

Módulo 1

Amplificación de un fragmento de ADN genómico por PCR

En este primer módulo se amplificará por PCR, mediante el uso de oligonucleótidos específicos, un fragmento de ADN genómico de hígado de pollo correspondiente a una región del promotor del gen de un factor GATA. El primer día deberán analizar en gel de agarosa y cuantificar por medidas espectrofotométricas el ADN de pollo extraído por los docentes según el protocolo que figura al final del módulo. El segundo día se realizará la PCR, y el tercero se analizarán los productos amplificados por migración en gel de agarosa.

Día 1: Análisis del ADN genómico

1. Cada grupo recibe dos muestras de ADN genómico de pollo extraído por los docentes según el protocolo descrito en el Anexo 1.
2. Se mide absorbancia a 260 y 280 nm y se calcula la concentración de ADN.
3. Se prepara un minigel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. Se funde la agarosa y se agrega, después de fundida, 5µl de una solución de bromuro de etidio de 10 mg/ml, cada 100ml de agarosa. **Atención: el bromuro de etidio es un fuerte mutágeno y debe ser manejado con guantes!** Verter el gel y dejar solidificar.
4. Se estimará el volumen a cargar a partir de la concentración determinada en el punto 2. Se agrega buffer de carga. Se colocan las muestras de ADN genómico en el gel, anotando el orden en que son cargadas. En otro pocillo se carga el marcador de peso molecular
5. Se deja migrar en buffer TAE 1X, a aproximadamente 8V/cm, hasta unos 2/3 del gel.
6. Se detiene la corrida y se visualiza bajo transiluminador de luz UV.

Día 2: Amplificación por PCR de un fragmento de ADN

1. Se diluye el ADN analizado la clase anterior a una concentración final de 50 ng/µl
2. En un tubo de microcentrífuga de 0.25 ml se agrega sucesivamente en hielo:

H ₂ O	csp	25 µl
Buffer 10x		2,5 µl
dNTPs 2,5 mM		2,5 µl
oligo1 (50pmoles/ µl)		0,5 µl
oligo2 (50pmoles/ µl)		0,5 µl
ADN de hígado de pollo cantidades variables		50 a 200 ng
Taq ADNpolimerasa (1U/ µl)		0,5 µl

3. En forma análoga se preparan mezclas de amplificación control: a) sin ADN; b) sin oligonucleótidos; y c) con ADN de un plásmido que porta la secuencia del promotor.
4. Se programa el termociclador para que la reacción ocurra en 36 ciclos de 94-65-72°C durante 1-1-1 min respectivamente.
5. Identifique en la Figura del anexo 2 la ubicación de los oligonucleótidos 1 y 2, y determine el tamaño del fragmento esperado en la amplificación.

Día 3: Análisis de los productos amplificados. Técnicas de secuenciación.

1. Se prepara un minigel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X.
2. Se agrega buffer de carga a las reacciones de amplificación y los controles. Se siembra junto con un marcador de peso molecular adecuado.
3. Se deja migrar en buffer TAE 1X, a aproximadamente 8V/cm, hasta unos 2/3 del gel.
4. Se detiene la corrida y se visualiza bajo transiluminador de luz UV.
5. Se recorta la banda del gel de agarosa que contiene el producto amplificado.
6. Se coloca en un tubo de microcentrífuga de 0,5 ml previamente agujereado en el fondo y en el que se ha colocado lana de vidrio.
7. Se coloca el tubo de 0,5 ml en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se centrifuga a 12000 rpm durante 10 minutos.
8. Se guarda el eluido.
9. Fundamento teórico de las técnicas de secuenciación por el método de Sanger. Secuenciación automática (Anexo 4). CD demostrativo del funcionamiento del secuenciador automático de Fac. de Ciencias.
10. Lectura de placas autoradiográficas de secuenciación manual. Discusión de resultados obtenidos en la secuenciación manual del inserto clonado.
11. Resultados obtenidos en el servicio de Secuenciación Automática de la Facultad de Ciencias después de haber enviado 1 μ g de ADN de uno de los clones recombinantes obtenidos en el curso práctico.

ANEXO 1: Protocolo de extracción de ADN genómico.

1. Se parte de 0,5 g de hígado que se corta en pequeños trozos con una hoja de bisturí. A continuación se homogeniza con homogenizador de teflón en 5 ml de solución de digestión con Nonidet P40 0,5%. Se deja 10 min. a temperatura ambiente.
2. Luego de filtrar sobre gasa, se incuba con pronasa a concentración 1mg/ml y SDS 0,25% durante una hora a 45°C.
3. Se adiciona NaCl para llevar a una concentración final de 1M.
4. Se extraen proteínas mediante el agregado de un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (25:1). La fase superior (acuosa) se transfiere a un tubo limpio.
5. El ADN contenido en la fase acuosa final se precipita mediante el agregado lento de dos volúmenes de alcohol absoluto. Se forma una madeja de ADN que se recoge con varilla de vidrio.
6. El ADN se lava dos veces con etanol 70° y se seca al aire.
7. Se agrega al ADN un volumen máximo de 0,5 ml de agua y se deja resuspendiendo a 4°C, de ser posible con un lento movimiento de rotación.

