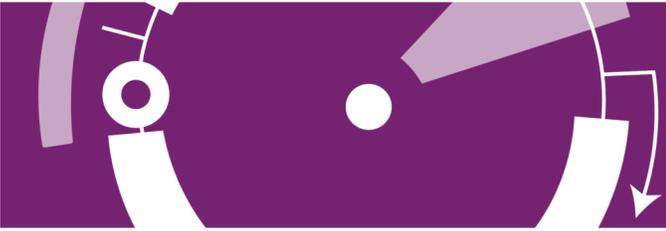




Manual de protocolos v.1

Equipo de iGEM Bolivia 2021





ÍNDICE

Protocolos básicos de biología molecular 01

- 01. Protocolo de PCR 03
- 02. Protocolo de qPCR Taqman 05
- 03. Protocolo de qPCR SYBRgreen 09

Protocolos básicos microbiológicos 15

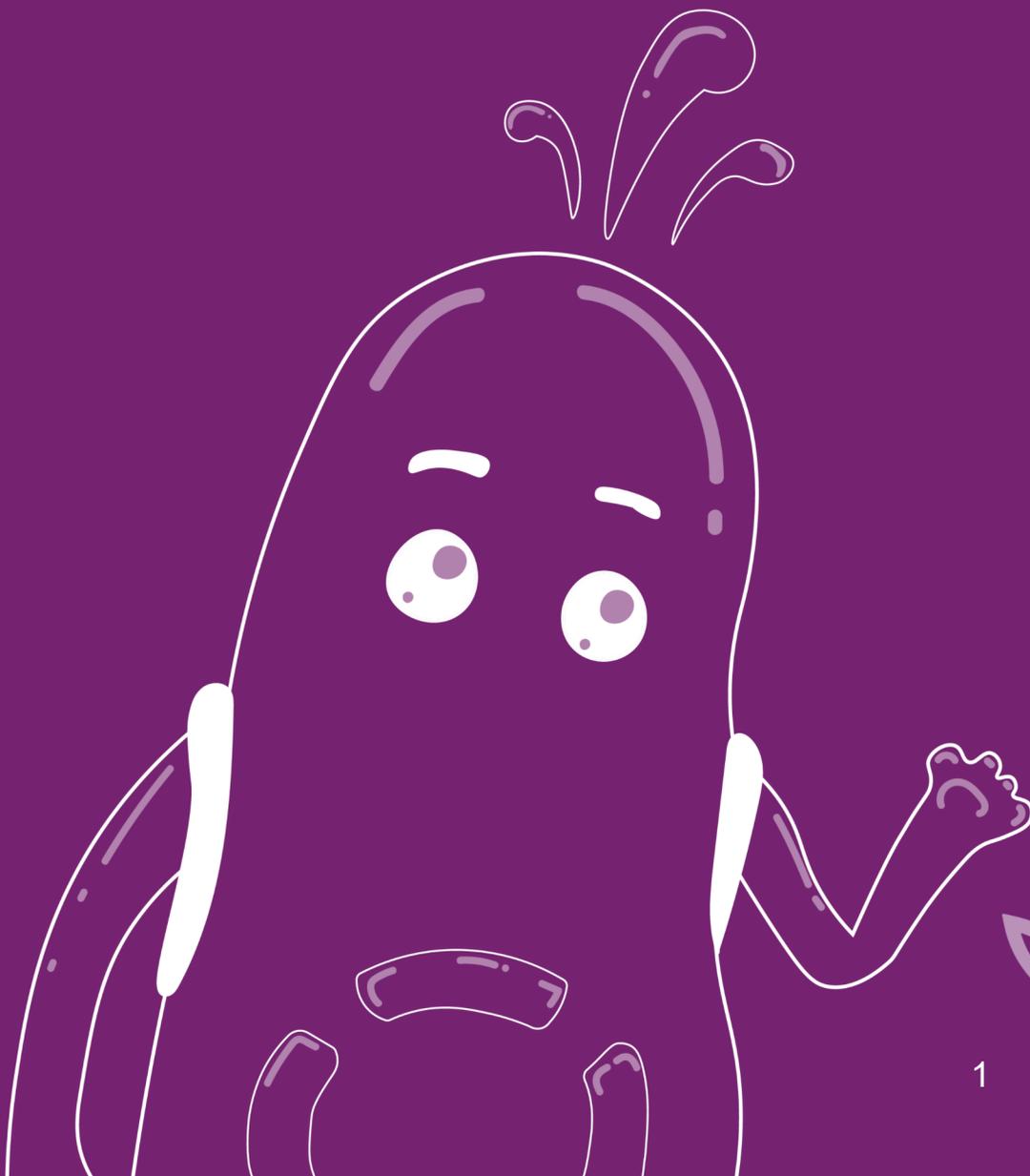
- 04. Protocolo de conteo de poblaciones bacterianas: método indirecto 17
- 05. Protocolo de conteo de poblaciones bacterianas: método directo 21
- 06. Protocolo de conteo de poblaciones bacterianas: Citometría de flujo 25
- 07. Protocolo de cultivo celular 29

Protocolos básicos de clonación molecular 39

- 08. Protocolo de transformación por choque térmico 41
- 09. Protocolo de clonación por enzimas de restricción 45
- 10. Protocolo de ensamblaje de gibson 49
- 11. Protocolo de ensamblaje Golden Gate 53
- 12. Protocolo de producción de proteínas recombinantes a pequeña escala 57

Protocolos básicos de biología molecular

Equipo de iGEM Bolivia 2021





Reacción en cadena de la polimerasa(PCR)

01

Capítulo

INTRODUCCIÓN:

En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa es la técnica más sensible para la detección de ácidos nucleicos (ADN). La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente.

OBJETIVO:

Amplificación y detección de fragmentos de ADN

METODOLOGÍA:

Tipo de muestra.- ADN.

Materiales, equipos y reactivos.-

Materiales:

- Tubos de 1,5 mL
- Puntas de pipetas
- Micropipetas 0,2 – 10uL ; 5 - 50uL y 10 – 100 uL
- Matraces.
- Pipetas de vidrio de 5 mL.
- Probetas.

Equipos:

- Cabina de flujo laminar
- Termociclador.
- Microcentrifuga.
- Microondas
- Equipo de electroforesis
- Transiluminador de luz UV.

Reactivos:

- Agua (biología molecular).
- Etanol 70%, MgCl₂ y agarosa.
- Primers: Forward y Reverse.
- Solución de dNTPs y Taq pol.
- Marcador de Peso molecular y tampon de carga.
- EDTA-acetato de sodio,
- Tris-acetato-EDTA (TAE).
- Bromuro de Etidio.

Desarrollo de los metodos.-

1. Agregue los reactivos a un tubo de tamaño apropiado en el orden provisto en la tabla. Al final, se debe agregar una plantilla a los tubos apropiados.
2. Mezcle suavemente usando una micropipeta y centrifuge brevemente para recoger todos los componentes en el fondo del tubo.

Reactivos	Concentración	Volumen para un tubo (uL)	Volumen para 10 tubos (uL)
ddH ₂ O		1,2	12
Buffer PCR	1X	5	50
MgCl ₂	0,1-0,5mM	1,1	5,4
dNTPs	0,2mM	1	10
Primer Forward	0,5uM	0,6	6
Primer Reverse	0,5uM	0,6	6
Taq DNA Polymerase	0,05U/uL	0,5	5
		10	100

Los parámetros de amplificación variarán según los primers y el termociclador utilizado. Puede ser necesario optimizar el sistema para cebadores individuales, plantilla y termociclador.

Ciclos de la Amplificación

- Se recomiendan 25-30 ciclos de amplificación.
- Desnaturalización: 94 °C - 1 minuto
- Hibridación: 55 °C - 2 minutos
- Extensión: 72 °C - 3 min

El ADN amplificado puede evaluarse mediante electroforesis en gel de agarosa.

NOTA

Las condiciones óptimas para la concentración de Taq ADN polimerasa, plantilla de ADN, cebadores y MgCl₂ dependerán del sistema que se utilice. Puede ser necesario determinar las condiciones óptimas para cada componente individual.

NOTA

Agregue 50 µL de aceite mineral a la parte superior de cada tubo para evitar la evaporación si se usa un termociclador sin tapa calentada.

NOTA

La capa de aceite mineral puede eliminarse mediante una sola extracción con cloroformo (1:1), recuperando la fase acuosa.

NOTA

La PCR depende de una ADN polimerasa termoestable, la Taq polimerasa.

NOTA

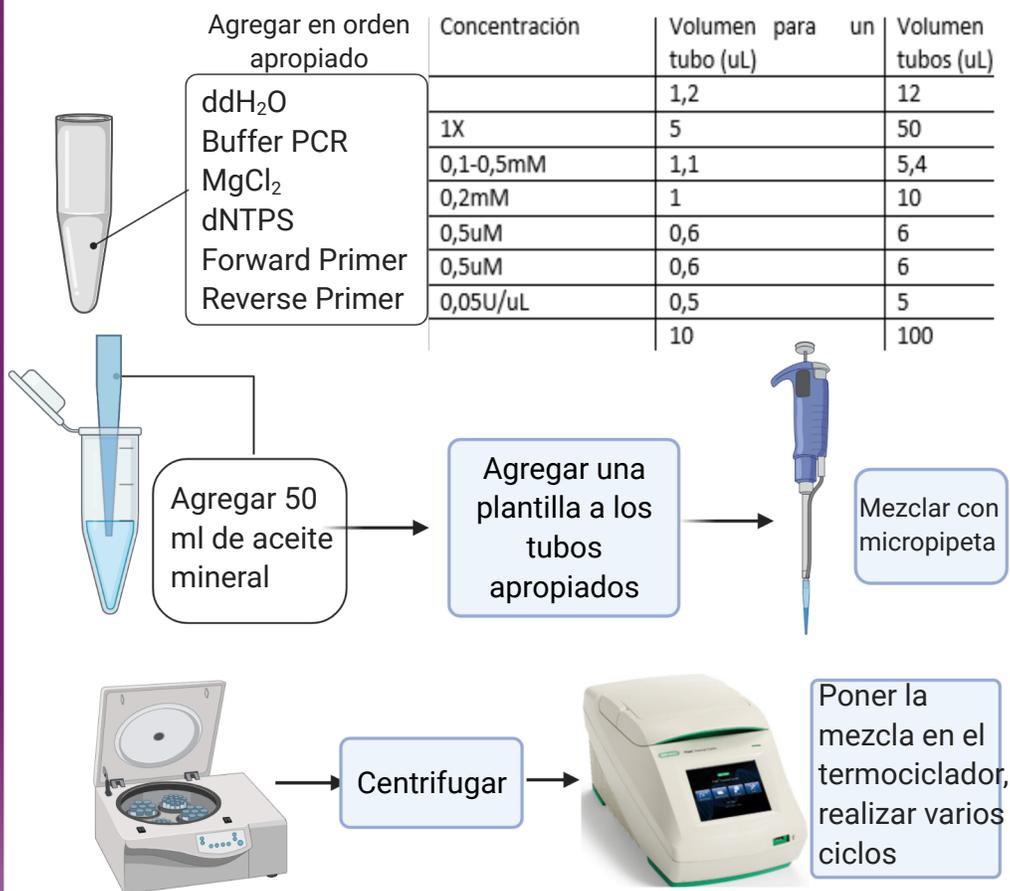
Requiere de primers de ADN diseñados específicamente para la región de ADN de interés.

NOTA

Una PCR normalmente tiene de 25 a 35 ciclos y tarda de 2 a 4 horas

FUNDAMENTO:

La reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, es una técnica para hacer muchas copias de una determinada región de ADN in vitro (en un tubo de ensayo en lugar de un organismo).



En la PCR, la reacción se somete repetidamente a un ciclo de cambios de temperatura que permiten la producción de muchas copias de la región blanco.

BIBLIOGRAFÍA:

- Biolabs, N. (2021). International.neb.com. De: <https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/pcr>

- PCR Amplification | An Introduction to PCR Methods | Promega. Worldwide.promega.com. (2021). De: <https://worldwide.promega.com/resources/guides/nucleic-acid-analysis/pcr-amplification/>



INTRODUCCIÓN:

Las sondas TaqMan® son sondas de hidrólisis de doble etiqueta que aumentan la especificidad de los ensayos de PCR en tiempo real. La introducción de estas sondas marcadas con fluorógenos, utilizan la actividad nucleasa 5' de la ADN Taq polimerasa, lo cual mejora los sistemas de PCR en tiempo real.

OBJETIVO:

Cuantificar la cantidad de ADN en tiempo real, con el método de Taqman PCR en tiempo real.

METODOLOGÍA:

Tipo de muestra.- ADN extraído.

Materiales, equipos y reactivos.-

Materiales:

- Tubos de microcentrifuga libres de ADNasa
- Micropipetas de 0.2 - 10 uL; 10 - 100uL; 100uL - 1000uL

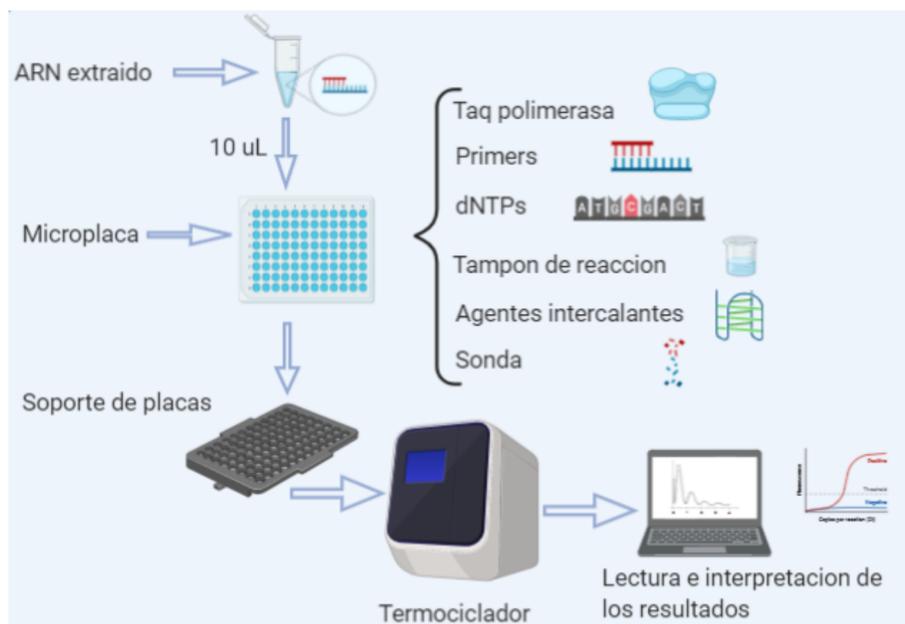
Equipos:

- Termociclador
- Microcentrifuga
- Placas o tarjetas de matriz taqman
- Transiluminador de luz UV

Reactivos:

- Etanol absoluto
- Primers
- Solucion de dNTPs
- Taq polimerasa

Desarrollo de los métodos.-



NOTA

Estas sondas fluorógenas permitieron el desarrollo de un método en tiempo real para detectar solo productos de amplificación específicos.

NOTA

Cada ensayo contiene el cebador y la sonda establecidos para su objetivo de interés

NOTA

Los ensayos contienen: Un par de cebadores sin etiquetar.

Una sonda TaqMan con una etiqueta de tinte FAM o VIC en el extremo de 5' y un aglutinante de surco menor (MGB)

Un atenuador no fluorescente (NFQ) en el extremo de la diana puede ser ADN, ADNc o ARN



NOTA

El quencher (Q) inhibe la fluorescencia del fluoróforo cuando es excitado por la fuente de luz del termociclador.

NOTA

Ventajas del método

- Se reduce significativamente el fondo y los falsos positivos.
- Se elimina el procesamiento posterior a la PCR, lo que ahorra tiempo..

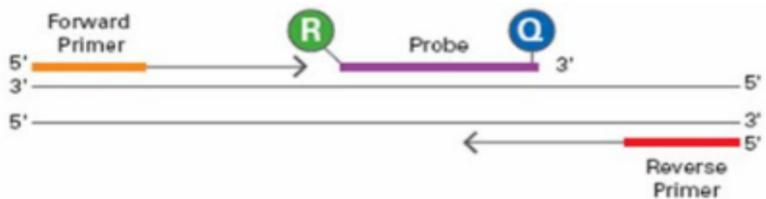
NOTA

Las sondas TaqMan son bastante diferentes de los cebadores en: No pueden ser extendidos por nuestra enzima amigable, Taq Polymerase, ya que carecen de un grupo hidroxilo libre. Se unen covalentemente a otras dos moléculas

FUNDAMENTO:

Las reacciones basadas en TaqMan requieren una plantilla de doble hebra, así como dos cebadores específicos de la diana bastante estándar. Pero a diferencia de los que se utilizan en la PCR normal, los ensayos TaqMan requieren un tercer oligo específico de secuencia llamado sonda. Comprende los siguientes procesos:

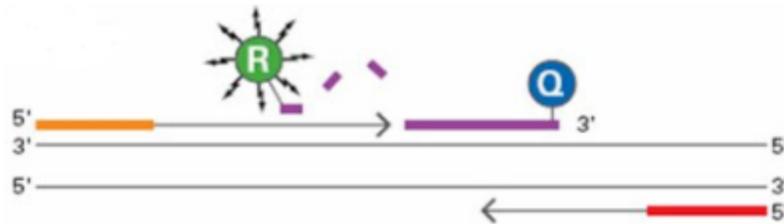
1.Polimerización.- Un tinte fluorescente (R) que nos informa de la señal a medida que generamos más y más producto y un extintor (Q) que apaga la señal fluorescente del informador en determinadas circunstancias. Se unen a los extremos 5 'y 3' de una sonda TaqMan®, respectivamente.



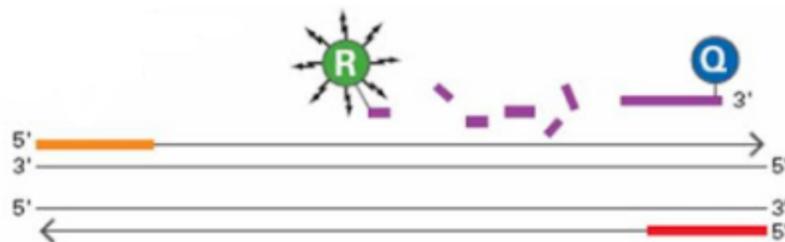
2.Desplazamiento de la hebra.- Cuando la sonda está intacta, se apaga la emisión de tinte indicador.



3.Escisión.- Durante cada ciclo de extensión, el ADN de la polimerasa escinde el tinte indicador de la sonda.



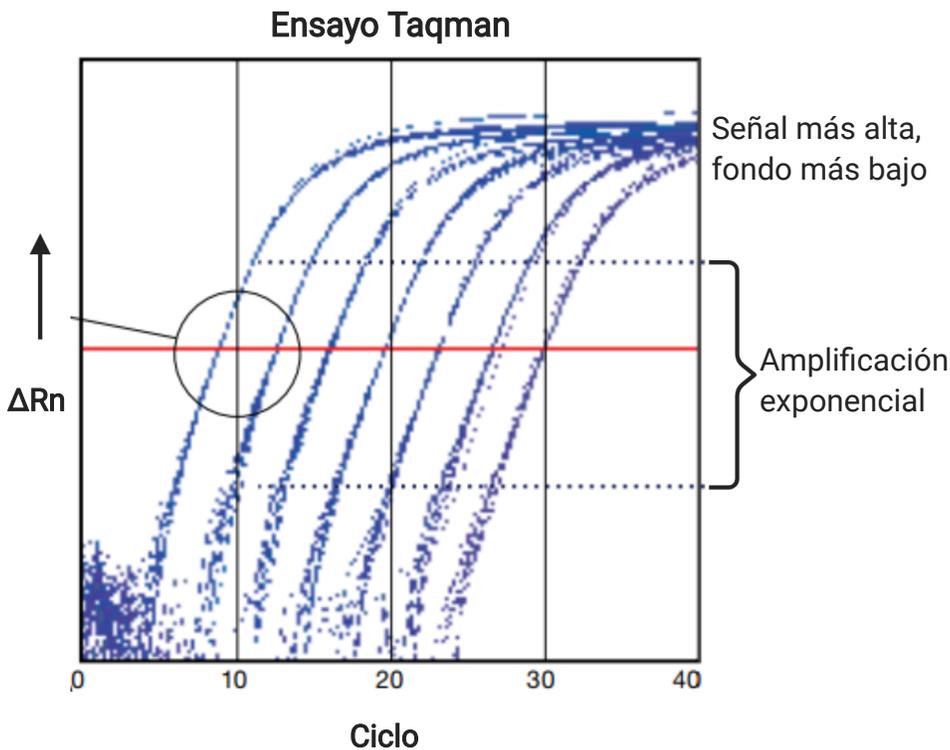
4.Polimerización completa.- Después de la separación de el extintor, el colorante reportero emite fluorescencia.





