria: 10 uL de α -amilasa recombinante purificada de bacterias
 - CHO : 10 uL de α -amilasa recombinante purificada de células CHO
4. Dejar transcurrir la reacción durante 5 minutos.
5. Interrumpir la reacción agregando a cada tubo 200 ul de la solución de yodo.
6. Agregar a cada tubo 2 ml de agua destilada.
7. Interpretar los resultados observando los cambios de color o midiendo la absorbancia de los tubos en un espectrofotómetro.

DISCUSIÓN FINAL

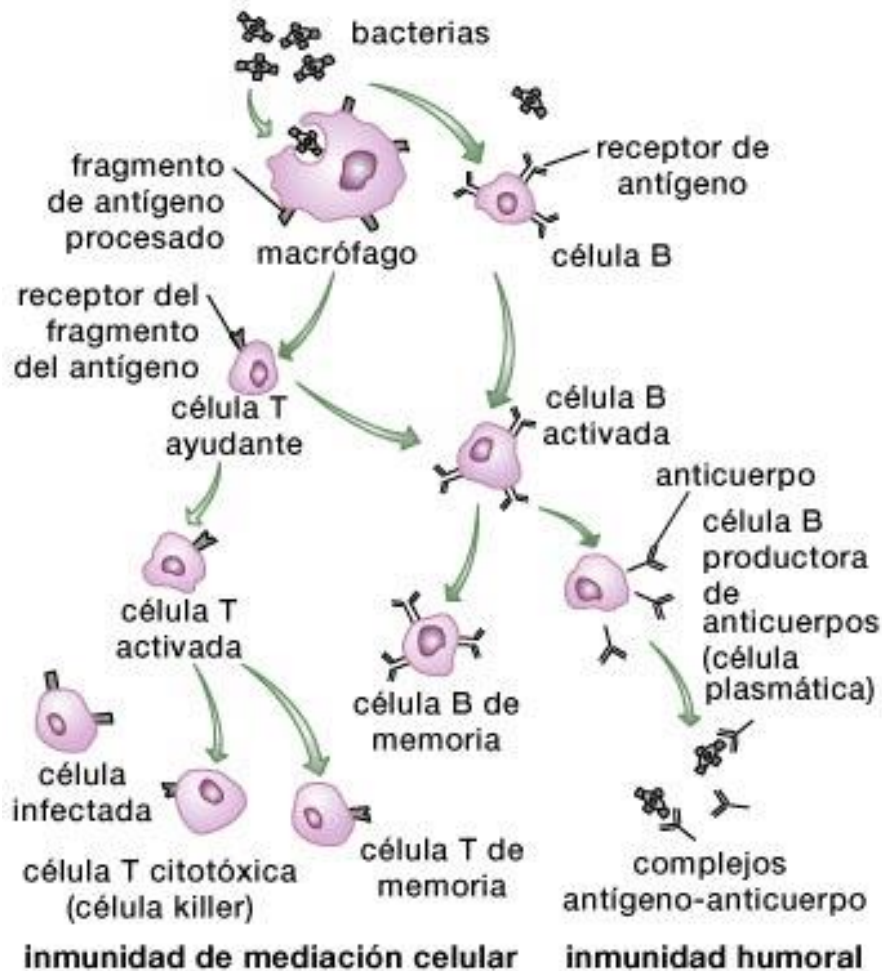
Discuta los resultados obtenidos en el transcurso del práctico y si ellos corresponden a los esperados. De no ser así proponga las posibles causas.

TRABAJO PRACTICO N°9 - SISTEMA INMUNITARIO

El organismo humano está expuesto a la invasión de una amplia variedad de agentes potencialmente patógenos (bacterias, virus, parásitos, hongos) que pueden ocasionar diferentes enfermedades. Los individuos normales disponen de sistemas de defensa capaces de protegerlos, llamado en su conjunto *sistema inmunitario (SI)*. Este es capaz de reconocer componentes del agente patógeno e iniciar una serie de respuestas encaminadas a eliminarlo cuyas características fundamentales son la especificidad y la memoria. Es decir, puede discriminar entre los componentes propios y ajenos del organismo, y además registra el primer contacto con el agente extraño y en encuentros posteriores con ese mismo agente el SI lo reconocerá produciendo una respuesta más rápida, intensa y eficaz.

Otros sistemas son inespecíficos: a) piel y mucosas, cuya integridad opone una barrera; b) enzimas de acción antimicrobiana (lisozima, peroxidasa); c) células y mediadores químicos que participan en los procesos de inflamación y promueven la destrucción de agentes nocivos. Desde una concepción clásica se ha hablado de *inmunidad humoral* cuando la respuesta inmunitaria está mediada por **anticuerpos** y de *inmunidad celular* cuando está mediada por **células**.

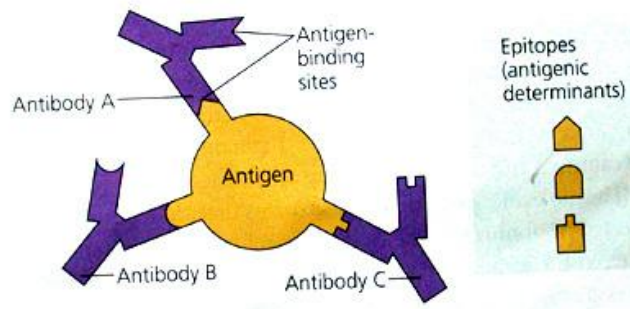
Las principales células que participan en las respuestas inmunitarias son los leucocitos, los glóbulos blancos de la sangre, de los que se distinguen varios tipos como los linfocitos B y T, los monocitos, etc., que mediante su presencia y la secreción de diferentes sustancias solubles que son capaces de producir, median en la respuesta del **SI** ante una agresión.



Antígeno

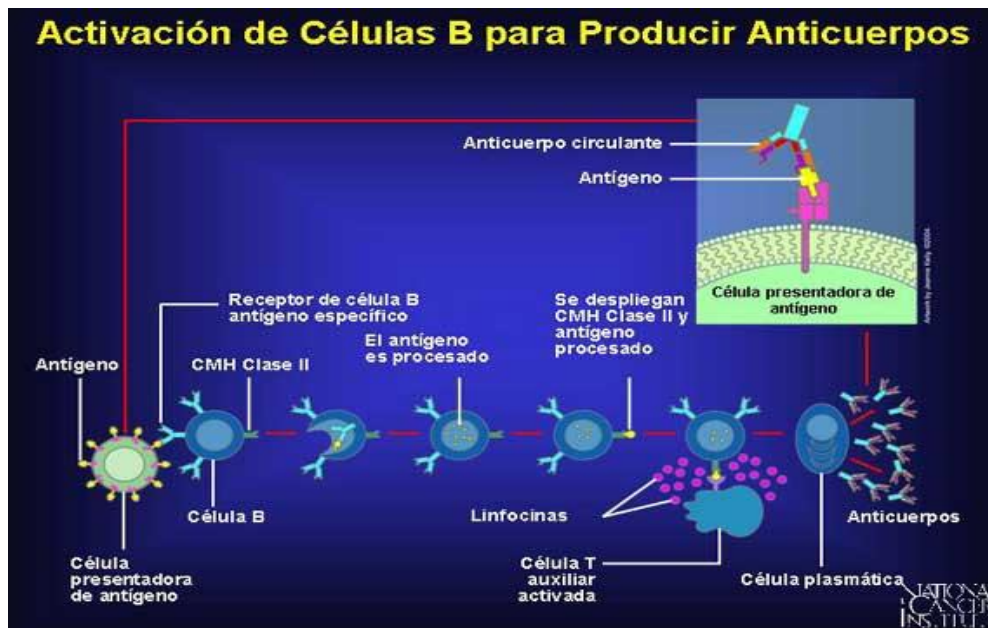
Las moléculas capaces de inducir una respuesta del sistema inmune se las denomina *Antígenos* (Ag). A veces el sistema inmune no reconoce a toda la molécula como extraña, sino a algunas partes pequeñas de la misma, denominadas *epitopes o determinantes antigénicos*. Los antígenos suelen ser proteínas, glicoproteínas o glicolípidos. Los hidratos de carbono, ácidos nucleicos y lípidos son poco antigénicos.

Macromoléculas como proteínas y heteropolisacáridos son antigénicas en la medida en que presenten diferencias estructurales con las constituyentes del propio organismo. Penetran al organismo por cualquier vía: formando parte de microorganismos, de compuestos químicos (medicamentos, alimentos), de tejidos transplantados, etc.



Anticuerpos o Inmunoglobulinas

Los anticuerpos (Ac), también conocidos como inmunoglobulinas, son un grupo de moléculas séricas que producen los linfocitos B (en realidad las células plasmáticas que derivan de estos). Si bien existen varias clases de inmunoglobulinas la estructura básica de todas ellas es semejante, constituida por cuatro cadenas polipeptídicas dispuestas en forma asimétrica, el conjunto semeja una letra Y. Además de las cadenas polipeptídicas básicas muchas inmunoglobulinas poseen un componente glucídico.

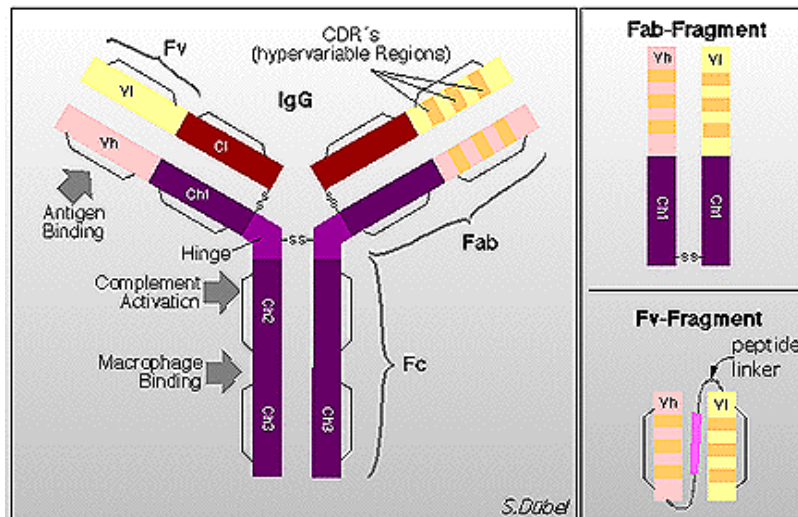


Dos de estas cadenas tienen mayor masa por lo que se las denomina “pesadas” y otras dos cadenas más pequeñas llamadas “livianas”. Las cuatro cadenas se mantienen unidas mediante puentes disulfuro intercatenarios e interacciones no covalentes. En estas cadenas pesadas, y a

nivel de los puentes disulfuro intercatenarios, hay una zona de unos 15 aminoácidos de gran flexibilidad debido a su estructura y constituye lo que se denomina **zona bisagra** por donde se deforma la molécula de inmunoglobulina cuando se produce la unión con el antígeno, facilitándose así su acoplamiento con éste.

