

Taller de Ciencia para
Jóvenes

“Lo Esencial es Invisible a los Ojos...Hasta que Estás en el Laboratorio”

Laboratorio de Genética Molecular
Departamento de Ingeniería Genética
CINVESTAV Unidad Irapuato

Irapuato, Guanajuato
26 de Julio de 2024

Los miembros del Laboratorio de Genética Molecular perteneciente al Departamento de Ingeniería Genética del CINVESTAV Unidad Irapuato te damos la bienvenida a nuestras instalaciones.

En nuestro laboratorio contamos con tres líneas principales de investigación:

- **Respuesta Temprana a Estrés Hídrico:** Analizamos los cambios en la expresión de genes, así como alteraciones fisiológicas de *A. thaliana* en respuesta a sequía.
- **Papel de las Ubicuitín Ligasas en Estrés Hídrico:** Las ubiquitín ligasas son un grupo de enzimas encargadas de “etiquetar” proteínas para su posterior degradación; por lo cual son de suma importancia para favorecer la adaptación de un organismo hacia las condiciones fluctuantes del ambiente en el que se desarrolla.
- **Modulación de la Regulación de la Expresión Génica a Nivel Postranscripcional:** O en palabras más sencillas, cómo la interacción de proteínas con el ARN mensajera favorece la protección y/o degradación de esta molécula.

Hoy te unirás a nosotros y experimentarás un día en la vida de un investigador.

¿Qué haremos?

Comenzaremos con una breve plática que incluirá conceptos básicos de bioquímica, biología molecular, bioinformática, fisiología y genética vegetal. Más adelante conoceremos a nuestro modelo de estudio, *Arabidopsis thaliana*, abordando algunas características importantes de esta planta. A continuación, realizaremos una parte del proceso para la generación de líneas mutantes de *Arabidopsis* mediante la aplicación de técnicas básicas de biología molecular. Finalmente discutiremos los resultados obtenidos.

Con esto aprenderás porqué “lo esencial es invisible a los ojos” ... hasta que tienes las herramientas necesarias para descubrir un mundo desconocido por el resto del mundo.

¡Que te diviertas!

Práctica 1: Extracción de ADN de *Arabidopsis thaliana*

- 1.- Colocar aproximadamente 100 μl de perlas de vidrio (425-600 μm) en un microtubo de 1.5 ml.
 - 2.- Cortar e introducir dentro del microtubo (previamente rotulado) una o dos hojas de la roseta de plantas de 3-4 semanas de edad.
 - 3.- Congelar la muestra inmediatamente en nitrógeno líquido.
 - 4.- Repetir la operación con cada una de las plantas a analizar.
- NOTA:** Es importante limpiar perfectamente las tijeras después de cada corte para evitar contaminación.
- 5.- Colocar los microtubos en el homogenizador y agitar a alta velocidad durante 15-18 segundos.
 - 6.- En caso de procesar varias muestras, regresar los microtubos a nitrógeno líquido hasta terminar con el total de las muestras o, bien, continuar con el paso 7 inmediatamente.
 - 7.- Adicionar 300 μl de CTAB 2X a cada microtubo, mezclar vigorosamente e incubar a 65°C durante 30 minutos.
 - 8.- Finalizada la incubación, enfriar las muestras a temperatura ambiente.
 - 9.- Añadir 300 μl de cloroformo y mezclar vigorosamente.
 - 10.- Centrifugar durante 2 minutos a una velocidad de 12,000 RPM para separar las fases.
 - 11.- Transferir la fase acuosa superior a un microtubo nuevo previamente rotulado.
 - 12.- Adicionar 300 μl de isopropanol y mezclar por inversión.
 - 13.- Centrifugar a velocidad máxima en la microcentrífuga durante 5 minutos para precipitar los ácidos nucleicos (pastilla blanquecina).
 - 14.- Retirar el sobrenadante y lavar la pastilla con 500 μl de etanol al 70%.
 - 15.- Centrifugar durante 1 minuto (opcional) a velocidad máxima.
 - 16.- Retirar el sobrenadante con precaución para posteriormente dejar secar la pastilla a temperatura ambiente durante 10-15 minutos.
 - 17.- Añadir 100 μl de agua desionizada y colocar el microtubo en hielo durante 10-20 minutos. Mezclar suave y ocasionalmente para disolver el ADN.
 - 18.- La muestra de ADN puede ser empleada inmediatamente. Para almacenamientos prolongados se sugiere guardar la muestra a -20°C.