RESULTADOS ESPERADOS:

El instrumento en tiempo real realizará el monitoreo y registro del aumento de fluorescencia después de cada ciclo, generando un gráfico de amplificación que permitirá la interpretación de los datos.



NOTA

Los Ensayos basados en sondas TaqMan se utilizan en PCR cuantitativa para:

- Ensayos de expresión génica
- Farmacogenómica
- Genotipado de antígenos leucocitarios humanos (HLA)
- Determinar la carga viral en muestras clínicas (VIH, Hepatitis)
- Ensayos de identificación bacteriana
- Genotipado SNP

BIBLIOGRAFÍA:

- Thermo Fisher Scientific. TaqMan Gene Expression Assay solutions.
 - Thermo Fisher Scientific. Introduction to Gene Expression.
 - Thermo Fisher Scientific. How TaqMan Works -- Ask TaqMan® Ep. 13 by Life Technologies.
- <https://www.youtube.com/watch?v=fkUDu042xic>



INTRODUCCIÓN:

SYBR® Green es un colorante que se intercala en el ADNdc (doble cadena) y tiene muchas aplicaciones en la biología molecular. Una de esas aplicaciones es la PCR en tiempo real, también conocida como qPCR. La intensidad de la fluorescencia del colorante aumenta con cada ciclo sucesivo de PCR y puede utilizarse para cuantificar el ADN en la reacción.

OBJETIVO:

Cuantificar la cantidad de copias de un gen que existen en una muestra.

METODOLOGÍA:

Tipo de muestra.- ADN purificado.

Materiales, equipos y reactivos.-

Materiales:

- Micropipeta 0.5 - 10 µL
- Micropipeta 10 - 100 µL
- Tubos con tapas para qPCR

Equipos:

- Termociclador para qPCR
- Microcentrífuga
- Campana de flujo laminar (opcional)

Reactivos:

- qPCR SYBR Green Mix. Sigma Aldrich®
- Plantilla de ADN/cADN
- Primers forward y reverse
- Agua grado PCR

Desarrollo de los métodos.-

1. Preparación

- Ponga todos los componentes de la reacción en hielo.
- Mezclar y luego centrifugar brevemente para recoger el contenido en el fondo del tubo.

2. Reacción SYBR Green I estándar

Master mix para otros qPCR ReadyMixes:

Reactivo	Concentración final	Volumen (20µL)
qPCR Mix (2X)	1X	10 µL
Primer Forward (10µM)	0.2 µM	0.4 µL
Primer Reverse (10µM)	0.2 µM	0.4 µL
Agua grado PCR	-	4.2 µL

Master mix para reactivos qPCR con componentes separados:

Reactivo	Concentración final	Volumen (20µL)
qPCR Mix (2X)	1X	10 µL
Primer Forward (10µM)	0.2 µM	0.4 µL
Primer Reverse (10µM)	0.2 µM	0.4 µL
25 Mm MgCl ₂	3.5 µM	3.5 µL
Colorante referencia	*	0 - 0.25 µL
Agua grado PCR	*	4.2 µL

(continúa en la siguiente página)

NOTA

Para análisis de expresión:

ADNc diluido en 1:10 para detectar un objetivo de expresión media a alta o 1:2 a 1:5 para transcripciones raras

Consideraciones para reacción:

- Prepare suficiente mezcla maestra para ejecutar todas las muestras por duplicado.
- Asegúrese de incluir controles negativos sin plantilla (NTC).
- Seleccione la tabla apropiada abajo basada en el reactivo qPCR seleccionado.
- Calcule la cantidad de reactivos a mezclar. Añada un 10% de volumen para tener en cuenta el error de pipeteo
- Mezclar bien, evitando las burbujas.

NOTA

ADN Plantilla

Se necesitan muy pocas copias del ADN objetivo (~100 pg de ADNg o ADNc) para iniciar la qPCR. Para reducir al mínimo la contaminación con inhibidores de reacción, la cantidad de plantilla inicial debe mantenerse al mínimo necesario para lograr una cuantificación precisa.

NOTA

Algunos termocicladores de qPCR requieren un colorante de carga como ROX para controlar la variabilidad del sistema óptico y normalizar las diferencias en la intensidad de la señal. Asimismo, otros termocicladores requieren fluoresceína para crear un fondo virtual cuando trabajan con ensayos SYBR Green I (que tienen un fondo muy bajo).

NOTA

Métodos de cuantificación:

Las técnicas de cuantificación absoluta se utilizan para determinar la cantidad de ADN diana en la muestra inicial, mientras que la cuantificación relativa determina la relación entre la cantidad de ADN diana y un amplicón de referencia. El amplicón de referencia ideal tendría una expresión invariable y constitutiva. En la práctica, para esta función se elige un gen de referencia, pero hay otras opciones de referencia que se ajustan mejor a los requisitos anteriores.

NOTA

Cuantificación absoluta: Utiliza estándares externos para determinar la cantidad absoluta de ADN objetivo. Para eliminar las diferencias de cuantificación debidas al alineamiento, los sitios de unión de los primers estándares deben ser los mismos que los de la secuencia objetivo. El patrón externo ideal contiene secuencias que son iguales a la secuencia objetivo o que sólo varían ligeramente de la secuencia objetivo.

NOTA

Cuantificación relativa:

Dado que este método mide la cantidad de objetivo en relación con un control presumiblemente invariable, la qPCR relativa se utiliza con mayor frecuencia para medir las diferencias de polimorfismo genético.

Cuando se utilizan los sistemas SYBR, la cuantificación del objetivo y de la referencia interna deben realizarse en reacciones separadas.

Desarrollo de los métodos (continuación)-

2. Preparar las reacciones:

- 1) Para reacciones de control negativo, añadir 4 μL de agua al tubo de reacción.
- 2) Para reacciones experimentales, añadir 4 μL de solución de ADN al tubo de reacción.
- 3) Centrifugar todos los tubos brevemente. Confirme visualmente que todos los tubos o pozos contienen la muestra en el fondo en el volumen correcto.
- 4) Cuidadosamente alícuota 16 μL de MasterMix en cada tubo.
- 5) Mezcle bien las reacciones y haga un "spin" si es necesario.
- 6) Tape los tubos o selle la placa y la etiqueta (según los requisitos del instrumento). (Asegúrese de que el etiquetado no obstruya el camino de la luz).

3. Correr las muestras de acuerdo a las recomendaciones del fabricante del instrumento. A continuación se incluyen ejemplos de ciclos estándar y rápidos.

- Parámetros de ciclaje estándar:

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	2 min
40 ciclos		
Desnaturalización	94°C	15 seg
Alineamiento, extensión y lectura de fluorescencia	60°C o 5°C menos que el T_m más bajo de un primer	1 min
"Hold" (opcional)	4°C si los productos serán sometidos a electroforesis	

*Depende de las primers y el ADN molde

- Parámetros de ciclaje rápido:

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	30 seg
40 ciclos		
Paso 1	95°C	5 seg
Paso 2	58°C	15 seg
Paso 3	72°C	10 seg

*Apéndice: Concentraciones de colorante recomendadas para su uso con instrumentos.

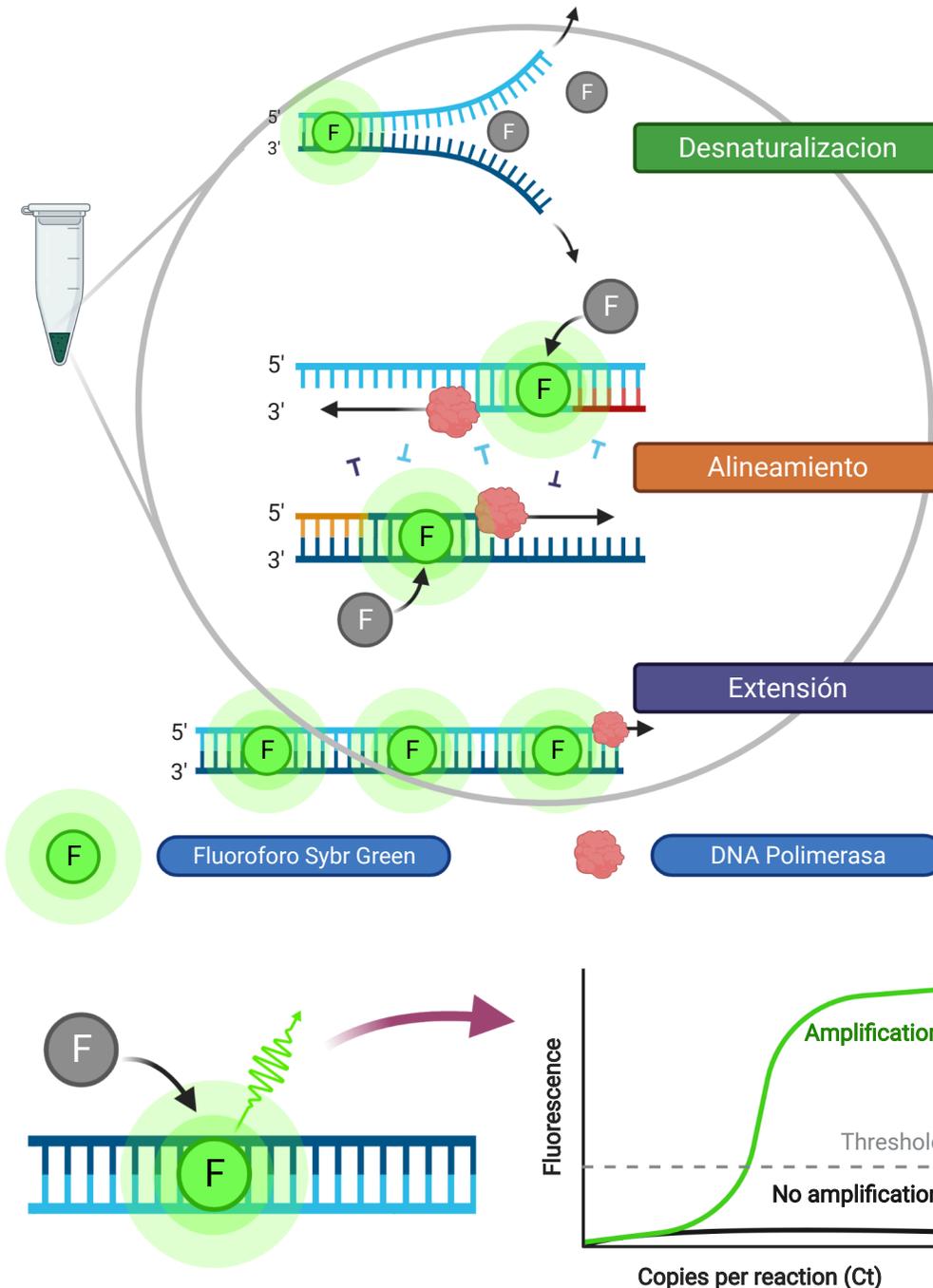
Para los reactivos de qPCR con un colorante separado

Instrumento	Concentración final referencia	μL de colorante referencia (por reacción de 20 μL)
Applied Biosystems 5700	1X	0.2 μL
Applied Biosystems 7000	1X	0.2 μL
Applied Biosystems 7300	1X	0.2 μL
Applied Biosystems 7500	0.1X	0.02 μL
Applied Biosystems 7500 Fast	0.1X	0.02 μL
Applied Biosystems 7700	1X	0.2 μL
Applied Biosystems 7900	1X	0.2 μL
Applied Biosystems 7900 HT Fast	1X	0.2 μL
Applied Biosystems 7900HT	1X	0.2 μL
Applied Biosystems StepOnePlus™	1X	0.2 μL
Applied Biosystems StepOne™	1X	0.2 μL
Applied Biosystems ViiA 7	0.1X	0.2 μL



FUNDAMENTO:

El SYBR Green es un agente intercalante, el cual se une al surco menor del ADN de doble cadena. Mientras más ADN de doble cadena haya en el tubo de reacción, mayores serán la unión y la señal de fluorescencia del SYBR Green.



NOTA

Este sistema es muy económico y permite el empleo de un solo fluoróforo en diferentes ensayos.

NOTA

No es posible hacer reacciones múltiples o multiplex, en donde se amplifican varios genes en la misma reacción.

NOTA

La intensidad de la fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la concentración del ADN de doble cadena.

NOTA

Cycle threshold (CT): Es el punto en el que la curva se eleva claramente por primera vez con respecto al umbral en un grado estadísticamente significativo.

NOTA

Línea basal: El número de copias no es suficiente para generar fluorescencia detectable

Fase exponencial: La reacción rebasa el valor CT, ascendiendo el valor de fluorescencia.

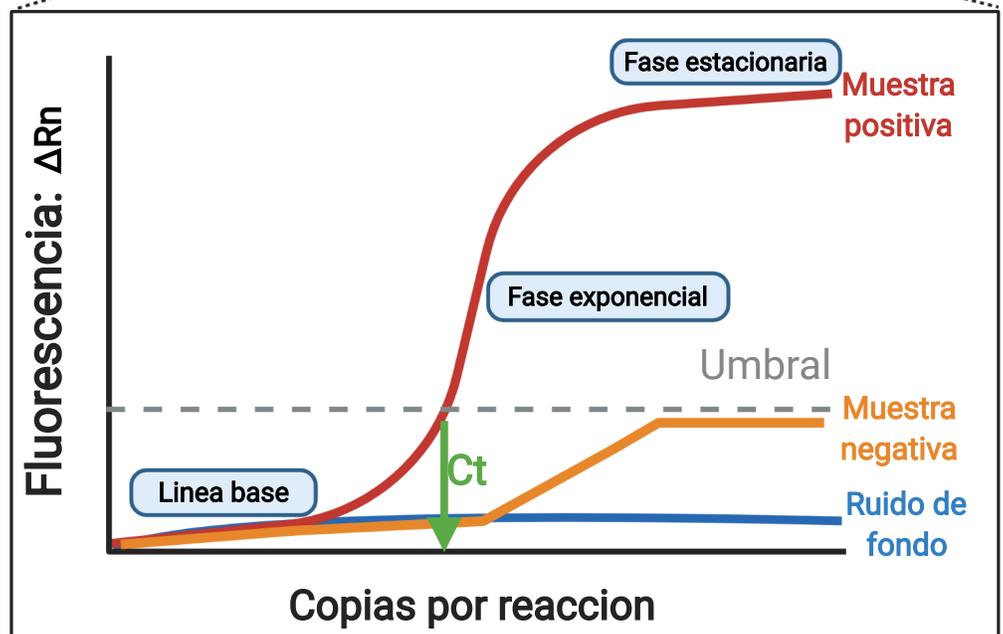
Fase estacionaria: Las reacción se limita por el agotamiento de reactivos y muestra.

NOTA

Umbral: Es el nivel de detección o el punto en el que una reacción alcanza una intensidad fluorescente por encima de los niveles de fondo.

RESULTADOS ESPERADOS:

Durante la amplificación por la qPCR, la sonda adicionada genera una señal de fluorescencia que refleja la cantidad de producto amplificado mediante la generación de una curva de amplificación conformada típicamente por una línea base, una fase exponencial y una fase estacionaria.



Se obtendrá una muestra positiva cuando la curva alcance el umbral de detección, estableciendo el valor de Ct, pasando a la fase exponencial de la reacción.

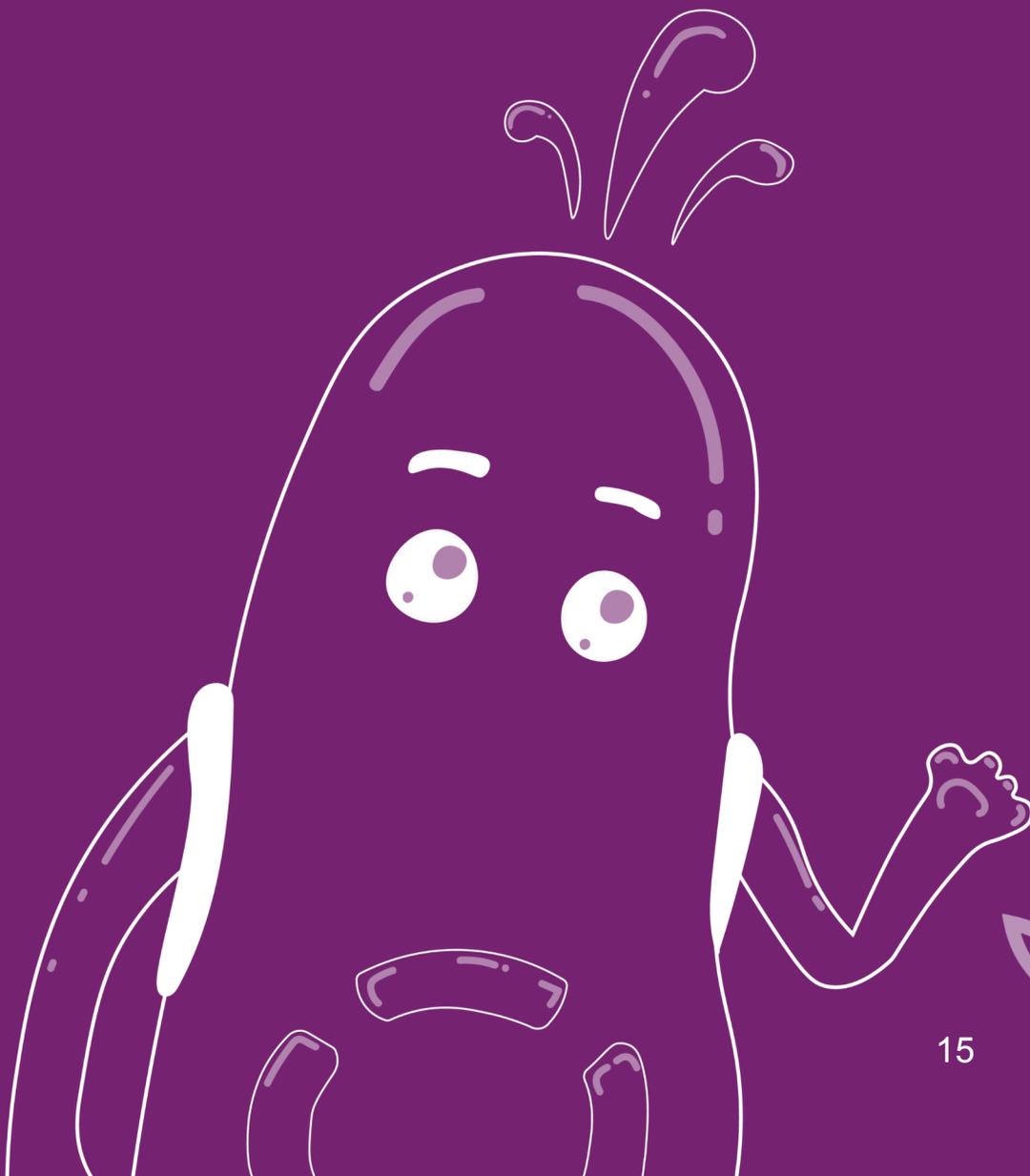
Si la curva no ha ascendido lo suficiente para alcanzar el umbral, se considera una muestra negativa.