El sitio por el cual se unen al Ag es específico de cada uno, la parte de la molécula que se une al Ag se denomina región Fab (*fragment antigen binding*) mientras que la zona que interactúa con otros elementos del SI se denomina región Fc (algunas células del SI tienen sobre su superficie receptores de Fc por lo que si un Ac se une a un patógeno esas células también pueden unirse a él).

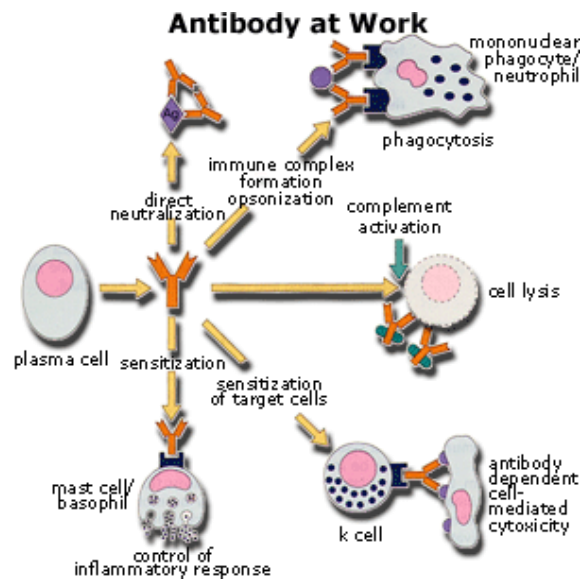
Tanto en las cadenas livianas como en las pesadas existen zonas o dominios denominados como **zona variable** y **zona constante**. Las zonas variables ubicadas hacia el extremo amínico de la proteína y las zonas constantes hacia el extremo carboxílico. Las zonas variables, tanto de la cadena L como H, poseen a su vez unas regiones en donde se concentra fundamentalmente la variabilidad. Son pequeños segmentos que constituyen las denominadas regiones o **segmentos hipervariables**, pues determinan la forma del centro activo que permite el reconocimiento y unión al antígeno. Cambios en muy pocos aminoácidos de estas zonas suponen una enorme diversidad de posibilidades de unión al antígeno sin variar el resto de la molécula.



La región constante es diferente según la clase de inmunoglobulina que consideremos, determinando la existencia de cinco tipos de cadenas pesadas: G, A, M, D y E que definen a su vez las cinco clases de inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE respectivamente. Debido a esta distinta estructura, las cadenas pesadas van a presentar distintas propiedades biológicas, tales como la capacidad de unirse entre sí, fijar complemento, fijar la pieza de secreción y unirse a macrófagos, neutrófilos y células NK (*natural killers*).

Las inmunoglobulinas se encuentran distribuidas en todos los fluidos orgánicos de la economía de los vertebrados y en las membranas de los linfocitos B y células plasmáticas. Las cantidades relativas de cada una de las clases de inmunoglobulinas en los diferentes compartimentos del organismo son muy diferentes. En el torrente sanguíneo predomina la IgG mientras que en las secreciones (saliva, lágrimas, secreción bronquial, así como en el líquido cefalorraquídeo y mucosas) la IgA es la predominante. Los niveles de inmunoglobulinas séricas fluctúan ampliamente en función de diversos aspectos, tales como el estado nutricional, la edad, etc. La función esencial de las inmunoglobulinas es la de unirse al antígeno, actuando como receptoras de señales antigénicas, o bien colaborando en la destrucción antigénica. La primera función se presenta cuando las inmunoglobulinas se encuentran insertas en la membrana de los linfocitos B (inmunoglobulinas de membrana), y

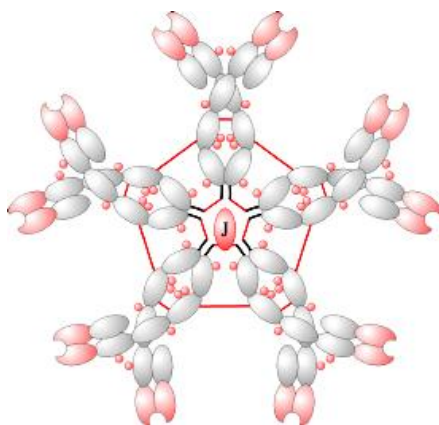
para la segunda requieren la colaboración del complemento, macrófagos, neutrófilos y células NK, que tienen la propiedad de unir las inmunoglobulinas por su extremo Fc.



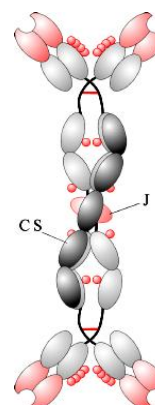
Clase	Concentración en plasma (mg/dL)	Porcentaje %
IgG	1.250	75,6
IgA	250	15,1
IgM	130	7,9
IgD	20	1,2
IgE	3	0,2

Las inmunoglobulinas G, D y E están constituidas por una sola unidad estructural determinando así dos sitios de unión con el antígeno. Las IgM son generalmente pentámeros unidos a través de puentes disulfuro, presentando 10 sitios posibles de unión con el antígeno. Las IgA se encuentran en el plasma como monómero, pero en las secreciones (saliva, lágrimas, leche materna) y en las mucosas de los tractos genitourinario y gastrointestinal donde son más abundantes se presentan como dímeros.

Las Igs no monoméricas poseen una cadena adicional llamada J o segmento de unión, el cual permite un buen ensamble entre las subunidades, además facilita el transporte de la IgA y la protege de posibles ataques de proteasas.



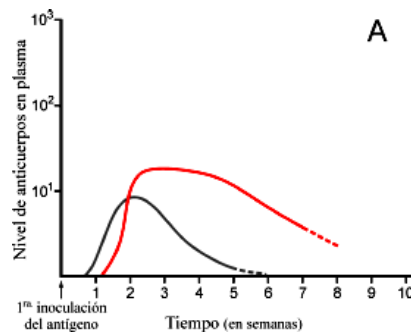
IgM



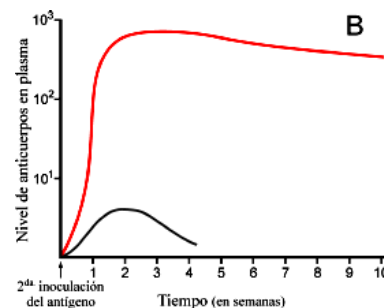
IgA

Cinética de la respuesta inmune

Cuando el sistema inmunitario contacta por primera vez con el antígeno se produce la *respuesta primaria*, que se manifiesta con la aparición en el plasma (quinto día) de anticuerpos tipo IgM específicos para ese antígeno. Días después aparecen anticuerpos tipo IgG de igual especificidad. La concentración de IgM descenderá rápidamente y la de IgG se mantendrá hasta 20 días después del ingreso del antígeno. Luego de este lapso la concentración disminuirá lentamente hasta alcanzar los valores normales.



Si tiempo después (meses, años) se vuelve a producir el ingreso del mismo antígeno, se lleva a cabo la *respuesta secundaria*. Esta respuesta se caracteriza por la aparición mucho más rápida en plasma de Igs y en concentraciones mucho más elevadas que en la respuesta primaria. La inmunoglobulina predominante desde el comienzo es la IgG, con una afinidad por el antígeno mayor que en la respuesta primaria.



Además de las inmunoglobulinas, muchos factores intervienen en la respuesta inmune tales como el sistema de complemento, los linfocitos T y las citoquinas.

El *sistema de complemento* está constituido por un conjunto de proteínas del plasma sanguíneo que participan en acciones de defensa. Muchas de ellas son zimógenos y su activación en cascada pone en funcionamiento el sistema. Este sistema promueve la lisis o fagocitosis de células extrañas, bacterias y virus, y puede ser activado por dos vías, una llamada clásica y otra alternativa. Esta acción solo se ejerce en membranas adyacentes al sitio de la activación y no dañan las células del propio individuo. Otro importante papel del complemento es eliminar los complejos antígeno-anticuerpo y así prevenir su acumulación.

Otras acciones son mediadas por productos intermedios de estas vías de activación, ciertos fragmentos por ejemplo, tienen capacidad de recubrir partículas o células (fenómeno llamado opsonización) y de esa forma facilitar la acción de los fagocitos. Otros se unen a receptores específicos de células cebadas, basófilos, plaquetas y células del músculo liso, provocando la liberación de histamina, leucotrienos y otros mediadores químicos que producen vasodilatación local, aumento de la permeabilidad vascular y liberación de enzimas lisosomales.

Los *linfocitos T* son los efectores de la inmunidad mediada por células y solo reconocerán al antígeno cuando este les es presentado por otra célula accesoria. Se distinguen dos tipos de linfocitos con funciones diferentes:

- Células auxiliares (*TH o Helper T cells*): Cuando son estimuladas secretan al medio factores que activan la proliferación y diferenciación de otras células. Un grupo de esta clase de linfocitos interactúa con las células B que han fijado el antígeno, induciendo su multiplicación y diferenciación, y la síntesis y secreción de anticuerpos.
- Células T citotóxicas (*Tc o Killer T cells*): Son las responsables de la destrucción de células infectadas por virus u otros agentes patógenos.
- Células citotóxicas naturales (*NK o Natural Killer cells*): son linfocitos que no pertenecen al tipo B o T. Tienen propiedades citotóxicas no específicas, pueden reconocer y destruir células tumorales o infectadas por virus.
- Las citoquinas son sustancias capaces de influir en el sistema inmunitario. Son producidas por linfocitos, monocitos y otras células no linfocíticas. Son mediadores químicos con múltiples acciones biológicas, actúan como factores de crecimiento y maduración, intervienen en la respuesta inflamatoria y alguna de ellas tiene intensa actividad citotóxica sobre algunos tumores malignos.

