

Curso de biología molecular

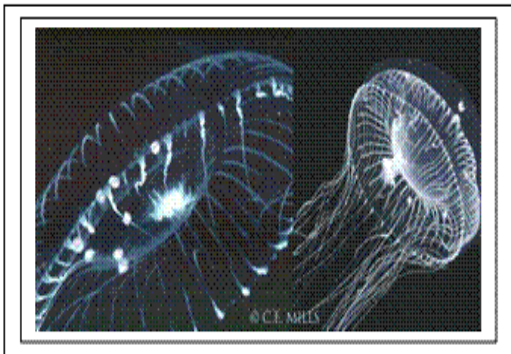
CIMAT

2007

Resumen

Este curso-taller tiene como propósito mostrar de manera teórica y práctica algunos principios básicos de biología molecular e ingeniería genética. Conocerás qué es el DNA y su importancia en la vida de todo organismo en este planeta. Aprenderás técnicas moleculares que han revolucionado la manera de hacer investigación en biología, con las que podrás extraer y manipular DNA de bacterias, construir un organismo transgénico (genéticamente modificado), y conocer que cada organismo tiene una huella genética que los distingue de cualquier otro. Durante este curso visitarás la Unidad de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N., en el cual realizarás un análisis molecular que te permitirá detectar si una planta es transgénica o no.

Bioluminiscencia



La bioluminiscencia se define como la producción de luz por organismos vivos. Es un fenómeno frecuente en especies marinas y se estima que el 90% de los seres vivos que habitan en la porción media y abisal de los mares (fosa marina donde la luz no llega) son capaces de producir luz. En hábitat terrestres la bioluminiscencia no es común. La luz emitida por el pescado o la carne en descomposición se debe a las

bacterias. En algunas especies la bioluminiscencia sirve como referencia sexual, en otras a modo de cebo. También es usado como defensa para confundir a los depredadores, pero en algunas especies la función no es clara.

Por medio de una simbiosis con bacterias, algunos animales marinos tales como los Cnidarios (corales, medusas y anémonas), gusanos, moluscos, equinodermos y peces, producen luz. En diversos lugares del cuerpo los animales disponen de pequeñas vejigas, comúnmente llamadas fotóforos, donde guardan bacterias luminiscentes. Algunas especies producen luz continua cuya intensidad puede ser neutralizada o

modulada mediante diversas estructuras especializadas. Normalmente los órganos luminosos están conectados al sistema nervioso, lo que permite al animal controlar la emisión lumínica a voluntad.

Entre los animales bioluminiscentes existe una pequeña medusa (*Aequorea victoria*) que ha ganado interés por presentar una proteína fluorescente que emite luz verde. Las medusas son animales marinos que pertenecen al filo Cnidario y se caracterizan por presentar un órgano urticante. Su cuerpo es casi siempre transparente, tienen forma de campana flotante o sombrilla cuando esta en fase reproductiva, y el 95% de su cuerpo es agua. En 1960 el Dr Osamu Shimomura observó que esta medusa, que mide entre 5 y 10 cm de diámetro, presenta 2 proteínas: una de ellas es fosforescente (ecuatorina), produciendo luz azul, y la segunda es fluorescente. La bioluminiscencia verde se produce en pequeños foto-órganos localizados en el anillo de la campana observándose que la localización es género o especie específica. En 1962 fue descubierto que la medusa *Aequorea victoria* convierte la luminiscencia azul de la fotoproteína ecuatorina en fluorescencia verde, mediante un proceso de transferencia de energía sin emisión y reabsorción de radiación. La proteína fluorescente se conoce como proteína verde fluorescente o GFP (por sus siglas en inglés, green fluorescent protein). En 1992 se demostró que su expresión en organismos distintos de la medusa produce fluorescencia sin requerir cofactor alguno. Su principal ventaja consiste en que la fluorescencia se genera espontáneamente en células vivas y con esto se puede observar también la expresión de genes in vivo en un amplio rango de hospederos.

En la actualidad varias empresas han estado creando organismos transgénicos o genéticamente modificados (OGM) con GFP. Como ejemplos está la creación de ratones transgénicos por parte de la empresa Anticancer Inc, con el propósito de implantarles células cancerosas de humanos; gracias a la fluorescencia se puede observar el movimiento de las células cancerosas en el cuerpo de un ratón vivo.

En la mayoría de los insectos, aves y algunas especies de arácnidos, los machos que copulan por segunda vez con una hembra engendran la mayoría de las crías de la hembra. Este fenómeno comenzó a entenderse en el momento que se utilizó la GFP. Lo que observaron es que el esperma de la segunda pareja desplaza al de la primera.

Dentro de los avances en la inserción de la proteína GFP en mamíferos, está la creación de cerdos transgénicos con GFP y YFP en la universidad de Missouri, Columbia; y el conejo ALBA, el cual en la actualidad vive en una galería de arte.

