

Programa sinóptico de la unidad curricular: **MANIPULACIÓN GENÉTICA DE PROCARIOTAS**

Unidad Curricular: <b>Manipulación Genética de Procariontas</b>						Unidad Responsable: Dpto. de Biología			
Datos Unidad Curricular		Modalidad			Tipo Dedicación		Dedicación Total Unidad Curricular		
Código	Semestre	T	P	L	HTSP	HTSNP	CA	Total Horas por Semana (HS=CA X 3)	Total Horas por Semestre (HS X 16)
191415	8	4	0	0	2	6	4	12	192
Prelaciones: Haber aprobado hasta el 7° semestre									

### Justificación

Esta unidad curricular electiva, que debería cursarse luego de haber aprobado Genética, se desarrolla como un curso dirigido al estudio práctico de los sistemas de regulación de la expresión de genes en procariontas, además del estudio e importancia de los plásmidos como vectores de clonación .

La vinculación teoría-práctica es una necesidad ineludible en el proceso de enseñanza-aprendizaje de cualquier rama de las ciencias biológicas, razón por lo cual el curso práctico está concebido con el propósito de aportar las herramientas básicas que les permita a los estudiantes iniciarse en el manejo y aplicación de las manipulaciones genéticas con fines científicos y/o de aplicación práctica y en la Biotecnología.

### Requerimientos

El estudiante debe haber aprobado el curso obligatorio Genética de la carrera de Biología. Es deseable que el estudiante del octavo/noveno semestre, donde se cursa esta asignatura, muestre un dominio técnico del idioma inglés.

### Objetivo General

Someter a ensayo mediante técnicas moleculares los sistemas regulatorios en procariontas, los principales componentes moleculares, genéticos, bioquímicos y fisiológicos de los genomas de bacterias y de sus elementos extra-cromosomales, así como de la regulación derivada de la interacción propia y foránea de éstos y entre ellos.

### Objetivos Específicos

- Evidenciar la presencia de un gen por observación de características fenotípicas de una cepa bacteriana (capacidad para multiplicarse en presencia de un antibiótico).
- Evidenciar un mecanismo de regulación de la expresión génica (operón lactosa en acción) y comprender sus aplicaciones para la expresión regulada de genes.
- Entender y analizar la alfa-complementación.



- Entender el mecanismo de Replicación del ADN poniendo en práctica la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

### **Contenidos**

#### **Taller de Bioinformática (4 semanas).**

El objetivo es ofrecer un taller práctico orientado hacia cómo analizar datos genómicos por medio del aprendizaje del uso de algunos programas disponibles en la web. Los principales esfuerzos de investigación en este campo incluyen búsqueda de secuencias en las bases de datos, el alineamiento de secuencias, la predicción de genes, montaje del genoma, alineamiento estructural de proteínas, predicción de estructura de proteínas, predicción de la expresión génica, interacciones proteína-proteína, y modelado de la evolución.

#### **PRÁCTICA 1. Purificación de ADN plasmídico, cuantificación espectrofotométrica y visualización en geles de agarosa.**

El ADN de una cepa bacteriana, puede ser extraído de las células por diferentes procedimientos y puede separarse el ADN cromosómico del plasmídico. Con un extracto de ADN plasmídico, puede realizarse una corrida electroforética y visualizarse lo que se denomina el “perfil plasmídico” de una cepa bacteriana. Este procedimiento tiene gran aplicación fundamentalmente en biología molecular y epidemiología. Dicha Extracción de ADN plasmídico se realizará por el método de lisis alcalina modificado (Kotchoni y col 2003).