Tipos de inmunidad:

Natural activa: aquella en que la persona es expuesta al patógeno de forma casual y se enferma, generando una respuesta inmune primaria. Su efecto es duradero, por la producción de células de memoria.

Natural pasiva: la que presentan los niños al nacer y que proviene de Ac producidos por la madre que llegan a través de la placenta. **Solamente** las **IgG** tienen la capacidad de atravesar la placenta. Dura unos meses luego de nacer. También lo reciben los niños lactantes, mientras se alimenten del pecho materno.

Artificial activa: La que se adquiere por vacunación al exponer intencionalmente el cuerpo al Ag de un agente infeccioso o al agente mismo, atenuado o muerto. Es duradera ya que estimula la producción de células de memoria.

Artificial pasiva: La que se adquiere al recibir una inyección de inmunoglobulinas producidas por otra persona o animal. Dura sólo unos meses. Ej: antitetánica.

PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES Y MONOCLONALES

Hasta ahora nos referimos a los anticuerpos humanos, los que se forman como consecuencia de una infección natural o por vacunación. Pero para la mayoría de las reacciones en las que se utilizan los anticuerpos en el laboratorio se utilizan inmunoseros preparados en animales: ratones, conejos, cabras y otros.

El proceso de inmunización es aquel en el cual se inyecta al animal un antígeno en condiciones adecuadas de cantidad, sustancias acompañantes, y número de veces que sean necesarias para alcanzar una buena respuesta inmune.

Cuando inmunizamos un animal con un antígeno determinado y se provoca una respuesta inmune, aumenta notablemente en el suero del animal la cantidad de Igs específicas contra el antígeno inyectado. Como hemos visto, un antígeno puede presentar diferentes epitopes y cada uno de ellos puede ser reconocido por un clon de linfocitos B que producirá anticuerpos dirigidos contra cada uno de esos determinantes antigénicos. Por ello en el suero del animal inmunizado se acumula un número elevado de diferentes moléculas de inmunoglobulinas específicas contra nuestro antígeno, sintetizadas por numerosos clones de linfocitos B y por ello se lo ha denominado: **suero policlonal**

Vamos a imaginar que queremos preparar anticuerpos contra glóbulos rojos (GR) humanos, tendremos que disponer de una solución pura de glóbulos rojos o eritrocitos extraídos de un

humano e inyectarlos en un ratón. Después de varios días el animal habrá fabricado anticuerpos contra los GR humanos. Para obtener los anticuerpos sangraremos al ratón a blanco (esto quiere decir que obtendremos la mayor cantidad de sangre posible bajo anestesia general) y luego separaremos en una centrífuga los glóbulos rojos que sedimentarán dejando en el tubo usado un suero límpido que recogeremos con una pipeta. Es de esperar que este suero contenga las Ig contra los GR humanos y que al poner en contacto en un tubo de ensayo o en una placa el suero con los GR se producirá una reacción antígeno-anticuerpo (similar a la que ocurriría dentro del organismo), reacción que es posible visualizarla de modo directo. Procedimientos similares para obtener sueros inmunes se pueden realizar utilizando otro tipo de antígenos. Cuanto más puro es el antígeno más específicos serán los anticuerpos porque en una mezcla con impurezas se van a formar anticuerpos contra todas las sustancias antigénicas presentes. Hay algo muy importante que mencionar: los anticuerpos, al ser proteínas, también se pueden emplear como antígenos en una reacción, es decir que se pueden generar anticuerpos contra ellos. Así, si un conejo se inocula con Ig de ratón formará anticuerpos contra la Ig de ratón. Este hecho es fundamental para la aplicación de los **inmunoensayos**.

ANTICUERPOS MONOCLONALES

En 1975 George Köhler y el investigador argentino César Milstein fusionaron por primera vez linfocitos con células de un mieloma y obtuvieron un hibridoma: una línea celular inmortal capaz de producir anticuerpos específicos (monoclonales). Por este trabajo, que no patentaron, recibieron el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1984. La importancia de la producción de anticuerpos monoclonales no se evidenció hasta 1987 cuando estos anticuerpos se produjeron en forma regular en ratones y fueron utilizados en el diagnóstico ya que son anticuerpos de pureza excepcional capaces de reconocer y unirse a un antígeno específico.

¿Cómo surgió la idea de obtener anticuerpos monoclonales?

Qué mejor respuesta que recurrir a las palabras del Dr. Milstein:

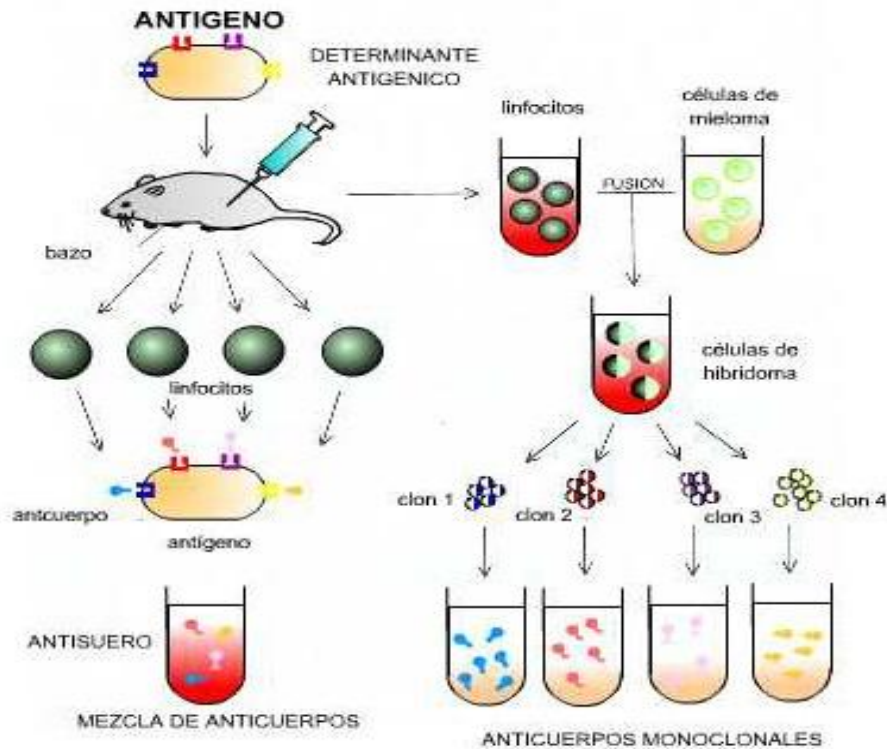
“Imaginemos una gran mezcla de sustancias químicas entre las cuales nos interesa sólo una de ellas. Una sustancia entre millones y millones. Es como una aguja en un pajar. Si tenemos un anticuerpo específico contra una sustancia, ese anticuerpo puede funcionar como un imán capaz de ignorar la existencia del pajar y reconocer exclusivamente la aguja. A los ojos de un anticuerpo, el pajar no existe. Este simple concepto dio lugar a lo que se dio en llamar inmunoensayos que permitieron la medición precisa de hormonas y otras muchas sustancias no sólo en medicina sino en química analítica en general. Los inmunoensayos introdujeron los anticuerpos para su uso como herramienta analítica de importancia fundamental en áreas que nada tenían que ver con la inmunología. El problema era que para preparar un anticuerpo específico era necesario utilizar agujas puras”.

Los anticuerpos monoclonales se producen “*in vitro*” y son la consecuencia de la síntesis de un único clon celular de linfocitos B.

El proceso de obtención de Ac monoclonales es complejo. Se disgrega el bazo de un ratón que ha sido previamente inmunizado con un antígeno, donde se acumulan los linfocitos B, los cuales se caracterizan por tener una escasa viabilidad en cultivo. Estos se fusionan con células de mieloma, las cuales, por el contrario, pueden mantenerse mucho tiempo en cultivo. Estas células además son deficientes en enzimas implicadas en la síntesis de “*de novo*” del ADN como la timidina kinasa o la hipoxantina guanina fosforibosil transferasa. Los productos de la fusión celular se llaman **hibridomas**.

Los productos de la fusión celular se cultivarán en un medio selectivo que contenga los sustratos necesarios para la síntesis de ADN (hipoxantina, aminopterina y timidina). En este medio sólo podrán crecer las células híbridas, ya que los linfocitos no son viables en cultivo y las células de mieloma carecen de las enzimas necesarias para metabolizar esos sustratos, por

ende morirán. Como resultado luego de varios días de cultivo obtendremos una línea celular capaz de crecer indefinidamente en cultivo y de producir anticuerpos altamente específicos, llamados *anticuerpos monoclonales (mAbs)*



Aplicaciones generales de los Anticuerpos monoclonales

La propiedad de los anticuerpos monoclonales de unirse con alta especificidad y afinidad a una molécula blanco permite su utilización como herramientas esenciales en la investigación biomédica y clínica, las cuales han probado ser invaluable para:

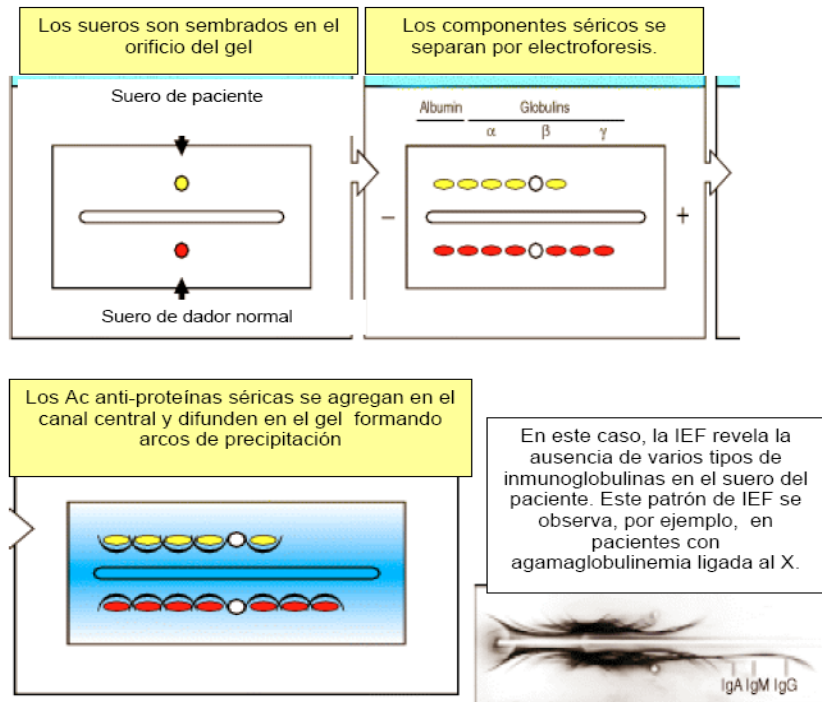
- Detectar y cuantificar niveles de expresión de genes.
- Determinar la localización de la expresión de genes a nivel celular, subcelular y en los tejidos.
- Inmunodiagnóstico: en el diagnóstico de numerosas enfermedades infecciosas y sistémicas al permitir la detección de antígenos y anticuerpos específicos en circulación y en tejidos, usando estos mAbs en inmunoensayos.
- Diagnóstico y tratamiento de tumores específicos.
- Análisis funcionales de moléculas de la superficie celular o proteínas secretorias.
- Estudios de investigación inmunológica, uniendo mAbs a moléculas de la superficie celular y así poder evaluar estimulación o inhibición de funciones particulares de la célula.
- Selección de posibles blancos terapéuticos y para fabricación de vacunas.