Práctica 2: Genotipificación de Líneas Mutantes de *Arabidopsis thaliana*

1. Acceder al recurso web (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Este portal, auspiciado por el Salk Institute for Biological Studies (La Jolla, California, EUA), facilita la búsqueda de colecciones de mutantes de *A. thaliana*.

2. En el apartado “1. Search” es posible buscar líneas mutantes empleado el ID del gen mutado o, bien, el ID específico de la línea mutante. De igual manera la búsqueda puede realizarse empleando las coordenadas del gen dentro del genoma, así como también el cromosoma en el que éste se encuentra.
3. Para este ejemplo emplearemos el gen **AT1G20823**.
4. En la ventana resultante podremos encontrar las diferentes líneas o inserciones que existen para dicho gen. En la parte superior se indica mediante un flecha el gen en estudio, así como la dirección y el contexto genético del mismo dentro del genoma. Enlistados (y con un código de colores) podrá observar las diferentes inserciones para dicho gen, así como posibles bibliotecas de cDNA del mismo.

Arabidopsis thaliana [Ararport 11]
chr1 7236676 - 7241676

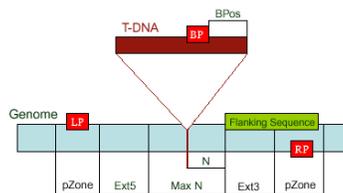
1. Search : [2]
 Type: Gene Query: AT1G20823
 Chr: chr1 Posn:
 Display: Graphy Search Clear

4. Blast :
 Program: blastn_DNA E-value: 1e-04 Hits: 5
 Cut and paste your sequence into here.

1. Help:
[GE Browser Help.](#)
[iSect Tool Help.](#)
[View Tool Help.](#)
 2. Tools:
[Edit Preferences](#)

5. Puede conocer las características específicas de alguna línea al seleccionarla; inmediatamente se abrirá una nueva ventana con la información disponible.
6. Al regresar a la ventana principal, y del lado inferior derecho, encontrará un pequeño menú del cual deberá seleccionar la opción "iSect Primers" (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>).
7. En la nueva ventana desplegada podrá conocer (1) las generalidades respecto al T-DNA empleado para generar las distintas líneas mutantes, así como también oligonucleótidos comunes para las diferentes colecciones de mutantes disponibles (SALK, SAIL, GABI, etc.).

1. Protocol for SALK T-DNA primer design



Note:

N - Difference of the actual insertion site and the flanking sequence position, usually 0 - 300 bases
 MaxN - Maximum difference of the actual insertion site and the sequence, default 300 bps
 pZone - Regions used to pick up primers, default 100 bps
 Ext5, Ext3 - Regions between the MaxN to pZone, reserved not for picking up primers
 LP, RP - Left, Right genomic primer
 BP - T-DNA border primer LB - the left T-DNA border primer
 BPos - The distance from BP to the insertion site

LB - Left border primer of the T-DNA insertion:
 > **LBb1** of pBIN-pROK2 for SALK lines
 GCGTGGACCGCTTCTGCAACT
 > **LBb1.3** (Newly used by Salk Genotyping Project and with better results)
 ATTTTCCGATTTCCGAAC
 > **LBa1** of pBIN-pROK2 for SALK lines
 TGGTTCACGTAGGGCCATCG
 > LB_6313R for SALK lines
 TCAAACAGGATTTCCGCTGCT

>LB1 for SAIL lines C/418-451 of pCSA110-pDAP101_T-DNAs
 GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
 > >LB2 for SAIL lines C/390-423 of pCSA110-pDAP101_T-DNAs
 GCTTCTATTATATCTCCCAAATACCAATACA
 >LB3 for SAIL lines C/350-383 of pCSA110-pDAP101_T-DNAs
 TAGCATCTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC

2. SALK T-DNA verification primer design

The program will pick up LP and RP for you. Its product size is around 900-1100 bps. If you want to confirm whether the design is right, simply cut and paste the LP and RP sequences together (you can cut/paste whole returned primer info line) to the blast textarea on the [tdnaexpress](#) page, hit "Return" if only one line of text and submit it.

Note: If you could not get primers or high quality primers for a line, it is possible that 1. either your input is "NOT RIGHT". 2. or the genomic region is "NOT GOOD" for picking up primers. However, you can change your settings, especially MAX_N, Ext5, Ext3, and/or pZone to get a return. You could also use the [iSect tool](#) to get the genomic sequences around the line and then design primers by yourself or other tools.