#### **PRÁCTICA 2. Preparación de células competentes para aplicar el método de Transformación.**

Uno de los métodos más utilizados para obtener grandes cantidades de un plásmido consiste en introducirlo en células bacterianas, en lo que se denomina proceso de transformación. Las bacterias que han incorporado el ADN plasmídico se denominan transformantes, y si se reproducen en el medio adecuado, a partir de un gran número de transformantes se podrá recuperar un gran número de unidades del plásmido. Para introducir ADN plasmídico en células bacterianas se requiere tener una preparación de células competentes, es decir, células capaces de incorporar plásmidos, para lo cual se pueden aplicar técnicas basadas en diversos tratamientos químicos o físicos que inducen la formación de poros transitorios en la pared celular. El tratamiento químico con cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) y la electroporación, que consiste en inducir la competencia mediante la aplicación de un pulso eléctrico muy breve e intenso, son dos métodos utilizados con frecuencia.

#### **PRÁCTICA 3. Transformación bacteriana.**

La transformación es un proceso por el cual las células procariontas captan ADN libre presente en el medio. Es un fenómeno que ocurre de forma natural en muchas bacterias, pero con variaciones en su eficacia entre especies. Para que ocurra la transformación, la bacteria tiene que encontrarse en un estado de competencia, como



se mencionó anteriormente. La transformación en el laboratorio es una técnica rutinaria de enorme utilidad, ya que nos permite introducir plásmidos recombinantes en casi cualquier tipo de bacteria. En el laboratorio seguiremos el procedimiento descrito por Sambrook. Para seleccionar las células transformantes, el ADN introducido llevará un marcador de resistencia a antibióticos que proporciona una ventaja selectiva bajo las condiciones de crecimiento.

#### **PRACTICA 4. Alfa-complementación.**

El fenómeno de  $\alpha$ -complementación comprende la restitución de un fenotipo silvestre por la obtención de productos génicos funcionales codificados por alelos distintos al que presenta el cromosoma bacteriano, sin implicar recombinación. Es decir, la complementación es bioquímica, más no genética. Para hacer estudios de complementación genética *sensu stricto* en bacterias, debe hacerse a las células parcialmente diploides, es decir, que contengan dos copias del gen a estudiar, mientras permanece haploide para el resto de los genes; esto puede llevarse a cabo transformando las células con plásmidos que porten clonado el gen de interés, es decir, aquel que se encuentra mutado en el cromosoma de la bacteria, y cuya función se desea complementar. Sin embargo, en la  $\alpha$ -complementación se hace el estudio del producto del gen *lacZ* del operón *lac* (que en condiciones nativas codifica un polipéptido de 1029 aminoácidos). Este polipéptido forma un tetrámero. Sólo este tetrámero es una enzima funcional. Esta conformación oligomérica depende de la presencia de los 50 primeros aminoácidos (la región N-Terminal). La supresión de los 50 primeros aminoácidos genera un péptido (el péptido Omega derivado del gen  $\Delta M15$ ) que es incapaz de tetramerizarse y no muestra actividad enzimática. No obstante, si se aporta la secuencia que codifica el péptido faltante (llamado el péptido alfa), el péptido omega se vuelve funcional. La mayoría de cepas de *E. coli* expresan constitutivamente el péptido Omega, por lo que no muestran actividad enzimática. Cuando una bacteria de tal especie es transformada con un plásmido capaz de realizar la complementación alfa, la actividad enzimática se restituye.

#### **PRÁCTICA 5. Amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S bacteriano por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

Esta técnica consiste en la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ADN, imitando el proceso de replicación del ADN celular. Se basa en el uso de oligonucleótidos (primers o cebadores) que son complementarios a las secuencias que delimitan el fragmento que se quiere amplificar. Es una técnica con alta sensibilidad y especificidad que permite a partir de unas pocas moléculas de un ADN molde, amplificar millones de veces un fragmento de interés para que pueda ser visualizado. Utiliza una ADN polimerasa, una mezcla de deoxiribonucleótidos-trifosfato (dNTPs), un par de cebadores específicos y un buffer que brinda las condiciones iónicas apropiadas para la polimerización. La reacción se lleva a cabo en un equipo (termociclador) que trabaja por ciclos de temperatura: desnaturalización, luego de hibridización de los



cebadores y por último la temperatura de polimerización a la cual actúa la enzima. Estos pasos se repiten unas 30 veces, aumentando exponencialmente el número de copias de la secuencia blanco.