GUÍA DE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

Inmunolectroforesis (IEF).

La inmunolectroforesis es una técnica cualitativa que permite la identificación de diferentes componentes proteicos presentes en distintas muestras biológicas (suero, orina, etc) a través de arcos de precipitación. La técnica se realiza preferentemente en geles de agarosa y se distinguen dos etapas: 1) las muestras se someten a una separación electroforética y 2) terminada la electroforesis, las proteínas son precipitadas con los Acs específicos aplicados en

el agar en un canal paralelo al eje de migración. Luego de un período de difusión de los Acs, se observan arcos de precipitación cuya forma y posición dependen de las características inmunoquímicas y de la concentración relativa de cada proteína.



Reacciones de aglutinación

Las reacciones de aglutinación involucran una interacción secundaria entre Ag-Ac que llevará a la aparición de un aglutinado que se visualiza como grumos. Los principios fisicoquímicos que gobiernan la formación de estos aglutinados son los mismos que gobiernan la formación de un precipitado. La gran diferencia entre las reacciones son las características del antígeno: mientras que en las reacciones de precipitación se emplean antígenos solubles, en las reacciones de aglutinación el **Ag es particulado**.

Con un Ag soluble, también es posible diseñar una reacción de aglutinación gracias a que es posible utilizar distintas partículas (partículas inertes ó glóbulos rojos) y realizar un pegado químico o fisicoquímico del Ag soluble a dichas partículas, generando de esa manera un “Ag particulado” útil para fines diagnósticos.

Las ventajas de las reacciones de aglutinación desde el punto de vista de su utilidad en el laboratorio es que son muy sencillas de realizar, no requieren de ningún equipamiento para su lectura, son rápidas y fáciles de implementar. Además, presentan una mayor sensibilidad que las reacciones de precipitación por lo que las han sustituido en muchos casos. Sin embargo, cabe mencionar, que las reacciones de aglutinación presentan una menor sensibilidad que las reacciones de interacción primaria tales como ELISA e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Esto hace que en determinados casos se prefiera el empleo de una de estas 2 técnicas para la detección de Ac contra un determinado agente patógeno. Las ventajas enumeradas hacen de las reacciones de aglutinación una valiosa herramienta para diversos estudios serológicos (búsqueda de Acs específicos contra agentes patógenos) y para la detección de antígenos en fluidos biológicos.

Tipos de reacciones de aglutinación según las características de las partículas aglutinantes:

De acuerdo a las características de las partículas aglutinantes, las reacciones de aglutinación pueden clasificarse en:

- reacciones de aglutinación activa.
- reacciones de aglutinación pasiva.

Las reacciones de aglutinación activa se basan en el empleo de la partícula aglutinante como antígeno. Como ejemplos podemos mencionar:

Partícula aglutinante	Reacción	Utilidad diagnóstica
Glóbulos rojos		Determinación de grupo sanguíneo y factor Rh
Glóbulos rojos	Coombs indirecta	Determinación de sensibilización por incompatibilidad Rh
Glóbulos rojos	Coombs directa	Determinación de eritroblastosis fetal
Bacterias (<i>Brucella</i>)	Huddleson	Búsqueda de Ac anti- <i>Brucella</i> en sueros humanos (banco de sangre)
Parásitos (<i>Trypanosoma</i>)	AD-Chagas	Búsqueda de Ac anti- <i>T. cruzi</i> en sueros

Las reacciones de aglutinación pasiva se basan en el empleo de una partícula aglutinante inerte a la cual se la ha unido un antígeno. Como ejemplos podemos mencionar:

Partícula aglutinante	Reacción	Utilidad diagnóstica
Glóbulos rojos + lisado de <i>T. cruzi</i>	HAI-Chagas	Búsqueda de Ac anti- <i>T. cruzi</i> en sueros humanos (banco de sangre)
Glóbulos rojos + lisado de <i>T. gondii</i>	HAI-Toxo	Búsqueda de Ac anti- <i>T. Gondii</i> en sueros humanos (banco de sangre)
Látex + gp120		Búsqueda de Ac anti-VIH en sueros humanos (banco de sangre)
Látex + sHBV		Búsqueda de Ac anti-HBV en sueros humanos (banco de sangre)
Látex + estreptolisina O	ASTO	Búsqueda de Ac anti-estreptolisina O en sueros humanos (infección por estreptococo β -hemolítico)

Como se desprende de la tabla anterior, los soportes particulados para las reacciones de aglutinación pasiva pueden ser glóbulos rojos (en este caso se habla en general de “hemaglutinación”) o partículas de látex. El empleo de este tipo de partículas inertes ha permitido extender el rango de utilidad de la técnica de aglutinación a la determinación de Ac contra agentes infecciosos tales como el VIH o el HBV, e inclusive para la determinación de Ac contra moléculas solubles estreptolisina O, proteína C reactiva, etc.). Como paso indispensable para la preparación de este tipo de reactivos, es necesaria una etapa de incubación entre la partícula inerte y el antígeno soluble sensibilizante en general. Los Ag sensibilizantes son proteínas, (aunque es posible inmovilizar hidratos de carbono), que permitirá el “pegado” del mismo a la partícula. Este procedimiento puede realizarse por simple adsorción (unión no covalente del Ag a la partícula) o por unión covalente. En la mayoría de los casos se requiere un acondicionamiento previo de la superficie de la partícula. Para el caso de los glóbulos rojos, esto se logra por incubación con ácido tánico (proceso denominado “tanado”) o con CrCl_3 . Una vez realizado el “pegado” del Ag a la superficie del glóbulo rojo, las partículas pueden ser fijadas con agentes químicos como el glutaraldehído

con el objeto de darles mayor estabilidad en el tiempo y a los cambios de temperatura, lo que aumenta la vida útil del reactivo diagnóstico.

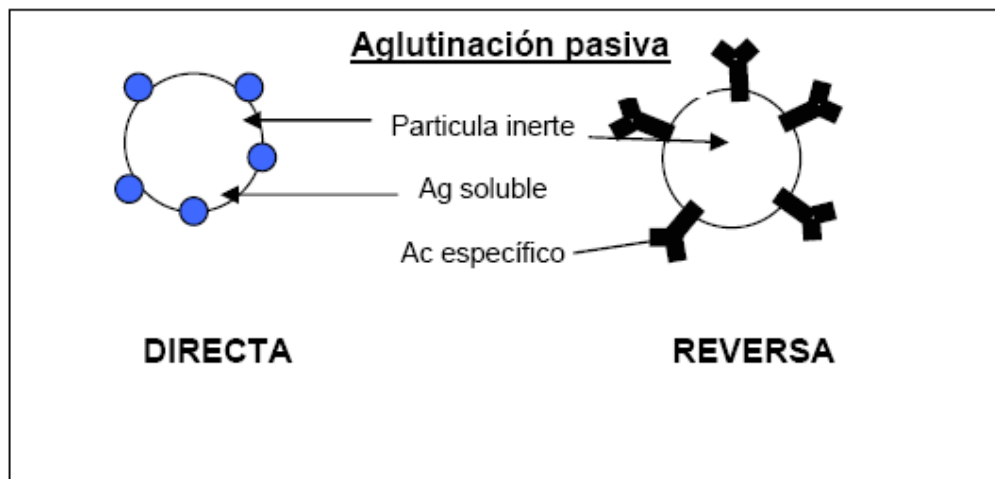
Tipos de reacciones de aglutinación pasiva según la identidad de la especie “pegada” a las partículas aglutinantes:

Considerando que es posible inmovilizar muchos tipos diferentes de proteínas a distintos tipos de partículas inertes, es posible clasificar las reacciones de aglutinación pasiva en:

- reacciones de aglutinación pasiva directa; o
- reacciones de aglutinación pasiva indirecta.

Las reacciones de aglutinación directa se basan en la sensibilización de la partícula inerte con el Ag, por lo que resultan útiles para la detección y titulación de Ac en distintos fluidos biológicos. Como ejemplos, basta repasar la información brindada en la tabla anterior.

Por el contrario, las reacciones de aglutinación indirecta se basan en la inmovilización del Ac (en general, se inmoviliza un anticuerpo monoclonal) en la superficie de la partícula inerte, siendo este tipo de reacciones particularmente útiles para la detección de Ag en distintas muestras biológicas.