Se ha pensado utilizar GFP en las gónadas de los mosquitos para poder diferenciar fácilmente los machos de las hembras; de esta forma se retiran a los machos, se esterilizan y se regresan al ambiente natural con lo que se espera que las poblaciones disminuyan y se controle la enfermedad de la malaria.

Recientemente científicos taiwaneses dicen haber creado cerdos fluorescentes verdes que resplandecen completamente, con lo cual se espera que se conozca más sobre la célula madre y entender mejor algunas enfermedades humanas. Una de las ventajas de esto es que se puede ver la evolución del material genético sin hacer biopsias o intervenciones mayores al animal.



El uso de GFP está revolucionando la biología celular al permitir obtener datos sobre la localización, dinámica y redes de interacción molecular de numerosas proteínas con una gran resolución espacial y temporal. También sirven para monitorear cambios bioquímicos dentro de las células.

También se utiliza esta proteína (GFP) para producir organismos transgénicos con interés comercial; por ejemplo, el pez cebra modificado genéticamente que brilla en la oscuridad.

Pero más allá del arte-científico la proteína GFP y otros marcadores se han utilizado para monitorear genes con interés y aplicación biotecnológica, como en el mejoramiento

de plantas, hongos y bacterias con las técnicas de ingeniería genética con la finalidad de obtener: mejoramiento de cultivos vegetales de importancia agronómica, producción de vacunas y nuevos medicamentos, enzimas de aplicación industrial e inclusive microorganismos y plantas para limpiar y recuperar el medio ambiente.

Biotecnología Uso de microorganismos benéficos

Actualmente en todo el mundo, se gasta mucho dinero en agroquímicos como fertilizantes y pesticidas que ayudan a lograr una buena producción agrícola que asegure la alimentación de los millones de habitantes del planeta.

Una alternativa biotecnológica para apoyar a la agricultura y que se convierta en una actividad sustentable, se encuentra en el suelo. El suelo cuenta con una gran variedad de microorganismos entre los que se encuentran hongos, bacterias, virus, algas, etc. Ante la necesidad de incrementar la producción agrícola y reducir o incluso reemplazar el uso de fertilizantes y pesticidas que contaminan el suelo y los mantos acuíferos, se ha puesto gran interés en el uso de productos biológicos dando paso a la agricultura orgánica. Así, dentro de la amplia diversidad microbiana encontramos biocontroladores, biofertilizantes, bioplaguicidas y promotores de crecimiento de plantas.

Los grupos microbianos más importantes en este campo son: 1) las bacterias promotoras de crecimiento, denominadas en inglés como "PGPR", que viven en las raíces de las plantas favoreciendo su crecimiento y formando además una barrera de protección contra organismos patógenos, y 2) los hongos micorrizicos, que forman una asociación simbiótica con las plantas llamada micorriza y son muy importantes para que las plantas adquieran del suelo nutrientes, agua, resistencia a contaminantes, etc.

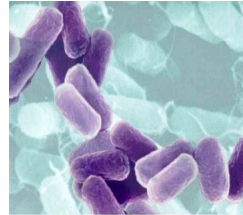
Otra importante aplicación de los microorganismos es su uso ecológico como herramientas en la biorremediación de zonas contaminadas (metales pesados o hidrocarburos) o deterioradas como bosques abiertos a agricultura y deforestación u otra actividad.



1



2



3



4

- 1) Placa con medio de cultivo que muestra la gran variedad de microorganismos que están en el suelo.
 - 2) Hongo Basidiomiceto común en los bosques, forma una unión simbiótica con los árboles y ambos obtienen beneficios.
 - 3) Grupo de bacterias de suelo *Bacillus subtilis* con la propiedad de promover el crecimiento de plantas.
 - 4) Producto comercial Probacil de la compañía de productos agrícolas LAPISA usado en los campos mexicanos, producto desarrollado en Cinvestav Campus Guanajuato.
-

Actividades en el curso

Los objetivos de las prácticas del curso son:

Observar la fluorescencia verde en una bacteria de *Escherichia Coli* transformada con el gen de la GFP.

Obtener el DNA de esta bacteria.

Corroborar por PCR la presencia de dicho gen.

Insertar este gen a otras bacterias.

Observar como se regula la expresión del gen de la proteína verde fluorescente.

Cultivo de microorganismos benéficos del suelo.

Calendario de actividades

DIA UNO (lunes)

1) Bacterias fluorescentes

Observar con una lámpara de luz ultravioleta que las colonias proporcionadas poseen fluorescencia verde.

Inocular 2 ml de caldo de cultivo (LB + Cb) con una asada de las colonias antes mencionadas e incubar el tubo toda la noche a 37°C.

2) Identificación de organismos del suelo

Tomar una muestra de suelo. Hacer una mezcla de 10 g de suelo con 90 ml de agua destilada estéril, agitar fuertemente por 10 min. Dejar en reposo la mezcla para sedimentar las partículas de suelo, verter en un contenedor de plástico, tomar 110 ml con una micropipeta multicanales y colocar la suspensión en una microplaca de 96 pozos e incubar a 28°C. Revisar a diario.