BIBLIOGRAFÍA:

- Library, T., Protocols, P., & PRISM, S. (2020). SYBR GreenER qPCR SuperMix for ABI PRISM | Thermo Fisher Scientific - UK.
- (2008). qPCR Technical Guide. Sigma Aldrich Co., Quantitative PCR: How does it work?, p. 2.
- (2020). Universal SYBR Green qPCR Protocol. De: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/sybr-green-qpcr.htm>

Protocolos básicos microbiológicos

Equipo de iGEM Bolivia 2021





Conteo de poblaciones bacterianas: metodos indirectos

04

Capitulo

INTRODUCCIÓN:

Estimar el número de células en una población, es necesario a la hora del crecimiento celular bacteriano o para evaluar el número de células de cierta muestra, veremos dos métodos indirectos, el recuento por sembrado en placa y espectrofotometría. Ambos métodos son rutinarios en los laboratorios.

OBJETIVO:

Estimar el numero de celulas presentes en una muestra o un cultivo celular.

METODOLOGÍA:

Tipo de muestra.- Cultivo celular liquido o solido.

Materiales, equipos y reactivos.-

Materiales:

- micropipeta 100 a 1000 μ l
- tubos de 1-10 ml.
- cubetas
- asa drigalski
- Cajas petri

Equipos:

- Espectrofotometro
- incubadora
- mechero
- cabina de flujo laminar

Reactivos:

- Medios de cultivo

Desarrollo de los métodos.-

Primero realizar diluciones seriadas en las muestras de provenientes de un cultivo celular, luego proceder por uno de dos métodos.

I. Método de recuento por sembrado en placa

- I.1.** Realizar un sembrado en placa, sacando con la micropipeta 0,1 o 1ml de cada dilución y colocándolo en una caja petri con agar.
- I.2.** colocar las cajas petri a la incubadora a temperatura adecuada, para el crecimiento de las bacterias.

II. Espectrofotometría

- II.1** Colocar con un gotero o una pipeta 1 o 2 ml de la dilución a una cubeta de cuarzo/vidrio/plástico.
- II.2** Realizar la calibración del espectrofotómetro.
- II.3** Medir la densidad óptica ("absorbancia") en el espectrofotómetro.

NOTA

Debemos tener precaución sobre el análisis de este métodos indirectos, ya que son solo una estimación específica de una población bacteriana, no es muy útil al evaluar comunidades bacterianas.

NOTA

Diluciones seriadas, son sucesivas diluciones simples. Para realizar una dilución centesimal se puede hacer por medio de dos diluciones decimales sucesivas.

NOTA

-La preparación de cultivo celular debe ser específica.
-El sembrado debe ser en un medio esteril como una cámara de flujo laminar o cercano al mechero.

NOTA

Los cambios en la temperatura afecta su fisiología de las bacterias, por lo que cada tipo de bacteria tiene su temperatura óptima de crecimiento. Se realizan gráficas de arrhenius entre la tasa de crecimiento y la temperatura.

NOTA

Calibración del espectrofotómetro.

Solo se requiere medir una sustancia con densidad óptica conocida o el medio con el que diluimos en la cubeta (agua o LB).

NOTA

El **cálculo** de unidades formadoras de colonias es por medio de la siguiente fórmula:

$$UFC = Co * FD / V$$

Co: Número de colonias

V: los [ml] sembrados

FD: factor de dilución

$$FD = CI / CF$$

CI: Concentración inicial

CF: Concentración final

Se recomienda solo realizar el conteo entre 30 a 300 colonias.

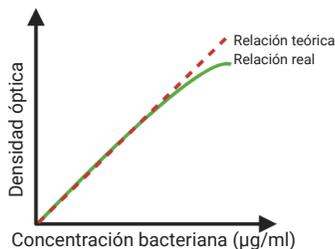
NOTA

Para medir la turbidez se mide la densidad óptica no la absorbancia (matemáticamente iguales). Las bacterias dispersan la luz y no la absorben, a no ser que tengan esa capacidad.

NOTA 8

Conteo por espectrofotómetro.

Presenta diferencias entre el número de células viables y el número de células totales, expresado en la siguiente gráfica:



FUNDAMENTO:

Aclarar que estos dos métodos sólo **estiman** el número de bacterias en una muestra, no cuentan bacteria por bacteria, por tal motivo se denominan métodos indirectos.

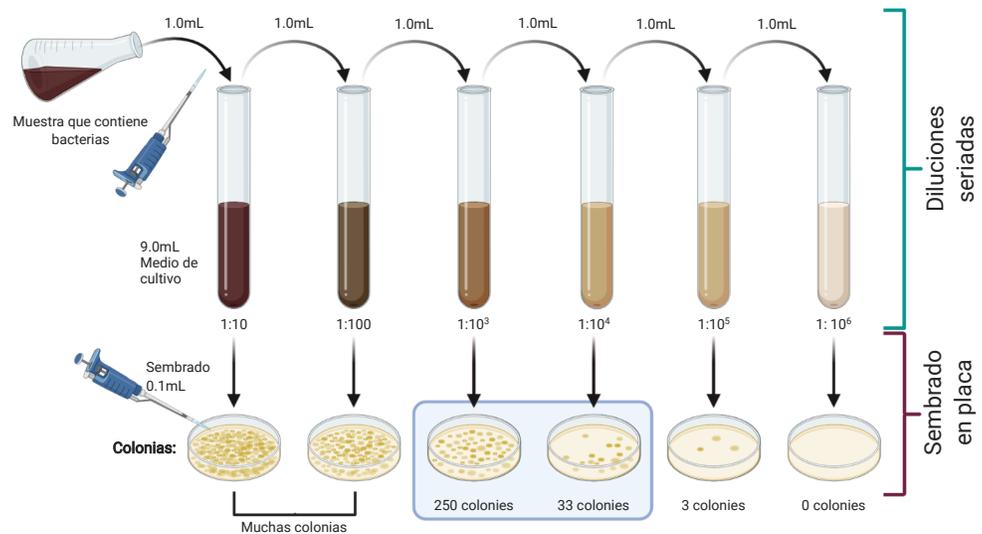
I. Método de recuento por siembra en placa

El método nos muestra colonias, donde se asume que cada colonia proviene de una célula individual, expresando este dato en UFC (unidades formadoras de colonias).

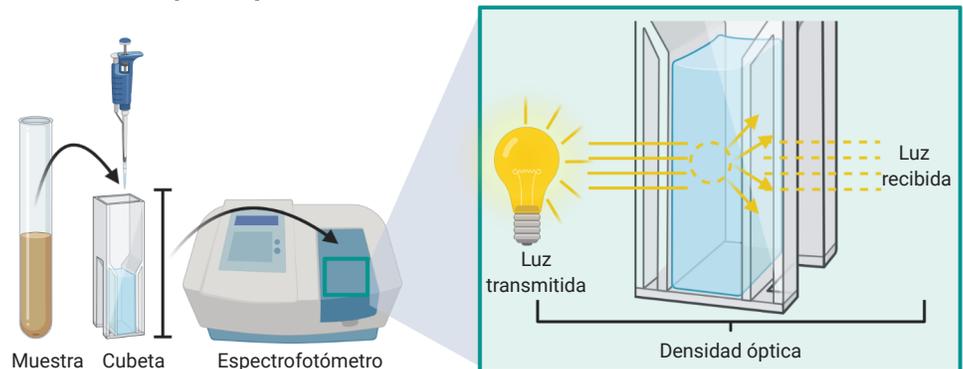
II. Espectrofotetría

El método nos muestra Turbidez, donde se mide la dispersión de luz en el espectrofotómetro, como estimación de masa celular.

Recuento sembrado en placa.-



Recuento por espectrofotetría.-



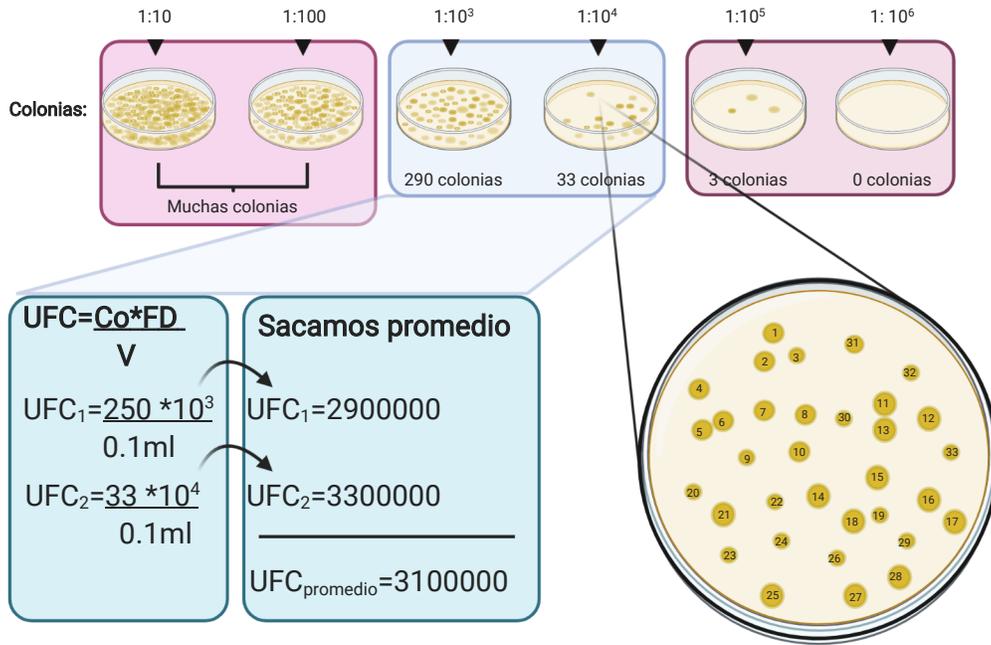
Diferencias entre el método de recuento por siembra en placa respecto al método de espectrofotetría, radica en los resultados que producen. El primer método te da solo el número de células viables (aquellas con capacidad de dividirse). Mientras que el segundo método te da células vivas como células muertas.



RESULTADOS ESPERADOS:

Recuento por siembra en placa:

Solo se anota aquellas placas que tienen entre 30 a 300 colonias, estimando las unidades formadoras de colonias, sin embargo si provienen de la misma muestra, estas se promedian.



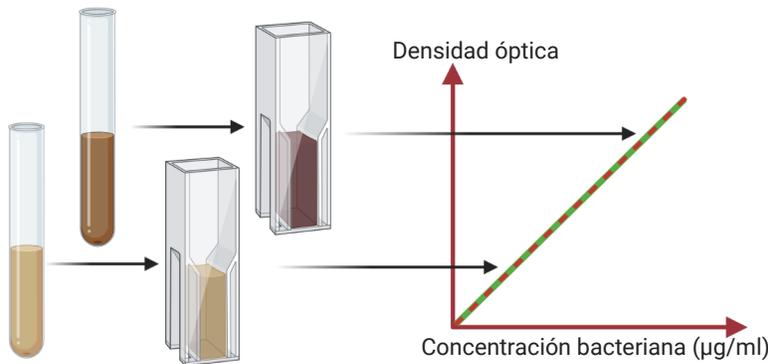
NOTA

Precauciones metodológicas. Para recuento por siembra en placa

1. Asegurarse de que en la micropipeta no queden residuos, pueden generar error.
 2. No contabilizar cuando hay demasiadas colonias (>300), debido a que estaríamos contando menos de lo que el medio podría soportar.
 3. Cuidado con la preparación de las muestras y siembra, evitar tener dos o más colonias juntas, ya que puede conllevar errores.
 4. Homogenizar la muestra, evitar tener más de 2 tipos de bacterias creciendo en la misma caja petri.
 5. Sembrado de la muestra en medio aséptico.
- Todo esto se puede solucionar si uno realiza duplicados.

Recuento por espectrofotometría:

Se anota la densidad óptica (matemáticamente igual que la absorbancia), de cada cubeta.



Para recuento por espectrofotometría

1. Evitar la formación de grumos en la cubeta (evitar cambios de temperatura bruscos)
2. Evitar usar cubetas de plástico que sean viejas o estén rayadas.
3. Al calibrar, no usar agua de grifo.

NOTA

Precauciones analíticas. El recuento por siembra en placa, es muy sensible, por lo que una contaminación es muy posible, es muy poco fiable para evaluar el número total de células en muestras naturales como suelo y agua.

BIBLIOGRAFIA:

- Madigan M.T, Martinko J.M., Stahl D and Clark D.P., (2015), Brock Biology of microorganisms, 14th edition, UK, Pearson Benjamin Cummings.



Conteo de poblaciones bacterianas

05

Capítulo

INTRODUCCIÓN:

El recuento microscópico es una técnica común, rápida y poco costosa para el recuento total de células microbianas en un cultivo o en una muestra natural, se puede llevar a cabo simplemente por observación y enumeración de las células presentes.

OBJETIVO:

Determinar el número de células microbianas, por observación directa en el microscopio.

METODOLOGÍA:

Tipo de muestra.- Cultivo celular líquido.

Materiales, equipos y reactivos.-

Materiales:

- Microscopio

Equipos:

- Cámara de Petroff-Hausser o de Neubauer

Reactivos:

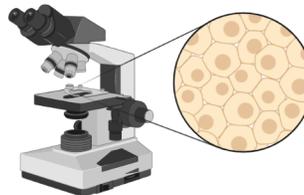
- Cubreobjetos
- Pipeta
- Tips

Desarrollo de los métodos.-

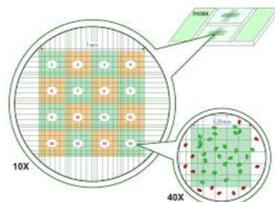
1. Primero debemos colocar la muestra en la cámara y taparla con el cubreobjetos.



2. Después de que la muestra está depositada y reposada debemos llevarla al microscopio.



3. Y proceder a contar las células en 16 celdas.



NOTA

Para estos recuentos se utilizan generalmente cámaras de recuentos, aunque también pueden realizarse a partir de muestras filtradas en membranas transparentes o teñidas con colorantes fluorescentes para aumentar el contraste de las células.

NOTA

Las células tienen que estar muertas o inmovilizadas de algún modo antes de contarlas y tener cuidado con los desechos para no confundirlos con las células.

NOTA

Hay que tener cuidado de que la muestra depositada no rebose en el espacio del cubreobjetos y el portaobjetos.

NOTA

En la cámara de Petroff-Hausser la excavación mide 0.02mm de profundidad y se divide en 25 cuadrados grandes subdivididos en 16 pequeños (hay 400 celdillas de 1mm²).

NOTA

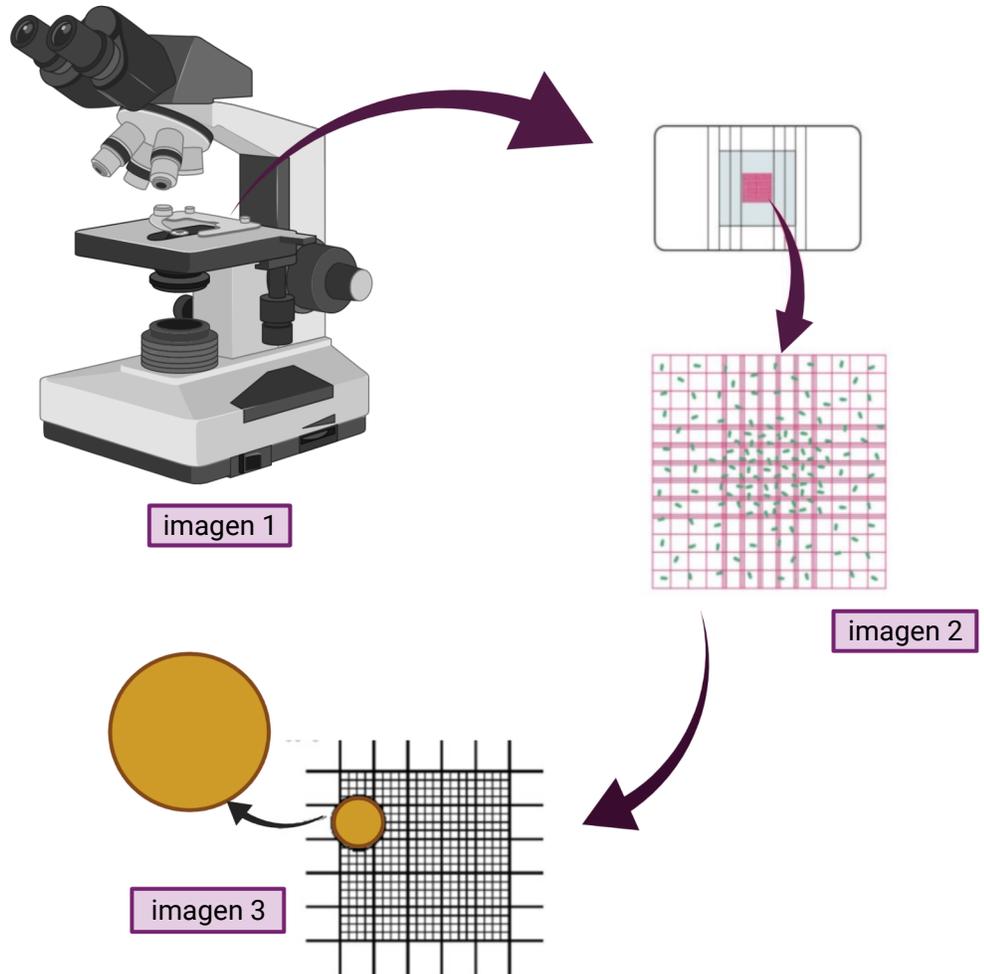
Debe ser utilizado en muestras con poblaciones concentradas de células (>10⁶ células/mL, ya que con menos poblaciones el recuento es poco significativo estadísticamente).

NOTA

El recuento directo en la cámara de Petroff-Hassen se debe usar un microscopio de contraste de fases para contar las células y evitar teñirlas.

FUNDAMENTO:

La muestra depositada en la cámara tiene impresa una cuadrícula graduada y con medidas exactas, entonces cuando la muestra a cuantificar es depositada entre el portaobjetos graduado y el cubreobjetos la muestra se distribuye en 400 celdas, para después proceder al conteo.



Figuras. La imagen 1 muestra la cámara y el portaobjetos para el deposito de la muestra, así como la imagen 2, cuadrícula graduada para el conteo de las células, el círculo amarillo muestra el area de conteo de 25 cuadrados subdivididos en 16 (imagen 3).



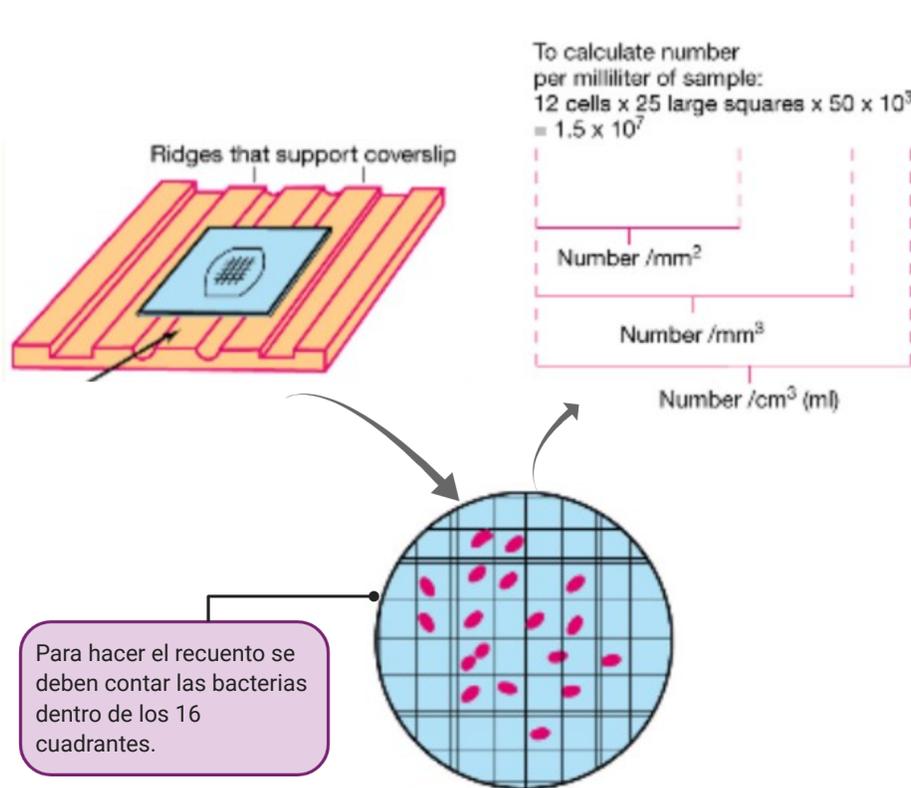
RESULTADOS ESPERADOS:

Para los resultados se cuentan las células de un cuadro grande que tiene 16 cuadros pequeños, después del recuento se deben realizar los cálculos.