Solución de digestión

Tris-HCl	10 mM pH=8
NaCl	0,1 M
EDTA	0,05 M pH=8

ANEXO 2: Secuencia del promotor de GATA-1 de pollo.
Reproducido de Hannon et al.(1991).

```
TCCCCACCCCAAAAGCGGAGGTCTCAGTGTGCCCCCCCCCAATAACAACCCACTATGG
GGTGGGGGGGAGGTAAAGCAAGGGGGGGGCACCCCTGATGCGTGTGTGTGTCCCCC
CCCCCGTTCCCAACTGCCTCCCGCTCGCTATCAGATAAGGCCTTATCAGTGCCCTAC
AGCCCTGGGGCCGTTACCCAAAAGGGCAGGGGGGCACCCTAAAGTGCCCGCCCCCCCC
CCACACCAAAAAAAAAACTTCTACAAGGAGGGGGGGGGGGGGGTGCACCGTCTGCGGGC
GGGGCCGTGTCCGTCCGTCCCTGTC
```

ANEXO 3: Reactivos**Electroforesis de ADN****-TAE 1x****Solución 50X -:**

Tris base	242g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5M, pH 8.0	100 ml
Agua	c.s.p. 1litro

-Buffer de carga: Glicerol 30%
Azul de Bromofenol 0,25%
Azul de Xilencianol 0,25%

-Bromuro de etidio 10mg/ml

-Marcador de Peso Molecular

-Agarosa

PCR

-Buffer de reacción 10x : Tris.HCl 100mM pH 8,3
KCl 500 mM
MgCl₂ 15 mM

-oligo1

5'GGCACTTTAGGGTGCCCCCTGCCCTT3' (50pmoles/ µl)

-oligo2

5'GGGCACCCCCTGATGCGTGTGTGTGTC3' (50pmoles/ µl)

-dNTPs

dATP, dCTP, dGTP, dTTP (c/u a 2.5 mM)

-Taq polimerasa

-Agua destilada estéril

ANEXO 4: Secuenciación (método de Sanger)

- Se desnaturalizó 1 µg de ADN del clon recombinante con NaOH (concentración final 0,2 M) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregó el oligonucleótido adecuado (KS, SK, T3 ó T7 a 50 ng/µl) y se precipitó con Acetato de Sodio 3 M pH 5,5 y Etanol Absoluto durante media hora a -70 C.
- Se resuspendió el ADN lavado en 12 µl de agua destilada estéril.
- Se hibridizó el ADN con el oligonucleótido (en exceso) en un buffer adecuado (Tris.HCl 40 mM pH 7,5, MgCl₂ 20 mM, NaCl 50 mM, DTT 5 mM).
- Se calentó a 37°C durante 20 minutos y se permitió que alcanzara temperatura ambiente.
- Se agregó 0,5 µl de [α -³⁵S]dATP de 10 mCi/ml, 1 unidad de enzima (T7 Polimerasa) y 2 µl de mezcla de marcado (1,5 µM de c/u dCTP, dGTP, dTTP en Tris.HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM).
- Se incubó durante 5 minutos a 37 C y se trasvasó alícuotas de 3,5 µl a tubos que contenían 2,5 µl de las mezclas de terminación para cada una de las bases previamente termostatzadas a 37 C.

Mezclas de terminación:

- A: dATP 80 µM, dCTP 80 µM, dGTP 80 µM, dTTP 80 µM, ddATP 8 µM, NaCl 50 mM en Tris.HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM
- C: dATP 80 µM, dCTP 80 µM, dGTP 80 µM, dTTP 80 µM, ddCTP 8 µM, NaCl 50 mM en Tris.HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM;
- G: dATP 80 µM, dCTP 80 µM, dGTP 80 µM, dTTP 80 µM, ddGTP 8 µM, NaCl 50 mM en Tris.HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM;
- T: dATP 80 µM, dCTP 80 µM, dGTP 80 µM, dTTP 80 µM, ddTTP 8 µM, NaCl 50 mM en Tris.HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM.

- Se permitió que la reacción continuara durante otros cinco minutos más a 37 C.
- Se paró la reacción por agregado de 4 µl de solución de carga (Ficoll 400 20 %, EDTA 0,1 M, SDS 1,0 %, Azul de Bromofenol 0,25 %, Xilencianol 0,25 %).
- Las muestras se calentaron a 75°C durante 2 minutos previo a su colocación en los geles desnaturalizante de Poliacrilamida (Acrilamida-Bisacrilamida, 30:1.6, al 6 % en TBE Urea 7 M) usando espaciadores de 0.2 mm. Las corridas se realizaron en TBE (Tris 89 mM, Acido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM) a 40 W de potencia constante durante toda la corrida.
- Se fijó el gel durante 10 minutos con una solución de Ácido Acético al 10 % y Metanol al 10 %.
- Se transfirió a papel Whatmann 3 MM y se secó cubierto con rolopac a 80°C con vacío.
- Se expuso con placa autoradiográfica (Konica AX) a temperatura ambiente.

Se reveló y fijo con reactivos Cenix.