If you want to design primers within your sequences, please click [here](#).

Primer size - Opt: 21 Min: 18 Max: 28
 Primer TM - Opt: 61 Min: 53 Max: 71
 GC Content: 20.0 Max: 80.0 Clamp: 1
 - Min:
 Max N: 300 Ext5: 300 Ext3: 300
 Primer Zone: 200 BPos: 110
 Data Type: Insertion Format:

1. PrimerL : Please paste your list: like

```
Salk_000002
SAIL_155_007
GABI_756F01
FLAG_270805
RATH15-1976-1_G
NISC0510c289_292P9
SH_3_19088
```

8. En la sección inferior de la ventana mencionada anteriormente **(2)** podrá obtener las secuencias y características (longitud, T_m, %GC) de los oligonucleótidos que empleará para llevar a cabo la genotipificación mediante el ingreso del código o ID de la línea mutante a evaluar.
9. Para esta práctica emplearemos **3** líneas mutantes: **SALK_063134**, **SALK_046204** y **SALK_058308**.

Línea	Gen	Proteína Codificada
SALK_063134		
SALK_046204		
SALK_058308		

10. A partir de las ID's de las líneas, procede a obtener los oligonucleótidos necesarios para realizar la genotipificación (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>).

Línea	Secuencia Oligo LP	Secuencia Oligo RP
SALK_063134		
SALK_046204		
SALK_058308		

11. Empleando los oligonucleótidos previamente mencionados, prepara las mezclas necesarias para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa:

	[Stock]	Volumen	[Final]
Buffer	10X	1 µl	
MgCl₂	50 mM	0.4 µl	
dNTP's	10 mM	0.2 µl	
Oligo LP	10 mM	0.2 µl	
Oligo RP	10 mM	0.2 µl	
DNA	-----	1 µl	
Taq Pol	5 U/µl	0.2 µl	
H₂O	-----	A 10 µl	

	[Stock]	Volumen	[Final]
Buffer	10X	1 µl	
MgCl₂	50 mM	0.4 µl	
dNTP's	10 mM	0.2 µl	
Oligo LBb1.3	10 mM	0.2 µl	
Oligo RP	10 mM	0.2 µl	
DNA	-----	1 µl	
Taq Pol	5 U/µl	0.2 µl	
H₂O	-----	A 10 µl	

Práctica 3: Transformación de Células Electrocompetentes de *A. tumefaciens*

1. Partirás de una muestra purificada de ADN.
2. Extrae del ultracongelador (-80°C) una alícuota de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* y permite su descongelación en hielo (5 minutos). A la par, enfría la celda que emplearás para la electroporación.
3. Adiciona de 2-4 µl de la muestra de ADN al microtubo con las células. Homogeniza suavemente e incuba por 5 minutos.
4. Posteriormente transfiere las células a la celda.
NOTA: Es de suma importancia evitar la formación de burbujas en la celda.
5. Procede a dar el pulso eléctrico en el electroporador (1800 V). Inmediatamente transfiere la celda a hielo.
6. Adiciona 300-500 µl de medio LB a la celda, recupera las células y transfírelas a un microtubo de 1.5 ml.
7. Continúa con una incubación a 37°C y agitación de 150 RPM durante 1 hora.
8. Concluida la incubación, estría el cultivo en placas con medio sólido adicionada con el antibiótico necesario.
NOTA: Es recomendable sembrar dos placas con distintos volúmenes con la finalidad de obtener colonias aisladas.
9. Incuba las placas durante 24 horas a 37°C y posteriormente analiza las clonas obtenidas.

Práctica 4: Transformación de Plantas de *A. thaliana* Mediante el Método de Inmersión Floral

1. Partirás de un cultivo de *Agrobacterium* el cual fue previamente transformado con la construcción de interés.
2. Este cultivo deberá presentar una DO_{600nm} de aproximadamente 0.8.
3. Recupera las células mediante centrifugación y resuspéndelas en una solución de sacarosa al 5% adicionada con Silwet-77 al 0.05%.
4. Las plantas que utilizarás para transformar deberán tener una edad de aproximadamente 4 semanas.
5. Sumerge las inflorescencias en la suspensión bacteriana por 15-30 segundos con una agitación leve.
6. Concluida la inmersión de todas las inflorescencias, cubre las plantas con un recipiente plástico para conservar la humedad y evitar la exposición a la luz.
7. Almacena las plantas por 16-24 horas bajo las condiciones idóneas (luz/humedad).