Se registra el número contado de células y se calcula la población de células de la siguiente forma:

$$\text{Concentración de células/mL} = n \times 25 \times 50 \times 1000$$

Donde n = número de células contadas en las 16 celdas.



NOTA

Para obtener resultados más exactos es recomendable tener un conteo entre 200 y 300 células por muestra.

NOTA

Suponiendo que el recuento de células de los 16 cuadrantes fue de 150 células:

Concentración de células/mL = $n \times 25 \times 50 \times 1000$

Concentración de células/mL =

$$150 \times 25 \times 50 \times 1000 = 187500000$$

$$n = 150$$

NOTA

Debe recalarse que si la muestra estaba diluída el resultado debe multiplicarse por la dilución hecha.

BIBLIOGRAFÍA:

- Knaysi G, Ford M. Un método de Contar bacterias viables en la leche por Medios del microscopio. J Dairy Sci [Internet]. 1 de marzo de 1938 [consultado el 19 de septiembre de 2020]; 21 (3): 129–41. Disponible en <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030238956279>.

- Madigan M.T, Martinko J.M., Stahl D and Clark D.P., (2015), Brock Biología de los microorganismos, 14va edition, UK, Pearson Benjamin Cummings.



Métodos directos conteo de poblaciones bacterianas: Citometría de flujo

06

Capítulo

INTRODUCCIÓN:

Citometría es un término genérico que se aplica a cualquier tecnología que se usa para la medición, recuento, comparación u otra caracterización de células. La citometría de flujo es una tecnología de rápido crecimiento y desarrollo que permite examinar muchas propiedades de un gran número de células en poco tiempo.

OBJETIVO:

Detectar y cuantificar de forma rápida, células microbianas que son viables pero en muchos casos se encuentran en un estado no cultivable y por lo tanto no detectable por métodos convencionales de cultivo.

METODOLOGÍA:

Tipo de muestra.- Células suspendidas en un líquido

Materiales, equipos y reactivos.-

Materiales:

- Micropipeta
- Microplacas o tubos

Equipos:

- Citómetro de Flujo (Sistemas):
 1. sistema de flujo celular
 2. Sistema óptico
 3. sistema electrónico que procesa los datos

Reactivos:

- Fluorocromos

Desarrollo de los métodos.-

I. Preparación: Visualizar el experimento en un análisis previo (Pre-citometría) mediante la adecuación de las condiciones de la muestra y del citómetro.

- I.1. Selección de parámetros a medir y reactivos necesarios.
- I.2. Diseño de protocolos de preparación.
- I.3. Tinción de células.
- I.4. Selección de Fluorocromos.

II. Citometría de flujo: Realizar la lectura de la muestra y un pre-análisis de su comportamiento.

- II.1 Procesamiento de las muestras en un citómetro de flujo.
- II.2 Medición de parámetros seleccionados en la fase de preparación.

III. Citometría de flujo: Interpretar los archivos y convertirlos en información útil.

- III. 1. Revisión de los datos en un programa de cómputo especializado.

NOTA

Se analizan Parámetros :

- Nucleares
- De superficie
- Citoplasmáticos
- Extracelulares

NOTA

PROTOCOLO BÁSICO

- 1) Hacer una suspensión de las células.
- 2) Las células, lavadas o no, son incubadas en tubos o microplacas con anticuerpos marcados con sustancias fluorescentes o fluorocromos
- 3) Lavados periódicos para remover el exceso de búferes, anticuerpos, fluorocromos o impurezas.

NOTA

Para descartar interferencias en las mediciones se realizan controles:

- a) Células sin tinción.
- b) Control positivo de células 100 % vivas, teñidas con el colorante Syto 9 que es permeable a todas las membranas.
- c) Control de células muertas, que fue realizado sometiendo el cultivo celular a un tratamiento térmico previo a la tinción.

NOTA

Ejemplo de fluorocromos y canal de fluorescencia

- FITC(Verde)
- PE(Amarillo)
- PerCP-Cy 5.5(Rojo)
- PerCP(Rojo)
- APC(Rojo)
- AmCyan(Verde)
- Pacific Blue(Azul)
- Alexa Fluor 405(Azul)
- APC-Cy7(Infrarrojo)

NOTA

VENTAJAS:

- 1) Los estudios pueden realizarse de manera directa de la muestra, sin necesidad de extraer el ADN, o realizar diluciones previas.
- 2) La velocidad con la cual se obtienen y procesan múltiples los datos.
- 3) La capacidad de separación (cell sorting) que tienen algunos citómetros.
- 4) La posibilidad de ser una técnica tanto cualitativa como cuantitativa.
- 5) Técnica que no usa marcadores genéticos.
- 6) La posibilidad de medir tantos parámetros como anticuerpos se dispongan para ello, marcados con distintos fluorocromos. Así, es posible caracterizar una célula por su fenotipo de superficie y, al mismo tiempo, conocer el estado intracelular que guarda la célula.

FUNDAMENTO:

El principio en el que se basa esta tecnología es hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso (Generalmente un láser). La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora

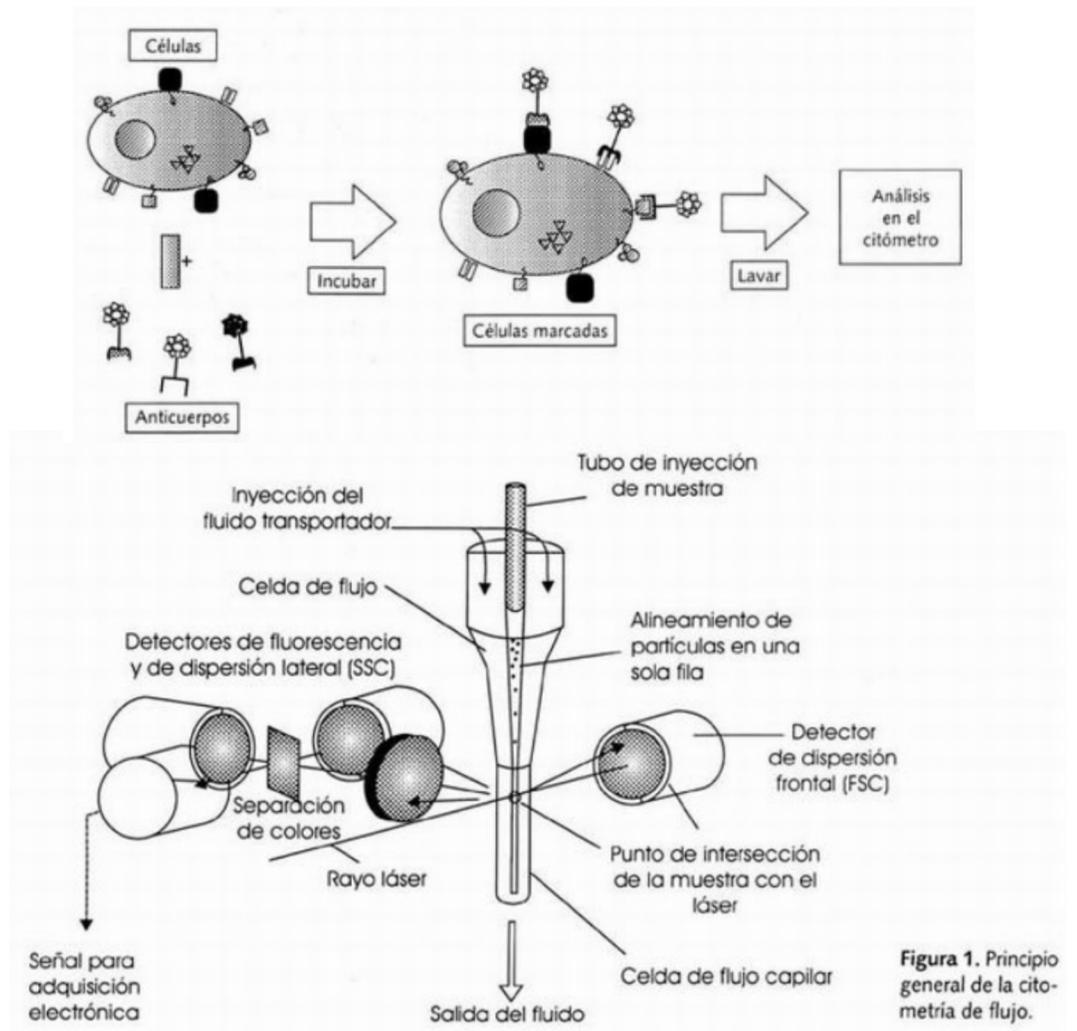


Figura 1. Principio general de la citometría de flujo.

La desviación frontal de la luz determina el tamaño celular (FSC) mientras que la dispersión lateral determina la complejidad (SSC).



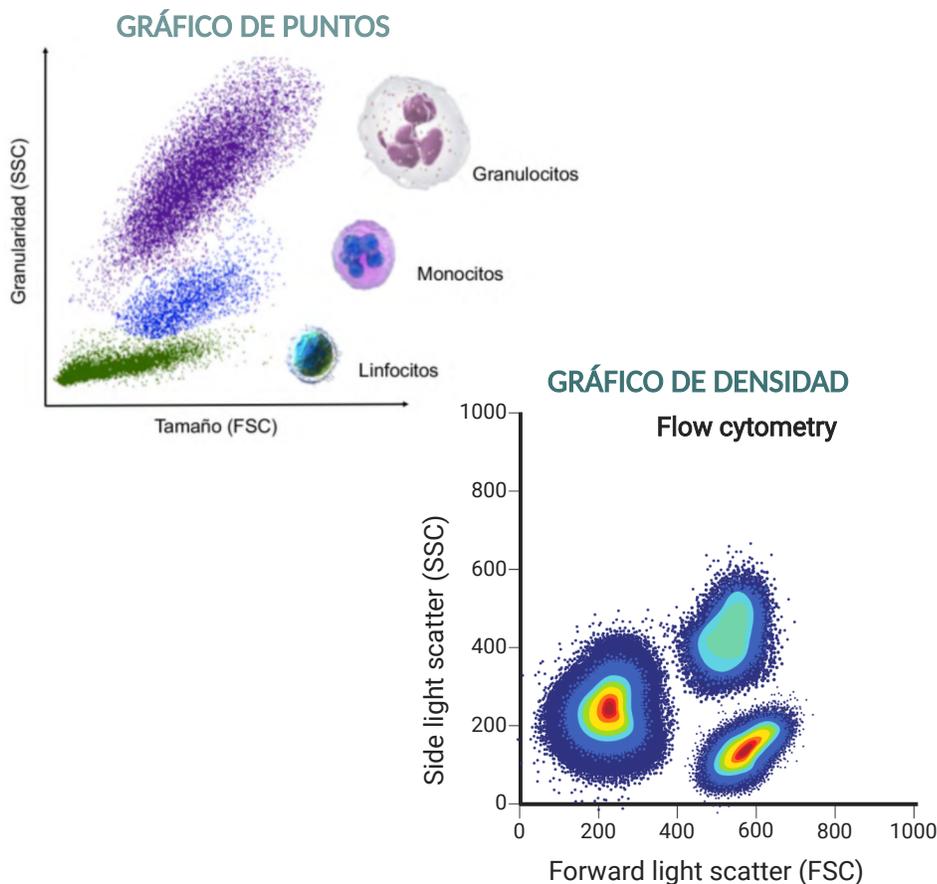
RESULTADOS ESPERADOS:

La luz incidente se transforma en pulsos eléctricos. Los resultados obtenidos pueden ser representados mediante diferentes estilos la clave se centra en seleccionar los gráficos que reflejen los resultados con precisión y sin generar confusiones.

Las representaciones más utilizadas en esta área:

1. Gráfico de puntos.
2. Gráficos de densidad
3. Histogramas
4. Gráficos 3D

Es importante mencionar que, dependiendo del modelo de citómetro de flujo que se utilice, será la cantidad de colores que se puedan leer simultáneamente.



NOTA

Gráfico de puntos

Desplazamiento a la derecha: Expresión de un marcador X

Desplazamiento hacia arriba: Expresión de un marcador Y.

NOTA

Gráficos de densidad

Además de representar a las poblaciones con base en la expresión de dos marcadores, muestran la **frecuencia relativa** (densidad) de las poblaciones;

NOTA

Histogramas

Muestran la intensidad de expresión de un marcador versus el número de eventos.

NOTA

Gráficos 3D

Este tipo de gráficos permite comparar a las poblaciones con respecto a la expresión de tres marcadores diferentes y la frecuencia relativa (Número de eventos).

BIBLIOGRAFÍA:

- Barrera, L. M. et al. (2004). Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 17(1), 42-55. Recuperado en 11 de octubre de 2021, de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-75852004000100007&lng=es&tlng=es.

- Pérez, J. C. et al. (2018). Fundamentos de citometría de flujo: su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica. Rev Med UV. 2018;18(2):41-52.



INTRODUCCIÓN:

El cultivo celular se refiere al cultivo de células nucleadas (eucariotas) bajo condiciones controladas dentro del laboratorio. Hay áreas muy comunes de uso de los cultivos celulares, estas áreas incluyen la producción de anticuerpos monoclonales, desarrollo de vacunas, enzimas, hormonas, interleucina y factores de crecimiento.

OBJETIVO:

Cultivar células eucariotas bajo condiciones controladas de laboratorio

METODOLOGÍA:

Tipo de muestra.- Células de tejido o línea celular establecida.

Materiales, equipos y reactivos.-

Materiales:

- Micropipeta 0.5 - 10 μ L
- Micropipeta 10 - 100 μ L
- Pipetas 10 mL
- Frascos T25, T75

Equipos:

- Cámara de flujo laminar
- Refrigerador (-80°C)
- Incubadora, con control de humedad y CO₂

Reactivos:

- Medio RPMI o DMEM
- FBS 10%
- Glutamina
- Penicilina y Estreptomina
- Gelatina 1%
- Tripsina-EDTA

Desarrollo de los métodos.-

1. Preparar un ambiente aséptico:

- Regulaciones de la cámara de flujo laminar:
- a) Irradiar con luz UV la superficie y los materiales por al menos 15 min.
- b) Asegurar mantener el flujo de aire laminar.
- c) Etanol al 70% (**Asegúrese de rociar todas las superficies en la cámara**)

- Autoclavado:

- a) Tips de micropipetas
- b) Pipetas de vidrio de 10 mL

2. Preparación del medio de cultivo celular

La mayoría de las líneas celulares pueden ser cultivadas usando medios de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) o RPMI (Roswell Park Memorial Institute) con FBS (suero bovino fetal) al 10%, 2 mM de glutamina y se pueden añadir antibióticos si es necesario (ver tabla)

(continúa en la siguiente página)

NOTA

Reactivos como los medios de cultivo celular, buffers y suplementos tienen que ser esterilizados mediante filtración con membranas:

- 0.2 μ m: esterilización
- 0.1 μ m: libre de micoplasmas
- 0.02 μ m: libre de virus

NOTA

Antes de comenzar el trabajo, **compruebe la información dada con la línea celular** para identificar el tipo de medio, los aditivos y las recomendaciones que deben utilizarse.

NOTA

La mayoría de las líneas celulares crecerán en frascos de cultivo sin necesidad de matrices especiales. Sin embargo, **algunas células, en particular las células primarias, requerirán el crecimiento en matrices como el colágeno** para promover la adhesión, la diferenciación o el crecimiento celular.

NOTA

Los medios con rojo fenol deben ser de color rosa/naranja, un color amarillo pálido indicaría acidez y disminución del pH que a menudo se asocia con la contaminación o con células no saludables.

NOTA

Comprobación de las células:

- Las células adherentes deben estar adheridas principalmente al fondo del frasco, mostrar una morfología adherente (dependiente de la línea celular) y refractar la luz alrededor de su membrana.
- Las células en suspensión deben mostrar una morfología circular y refractar la luz alrededor de su membrana. Algunas células en suspensión pueden aglutinarse

NOTA

No todas las células requerirán tripsinización, y para algunas células puede ser tóxico. También puede inducir la internalización temporal de algunas proteínas de la membrana. Otros métodos como el raspado celular suave, o el uso de un detergente muy suave pueden utilizarse a menudo como sustituto en estas circunstancias.

NOTA

Cantidad de tripsina-EDTA a agregar:

- En un frasco de 25 cm² aprox. 1 ml
- En un frasco de 75 cm² aprox. 5 ml
- En un frasco de 175 cm² aprox. 10 ml

Desarrollo de los métodos (continuación)-

Ejemplo general usando medios DMEM:

Reactivo	Cantidad
DMEM (remover 50mL del frasco de 500 mL y agregar los otros constituyentes)	450 mL
FBS 10%	50 mL
Glutamina 2 mM	5 mL
Penicilina 100U y Estreptomicina 0.1 mg/mL	5 mL

3. Crear el entorno de cultivo correcto

El siguiente es un ejemplo de células endoteliales y epiteliales: Para células humanas, recubre el interior de los frascos con gelatina al 1%. Alternativamente, para otros tipos de células como BAEC, los frascos pueden ser recubiertos con fibronectina al 1%.

- 1) Preparar 10mL de solución de recubrimiento compuesta de gelatina al 1% o fibronectina al 1% diluyendo con agua destilada, seguido de filtración. Esto es eficiente para recubrir unos 5 frascos.
- 2) Pipetear la solución de revestimiento en el matraz. Muévase hacia adelante y hacia atrás para distribuir uniformemente el fondo del frasco. Déjelo reposar en una incubadora durante 15-30 minutos.
- 3) Aspirar la solución de revestimiento y lavar con dH₂O estéril antes de sembrar las células.

4. Subcultivo

Las líneas celulares en suspensión se siembran en función del volumen, por lo que las densidades de siembra se calcularán como células/mL, mientras que las líneas celulares adheridas se siembran en función de la superficie del matraz, por lo que se calcularán como células/cm². Las células de crecimiento lento pueden no crecer si se utiliza una alta dilución. Las células de crecimiento rápido pueden requerir una alta dilución para asegurarse de que no crezcan en exceso.

- Dilución 1:2 debe ser 70-80% confluyente y estar lista para un experimento en 1 a 2 días.
- Dilución 1:5 debe ser 70-80% confluyente y lista para un experimento en 2 a 4 días.
- Dilución 1:10 debe ser 70-80% confluyente y estar lista para el subcultivo o plaqueado en 4 a 6 días.

5. Subcultivo de líneas celulares adherentes que requieren tripsina (tripsinización)

- 1) Vierta cuidadosamente el medio del matraz de las células requeridas en un recipiente de desecho (que contiene aproximadamente 100 ml de hipoclorito de sodio al 10%), teniendo cuidado de no aumentar el riesgo de contaminación con ningún goteo.
- 2) Utilizando la técnica aséptica, vierta/pipetee suficiente PBS estéril en el matraz para lavar las células y deshacerse de cualquier FBS en el medio de cultivo residual. Volcar el matraz suavemente unas cuantas veces para enjuagar las células y cuidadosamente verter/limpiar el PBS de nuevo en el recipiente de residuos.

Esto puede repetirse una o dos veces más si es necesario (algunas líneas celulares tardan mucho tiempo y necesitarán más lavados para deshacerse de cualquier FBS residual para ayudar a la prueba).

- 3) Usando la pipeta, agregue suficiente tripsina EDTA para cubrir las células del fondo del frasco.

(continúa en la siguiente página)



Desarrollo de los métodos (continuación)-

- 4) De vueltas el frasco suavemente para asegurar el contacto de la tripsina con todas las células. Ponga el matraz en una incubadora a 37°C. Diferentes líneas celulares requieren diferentes tiempos de tripsinización..
- 5) Tan pronto como las células se hayan desprendido (el frasco puede requerir unos pocos golpecitos suaves) añadir un poco de medio de cultivo (el FBS inactivará la tripsina).
- 6) Usando esta suspensión celular, trasvasar en nuevos frascos la proporción de división requerida. Estos frascos deben ser suplementados con medios de cultivo hasta el volumen requerido.
- 7) Deje las células durante la noche para que se recuperen y se asienten. Cambie el medio para deshacerse de cualquier tripsina residual.