### **PRÁCTICA 6. Electroforesis en gel de agarosa.**

La electroforesis es una técnica que permite separar distintos fragmentos o moléculas de ADN en función de sus pesos moleculares y/o de su conformación (circular superenrollada, circular relajada o lineal). El ADN a pH neutro está cargado negativamente por lo que migra hacia el polo positivo cuando es sometido a un campo eléctrico. La distancia recorrida muestra una relación inversa al tamaño del ADN, por lo que las moléculas pequeñas migrarán más que las de mayor tamaño. Las moléculas de ADN circular como los plásmidos pueden encontrarse en distintas conformaciones con diferente movilidad electroforética.

### **Estrategias Metodológicas**

Cada trabajo práctico constará de dos sesiones de laboratorio. La primera sesión consistirá en la evaluación de la preparación del estudiante mediante un quiz entrada, seguido de una clase introductoria y discusión de los protocolos a llevar a cabo con el fin de cumplir el objetivo de la práctica; así como la instrucción de la correcta forma de llevar a cabo el trabajo. Los alumnos serán divididos en grupos, de forma tal que cada uno de ellos tenga igual oportunidad de trabajar y ser supervisados en su desempeño. La segunda sesión se registrarán los resultados y discutirán según los fundamentos teóricos genéticos de los mismos.

### **Estrategias de Evaluación**

Se pretende evaluar el desempeño del estudiante con la realización de pruebas cortas antes de la realización de cada práctica, el desarrollo de las técnicas durante cada sesión de laboratorio, cuaderno de protocolo, presentación de un informe final que abarque los procedimientos utilizados y resultados obtenidos, así como también se evaluará la presentación de un seminario sobre un artículo de investigación referente a la complementación heteróloga, en comparación con la homóloga.

### **Bibliografía**

- Beckwith. J. & D. Zipser. (Eds.). The lactose operon. Cold Spring Harbor laboratory. 1970.
- Bukhari A. Shapiro J. & Adhya S. DNA inserion elements. plasmids and episomes. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York, 1977.
- Davis. R., D. Botstein & J. Roth. (Eds.) Advanced Bacterial Genetic. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1980.
- Freifelder. D. Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular. Ed. Reverte. S.A., 1979.

- Grinsted J. & Bennett P. (Eds.) *Methods in Microbiology: Plasmid Technology*, Academic Press. Vol. 21, 19 2da. Ed., 1988.
- Lewin B. *Gene Expressions*. Jhon Wiley & Sons, London, 2da. Ed., 1985.
- Lewin B. *Gene Expressions: Bacterial genomes*. Jhon Wiley & Sons, London, Vol. 1, 1975.
- Lewin B. *Gene Expressions-3: Plasmids & Phages*. Jhon Wiley & Sons, London, Vol. 3, 1977.
- Lewin B. *Genes IV*. Cell Press. Mass. Oxford University Press. Walton Street, Oxford OX2 6DP. 1990.
- Lewin B. *Genes*. Editorial Reverté. S.A. (versión española de *Genes*, 3ra. Ed.), 1991.
- Methods in Enzymology*, vol. 204, 1991.
- Miller J. *A Short course in Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.
- Miller, J.H. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1972.
- Sambrook J., Fritsch & T. Maniatis. *Molecular cloning, A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 2da. Ed.
- Serrano J. y García J: *Manual de Genética Molecular*. Ed. Síntesis, 1990.
- Pascual A., M. R. *Microbiología Alimentaria*, Ediciones Díaz de Santos, España, 1992
- Perez Gavilan, E. *Bioquímica y Microbiología de la leche*. Editorial Limusa, México, 1984
- Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. (ED.). *Lactic Acidic Bacteria . Microbiological and Functional Aspects*. (3º ed.) Marcel Dekker, Inc (New York, USA). 2004.