INTERACCIÓN PRIMARIA Ag-Ac

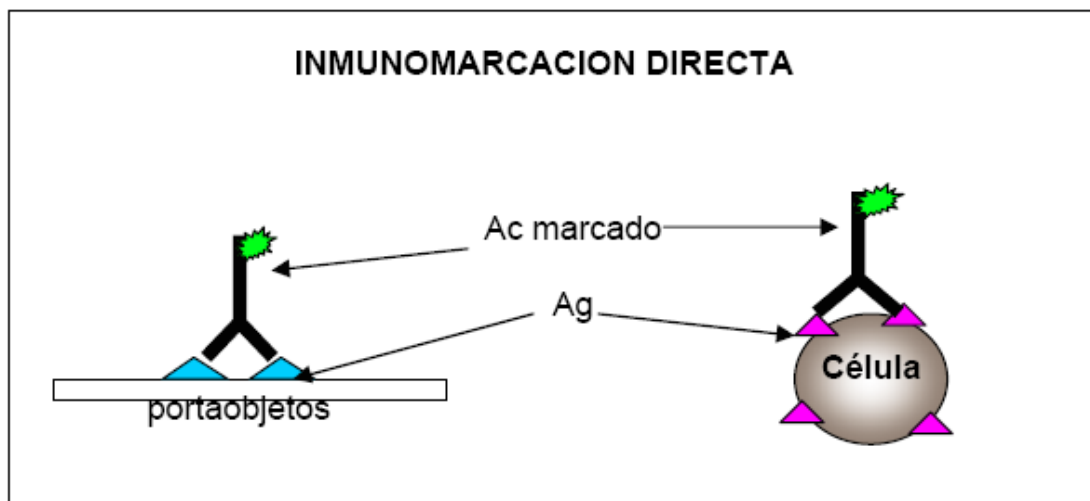
Si bien la interacción primaria Ag-Ac no es visible, existen distintos métodos que hacen posible visualizarla. La estrategia consiste en "marcar" al Ac ó al Ag mediante la unión covalente (conjugación) de determinadas moléculas, tales como FLUOROCROMOS, ISOTOPOS RADIOACTIVOS o ENZIMAS, para poder hacer visible esa primera interacción. Tal como se observa en la Tabla, dependiendo del marcador que se utilice, la técnica inmunológica recibe un determinado nombre y utiliza un sistema de detección diferente. Las técnicas que veremos a continuación no son tan sencillas y económicas como las que vimos anteriormente, sin embargo son mucho más sensibles, es decir, son capaces de detectar menores concentraciones de Ag o Ac.

Técnica Inmunológica	MARCADOR	Sistema de detección
Inmunomarcación	Enzima	Microscopio óptico
	Fluorocromo	Microscopio de fluorescencia Citómetro de Flujo
Radioinmunoanálisis (RIA) Técnicas radioinmunométricas (PRIST, RAST)	Isótopo Radioactivo	Contador de Radiación
ELISA	Enzima	Espectrofotómetro

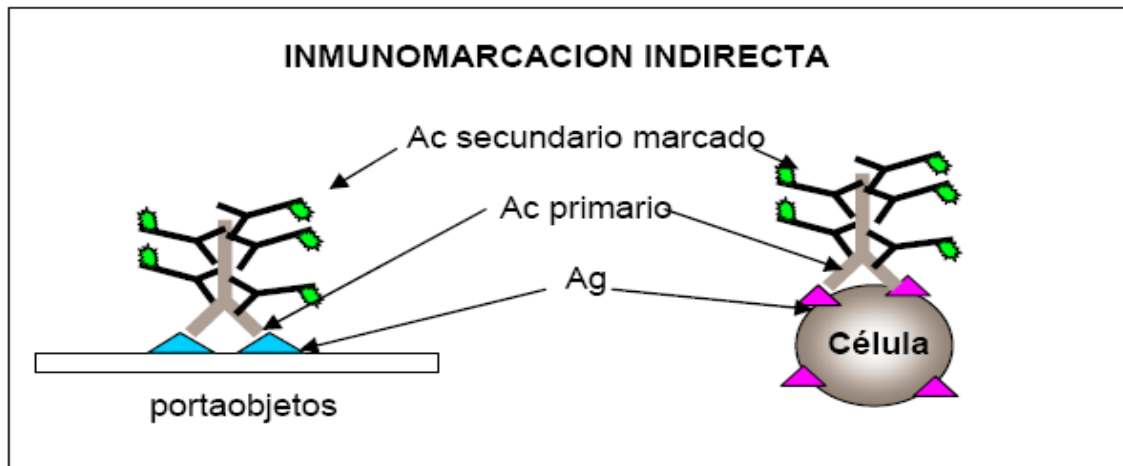
INMUNOMARCACIÓN

Las técnicas de inmunomarcación utilizan Ac conjugados que permiten detectar la presencia de Ags en tejidos (inmunohistoquímica) o células (inmunocitoquímica). La inmunomarcación de tejidos se realiza sobre cortes de tejido fijado y montado sobre un portaobjetos. A través de estas técnicas es posible detectar tanto Ags celulares (de membrana, citoplasmáticos ó nucleares) como extracelulares (matriz extracelular, membrana basal, etc). La inmunomarcación de células puede efectuarse sobre células vivas o fijadas, las cuales pueden hallarse en suspensión o adheridas a un soporte sólido (portaobjetos). Esta técnica permite detectar Ags localizados en la membrana plasmática, citoplasma o núcleo.

La inmunomarcación DIRECTA es la forma más simple de localizar un Ag y consiste en utilizar un Ac "marcado" específico para dicho Ag (Ac primario). Para realizar esta técnica, se incuba la muestra con el Ac primario "marcado" durante un determinado tiempo, a la temperatura indicada, luego del cual se retira el exceso de Ac mediante lavados y se procede a la detección de la marca.



La inmunomarcación INDIRECTA utiliza un Ac primario sin marcar que reconoce al Ag de interés y luego, para evidenciar la presencia del Ag, emplea un segundo Ac marcado (Ac secundario) capaz de reconocer el Ac primario. Por ejemplo, si el Ac primario es una IgG de ratón, el Ac secundario podrá ser anti-IgG de ratón hecho en conejo.



Para realizar esta técnica, se incubaba la muestra con el Ac primario, tal como vimos anteriormente, se realizan lavados para retirar el exceso de Ac y luego se incubaba con el segundo Ac marcado. Posteriormente se realizan lavados y se procede a la detección de la marca.

Inmunomarcación	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Directa	Rápida y sencilla.	Se necesita un Ac primario marcado para cada Ag a detectar (los Ac marcados son más caros que los Ac no marcados). Menos sensible.
Indirecta	Más sensible. Un mismo Ac secundario puede reconocer distintos Ac primarios (generados en la misma especie)	Lleva más tiempo.

Inmunomarcación con Acs conjugados a ENZIMAS

Esta técnica suele utilizarse para inmunohistoquímica y para detectar Ag sobre células adheridas a portaobjetos. Una vez realizada la inmunomarcación (directa o indirecta) la presencia del Ac conjugado con la enzima se evidencia por el agregado de un sustrato incoloro. La acción de la enzima sobre el sustrato genera un producto coloreado que precipita en el lugar donde ocurrió la reacción y es visualizado directamente o al microscopio óptico. Los sustratos incoloros que viran a un producto coloreado se los conoce con el nombre de cromógenos. El hecho de que existan distintos cromógenos capaces de generar productos de distinto color, permite que puedan detectarse Ag diferentes en un mismo corte de tejido o célula.

Inmunomarcación con Acs conjugados a FLUOROCROMOS:

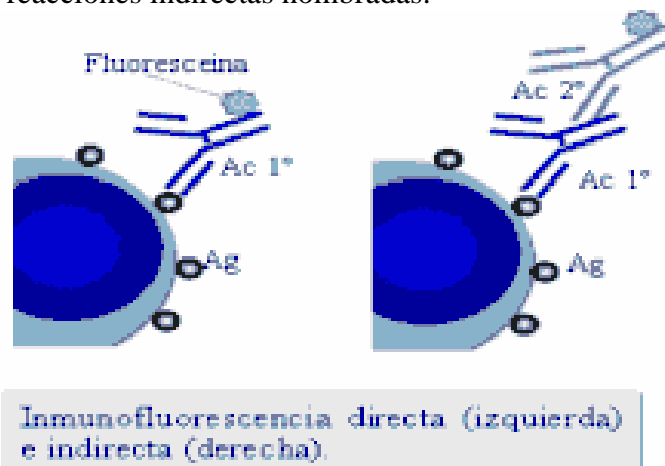
Técnicas de inmunofluorescencia

La *fluorescencia* es una propiedad de ciertas moléculas, que al ser irradiadas con energía electromagnética de longitud de onda adecuada, emiten radiación de longitud de onda característica permitiendo su cuantificación.

Las moléculas de un colorante fluorescente absorben luz en una longitud de onda y convierten la luz absorbida de alta energía (*longitud de onda más corta*) en luz de menor energía

(*longitud de onda más larga*). Cada fluorocromo tiene un espectro de emisión y excitación característicos, si se utilizan dos con el mismo espectro de excitación pero distinto espectro de emisión, se pueden medir dos características al mismo tiempo (fluorescencia de dos colores).

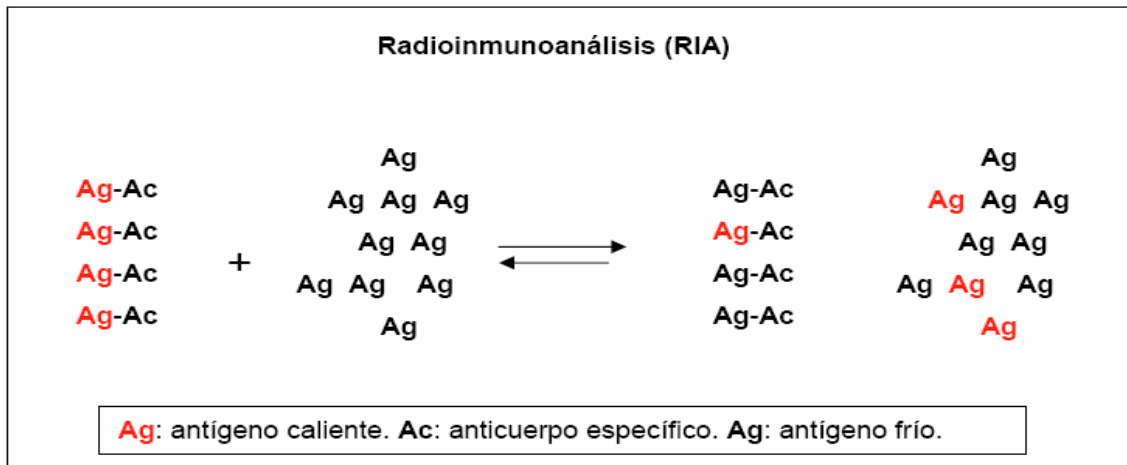
La *inmunofluorescencia* se utiliza esencialmente en la detección de autoanticuerpos y anticuerpos contra antígenos de superficie o intracelulares de células y tejidos. Para ello se emplean anticuerpos preparados frente a la proteína que se desea detectar marcados con moléculas fluorescentes. Se aprecia si hubo unión del anticuerpo con el antígeno por la fluorescencia emitida, que se observa bajo microscopio de luz ultravioleta. Este procedimiento (*Inmunofluorescencia directa*) tiene la limitación del marcaje con un fluorocromo de cada uno de los anticuerpos necesarios para cada una de las sustancias a investigar. La otra alternativa es la *Inmunofluorescencia indirecta* que posee las mismas características de las reacciones indirectas nombradas.



RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

La técnica de **radioinmunoanálisis (RIA)** permite cuantificar la presencia de pequeñas cantidades de un determinado Ag o Ac en una muestra biológica. Si bien es una técnica sumamente sensible, en la actualidad no es tan utilizada como lo era antes y ha sido reemplazada por otras técnicas que no utilizan radioisótopos. La técnica se basa en la inhibición competitiva de la unión de un Ag marcado radiactivamente con su Ac específico, por parte de Ags idénticos no marcados presentes en la muestra a analizar. Para realizar la técnica debe contarse de antemano con: (1) Acs específicos contra la molécula a cuantificar (esa molécula puede ser un Ag o una inmunoglobulina), (2) la molécula a cuantificar marcada radioactivamente y (3) la muestra a analizar (donde se encuentra la molécula a cuantificar).

Tal como puede verse en el esquema, los complejos inmunes formados por la molécula marcada (Ag caliente) y el anticuerpo específico se enfrentan a la muestra que posee la molécula sin marcar (Ag frío). Si la concentración de Ag frío es mayor, se producirá el desplazamiento del Ag caliente y por lo tanto, la radioactividad de los complejos Ag-Ac irá disminuyendo, mientras que la radioactividad de la fracción de Ag libre aumentará. Realizando una curva patrón con concentraciones conocidas de Ag libre puede calcularse, luego, la concentración de Ag en la muestra biológica.



ELISA (*Enzyme Linked Immunoassay Sorbent Assay*)

La técnica de ELISA utiliza Acs marcados con una enzima (generalmente la peroxidasa) para poder visualizar la reacción Ag-Ac. La técnica se utiliza tanto para la determinación de Acs como de Acs.

Determinación de Ag por ELISA

La modalidad más frecuente del método ELISA para la determinación de Acs es el modelo ELISA "Sandwich" directo. En este modelo, el Ac específico para el Ag de interés, se encuentra adsorbido en un soporte sólido (placa de petri), sobre el que se añadirá la muestra biológica. En el caso de que en dicha muestra se encuentre el Ag, quedará capturado en la placa y será puesto en evidencia tras la adición de otro Ac específico conjugado con la enzima. Por último, se añade el sustrato sustrato incoloro que, por acción de la enzima, dará un producto coloreado que producirá un color observable a simple vista y cuantificable mediante un espectrofotómetro.



Determinación de Acs por ELISA

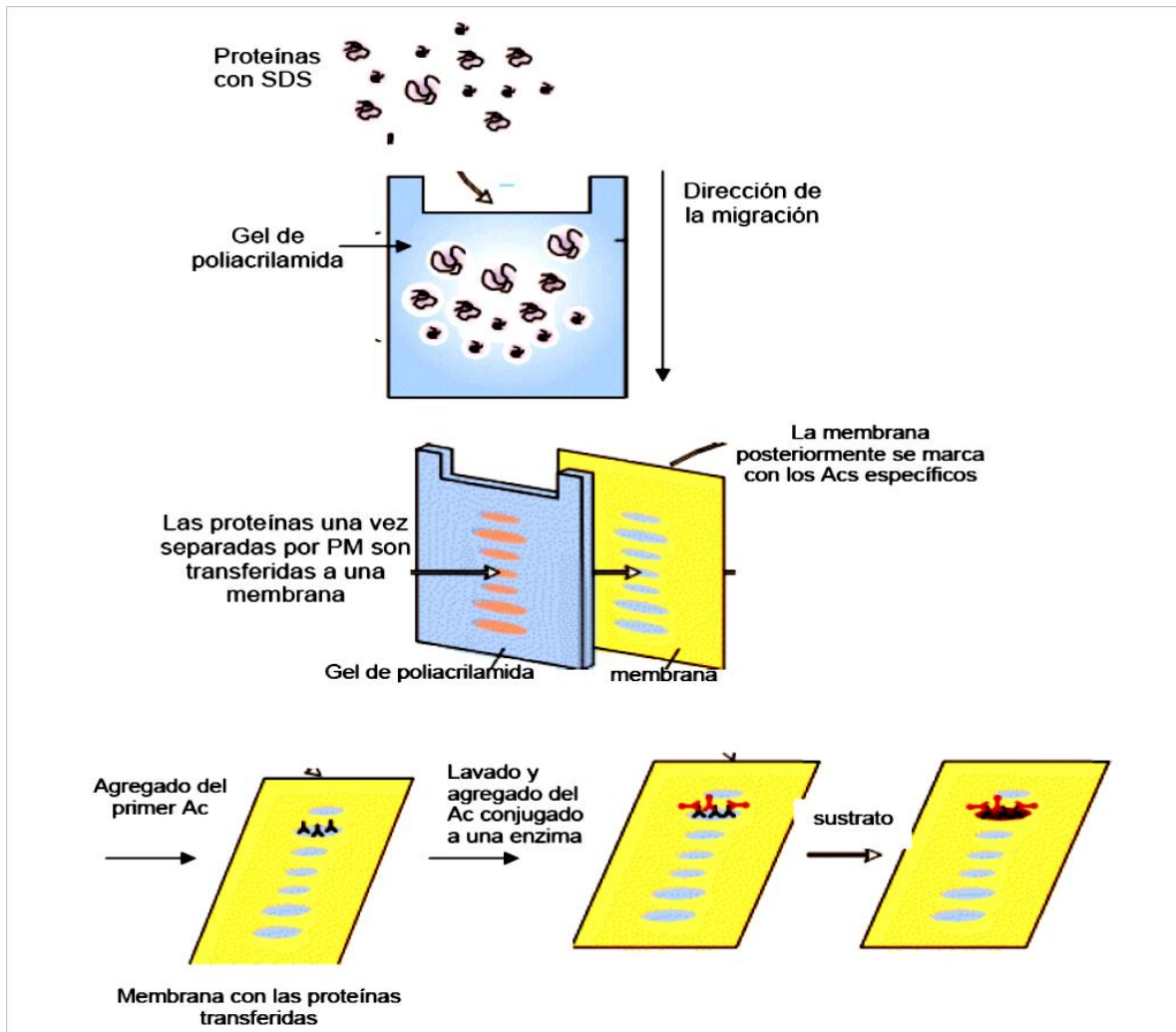
Para la determinación de Acs específicos para un determinado Ag se utiliza normalmente la modalidad de ELISA indirecto en donde el Ag de interés se encuentra adsorbido en la placa de ELISA. Se pueden utilizar como antígenos, proteínas virales o bacterianas e incluso virus completos, pero cada día es más frecuente adsorber exclusivamente las proteínas de interés inmunológico. Esta es una de las técnicas de elección para buscar Acs contra proteínas del

virus HIV en sueros de pacientes. Los pasos de la técnica se encuentran esquematizados en la figura.



WESTERN BLOT

Es una técnica muy sensible que permite identificar Ag y Ac. Tal como puede observarse en la figura, la técnica de Western Blot se basa en la separación electroforética de proteínas en geles de poliacrilamida, la transferencia (*blotting*) de dichas proteínas a un soporte sólido (membrana de nitrocelulosa o nylon) y la posterior detección de una ó más bandas identificadas por Acs específicos. La migración de las proteínas se realiza en presencia de detergentes (Dodecil Sulfato de Sodio, SDS) a fin de que su migración dependa fundamentalmente de peso molecular (PM) de los péptidos, ya que este compuesto le otorga carga negativa a las proteínas.



Así descrita, la técnica permite investigar la presencia de un antígeno dado en una mezcla de proteínas presentes en una determinada muestra y para ello se debe disponer del Ac específico para dicho antígeno. Sin embargo, la técnica de Western Blotting es también muy útil para la detección de Acs específicos en sueros. Si se desea detectar Acs específicos, debe contarse con el Ag de interés separado por electroforesis y transferido a una membrana, la cual se incubará con el suero a analizar. Posteriormente esa membrana deberá incubarse con el segundo anticuerpo marcado con la enzima para poder detectar las bandas específicas. La técnica de Western Blotting para determinar la especificidad de los Acs contra Ag del virus de HIV es la prueba confirmatoria de elección para los casos en que los sueros de los pacientes dieron un ELISA positivo.








ACTIVIDAD DE LABORATORIO:

DETERMINACIÓN DE FACTOR Y GRUPO SANGUÍNEO

Introducción:

El laboratorio de bioquímica actualmente utiliza gran cantidad de técnicas que aprovechan la unión específica entre anticuerpo y antígeno para el diagnóstico de numerosas enfermedades. Por ejemplo reacciones de aglutinación para determinación de Artritis reumatoidea, Sífilis, Brucelosis, Proteína C reactiva, dosaje de niveles de hCG-beta (como el test de embarazo), reacciones de ELISA y Radioinmunoensayo (RIA) para dosar el nivel de hormonas circulantes, e Inmunomarcación para diagnóstico de Toxoplasmosis y Chagas.

La aglutinación es muy usada en el laboratorio para la determinación del factor Rh y de los grupos sanguíneos. Las membranas de los glóbulos rojos poseen glicoproteínas y glicolípidos que actúan como antígenos, a los cuales se los llama comúnmente 'aglutinógenos'. El determinante antigénico de estas moléculas reside en la porción glucídica. El antígeno 0 es un oligosacárido formado por N-Acetil-Galactosamina, Galactosa y Fucosa unidos a una ceramida si es un glicolípidio y a un resto aminoacídico si es una glicoproteína. Todos las personas pueden sintetizar el grupo 0, pero para completar la cadena se necesitan enzimas específicas. Los individuos de tipo A tienen una enzima (glucosiltransferasa) que incorporara N-Acetil-Galactosamina en el esqueleto de la glicoproteína, en tanto los individuos de tipo B incorporan galactosa a través de una transferasa. El grupo AB posee ambas enzimas. Los anticuerpos específicos para los aglutinógenos se llaman aglutininas y existen naturalmente en los individuos.