6. Subcultivo de líneas celulares en suspensión

- 1) Revise las pautas de la línea celular para ver la proporción de división recomendada o las densidades celulares de subcultivo.
- 2) Saque la cantidad necesaria de suspensión celular del frasco con la pipeta y colóquela en uno nuevo.
- 3) Añada la cantidad necesaria de medio de cultivo precalentado al frasco nuevo.

7. Cambiar los medios de cultivo

Si las células han estado creciendo bien durante unos pocos días pero aún no son confluentes, entonces requerirán un cambio de medio para reponer los nutrientes y mantener el pH correcto. Las células producen factores de crecimiento que son secretados en sus medios, por lo que puede ser beneficioso realizar un cambio de sólo la mitad del medio para reponer los nutrientes proporcionados y también mantener estos factores de crecimiento.

- 1) Para cambiar de medio, calentar el medio de cultivo a 37°C usando un baño de agua o una incubadora durante al menos 30 min.
- 2) Aspirar los medios viejos del frasco y sustituirlos por el volumen necesario de medio de cultivo frescos precalentado y volver a la incubadora.

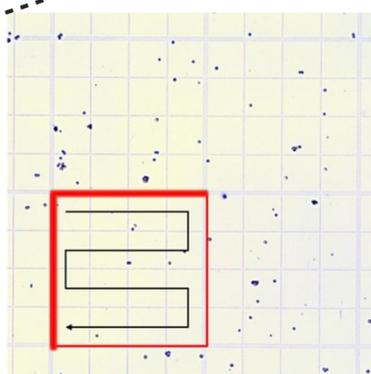
8. Observación y monitoreo del cultivo.

- 1) Saque las células de la incubadora y póngalas bajo el microscopio invertido para una rápida revisión celular (objetivo 100x).



9. Conteo y viabilidad celular

- 1) Mezclar 100 µL de suspensión celular con una cantidad igual de solución de azul de tripán al 0,4%.
- 2) Prepare el hemocitómetro colocando el cubreobjetos sobre la superficie de conteo.
- 3) Cargue la cámara de conteo con la suspensión celular (~4 µl por área de conteo) colocando la punta de la pipeta en el borde de la tapa y expulse suavemente la suspensión celular.
- 4) Coloque la cámara en el microscopio y enfoque las células para contarlas.



NOTA

Proporciones de suspensión celular:

- Para una dilución 1:2 de 100 ml de suspensión celular, saque 50 ml
- Para una dilución 1:5 de 100 ml de suspensión celular, saque 20 ml

NOTA

Proporciones de medio de cultivo:

- Para una dilución 1:2 de 100 ml agregue 50 ml de medio fresco a 50 ml de suspensión celular.
- Para una dilución 1:5 de 100 ml agregue 80 ml de medio fresco a 20 ml de suspensión celular.

NOTA

Número de pasaje

El número de pasaje es el número de subcultivos por los que han pasado las células. Este debe registrarse y no ser muy alto. Esto es para prevenir el uso de células que sufren deriva genética y otras variaciones.

NOTA

Para el conteo y viabilidad celular:

- El Azul Tripán penetra selectivamente en las membranas celulares de las células muertas y las tiñe de azul, pero no es absorbido por las células vivas.
- El área bajo el cubreobjetos se llena por acción capilar.
- En la mayoría de los casos, la cámara tiene dos áreas de conteo que pueden ser cargadas independientemente.

NOTA

El laboratorio debe contar con un área específica de preparación y esterilización de los medios de cultivo.

NOTA

Todos los medios de cultivo, suero, soluciones de antibióticos y otros medicamentos deben ser esterilizados por filtración.

NOTA

Es conveniente no cultivar en el mismo incubador cultivos primarios con líneas celulares estables pues los primeros se constituyen en una fuente de contaminación.

FUNDAMENTO:

Medios de cultivo.-

Los cultivos celulares requieren de un medio de cultivo específico, se logró definir 28 sustancias esenciales para el desarrollo y mantenimiento *in vitro*, siendo las más importantes: **glucosa, aminoácidos, vitaminas, sales minerales y soluciones corporales complejas (suero)** en mínimas cantidades. Eagle consiguió desarrollar dos medios de cultivo ampliamente conocidos y usados habitualmente:

a) Medio basal de Eagle (MBE): medio semisintético que contiene glucosa, 13 aminoácidos, 8 vitaminas y 6 sales minerales que actúan como cofactores metabólicos, buffers para mantener el pH y balance eléctrico y suero bovino fetal (**FBS**) como principal portador de crecimiento de fibronectina, importante para la adhesión, división y visibilidad de las células.

b) Medio Eagle mínimo esencial: similar al **MBE** pero con mayor concentración de aminoácidos y vitaminas. Con este medio se consigue un mayor mantenimiento de las células *in vitro*.

Un buen medio de cultivo será aquel que reúna las siguientes cualidades: Especificidad respecto a la célula a cultivar, carácter nutritivo, pH adecuado, capacidad de buffer, isotónico y esteril.

Clasificación:

1. Medios completos

a) Medio DMEM con formulación modificada: Específico para el crecimiento de células epiteliales, contiene proteínas plasmáticas, lípidos, colesterol, albúmina, factores de crecimiento, componentes de extracto de soja. No requiere la adición de suero o factores de crecimiento lo que reduce la posibilidad de contaminación del medio y permite una tasa de crecimiento estable bajo condiciones definidas.

- **Recomendaciones de Uso:** Se recomienda para cultivos celulares con densidad celular entre 2000 y 10000 células/cm²

- **Almacenamiento:** 20°C en ausencia de luz.

b) Medio RPMI: Específico para el crecimiento de células tumorales, contiene además de factores de crecimiento, proteínas plasmáticas, lípidos, aminoácidos, componentes de extracto de soja, colesterol, albúmina, proteínas transportadoras de hierro. Con esta composición se favorece una mayor optimización del cultivo celular, sin requerir una adición extra de suero factores de crecimiento y con ello, una posible contaminación.

- **Recomendaciones de uso:** Se recomienda para cultivos celulares entre 2000 y 10000 células/cm²

- **Almacenamiento:** 20° en ausencia de luz.

c) Medio PHA: Específico para el crecimiento de linfocitos, contiene fitohemaglutininas, principal para activar el ciclo celular en linfocitos adultos. Es una modificación del RPMI conteniendo además, una mezcla balanceada de factores de crecimiento, proteínas plasmáticas, lípidos, aminoácidos, componentes de extracto de soja, colesterol, albúmina, proteínas transportadoras de hierro.



FUNDAMENTO (continuación):

2. Formulaciones específicas

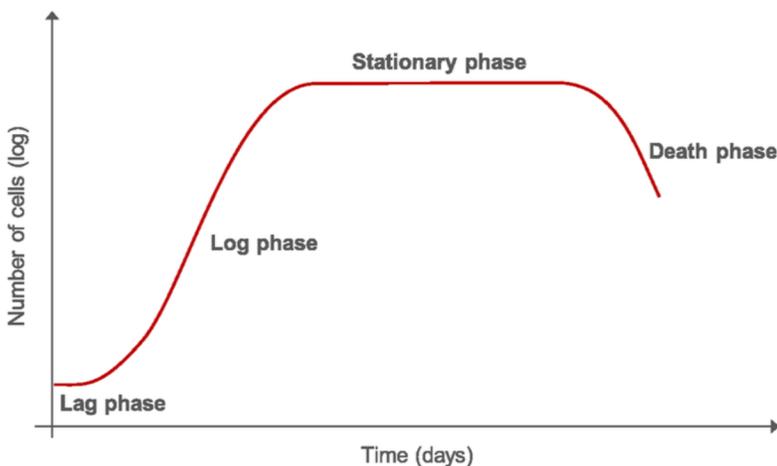
a) **Endopan 3:** Formulación específica para células del endotelio microvascular de origen humano. Su uso se destina exclusivamente a la investigación no siendo apto para diagnóstico o tratamiento. Contienen todos los componentes necesarios para un crecimiento óptimo y está diseñado para usar una incubadora de 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%.

b) **Amnipan S2:** Medio completo específico para el cultivo y diagnóstico in vitro optimizado para establecer cultivos primarios de células humanas del líquido amniótico y biopsia de vellosidades coriales, con aplicación directa para análisis y estudios citogenéticos, cariotipo o hibridación con fluorescencia in situ (FISH). Se trata de una formulación basada en el medio ALPHA - MEM. En su composición nutricional encontramos suero fetal bovino, factores de crecimiento, L - glutamina, hormonas y antibióticos.

Recomendaciones de Uso: Deben evitarse las exposiciones repetidas al calor, al frío y a la luz.

Almacenamiento: 20°C.

¿Por qué necesito subcultivar las células?



Una vez que se ha iniciado un cultivo celular, **no se puede cultivar indefinidamente debido al aumento del número de células, el consumo de nutrientes y el aumento de los metabolitos tóxicos, lo que finalmente da lugar a la muerte celular.** Además, los investigadores suelen querer realizar experimentos con sus células varias veces, y por lo tanto no quieren agotar todas las células a la vez. **El subcultivo, o la división de las células, produce nuevos cultivos con menor densidad celular que el cultivo original.** Al eliminar el medio y transferir las células a un nuevo medio de crecimiento, las células reciben nutrientes frescos y se eliminan los metabolitos tóxicos, lo que permite el mantenimiento a largo plazo del cultivo. Después de sembrar las células inicialmente, el crecimiento comienza con una fase lag y procede a una fase logarítmica, en la que las células proliferan exponencialmente, seguida de una fase estacionaria en la que la tasa de crecimiento y la tasa de mortalidad son iguales. En la fase de muerte, las células mueren debido a la falta de nutrientes y a las condiciones de vida inadecuadas.

NOTA

La curva de crecimiento de las células:

La curva de crecimiento de las células en cultivo se compone de cuatro fases: la fase latente antes de que comience el crecimiento (fase lag), la fase de crecimiento exponencial (fase logarítmica), la fase estacionaria en la que el rápido aumento del número de células se ralentiza gradualmente y la fase de muerte en la que las células mueren, debido a la falta de nutrientes y a las condiciones de vida equivocadas.

NOTA

Para mantener las células sanas y en crecimiento activo es necesario renovar el medio de crecimiento y subcultivarlas a intervalos regulares.

El cambio de medio de cultivo puede tener lugar varias veces en la fase logarítmica, dependiendo del tipo de célula. El mejor momento para subcultivar las células es entre la fase logarítmica y la fase estacionaria, antes de que las células alcancen la confluencia.

NOTA

Además, ciertas líneas celulares pueden tener características morfológicas específicas, por ejemplo, las neuronas (SH-SY5Y) que tienen dendritas muy largas.

NOTA

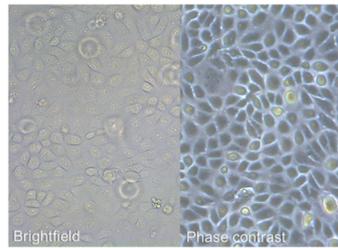
La morfología de las células también se ve afectada por los acontecimientos en el ciclo de vida de las células. Durante la mitosis muchas células se redondean, formando esferas brillantes muy refractarias que pueden flotar en el medio. Las células muertas a menudo se redondean y se desprenden también, pero normalmente no son brillantes y refractarias.

NOTA

Varias líneas celulares no sólo difieren en tamaño y forma, sino también en su comportamiento de crecimiento. Pueden crecer adheridas (células fibroblásticas y epiteliales) o en suspensión (células similares a las del linfoblasto). La mayoría de las líneas celulares adherentes crecen como una capa celular única (monocapa) adherida a sustratos de vidrio o plástico tratado (recubierto con polilisina, fibronectina, colágeno o gelatina).

FUNDAMENTO (continuación):

¿Por qué necesito revisar las células?



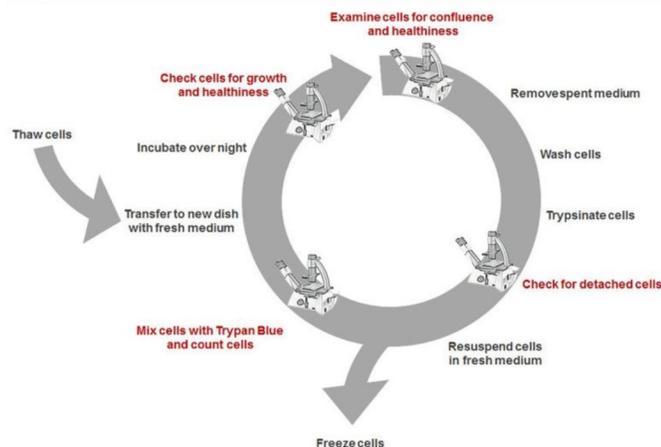
Comparación de imágenes de campo brillante y contraste de fase de células MDCK. La imagen de contraste de fase da una mejor visión general y facilita la inspección de la morfología celular y el recuento de células.

Una primera revisión del cultivo a ojo, para detectar contaminación por hongos, turbidez y partículas en el medio, así como cambios inesperados de pH, indicados por el cambio de color del medio, se puede hacer a nivel macroscópico. Después de esto, se debe examinar más de cerca la morfología celular y los patrones de crecimiento utilizando un microscopio invertido. Como las células están adheridas al fondo del plato, pueden verse fácilmente desde esta perspectiva. La observación debe realizarse con un aumento total de 100 - 200x y con contraste de fase, porque la mayoría de las células son difíciles de observar con una iluminación normal de campo brillante.

Hay muchas variaciones en la morfología de las células de mamíferos, pero la mayoría de las células de mamíferos en cultivo se pueden dividir en tres categorías: células fibroblásticas (células del ovario del hámster chino (CHO)), células epiteliales similares a las células del cuello del útero humano (HeLa) y células similares a los linfomas (células de leucemia humana (HL60)).

¿Cómo funciona la preparación para el subcultivo?

El método más común para preparar las células para el subcultivo es rompiendo las conexiones intercelulares y de célula a sustrato con enzimas proteolíticas como la tripsina. La tripsina en combinación con el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) hace que las células se desprendan de la superficie de crecimiento. La tripsina corta las adherencias focales que anclan la célula al plato de cultivo y el EDTA actúa como un quelante del calcio. Al eliminar el calcio, las caderinas que están involucradas en las interacciones entre células, se rompen y las células se separan unas de otras. Una vez separadas de la superficie de crecimiento y las células circundantes, pueden ser fácilmente separadas y cultivadas en nuevos platos de cultivo celular.



Flujo de trabajo para subcultivos; el rojo indica los pasos que necesitan ser revisados con el microscopio.

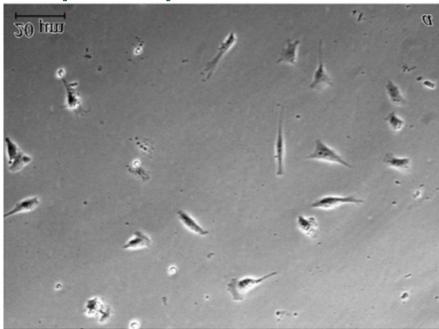


RESULTADOS ESPERADOS:

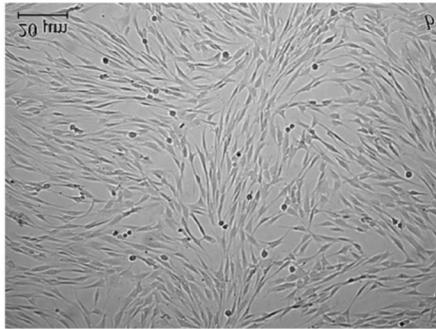
Los resultados variarán dependiendo de las características de crecimiento de las células. La viabilidad y la tasa de crecimiento de las células depende en gran medida de las condiciones en que se cultivan las células, incluyendo la temperatura, la confluencia y la precisión del pipeteado.

Ej. Línea celular de fibroblastos observados en microscopio invertido

Etapas tempranas de desarrollo

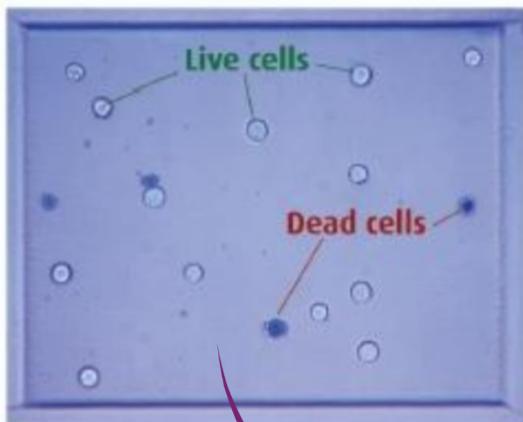


Confluencia

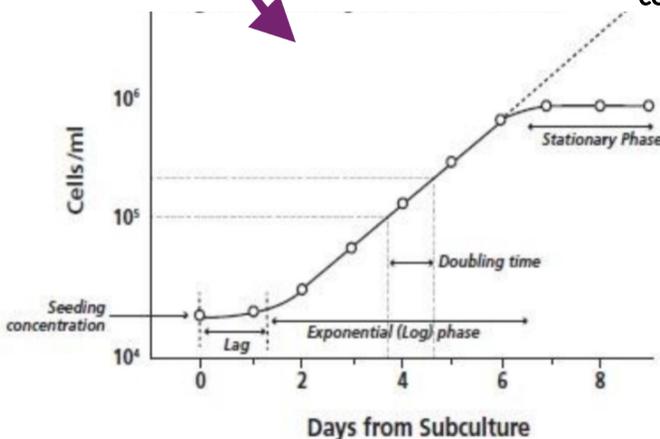


Cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia. En esta etapa, las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene.

Determinación de la viabilidad celular



Ejemplo de células de cultivo en hemocitómetro



Ejemplo de grafica del recuento de cultivo celular

NOTA

Cálculo del número total de células por ml de cultivo

Células/ml = Número células contadas x Dilución x 90000

Utilizando el conteo en el hemocitómetro.

- Número medio de células vivas = 13
- Dilución = 10 μl/20 μl de volumen final = 1/2 = dilución de 2 veces
- Factor de multiplicación = 90.000

Para calcular células/ml = 13 x 90.000 x 2 = 2,34 x 10⁶ células/ml

NOTA

Cálculo del porcentaje de viabilidad de las células

Viabilidad = (N° de células viables / N° total de células contadas) x 100

Utilizando la imagen 1:

- Células vivas (brillantes) = 13
- Total de células contadas = 17 Para calcular la viabilidad = (13/17) x 100 = 76.5% Viabilidad

NOTA

Las curvas de crecimiento celular variarán dependiendo de muchos factores, incluyendo la densidad inicial de células, la temperatura de cultivo y la salud de las células. Las células sanas pueden no experimentar una fase de latencia después de transferirlas a un frasco nuevo y entrarán inmediatamente en la fase de crecimiento exponencial.

NOTA

El CO₂ no es un requerimiento metabólico para los cultivos celulares, su propósito es disolverse en el medio de cultivo celular donde una pequeña proporción de éste reacciona con el agua para formar ácido carbónico que a su vez interactúa con su base conjugada (los iones de bicarbonato disueltos en el medio) para controlar un pH fisiológico estable a través del sistema de amortiguación de bicarbonato.

NOTA

Recomendamos descartar los cultivos contaminados inmediatamente. Si se detecta a tiempo, es posible erradicar la contaminación bacteriana con antibióticos. Sin embargo, la contaminación bacteriana no es fácilmente tratable una vez que la bacteria comienza la fase de crecimiento exponencial.

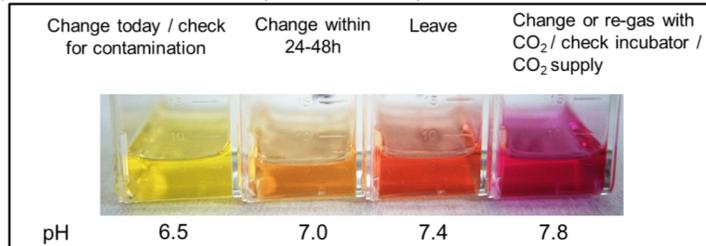
NOTA

La fuente más probable de contaminación bacteriana es el baño de agua.