3) Confrontación de un hongo patógeno contra una bacteria protectora de plantas.

De una placa con hongo tomar una rodaja con un sacabocados estéril y colocar en una placa nueva. Incubar 24 h.

DIA DOS (martes)

1) Bacterias fluorescentes

Transferir el cultivo a tubos eppendorf de 2 ml. Centrifugar a 6000 rpm durante 5 min, decantar el sobrenadante, agregar 1 ml de agua destilada y centrifugar nuevamente a 6000 rpm durante 5 min, decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla celular en el volumen remanente. Añadir 300 µl de la solución de lisis (Tris 10mM, EDTA 4mM, NaCl 20mM, SDS 4%, NaOH 0.04M. pH final 12) homogeneizar la solución volteando el tubo lentamente unas cinco veces e incubar a temperatura ambiente 3 min. Añadir 150 µl NaCl 5M, agitar por inversión 6 veces e incubar en hielo durante 10 min, centrifugar a 13000 rpm durante 8 min y recuperar el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml. Agregar la solución de RNAsa, incubar a 37°C durante 30 min y agregar 150 µl de la solución de precipitación de proteínas (**Acetato de amonio 3M**), agitar por inversión 6 veces e incubar en hielo 15 min. Centrifugar nuevamente a 13000 rpm durante 20 min y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo. Agregar 700 µl de isopropanol, incubar a -20°C toda la noche.

2) Identificación de organismos del suelo

Revisar placa de cultivo.

3) Confrontación de un hongo patógeno contra una bacteria protectora de plantas.

Inocular la bacteria y revisar 24 h después.

DIA TRES (miércoles)

Visita al Cinvestav Campus Guanajuato (Irapuato): En la visita al Cinvestav Campus Guanajuato (Irapuato) se abordará el controvertido tema de los Organismos Genéticamente Modificados (OGM) u organismos transgénicos.

Mediante un ensayo conocido como PCR se aprenderán las metodologías que se usan comúnmente para determinar si una planta es transgénica o silvestre. También se realizara el ensayo de PCR para amplificar el gen de la proteína verde fluorescente a las muestras de DNA que se extrajeron previamente. La reacción de PCR será realizada por los instructores del Taller.

DIA CUATRO (jueves)

1) Bacterias fluorescentes

Centrifugar a 13000 rpm durante 15 min las muestras de ADN que se dejaron precipitando. Agregar 500 µl de etanol al 70%, agitar suavemente, desechar el etanol y dejar secar la pastilla de ADN con la boca del tubo sobre papel higiénico durante 5 min. Resuspender el ADN en 50 µl de solución de almacenamiento (agua destilada o buffer TE). Para analizar las muestras de ADN se deben separar de acuerdo a tamaños por medio de un gel de electroforesis. Preparar un gel de electroforesis usando agarosa al 1 % y buffer TAE. Mezclar 50 ml de TAE y 500 mg de agarosa, fundir en el horno de microondas y formar el gel vaciando la agarosa fundida sobre la base de la cámara de electroforesis evitando que se tire y se formen burbujas. Colocar el peine para formar los pozos antes de vaciar la agarosa. Tomar 3 µl de tus muestras de ADN y añadirles 3 µl de buffer de carga y correr hasta que el colorante llegue hasta $\frac{3}{4}$ partes del gel. Teñir el gel y observar el ADN.

2) Identificación de organismos del suelo

Revisar la placa

3) Confrontación de un hongo patógeno contra una bacteria protectora de plantas.

Observar la caja

DIA CINCO (viernes)

1) Bacterias fluorescentes

Para clonar el ADN que contiene el gen de la fluorescencia de debe hacer lo siguiente: Añadir entre 1 y 10 μ l del ADN obtenido a un tubo con células receptoras. A modo de experimento control tomar un tubo de células receptoras y añadirles solo agua (el mismo volumen que se añadió de ADN) Incubar en hielo 30 min, calentar a 42°C por 2 min e inmediatamente poner en hielo durante cinco min. Añadir al tubo con las células receptoras 1 ml de medio rico (LB). Incubar a 37°C 1 hora. Tomar 200 μ l del cultivo y sembrar en una caja petri con medio rico, marcador de selección (Carbenicilina análogo de la ampicilina) y regulador de la expresión (Arabinosa) y otra caja sin regulador. Incubar toda la noche a 37°C. Para el cultivo control sembrar 200 μ l en una caja petri con medio rico con marcador de selección y sin marcador de selección.

2) Identificación de organismos del suelo

Revisar la placa

3) Confrontación de un hongo patógeno contra una bacteria protectora de plantas.

Revisar la caja de petri

DIA SEIS (sábado)

Observación y discusión de los resultados.