

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FUNDAMENTOS DE BIOLOGÍA APLICADA I
4º CURSO DE BIOLOGÍA**

**MÓDULO DE GENÉTICA
TÉCNICAS MOLECULARES DE ANÁLISIS GENÉTICO**

AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DE ADN SATÉLITE

Esta práctica tiene una duración mínima de 6 horas distribuidas en 3 sesiones de 2 horas cada una. Para ello, los puntos 1.1, 1.2 y 2.1 del siguiente conjunto de protocolos técnicos habrán sido previamente realizados por los profesores de éste módulo y, por tanto, los alumnos en el laboratorio comenzarán la práctica a partir del punto 2.2. Tanto la digestión de ADN como la preparación de geles de agarosa (puntos 1.1 a 2.1) son técnicas de laboratorio que previamente fueron desarrolladas en las prácticas de la asignatura Genética (2º curso de Biología).

A continuación se detallan los protocolos de cada una de las técnicas necesarias para llevar a cabo el objetivo propuesto: la clonación de una familia de ADN satélite existente en el genoma de una especie de esturión: *Acipenser naccarii*.

Técnica 1: Digestión de ADN de *A. naccarii* y de pUC18 con enzimas de restricción

1.1. Digestión de ADN genómico de *A. naccarii*

- a) En un microtubo eppendorf, añadir:
- 10 µl de ADN genómico (500 ng/µl)
 - 2 µl de tampón de restricción
 - 3 µl de enzima HindIII
 - 5 µl de agua destilada estéril
- b) Incubar durante 16 horas a 37°C

1.2. Digestión de ADN plasmídico con enzimas de restricción

- a) En un eppendorf, añadir:
- 4 µl de ADN plasmídico (250 ng/µl)
 - 2 µl de tampón de restricción
 - 1 µl de enzima HindIII
 - 13 µl de agua destilada estéril
- b) Incubar durante 1 hora a 37°C
- c) Purificar

Técnica 2: Aislamiento del ADN satélite a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión

2.1. Preparación del gel de agarosa de bajo punto de fusión:

- a) En un matraz de 250 ml de capacidad añadir:
 - 30 ml de tampón TAE (0.04 M Tris-acetato; 0.001 M EDTA)
 - 0.9 gramos de agarosa de bajo punto de fusión
- b) Calentar, utilizando un microondas, hasta que se funda la agarosa
- c) Dejar enfriar hasta aproximadamente 50°C y añadir:
 - 3 µl de solución de bromuro de etidio (10 mg/ml)
- d) Mientras se enfría la agarosa, sellar con cinta adhesiva el molde en el que se preparará el gel. Colocar el molde en una superficie horizontal y situar el peine que labrará los pocillos a unos centímetros del borde.
- e) Una vez se ha enfriado la agarosa hasta 50°C, añadir esta solución al molde con cuidado de retirar las burbujas que se formen. Dejar gelificar la agarosa hasta que adquiera una apariencia translúcida.
- f) Retirar el peine y la cinta adhesiva. Colocar el gel en la cubeta de electroforesis y cubrirlo con tampón de recorrido (TAE).

2.2. Electroforesis

- a) Con cuidado de no romper los pocillos, cargar en el gel las diferentes muestras de ADN digerido. Para ello, añadir 4 µl de tampón de carga a los tubos en los que se desarrolló la digestión y, una vez mezclado ADN y tampón de carga, ayudados de una micropipeta, cargar dicha mezcla en un pocillo del gel.
- b) Conectar la fuente de alimentación al gel y correrlo durante 2 horas a 50 volts/cm.
- c) Analizar los resultados mediante observación del gel en un transiluminador, tratando de identificar sobre los rastros de ADN genómico los monómeros del ADN satélite.

2.3. Purificación del ADN satélite

Aunque se pueden utilizar otros métodos para la purificación del ADN satélite obtenido a partir del gel de agarosa, por su sencillez y rapidez utilizaremos para dicha purificación el kit "Sephaglas™ BandPrep Kit" (Pharmacia Biotech). Este método se basa en la unión del ADN a una matriz de sílice en condiciones de elevada fuerza iónica tras la solubilización de la agarosa con sales caotrópicas. Posteriormente esta matriz se lava varias veces para finalmente eluir el ADN con agua destilada estéril.