- Se recomienda que el baño de agua se vacíe y se limpie cada mes.
- Se recomienda que el baño se llene con ddH₂O estéril y cloruro de benzalconio al 0,05% para inhibir el crecimiento microbiano.
- Se recomienda que la incubadora se limpie una vez al mes con un desinfectante químico como el 70% de etanol

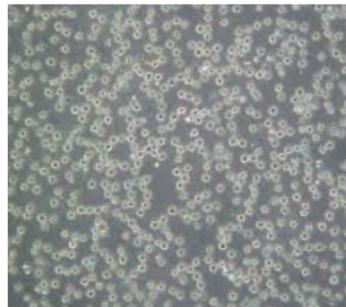
RESULTADOS ESPERADOS (continuación):

Los medios de cultivo celular también se complementan con el colorante indicador Rojo Fenol. Un tono amarillo en el medio indica que el pH es demasiado bajo (ácido), es probable que exista una contaminación, un tono púrpura muestra que el pH es demasiado alto (alcalino), indica posible mal funcionamiento de la incubadora, mientras que un tono rojo anaranjado indica que el medio tiene el pH correcto para el desarrollo de las células.

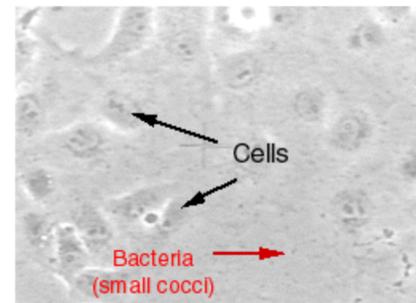


Ej. Línea celular en suspensión observada en microscopio invertido

Cultivo "limpio"



Cultivo "contaminado"



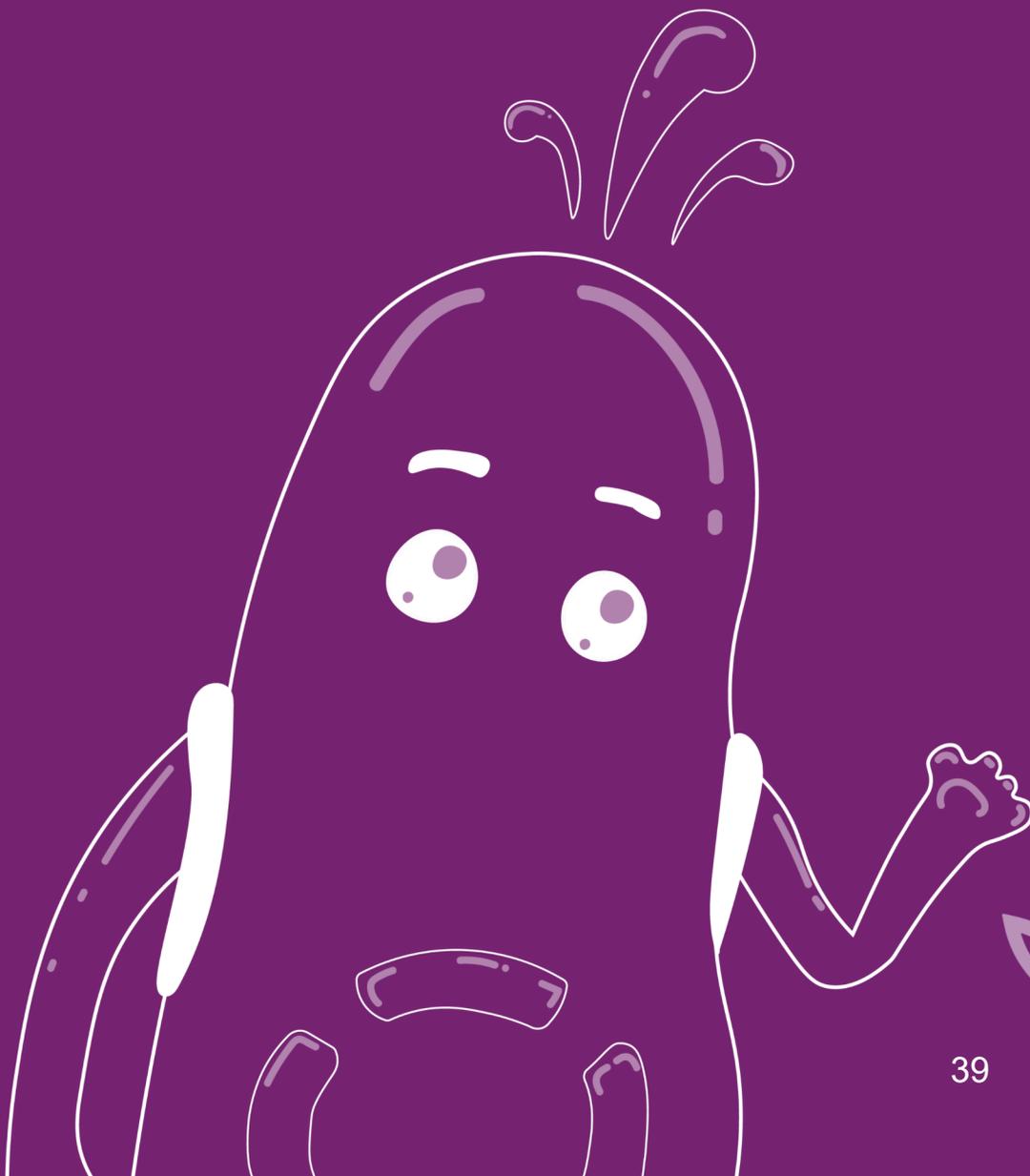
La contaminación bacteriana suele provocar cambios repentinos en el pH. Si un cultivo se contamina con bacterias aeróbicas, entonces el medio se volverá ácido y aparecerá amarillo. La mayoría de los casos de contaminación bacteriana en el laboratorio de cultivo celular son causados por aerobios. Sin embargo, si las bacterias son anaeróbicas, la contaminación hará que el medio se vuelva básico y aparecerá de color rosa. Las bacterias suelen producir toxinas que alteran la función celular y, en última instancia, destruyen los cultivos celulares.

BIBLIOGRAFIA:

- Mammalian cell tissue culture techniques protocol | Abcam. Abcam.com. (2020). De: <https://www.abcam.com/protocols/mammalian-cell-tissue-culture-techniques-protocol>.
- El Ayer y Hoy de las técnicas y medios de cultivo celular | Ibiantech. (2020). De: <https://www.ibiantech.com/el-ayer-y-hoy-de-las-tecnicas-y-medios-de-cultivo-celular/>
- Straube, T., & Müller, C. (2020). How to do a Proper Cell Culture Quick Check. Leica-microsystems.com. de: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/how-to-do-a-proper-cell-culture-quick-check/>

Protocolos básicos de clonación molecular

Equipo de iGEM Bolivia 2021





Transformación por choque térmico

08

Capítulo

INTRODUCCIÓN:

La transformación bacteriana por choque térmico es el paso de un plásmido con o sin gen de interés dentro de la célula.

OBJETIVO:

Transferir material genético a bacterias empleando el método de transformación por choque térmico.

METODOLOGÍA:

Tipo de muestra.- Cepa *E.coli* DH5 - alpha

Materiales, equipos y reactivos.-

Materiales:

- Micropipetas de 10 μ L, 200 μ L y 1 mL
- Tips de varios volúmenes
- Matraz de Erlenmeyer de 50 mL
- Cubetas de cuarzo para espectrofotómetro
- Eppendorfs estériles
- Asas de Drigalsky
- Cajas petri con LB-agar y LB-agar con Ampicilina 100 μ g/mL+ X-gal

Equipos:

- Espectrofotómetro UV-VIS
- Centrifugadora
- Incubadora
- Mechero Busen

Reactivos:

- Solución fría de $MgCl_2$ - $CaCl_2$ (80 mM $MgCl_2$, 20 mM $CaCl_2$).
- Solución fría de $CaCl_2$ 0.1M
- Cultivo de *E. coli*
- Dimetilsulfóxido DMSO
- Agua estéril
- Plásmido pg/ μ L
- Etanol 70%
- Medio LB

Desarrollo de los métodos.-

Transformación

1. Agregar 1 μ L del vector a uno de los tubos con células competentes.
2. Agregar 1 μ L de agua esteril a los otros 2 tubos (control).
3. Incubar los tubos en hielo por 30 min.
4. Sumergir los tubos en baño maría a 42°C por 45 segundos.
5. Inmediatamente devolver los tubos al hielo por otros 5 min.
6. Agregar 250 μ L de caldo LB tibio e incubar por 1h a 37°C en agitación.
7. Transferir 100 μ L de cada tubo a cajas Petri con medio de cultivo suplementado con el antibiótico, metal u otra variable frente a la cual se busca resistencia.
8. Expandir la solución utilizando un asa de Drigalski, realizando todo el trabajo dentro del rango de esterilidad que ofrece el mechero.

NOTA

Antes de iniciar el desarrollo del método, se debe preparar las células competentes, de lo contrario, no se llevará a cabo correctamente el procedimiento

NOTA

Las células que han recibido el tratamiento apropiado para llevar a cabo la introducción del material genético, se denominan: células competentes.

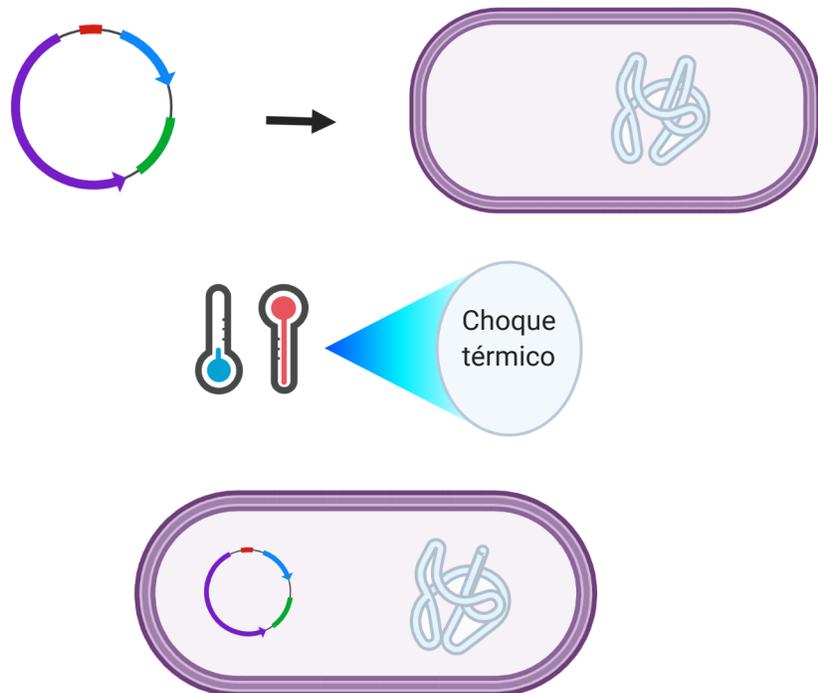
NOTA

Usar los medios cuanto antes, el medio de cultivo se vuelve tóxico e inhibe el crecimiento celular.

9. Incubar por un día a 37°C en disposición invertida.
10. Determinar la eficiencia de transformación mediante la relación del número de transformantes/ μg de DNA.

FUNDAMENTO:

Durante el choque térmico, las bacterias que serán hospederas son pretratadas con agentes que ocasionan el aumento e su permeabilidad membranal. Entre éstos se encuentran una temperatura muy elevada y el uso de iones que cambian la carga eléctrica de la membrana al recurrir las cabezas polares de lípidos, lo que disminuye la repulsión de cargas eléctricas entre los fosfatos de los nucleótidos y la membrana, además facilita la entrada del plásmido al interior celular.

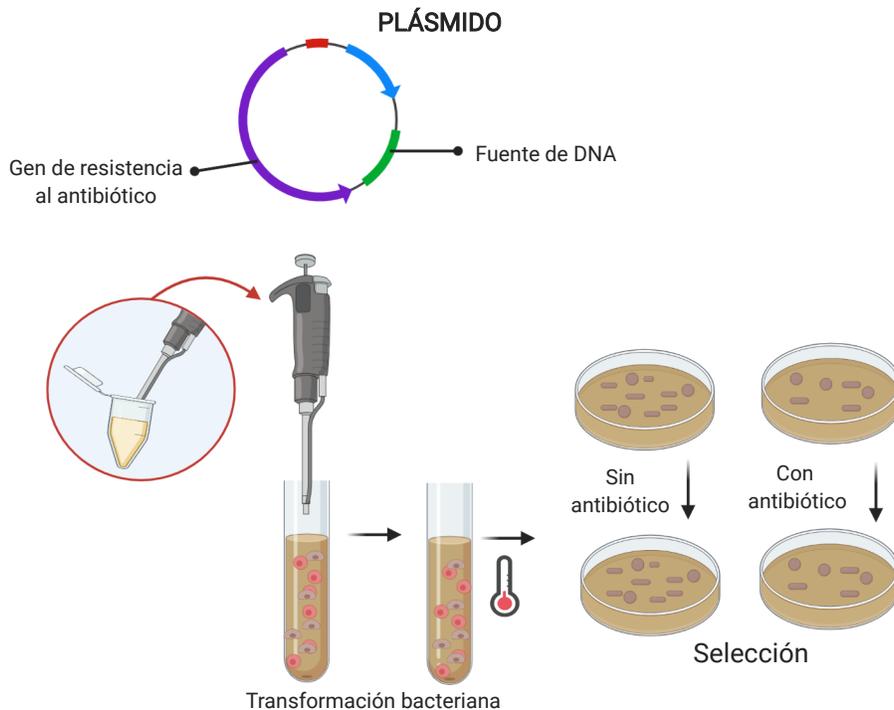


Al suspender las células en CaCl_2 se induce a las células a aceptar ADN de este modo se facilita la entrada de DNA. Al someter las células a un cambio repentino de temperatura (0 a 42°C) se disminuye el potencial de membrana favoreciendo la introducción del ADN. Un choque frío posterior (42 a 0°C) eleva el potencial alcanzando mayor magnitud del que originalmente tenía.



RESULTADOS ESPERADOS:

Obtención de células competencias y células transformadas



NOTA

Utilizar unidades "g" en la centrifuga en lugar de "rpm" con el fin de que sea una medida universal (usada en cualquier centrifuga).

NOTA

Transferir material genético a bacterias empleando el método de transformación por choque térmico.

NOTA

Vigilar la temperatura, así se evitarán variaciones.

BIBLIOGRAFÍA:

- Panja, S., Saha, S., Jana, B., & Basu, T. (2006). Role of membrane potential on artificial transformation of E. coli with plasmid DNA. *Journal of biotechnology*, 127(1). Recuperado el 10 de Julio de 2021, de <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.06.008>
- Rahimzadeh, M., Sadeghizadeh, M., Najafi, F., Arab, S. y Mobasheri, H. (2016). Impacto del paso de choque térmico sobre la eficiencia de la transformación bacteriana. *Comunicaciones de investigación de biología molecular*, 5 (4), 257-261. Recuperado el 10 de julio de 2021, de <https://www.addgene.org/protocols/bacterial-transformation/>



Clonación con enzimas de restricción

09

Capítulo

INTRODUCCIÓN:

La digestión con enzimas de restricción aprovecha las enzimas naturales que escinden el ADN en secuencias específicas. Hay cientos de enzimas de restricción diferentes, lo que permite a los científicos apuntar a una amplia variedad de secuencias de reconocimiento. Estas enzimas se usan comúnmente en técnicas de clonación molecular, como PCR o clonación.

OBJETIVO:

Insertar una secuencia de ADN de interés dentro de un vector (plásmido) el cual posteriormente será introducido dentro de un microorganismo chasis para su expresión.

METODOLOGÍA:

Tipo de muestra.- Fragmentos ADN insertos y vector compatibles.

Materiales, equipos y reactivos.-

Materiales:

- Micropipeta 0.5 - 10 µL
- Micropipeta 10 - 100 µL
- Tubos de PCR
- Cajas petri con medio sólido Agar nutritivo + Antibiótico

Equipos:

- Cámara de electroforesis y fuente de poder
- Transiluminador
- Incubadora (37°C)

Reactivos:

- Enzimas de restricción adecuadas
- Buffer de reacción adecuado
- BSA (si es recomendado)
- Agua libre de nucleasas
- Reactivos para ligación y transformación, purificación, extracción de ADN plasmídico

Desarrollo de los métodos.-

1. Seleccione las enzimas de restricción adecuadas para digerir sus plásmidos, desea elegir enzimas que:

- Flanquea su inserto, pero no corta dentro de él.
- Cortan en la ubicación deseada en el plásmido receptor (MCS: Multiple Cloning Site), pero no cortan otra parte.
- El inserto está en la orientación correcta en el plásmido receptor.

2. Determine un buffer de reacción apropiado leyendo las instrucciones para sus enzimas.

3. Adicionar reactivos en 2 tubos de PCR en el siguiente orden:

Orden	Componente	Cantidad
1°	(tubo 1) Plásmido donador	1.5 - 2 µg
	(tubo 2) Plásmido receptor	1 µg
2°	Buffer de reacción (10x)	3 µL
3°	BSA (si es recomendado)	3 µL
4°	Enzimas de restricción	1 µL cada una
5°	Agua libre de nucleasas	Completar a 20 µL

NOTA

-Para determinar qué enzimas de restricción cortan su secuencia de ADN (y dónde se cortarán), use herramientas como el Sequence analyzer de Addgene.

-Si va a usar sólo una enzima de restricción, o enzimas que producen extremos compatibles o romos, necesitará usar una fosfatasa para evitar la recircularización del plásmido receptor.

NOTA

Si las enzimas no cumplen con los criterios, tiene otras opciones:

-Agregar sitios de restricción para flanquear su inserto: Clonación basada en PCR.

-Agregar sitios de restricción al plásmido receptor: modificar el MCS utilizando Annealed Oligo Cloning.

NOTA

Hay que ser cuidadosos con la cantidad de enzima agregada a la reacción, depende de la concentración pero por lo general es suficiente con 0,25 µL, esto para evitar que la enzima empiece a cortar en sitios donde no debe.

NOTA

- El tiempo de incubación puede variar, es crítico que la mayor cantidad posible del plásmido receptor se corte con ambas enzimas, por lo tanto, es importante que la digestión dure al menos 4 hrs o durante toda la noche.
- Verifique las condiciones óptimas para cada enzima.

NOTA

Para la corrida electroforética recomendamos que use un peine de gel ancho, que corra el gel en el lado más lento y que deje carriles vacíos entre las muestras.

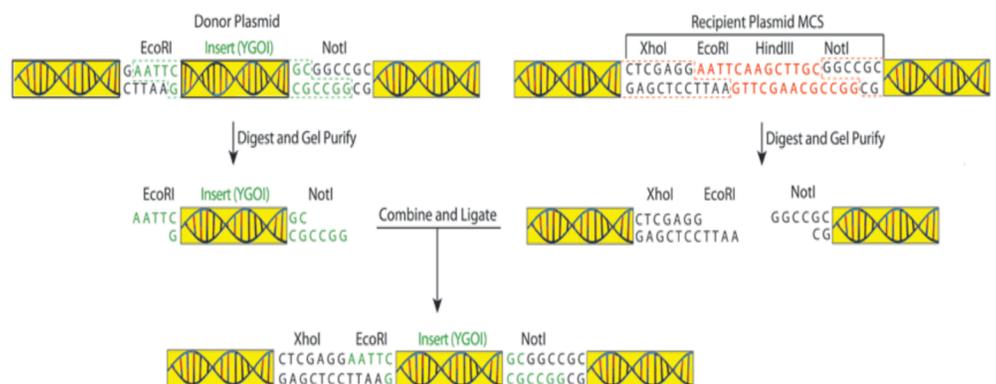
NOTA

Para la clonación más estándar, puede transformar 1-2 μ l de su reacción de ligación en células competentes como DH5 α . Si su producto final va a ser muy grande (>10 kb), es mejor utilizar células electrocompetentes.