Blood Type (genotype)	Type A (AA, AO)	Type B (BB, BO)	Type AB (AB)	Type O (OO)
Red Blood Cell Surface Proteins (phenotype)	 A agglutinogens only	 B agglutinogens only	 A and B agglutinogens	 No agglutinogens
Plasma Antibodies (phenotype)	 b agglutinin only	 a agglutinin only	NONE. No agglutinin	 a and b agglutinin




Así una persona del grupo A poseerá aglutininas circulantes del tipo B, una del grupo B poseerá las aglutininas A, las del grupo 0 tendrán ambas y las personas del grupo AB no poseerán ninguna. De esta forma el organismo se defenderá ante la entrada de algo que no reconoce como propio. A las personas del tipo AB se les llama "receptores universales" porque no tiene aglutininas circulantes y se les puede dar sangre de cualquier tipo. Así las personas de tipo 0 son "dadores universales" ya que al no tener aglutinógenos en su membrana no desarrollaran una reacción de incompatibilidad. Es por eso que en las transfusiones los individuos deben ser cuidadosamente tipificados, ya que la administración de sangre del tipo incompatible provoca reacciones muy severas como la hemólisis.

Factor Rh

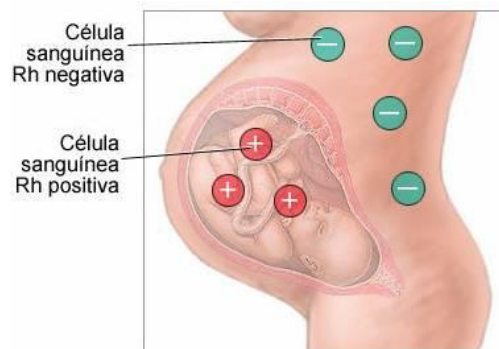
Además de los antígenos del sistema ABO, los del sistema Rh son de gran importancia clínica (si bien existen muchos más). El factor Rh, llamado así porque fue estudiado por primera vez

en los monos del genero rhesus, es en realidad un sistema compuesto por muchos antígenos. El D es el más antigénico de ellos, y el termino Rh positivo significa que el individuo tiene aglutinógeno D. El individuo Rh Negativo no tiene antígeno D y forma aglutininas anti-D cuando de alguna manera toma contacto con células D-Positivas.

Factor Rh

Blood Type (genotype)	Rh (+)	Rh (-)
Red Blood Cell Surface Proteins (phenotype)	 Rh agglutinogens	 No agglutinogens
Plasma Antibodies (phenotype)	NONE.	

Una de las complicaciones debida a la incompatibilidad Rh surge cuando una madre Rh negativa lleva un feto Rh positivo. En el momento del parto pequeñas cantidades de sangre fetal toman contacto con la circulación materna. Esto provocara que la madre desarrolle cantidades significativas de aglutininas anti Rh durante el postparto. Durante el siguiente embarazo los anticuerpos anti Rh que la madre desarrolló, cruzan la placenta y llegan al feto, pudiendo provocar hemólisis (ruptura de los glóbulos rojos), anemia, ictericia y puede llevar a la muerte del feto. Este cuadro se lo conoce con el nombre de *Eritroblastosis Fetal*.



FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El método está basado en el principio de aglutinación. Cuando los glóbulos rojos de la muestra de sangre del paciente se ponen en contacto con los Reactivos Anti A o Anti B, se producirá un aglutinación visible microscópicamente si en la superficie de los eritrocitos existen los respectivos antígenos en estudio.

REACTIVOS

Reactivos Anti A, Anti B y anti-D (anti-Rho): solución de anticuerpos monoclonales IgM obtenidos a partir de hibridomas de ratón.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Reacciones de aglutinaciones débiles pueden presentarse en prematuros o recién nacidos, debido a la baja expresión de antígenos eritrocitarios. En las patologías que cursan con desórdenes sanguíneos, o en los casos de utilización de drogas terapéuticas, pueden presentarse errores en la interpretación de los resultados. Por esta razón siempre es importante

conocer al paciente y sus antecedentes. Pueden existir sustancias que interfieren en la reacción, provenientes del material utilizado en la recolección de las muestras, lavado de G.R., etc. Por ello, debe observarse el correcto estado de los elementos del laboratorio.

PROCEDIMIENTO:

1. Desinfectar con alcohol la yema del dedo de un voluntario.
2. Luego punzar con una aguja estéril descartable.
3. Colocar 3 gotas de sangre en cada uno de los espacios de la placa de plástico
4. En uno de los espacios agregar una gota del reactivo Anti - A y mezclar con una varilla plástica.
5. En el segundo agregar una gota de reactivo Anti - B y mezclar con la gota de sangre.
6. Y en el tercero agregamos una gota de reactivo Anti - D y mezclamos.
7. Movemos la placa suavemente para observar la presencia o no de una aglutinación visible.
8. Con ayuda de su docente evaluamos los resultados obtenidos y determinamos el grupo y factor del compañero voluntario.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Reacción con antisuero			Resultado	
Anti A	Anti B	Anti D	Grupo Sanguíneo	Factor RH
-	-	+	O	+
-	-	-	O	-
+	-	+	A	+
+	-	-	A	-
-	+	+	B	+
-	+	-	B	-
+	+	+	AB	+
+	+	-	AB	-

TRABAJO PRACTICO Nº 10 - INTEGRACIÓN Y REGULACIÓN METABÓLICA

Durante el transcurso del corriente año hemos aprendido la estructura, la forma en que se sintetizan y degradan las diferentes macromoléculas que componen nuestro organismo.

Denominamos *metabolismo* al conjunto de reacciones químicas, catalizadas por enzimas y ordenadas en una secuencia definida que se llevan a cabo en los tejidos de nuestro cuerpo. Hemos estudiado los anabolismos (procesos de síntesis) y catabolismos (procesos degradativos) de carbohidratos, lípidos, aminoácidos, bases púricas y pirimídicas y del grupo hemo. Estos, al ser estudiados por separado parecen algo estático y sin vinculación entre sí. Por eso es importante destacar que gran parte de estos compuestos están íntimamente relacionados y presentan frecuentes interconexiones. Pudimos observar que compuestos de diversa naturaleza pueden generar un mismo producto y que un mismo compuesto tiene la posibilidad de formar parte de diferentes vías metabólicas. Existen algunos metabolitos a los que llamamos *encrucijadas* ya que a ellos convergen y de ellos parten numerosas vías metabólicas. Citamos a continuación algunos ejemplos de encrucijadas metabólicas y las vías posibles para ellos:

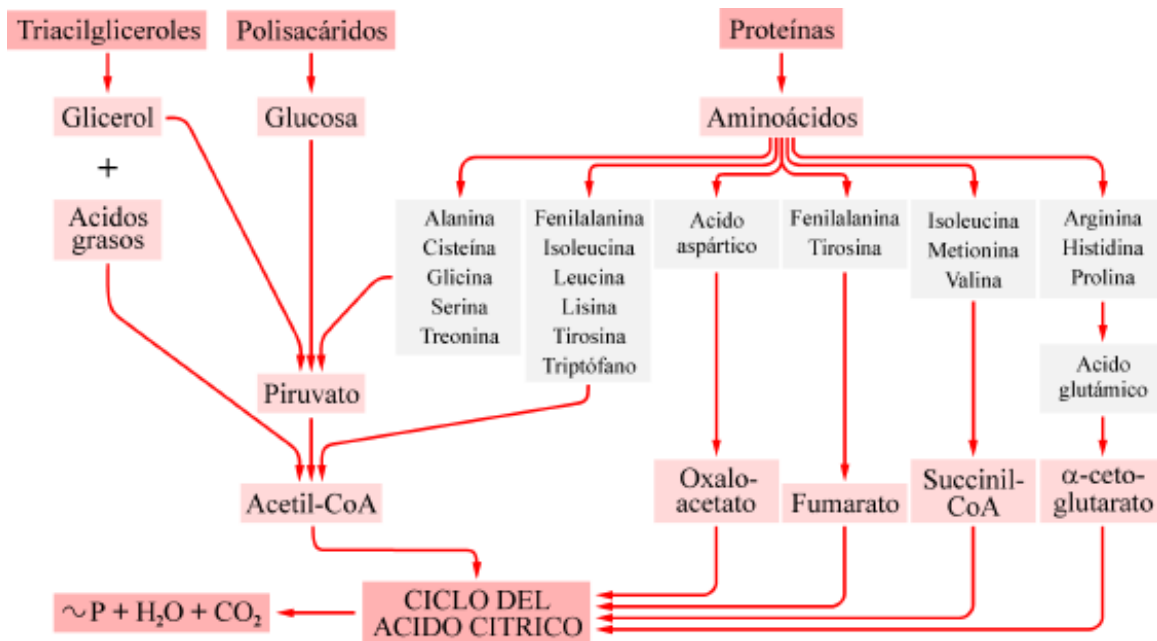
-Glucosa-6-fosfato: Glucólisis, incorporación a glucógeno, vía de las pentosas, hidrólisis a glucosa libre.

-Piruvato: descarboxilación a Acetil-CoA y de allí a todas las posibilidades metabólicas de éste, formación de glucosa o glucógeno por vía gluconeogénica, transaminación para dar alanina, reducción a lactato.

-Acetil-CoA: intervención en ciclo de Krebs con producción de energía utilizable, síntesis de ácidos grasos, síntesis de colesterol, síntesis de cuerpos cetónicos, incorporación a moléculas más complejas mediante acetilaciones.

-Tirosina: síntesis de proteínas, síntesis de hormonas tiroideas, síntesis de catecolaminas (dopamina, adrenalina, noradrenalina), síntesis de melanina, oxidación total a CO₂ y H₂O con producción de energía, formación de glucosa por gluconeogenesis, formación de cuerpos cetónicos.