1. En primer lugar, ayudados de un bisturí, cortar y escindir el trozo de gel de agarosa en el que se localice la banda de fragmentos monoméricos de ADN satélite. Una vez escindido del gel el trozo con ADN satélite, introducir dicho trozo de agarosa en un microtubo eppendorf.
2. Añadir 250 µl de la solución utilizada para ayudar a solubilizar el gel ("Gel Solubizer").
3. Agitar mediante el uso de vortex, hasta que se disuelva la agarosa.
4. Mantener 10 minutos en un baño a 60°C.
5. Añadir 5 µl de la matriz de sílice utilizada para purificar el ADN ("Sephaglass-BP")
6. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Mezclar cada minuto mediante vortex.
7. Centrifugar a 12000 rpm, 1 minuto, y descartar el sobrenadante.
8. Volver a centrifugar a 12000 rpm, 1 minuto, y volver a descartar el sobrenadante.
9. Añadir 80 µl del tampón de lavado ("Wash buffer") al pellet y mezclar bien mediante succión y expulsión con una micropipeta.
10. Centrifugar durante un minuto y descartar el sobrenadante.
11. Repetir el lavado dos veces más.
12. Dejar secar 15-20 minutos.
13. Añadir 20 µl del tampón de dilución y mezclar bien.
14. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente con agitación periódica.
15. Centrifugar durante 1 minuto.
16. Pasar el sobrenadante a un microtubo eppendorf limpio.

Técnica 3: Ligación

Se trata en este caso de ligar los fragmentos de ADN satélite obtenidos mediante digestión con la enzima HindIII al plásmido pUC19 previamente digerido también con la enzima HindIII. Para ello:

1. En un microtubo eppendorf añadir:
 - A. 100 ng de ADN satélite previamente purificado.
 - B. 25 ng del plásmido pUC19 digerido con HindIII
 - C. 2 μ l de tampón de ligación
 - D. 2 μ l de ADN ligasa
 - E. Completar hasta 20 μ l con agua estéril

2. Incubar durante 16 horas a 15°C.

Técnica 4: Transformación

Se trata finalmente de introducir los plásmidos recombinantes en células bacterianas (transformación). Para ello utilizaremos una cepa de *Escherichia coli*, la cepa DH5- α , útil para su transformación con plásmidos recombinantes derivados del vector pUC19. Se ha de utilizar para la transformación un cultivo de dicha cepa con bacterias competentes ("ávidas" para captar ADN por transformación). Las células que se van a utilizar han sido tratadas de tal forma que ya son competentes.

1. Depositar en hielo un microtubo eppendorf durante unos minutos.
2. Añadir: 50 μ l de la suspensión bacteriana y 15 μ l de la solución de ligación.
3. Dejar 30 minutos en hielo.
4. Introducir los eppendorfs con la mezcla en un baño a 37°C durante 20 segundos.
5. Pasar ahora el microtubo a hielo, nuevamente, durante 2 minutos.
6. Añadir 950 μ l de medio de cultivo LB líquido.
7. Incubar durante 1 hora a 37°C con agitación.
8. Sembrar 100 μ l del cultivo líquido en placas de medio LB sólido con Ampicilina, X-gal e IPTG.

Medio LB líquido

Peptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
CINa	5 g/l
Ajustar el pH=7	

Autoclavar

Medio LB sólido

Añadir a medio líquido agar al 1.5% y autoclavar

Medio LB sólido con Ampicilina, X-gal e IPTG

Preparar 500 ml de medio LB sólido. Una vez autoclavado, dejar enfriar y añadir 500 µl de una solución de Ampicilina (50 mg/ml). Verter en placas de Petri.

Una vez enfriadas las placas, extender sobre cada placa 40 µl de una solución de X-gal (20 mg/ml en dimetil-formamida) y 4 µl de la solución de IPTG (200 mg/ml en agua destilada estéril). Dejar en la estufa a 37°C durante 4-6 horas antes de usarlas para extender el cultivo con células transformadas.