4. Mezclar gentilmente pipeteando de arriba a abajo.
5. Incubar el tubo a la temperatura adecuada (generalmente 37°C) durante al menos 4 horas. Siempre siga las instrucciones del fabricante.
6. Realice una corrida electroforética en un gel de agarosa del ADN digerido y realice una purificación en gel para aislarlo.
7. Una vez purificado el inserto y las bandas del plásmido receptor se procede a determinar la concentración de ADN recuperado. El método espectrofotométrico es el más sencillo al realizar la lectura de la absorbancia (260 nm) de la muestra.
8. Realice una ligación de ADN para fusionar su inserto con el plásmido receptor.
9. Transforme el producto de la ligación en la cepa bacteriana de su elección.
10. Sembrar la cepa transformada en placas de agar nutritivo suplementado con antibiótico marcador e incubar a 37°C durante un día.
11. Seleccionar colonias y extraer ADN plasmídico, purificar, digerir con enzimas de restricción utilizadas y efectuar una corrida electroforética para observar las bandas generadas.

FUNDAMENTO:

Las enzimas de restricción escinden el enlace fosfodiéster del ADN. Pueden cortar en el centro de ambas hebras para producir un extremo romo, o en una posición escalonada dejando salientes llamados extremos adhesivos o voladizos. Existen 6 tipos pero las más utilizadas son las de tipo II, estas se caracterizan por cortar el sitio que reconocen y no necesitan ATP, sino Mg²⁺ como cofactor para funcionar.



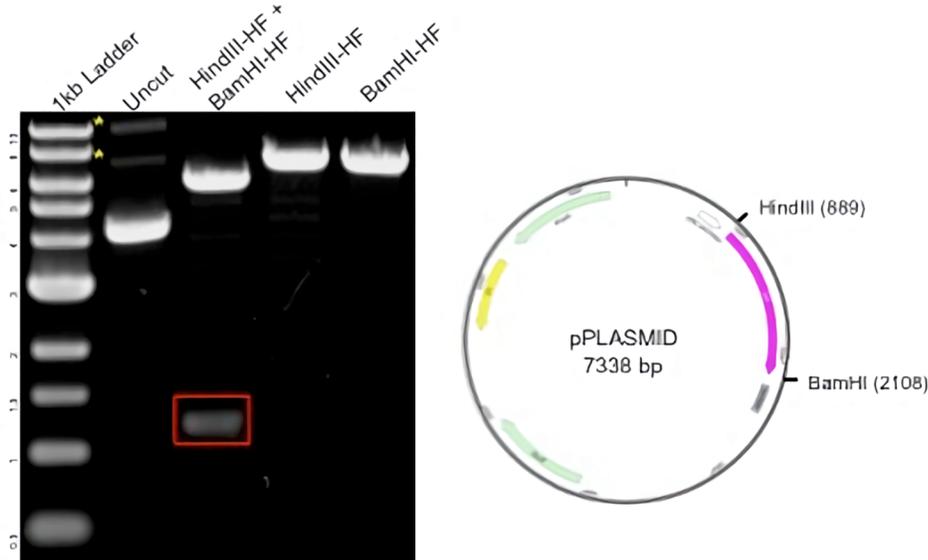
Es preferible la utilización de enzimas que produzcan cortes adhesivos (por ej. EcoRI y NotI), esto permite un manejo más sencillo de los fragmentos. Como se muestra en la figura, la digestión con estas enzimas producen fragmentos (donador y receptor) con extremos complementarios, esto ayuda a que el fragmento donador



pueda acoplarse de la manera esperada, para terminar la inserción es necesario la creación de enlaces fosfodiéster entre los azúcares de los nucleótidos, de esto se encarga la ADN ligasa T4 utilizada generalmente en el paso de la ligación. Finalmente el vector es introducido al microorganismo chasis mediante técnicas de transformación química y eléctrica.

RESULTADOS ESPERADOS:

Las digestiones de diagnóstico se pueden usar para confirmar la estructura aproximada del plásmido en función de los tamaños predichos. El plásmido de ejemplo tiene un tamaño total de 7.3kb, e incluye un inserto de 1.2 kb. Este se digirió con 2 enzimas (HindIII y BamHI). La imagen de gel resultante incluye un ladder de 1 kb (carril 1). El ADN sin digerir (carril 2) muestra 3 posibles conformaciones del plásmido. Cuando el plásmido se digiere con HindIII o BamHI (carriles 4-5), hay una única banda de 7,3 kb que representa el tamaño completo del plásmido. La doble digestión con HindIII y BamHI (carril 3) produce bandas a 6kb y 1.2kb (cuadro rojo), que corresponden al vector e inserto correspondientemente, esto sugiere un procedimiento de clonación exitoso.



NOTA

Procure utilizar enzimas únicas, enzimas que solo cortan una vez le permiten visualizar de manera más fácil y precisa el tamaño completo de su constructo.

NOTA

Cuidado con los problemas de metilación. Las enzimas como XbaI y ClaI son sensibles a la metilación y su actividad puede verse bloqueada.

BIBLIOGRAFÍA:

- Addgene: Molecular Biology Protocol - Restriction Digest of Plasmid DNA. Addgene.org. (2020). Recuperado el 12 de junio de 2021, de <https://www.addgene.org/protocols/restriction-digest/>
- Addgene: Plasmid Cloning by Restriction Enzyme Digest (with Protocols). Addgene.org. (2020). Recuperado el 12 de junio de 2021, de <https://www.addgene.org/protocols/subcloning/> the, A. (2019).
- Plasmid Cloning by Restriction Enzyme Digest (aka Subcloning) v2 (protocols.io.bawnifde). Protocols.io. Recuperado el 12 de junio de <https://doi.org/10.17504/protocols.io.bawnifde>



INTRODUCCIÓN:

La técnica permite unir múltiples fragmentos de ADN independientemente de su longitud o compatibilidad, en una reacción isotérmica de un solo tubo.

OBJETIVO:

Ensamblar múltiples fragmentos de ADN de interés dentro de un plásmido (vector).

METODOLOGÍA:

Tipo de muestra.- Fragmentos de ADN de interés y un plásmido.

Materiales, equipos y reactivos.-

Materiales:

- Micropipeta 0.5-10 µl
- Micropipeta 10-50µl
- Tubos de PCR

Equipos:

- Termociclador
- Cubeta de hielo
- Nevera a -20°C

Reactivos:

- Agua desionizada
- Fragmentos de ADN
- vectores (plásmidos)
- Hielo

Desarrollo de los métodos.-

1. Diseñar cebadores para amplificar los fragmentos y el vector con superposiciones apropiadas.
2. Amplifica fragmentos y prepare el vector linealizado usando PCR.
3. Determine la concentración de fragmentos y el vector linealizado usando espectrofotómetro o por electroforesis en agarosa .
4. Agregue fragmentos y vector linealizado al mix de Gibson Assembly empleando las micropipetas según las especificaciones:

tipo de ensamble	2-3 Fragmentos ensamblados (vector + 1-2 fragmentos)	4-6 Fragmentos ensamblados (vector + 3-5 fragmentos)	Control positivo
Cantidad total de fragmentos	0.02–0.5 pmols (x µL)	0.2–1 pmols (x µL)	10 µL
Mix ensamble Gibson (2X)	10 µL	10 µL	10 µL
Agua desionizada	(10-x) µL	(10-x) µL	0
Volumen total	20 µL	20 µL	20 µL

5. incube en un termociclador a 50 ° C durante 15 min a 1 hora.
6. Almacene las muestras en hielo (o -20°C)

NOTA

-Hay mayor eficiencia si solo se ensamblan hasta 6 fragmentos de ADN.
 -La concentración de los fragmentos de ADN de interés debe ser 2 a 3 veces la concentración del plásmido.

NOTA

Cálculo de pmoles óptimos de ADN:

Ecuación

$$\text{pmols} = \frac{1000 \times \text{peso en ng}}{\text{longitud en pb} \times 650 \text{ Da}}$$

Dato

50 ng de 500 bp dsADN son aprox. 0,15 pmoles.

Instrumento

Espectrofotómetro (260nm) mide la masa del fragmento.

Recomenacion

0.02–0.5 pmoles de fragmentos de ADN cuando 1-2 fragmentos se ensamblan en un vector y de 0.2–1.0 pmoles sin son 4-6 fragmentos.

NOTA 3

Incubar:

-15 minutos cuando se ensamblan 2 o 3 fragmentos
 -60 minutos cuando se ensamblan 4-6 fragmentos.

NOTA

- Cada cebador tiene entre 15 a 40 nucleotidos (no mayor a 60).
- Los cebadores se diseñan con programas incluidos en kits de venta (ejemplo NEBuilder)
- Durante el PCR, no es necesario purificar los fragmentos de ADN y el vector linealizado siempre y cuando sea aprox 20 % respecto al mix de la reaccion de gibson.

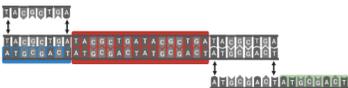
NOTA

Diseño de cebadores (generalidades):

Secuencia del gen A + cebadores.



Secuencia del gen B + cebadores.



Secuencia del vector linealizado + cebadores.

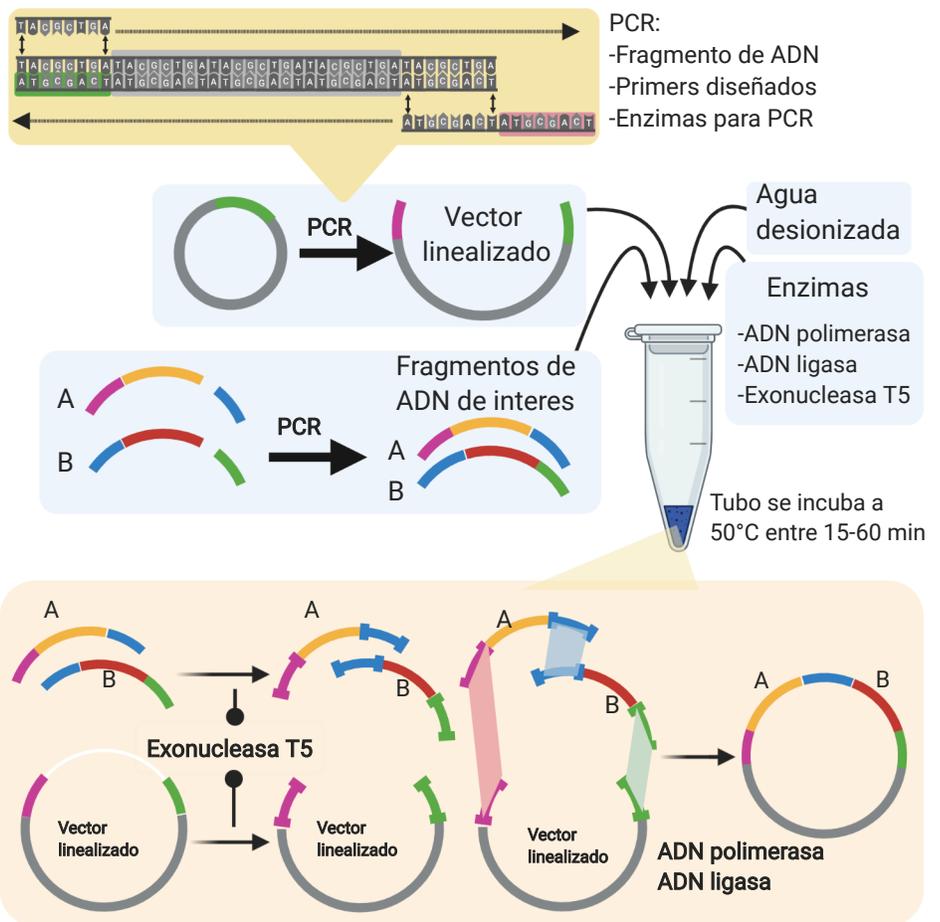


Esto se logra al colocar secuencias extra en los cebadores de PCR

FUNDAMENTO:

Primero se diseñan los cebadores (representados por colores: rosa, verde y azul), estos se deben poder superponer entre cada fragmento de ADN (gen A y B) con el vector linealizado, es decir que la secuencia del cebador para el gen A se complementa con la secuencia del cebador para el gen B (cebador azul). También se diseñan cebadores para que todos los fragmentos de ADN se complementen con los cebadores del vector linealizado (cebadores rosa y verde).

Posteriormente estos cebadores diseñados se incorporan a los fragmentos de ADN de interés (A y B) por medio de PCR.



Se le añaden 3 enzimas:

-**Exonucleasa T5.**- Deja secuencias complementarias.

-**ADN polimerasa.**- Incorpora nucleótidos a los fragmentos de ADN.

-**ADN ligasa.**- Une los fragmentos de ADN complementarios. Una vez ensamblado todos los fragmentos de ADN, los plásmidos pueden pasar a procedimientos de transformación (se requiere un gen de resistencia a antibiótico).

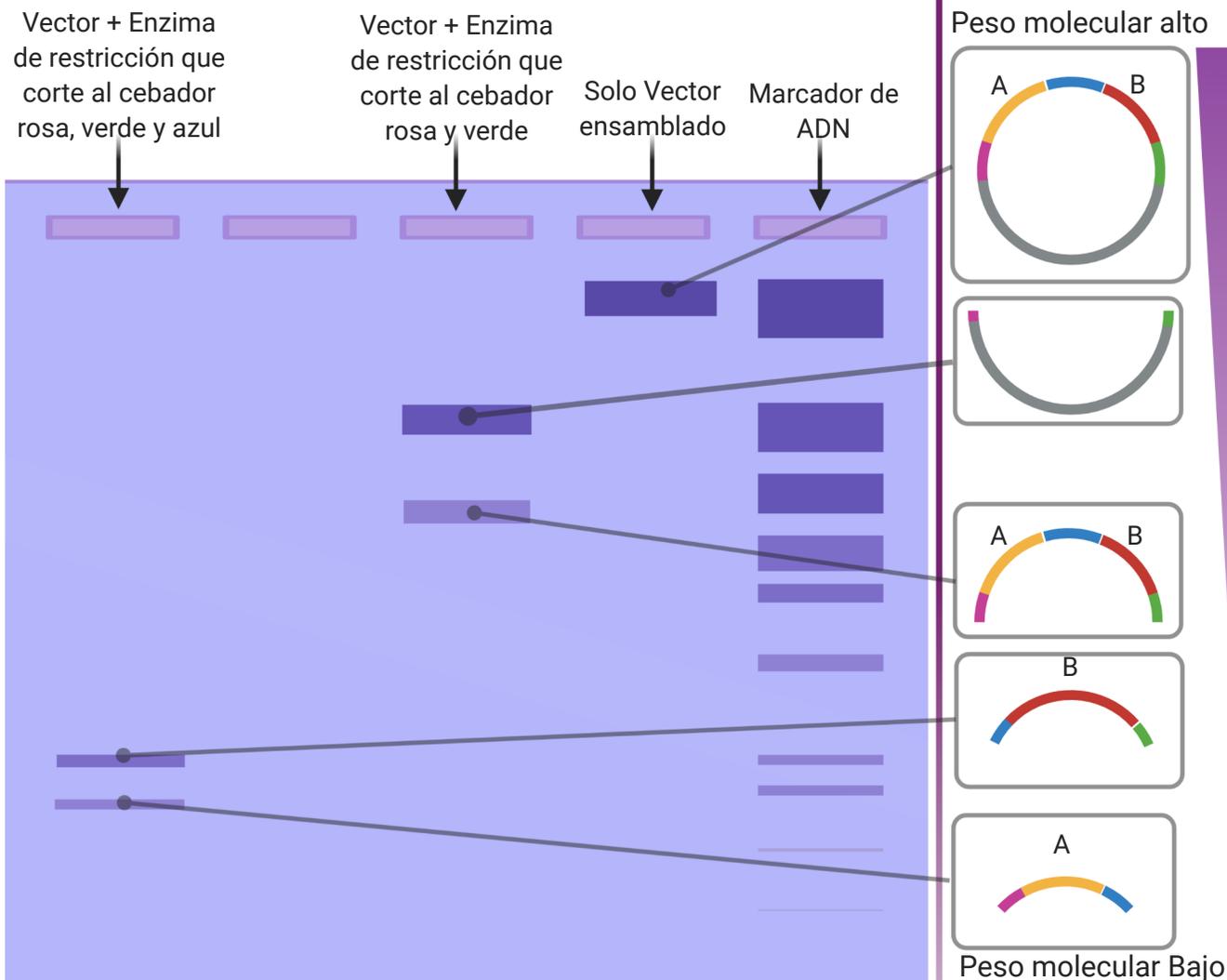


RESULTADOS ESPERADOS:

Al realizar la corrida electroforética, se espera que se hayan ensamblado satisfactoriamente los fragmentos de ADN y el vector. Para eso el vector ensamblado se expone a enzimas que cortan los cebadores (azul, rosa y verde) para generar fragmentos de ADN pequeños.

NOTA

Es posible que se generen fragmentos de ADN indeseados. Para evitar eso, uno de debe asegurar que las enzimas de restricción cortan de forma precisa



BIBLIOGRAFÍA:

-Addgene protocol - Gibson Assembly Cloning. Addgene.org (2020) de: <https://www.addgene.org/protocols/gibson-assembly/>

-New England Biolabs - Gibson Assembly® Protocol (E5510). International.neb.com (2020) de: doi.org/10.17504/protocols.io.cdms45



INTRODUCCIÓN:

El Ensamblaje Golden Gate es un método de clonación para ensamblar múltiples secuencias de ADN en un solo plásmido, usando enzimas de restricción tipo IIS y ADN ligasa T4/T7 para crear extremos voladizos no palindrómicos.

OBJETIVO:

Ensamblar múltiples secuencias de ADN (piezas de ensamblaje) en un solo vector.

METODOLOGÍA:

Tipo de muestra.- Fragmentos ADN compatibles: vector linealizado y piezas de ensamblaje.

Materiales, equipos y reactivos.-

Materiales:

- Tubos de PCR
- Micropipeta 0,5 – 10 µL
- Micropipeta 10 – 100 µL

Equipos:

- Tubos de PCR
- Micropipeta 0,5 – 10 µL
- Micropipeta 10 – 100 µL

Reactivos:

- Ligasa T4 NEB (2.000.000 U/mL)
- Enzima de restricción tipo IIS Bsal
- Buffer T4 NEB 10X
- BSA 100X
- Agua Mili-Q

Desarrollo de los métodos.-

1. Mida la concentración de ADN (ng/µl) de cada pieza de ensamblaje.
2. Agregue 100 ng del vector linealizado y cantidades equimolares de las otras piezas de ensamblaje a una mezcla de reacción de volumen total de 15 µl de la siguiente manera:

Orden	Componente	Cantidad
1°	Vector linealizado	100 ng
2°	Pieza de ensamblaje	(cantidad equimolar al anterior)
3°	Buffer T4 NEB 10X	1.5 µL
4°	BSA 100X	0.15 µL
5°	Enzima Bsal	1 µL
6°	Ligasa T4 NEB	1 µL
7°	Agua Mili-Q	Completar a 15 µL

NOTA

Este método también es conocido como ensamblaje eficiente y sin fisuras de fragmentos de ADN. Las enzimas de restricción más usadas son Bsal, BsmBI y BbsI. Estas tienen ventaja sobre las tipo II estándar porque cortan el ADN fuera de sus sitios de reconocimiento.

NOTA

- Es esencial usar una ligasa de alta concentración.
- Bsal es solo 10% activa a 37°C sin la adición de BSA.

NOTA

Una cantidad equimolar de 0,02pmol es recomendada, puede realizar el cálculo con la siguiente fórmula:

$$\text{pmol} = (1000 \times \text{peso en ng}) / (\text{longitud en bp} \times 650 \text{ Da})$$

NOTA

Si alguna de las piezas de ensamblaje contiene uno o más sitios internos de Bsal, es preferible primero silenciarlos mediante mutaciones puntuales.

NOTA

Se debe utilizar un vector que no tenga los sitios tipo IIS. Puede consultar su secuencia en el siguiente sitio web: goldengate.neb.com

NOTA

Para consultar una lista de enzimas de restricción, puede usar el sitio web Golden Gate Assembly u otra aplicación.