-Glicina: síntesis de proteínas, síntesis de creatina, síntesis de glutatión, síntesis del grupo hemo, síntesis de purinas, conjugación con ácidos biliares, reacciones de desintoxicación, conversión a serina, formación de piruvato, transaminación.



En última instancia, todos los compuestos que convergen a ciclo de Krebs son oxidados a CO₂ y H₂O, y cadena respiratoria es la vía final común donde canalizan todos los equivalentes de reducción cedidos por numerosos sustratos para la formación de ATP.

El ATP es la unidad biológica de energía, el elevado potencial de transferencia de grupos fosforilos capacita al ATP para ser utilizado como fuente de energía en la contracción muscular, transporte activo, amplificación de señales y biosíntesis de sustancias.

Además de estar integrados entre sí, estos metabolismos deben estar finamente regulados para asegurarnos la cantidad necesaria de cada uno de los componentes y el correcto funcionamiento de las vías metabólicas según el requerimiento de cada tejido.

Siendo nuestro organismo un sistema pluricelular con altos niveles de organización y complejidad es necesario que posea un complejo sistema de regulación. Además de la regulación a nivel molecular, por ejemplo modificando la actividad de alguna enzima o el desarrollo de órganos y tejidos altamente diferenciados, nuestro cuerpo requiere de un sistema de comunicación a fin de adaptar la actividad de cada célula a las necesidades del organismo y promover su funcionamiento como una unidad integrada.

Esa misión está a cargo de los sistemas nervioso y endocrino.

El **sistema nervioso** cumple la función de red de comunicaciones rápidas que conecta e interrelaciona los diversos componentes del organismo. El **sistema endocrino** en cambio está conformado por un sistema de células agrupadas en glándulas que elaboran o secretan productos activos llamados hormonas, las cuales son vertidas a la circulación en respuesta a estímulos específicos provocando un efecto en determinada célula o tejido.

Mecanismos frecuentes en la regulación metabólica

La compleja red de reacciones en la célula está regulada y coordinada con precisión. El metabolismo puede controlarse de diversas maneras:

- **Interacciones alostéricas:** el flujo de moléculas en la mayoría de las vías metabólicas viene determinado fundamentalmente por las cantidades y actividades de ciertas enzimas, los puntos de control de esas vías son

- generalmente irreversibles. La primera reacción irreversible de una vía se llama *limitante* y es normalmente el elemento más importante en el control. Las enzimas que catalizan etapas limitantes están reguladas alostéricamente.
- **Modificación covalente:** Muchas enzimas reguladoras están controladas por modificación covalente (por ej. Adición de fosfatos catalizada por quinasas)
 - **Niveles enzimáticos:** las cantidades de enzimas, al igual que sus actividades están controladas. Las velocidades de síntesis y de degradación de algunas enzimas reguladoras están sometidas a control hormonal.
 - **Modificación de la actividad de enzimas preexistentes:** relacionado con la cantidad de sustrato presente en el medio, si este es cercano o inferior a la K_m de la enzima, la velocidad de la reacción está directamente relacionada con la concentración del sustrato.
 - **Compartimentalización y existencia de isoenzimas:** la presencia de isoenzimas con localizaciones subcelulares diferentes, catalizan la misma reacción en vías metabólicas diferentes lo cual permite una regulación independiente.
 - **Especializaciones metabólicas de los órganos:** la regulación en organismos superiores está profundamente afectada y favorecida por la existencia de órganos con funciones metabólicas distintas.

Perfiles metabólicos de los órganos más importantes

Las pautas metabólicas de cerebro, músculo, tejido adiposo e hígado son profundamente distintas. Consideremos en que se diferencian estos órganos con respecto a la utilización de combustibles para satisfacer sus necesidades energéticas.

Cerebro

La glucosa es prácticamente el único combustible utilizado por el cerebro humano, excepto durante el ayuno prolongado. El cerebro carece de almacenamiento de combustible y, por consiguiente, requiere un suministro continuo de glucosa, que entra con facilidad en todo momento. En estado de reposo el cerebro utiliza el 60% de la glucosa total consumida por el organismo entero. Durante el ayuno prolongado, los cuerpos cetónicos, sintetizados en el hígado, reemplazan en parte a la glucosa como combustibles cerebrales. El acetoacetato se activa mediante la transferencia de CoA procedente de succinil-CoA y así se convierte en acetoacetil-CoA, que entra en el ciclo del ácido cítrico. Recordemos que habitualmente el cerebro no posee la enzima capaz de catalizar esta reacción, la tiorforasa, pero en estas situaciones experimenta adaptaciones que permiten expresarla y de esta forma poder utilizar los cuerpos cetónicos. Los ácidos grasos no sirven como combustible cerebral porque están unidos a la albúmina en el plasma, y en consecuencia, no pueden atravesar la barrera hematoencefálica. En el fondo, los cuerpos cetónicos son equivalentes a ácidos grasos transportables.

Músculo

Los principales combustibles del músculo son: glucosa, ácidos grasos y cuerpos cetónicos. El músculo difiere del cerebro en que posee un gran almacenamiento de glucógeno. De hecho las $\frac{3}{4}$ partes del glucógeno corporal están almacenadas en el músculo. Este glucógeno se convierte fácilmente en glucosa-6-fosfato para su utilización por las células musculares. El músculo, como el cerebro carece de glucosa-6-fosfatasa, y

de este modo no puede liberar glucosa (por ende no es un órgano indispensable para el mantenimiento de la glucemia). Más bien, el músculo retiene la glucosa, el mejor combustible para su proceso de actividad. En el músculo esquelético en contracción activa, la velocidad de la glucólisis excede, a la del ciclo del ácido cítrico. La mayor parte del piruvato formado en estas condiciones se reduce a lactato, que fluye hacia el hígado, donde se convierte en glucosa. Estos intercambios, conocidos como ciclo de Cori, trasladan parte de la carga metabólica del músculo al hígado. Además en el músculo activo, se forma gran cantidad de alanina por transaminación de piruvato (piruvato + glutamato + alanina + α -cetoglutarato). En el hígado, tanto la alanina como el lactato, puede reconvertirse en glucosa.

La conducta metabólica del músculo en reposo es completamente distinta. En el músculo en reposo, el combustible principal son los ácidos grasos. Los cuerpos cetónicos sirven también de combustible para el músculo cardíaco. De hecho, el músculo del corazón consume con preferencia acetato en vez de glucosa.

Tejido adiposo

Los triacilglicérols almacenados en el tejido adiposo constituyen la mayor reserva energética del organismo. El tejido adiposo está especializado en la esterificación de los ácidos grasos y en su liberación de los TAG. En el hombre, el hígado es el principal centro de síntesis de ácidos grasos, mientras que el principal trabajo biosintético del tejido adiposo consiste en activar estos ácidos grasos y transferir los acetyl-CoA resultantes al glicerol. El glicerol-3-fosfato, un intermediario clave en esta biosíntesis, procede de la reducción de la dihidroxiacetona fosfato, formada a partir de glucosa en la vía glucolítica. Las células adiposas son incapaces de fosforilar el glicerol endógeno, porque carecen de quinasa. Así pues, las células adiposas necesitan glucosa para sintetizar triacilglicérols. Las lipasas hidrolizan los TAG a ácidos grasos y glicerol. La liberación del primer ácido graso de un TAG, es la etapa limitante de velocidad catalizada por una lipasa sensible a hormonas, que se fosforila reversiblemente (enzima activada por adrenalina, noradrenalina, glucagón, etc. e inhibida por la insulina). El AMP cíclico actúa como mensajero celular activando la lipólisis. Los TAG de las células adiposas están continuamente hidrolizándose y resintetizándose. El glicerol liberado en la hidrólisis fluye hacia el hígado. La mayoría de los ácidos grasos formados en la hidrólisis, si el glicerol-3-fosfato abunda, se reesterifican. Por el contrario, si el glicerol-3-fosfato escasea por falta de glucosa, los ácidos grasos se liberan al plasma. De este modo, el nivel de glucosa en las células adiposas es el principal factor determinante de la liberación de ácidos grasos a la sangre.

Hígado

La actividad metabólica del hígado es esencial para suministrar combustible al cerebro, músculo y otros órganos periféricos. La mayoría de los compuestos absorbidos por el intestino pasan a través de hígado, lo que permite regular el nivel de muchos metabolitos de la sangre. El hígado puede retener grandes cantidades de glucosa y convertirla en glucógeno. El hígado puede liberar glucosa en sangre, por degradación de glucógeno almacenado y por realización de gluconeogénesis. Los precursores principales de la

glucosa son: lactato y alanina del músculo, el glicerol del tejido adiposo y los aminoácidos glucogénicos de la dieta.

El hígado juega también un papel central en la regulación del metabolismo lipídico. Cuando los combustibles son abundantes, el hígado esterifica los ácidos grasos, y luego los secreta a la sangre en forma de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). Esta lipoproteína es la fuente principal de triacilglicéridos de origen endógeno. Sin embargo, en estado de ayuno, el hígado convierte los ácidos grasos en cuerpos cetónicos. ¿Cómo escoge la célula hepática entre estas 2 vías antagónicas? La selección depende de que los ácidos grasos entren o no en la matriz mitocondrial. Recordemos que los ácidos grasos de cadena larga atraviesan la membrana mitocondrial interna solamente si están unidos a carnitina. La carnitina aciltransferasa I es inhibida por el malonil-CoA, el intermediario limitante en la síntesis de ácidos grasos. Así, cuando abunda el malonil-CoA, se evita que los ácidos grasos de cadena larga puedan entrar en la matriz mitocondrial, impidiendo la β -oxidación y formación de cuerpos cetónicos. En cambio, los ácidos grasos son exportados al tejido adiposo para que se incorporen a los TAG. Por el contrario, cuando el combustible escasea, el nivel de malonil-CoA desciende. En estas condiciones, los ácidos grasos liberados en el tejido adiposo entran en la matriz mitocondrial para convertirse en cuerpos acetil-CoA a través de β -oxidación.

El hígado es el órgano de formación de la urea. Además, es por excelencia quien se encarga de biotransformar cualquier sustancia extraña que ingresa a nuestro organismo y también de metabolizar el etanol. El hígado es el principal productor de cuerpos cetónicos, pero no puede utilizarlos como fuente energética ya que carece de las enzimas necesarias para ello.