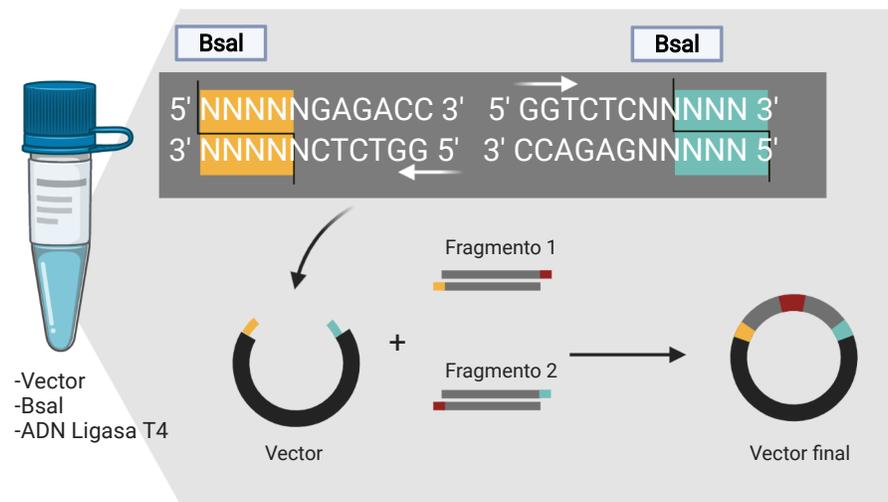
3. Realice la reacción de ensamblaje en un termociclador de la siguiente manera:

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de la enzima de restricción	37°C	3 min	25
Activación de ligasa	16°C	4 min	
Inactivación de la enzima	50°C	5 min	1
Inactivación de la ligasa	80°C	5 min	
Final	4°C	-	-

4. Transforme 5 µl de la reacción de ensamblaje en 100 µl de E. coli competente y/o ejecute un diagnóstico electroforético en gel de agarosa para verificar el ensamblaje exitoso.

FUNDAMENTO:

El ensamblaje Golden Gate es un método para ensamblar múltiples fragmentos de DNA. Las endonucleasas tipo IIS cortan fuera del sitio de reconocimiento palindrómico, formando sitios Bsal en direcciones opuestas.

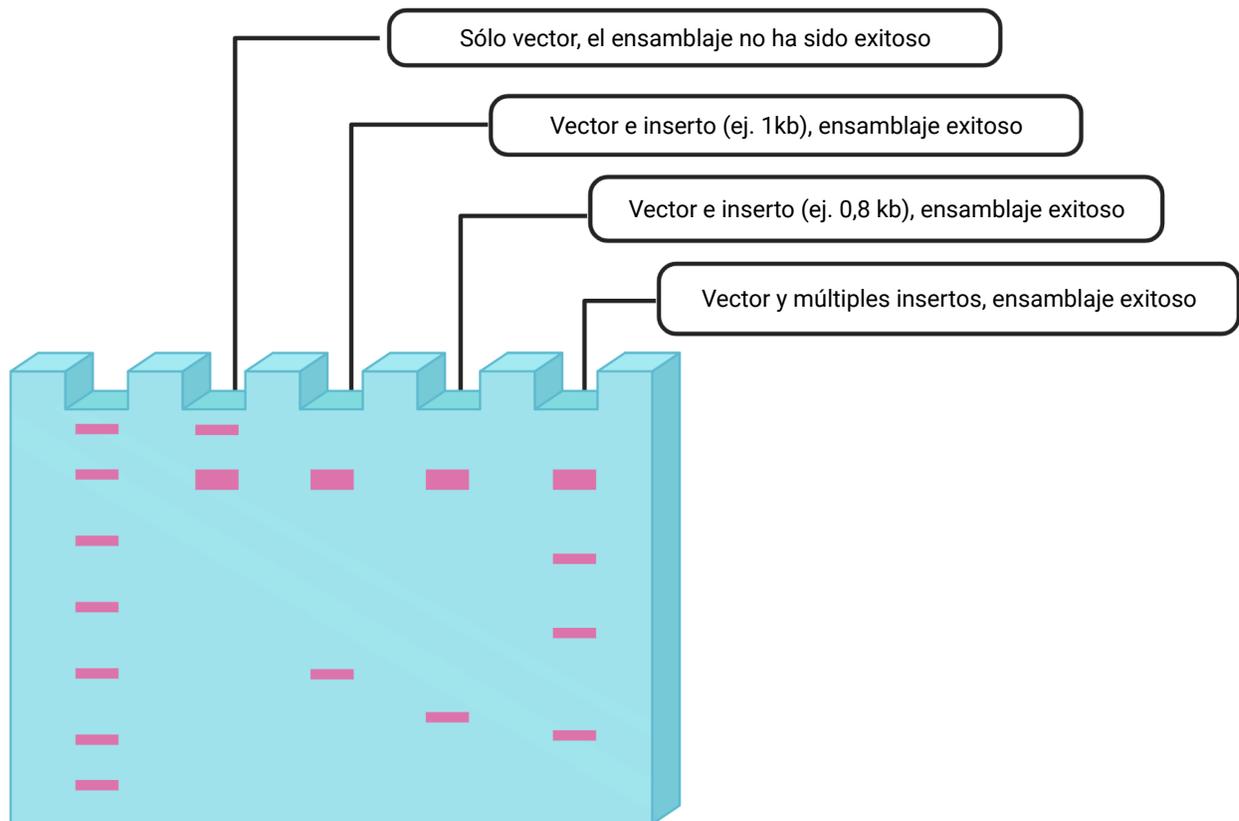


El gen de interés está diseñado con sitios Tipo IIS (como Bsal o BbsI), que se encuentran en el exterior del sitio de escisión. Como resultado, estos sitios se eliminan por digestión/ligadura y no aparecen en el constructo final. El vector de destino contiene sitios con voladizos complementarios que dirigen el ensamblaje del producto. Por ejemplo, un fragmento con 5' voladizo TGGG y 3' voladizo TCCG puede ligarse en un vector que contiene esos voladizos. Estos pueden estar presentes en el plásmido original o agregarse mediante amplificación basada en PCR.



RESULTADOS ESPERADOS:

Para verificar el plásmido generado se puede acudir hasta técnicas de secuenciación pero la manera más sencilla es mediante una digestión de diagnóstico con enzimas que corten en el vector y otras que cortan los insertos, es importante ver bandas que identifiquen a los productos y el vector linealizado. El peso de las bandas correspondientes debe sugerirnos un proceso exitoso.



BIBLIOGRAFÍA:

- Golden Gate Assembly - iGEM evry. Recuperado el 12 de junio de 2021, de https://2017.igem.org/wiki/images/e/e8/T--Evry_Paris-Saclay--protocol--pdf--gate.pdf
- Barrick Lab: GoldenGateAssemblyProtocolsMainPage-GoldenGateAssembly. Barricklab.org. (2020). Recuperado el 12 de junio de 2021, de <https://barricklab.org/twiki/bin/view/Lab/GoldenGateAssemblyProtocolsMainPage-GoldenGateAssembly>.
- Biolabs, N. (2020). Golden Gate Assembly | NEB. International.neb.com. Recuperado el 12 de junio de 2021, de <https://international.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-assembly-and-cloning/golden-gate-assembly,y>
- Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2009). Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA -Shuffling Method Based on Type IIs Restriction Enzymes. Plos ONE, 4(5), e5553. Recuperado el 12 de junio de 2021, de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005553>



Producción de proteínas recombinantes a pequeña escala

12

Capítulo

INTRODUCCIÓN:

La producción de proteínas recombinantes (PR) es una de las aportaciones más importantes de la biotecnología moderna; siendo resultantes de la expresión de un gen insertado en el microorganismo huésped.

OBJETIVO:

Producir proteínas recombinantes a través del cultivo líquido de *E. coli* transformado.

METODOLOGÍA:

Tipo de muestra.- Biológica, cultivo líquido de *E. coli* transformado.

Materiales, equipos y reactivos.-

Materiales:

- Un asa bacteriológica.
- Dos tubos de tapa rosca de 10 mL.
- Dos tubos falcon de 50 mL.
- Un erlenmeyer de 250 mL.
- Tips de 1000 uL

Equipos:

- Micropipeta de 200 - 1000 uL.
- Incubadora.
- Shaker.
- Espectrofotometro UV-VIS
- Campana de flujo laminar.

Reactivos:

- Caldo Luria Bertani (LB).
- Ampicilina 100 µg/mL.
- Isopropil-B-D-1-tiogalacto piranosido (IPTG) 0,125 mg/mL.
- Agua destilada.

NOTA

Recuerda seguir todas las normas de bioseguridad, antes y después de ingresar al laboratorio.

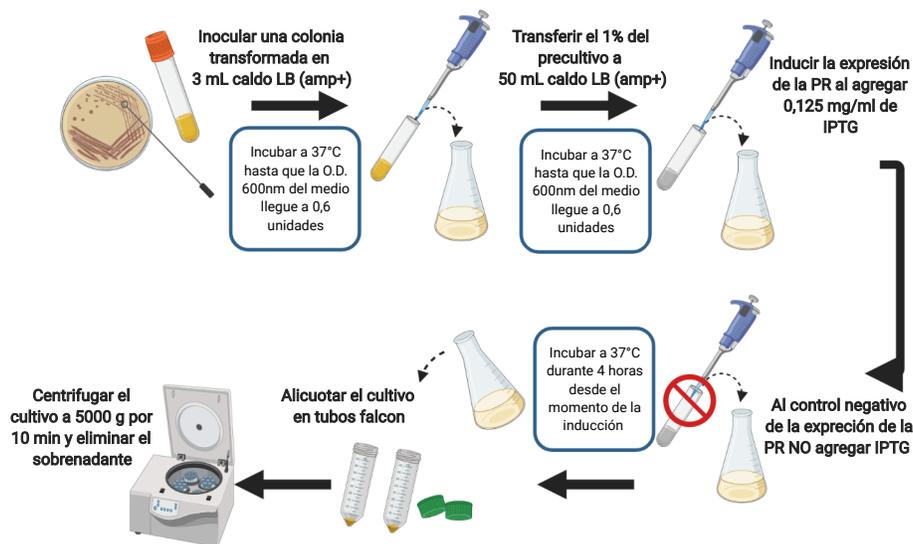
NOTA

La concentración del inductor de expresión IPTG puede ser modificada para obtener una mayor expresión génica y producción de PR.

NOTA

Seguida a la preparación de la solución de ampicilina, esta debe ser filtrada y almacenada a -20°C para su posterior uso.

Desarrollo de los métodos.-



NOTA

Buffer de unión (obtención de PR por sonicación)

- Imidazol 40 mM.
- NaCl 4 M.
- Tris-HCl 160 mM pH:7,9.

NOTA

Reactivos adicionales

Buffer A (obtención de PR por lisis celular)

- Tris - HCl 50 mM pH: 7.9 (25 ml Tris - HCl 1M pH:7.9)
 - Dextrosa 50 mM (25 ml de dextrosa 1 M).
 - EDTA 1 mM pH: 8 (1 ml de EDTA 0.5 M pH: 8).
- Aforar a 500 ml con H₂O, esterilizar en autoclave, y almacenar a temperatura ambiente.

Buffer de lisis (obtención PR por lisis celular)

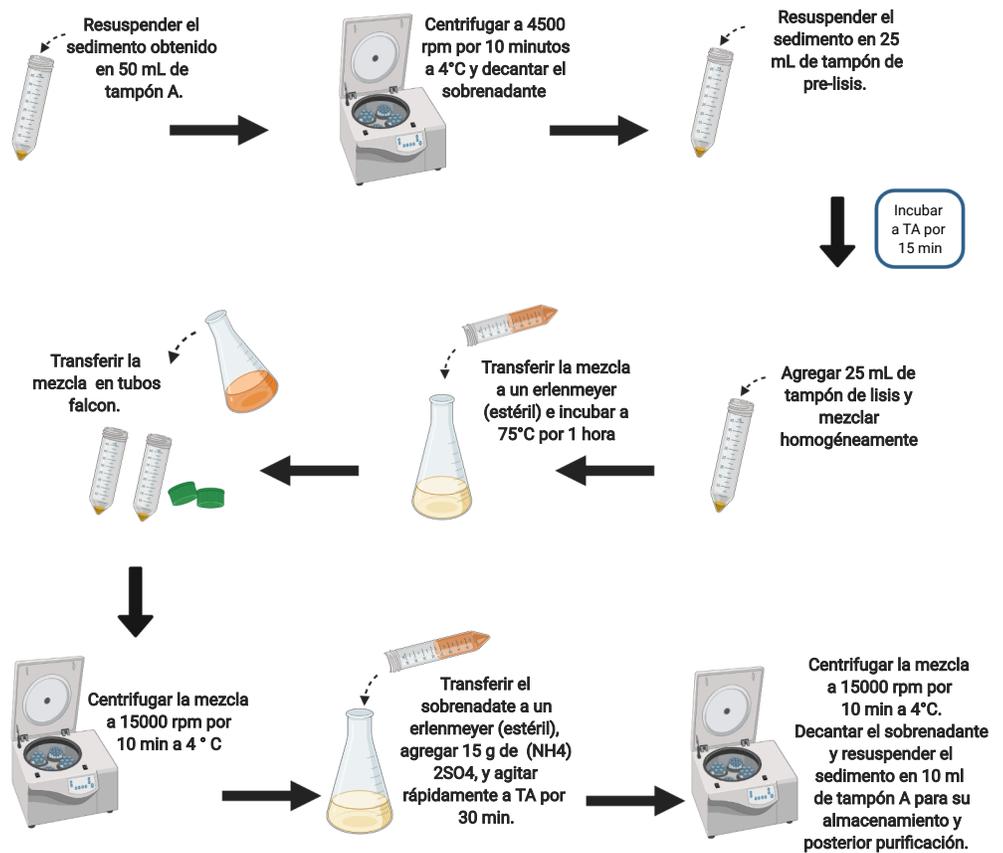
- Tris - HCl 10 mM pH: 7.9 (1 ml de Tris-HCl 1M pH: 7.9).
- 50 mM KCl; 5 ml de KCl 1M).
- EDTA 1 mM pH: 8 (0.2 ml de EDTA 0.5 M pH: 8).
- PMSF* 1 mM (2 ml de PMSF 50mM).
- Tween 20 0.5% (0.5 ml de Tween 20).
- NP40 0.5% (0.5 ml de NP40).

Aforar a 100 ml con H₂O, esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

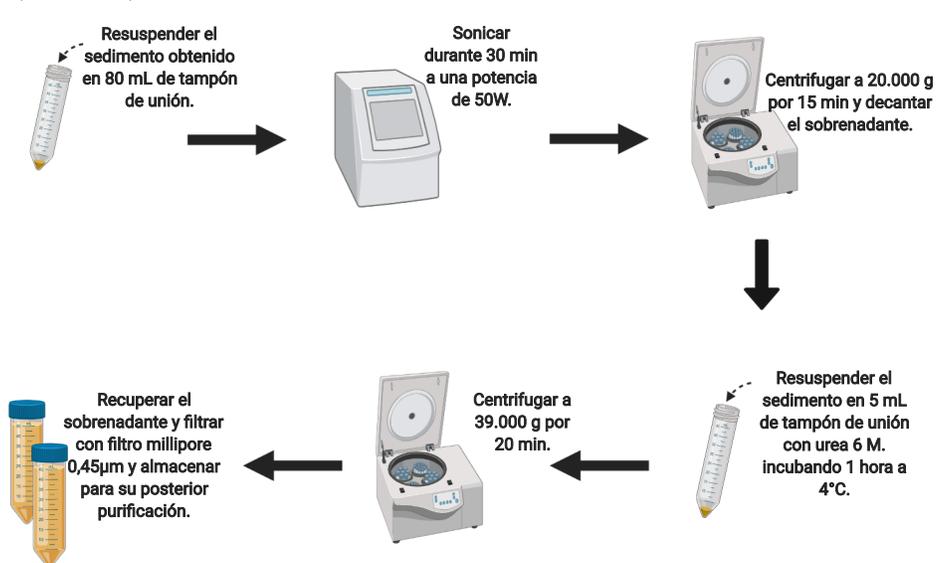
Buffer de pre-lisis. Buffer A + 4 mg/ml de lisozima.

- * Material tóxico, usar barbijo y guantes.
- *PMSF solo puede ser disuelto en EtOH al 100%.

Obtención de proteínas recombinantes por lisis celular (Bacterias)



Obtención de proteínas recombinantes por sonicación (Bacterias)



*En el caso de producción de PR en levaduras, solo es necesario centrifugar el cultivo líquido para obtener las PR.

NOTA

El porcentaje de acrilamida a utilizar en el gel está determinado por el tamaño de las proteínas de interés. Los geles de mayor porcentaje de acrilamida se usan para separar proteínas más pequeñas y los geles de menor porcentaje se usan para separar proteínas más grandes.

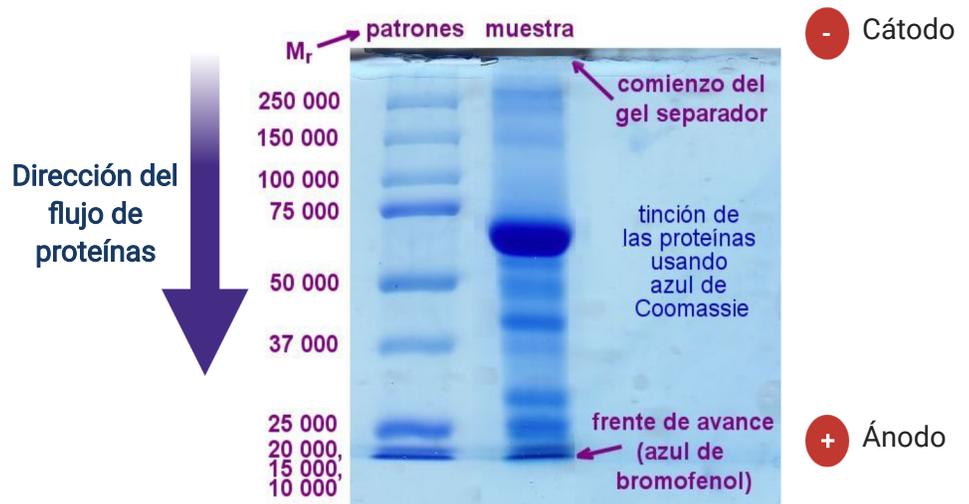
NOTA

Los geles son discontinuos, es decir, tienen un gel de apilamiento y de separación, de modo que todas las proteínas ingresan al gel de separación al mismo tiempo.

RESULTADOS ESPERADOS:

Cabe recalcar que el paso posterior a la producción y obtención de PR es la purificación de la misma, seguida de su valoración por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, una técnica básica y fundamental en el laboratorio de biología molecular. Técnica que se basa en la separación de proteínas en un campo eléctrico en base a su carga que es proporcional a su peso molecular.

Para la estimación del peso molecular de una proteína, se emplean proteínas de peso molecular conocido como patrones que permiten realizar una estimación del peso molecular de las proteínas de interés. Al realizar la medición de la movilidad relativa R_f (distancia migrada por la proteína / distancia migrada por el frente). Una vez determinada el R_f del patrón, se realiza una representación gráfica logarítmica del peso molecular frente al R_f , obteniendo una recta que será útil para obtener el peso molecular de la proteína de interés.



BIBLIOGRAFÍA:

- Farazmandfar, T., Rafiei, A., Hashemi-Sotehoh, M. B., Valadan, R., Alavi, M., & Moradian, F. (2013). A simplified protocol for producing Taq DNA polymerase in biology laboratory. *Research in Molecular Medicine*, 1(2), 23-26.
- Menor-Salvan, C. (2019). SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida. 2020, julio 25, de ChemEvol Sitio web: <https://www3.uah.es/chemevol/index.php/sds-page-electroforesis-en-gel-de-poliacrilamida/>
- Martin, K. (2018). A deep dive into induction with IPTG. 2020, julio 25, de Luciferin Sitio web: <https://www.goldbio.com/articles/article/a-deep-dive-into-iptg-induction>

El manual de protocolos en español realizado por el equipo de iGEM Bolivia tiene el fin de proporcionar una guía de ejecución de técnicas más usadas en laboratorios de biología molecular y biología sintética para hispanohablantes.

Equipo de iGEM Bolivia 2021

