

## Módulo 1

### Amplificación de un fragmento de ADN genómico por PCR

En este primer módulo se amplificará por PCR, mediante el uso de oligonucleótidos específicos, un fragmento de ADN genómico de *Aspergillus nidulans* correspondiente a la región amino terminal de la proteína reguladora PrnA.

El primer día se cuantificará por medidas espectrofotométricas el ADN extraído por los docentes según el protocolo que figura al final del módulo y se realizará la PCR. El segundo día se analizarán los productos amplificados por migración en gel de agarosa.

Cada uno de tres grupos trabajará con ADN de uno de los mutantes que se mencionan en la Introducción; el cuarto grupo trabajará con ADN proveniente de una cepa silvestre (es decir que no porta mutaciones en el gen PrnA).

#### Día 1:

##### A) Cuantificación de ADN genómico

1. Cada grupo recibe una muestra de ADN genómico de *Aspergillus nidulans* extraído por los docentes según el protocolo descrito en el **Anexo 1**.
2. Se mide absorbancia a 260 y 280 nm y se calcula la concentración de ADN.

**NOTA:** Sobre estos mismos ADNs se llevarán a cabo el Southern blot del módulo 3, para lo cual en la 5º clase del módulo 2 se digerirá con enzimas de restricción. **¡¡GUARDARLOS CUIDADOSAMENTE!!**

##### B) Amplificación por PCR de un fragmento de ADN

1. Se diluye el ADN que se acaba de analizar a una concentración final de 50 ng/ $\mu$ l
2. En un tubo de microcentrífuga de 0.25 ml se agrega sucesivamente en hielo:

H <sub>2</sub> O	csp	25 $\mu$ l
Buffer 10x		2,5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 2,5 mM		1.5 $\mu$ l
dNTPs 2,5 mM		2,5 $\mu$ l
oligo1 (10pmoles/ $\mu$ l)		2,5 $\mu$ l
oligo2 (10pmoles/ $\mu$ l)		2,5 $\mu$ l
ADN en cantidades variables		50 a 200 ng
Taq ADNpolimerasa (1U/ $\mu$ l)		0,5 $\mu$ l

3. En forma análoga se preparan mezclas de amplificación control: a) sin ADN; b) sin oligonucleótidos; y c) control positivo

4. Se programa el termociclador para que la reacción ocurra en 30 ciclos de 94-58-72°C durante 30-30-45 segundos respectivamente.
5. Identifique en la Figura 2 de la Introducción la ubicación de los oligonucleótidos 1 y 2, y determine el tamaño del fragmento esperado en la amplificación.

## Día2:

### A) Análisis de los productos amplificados. Técnicas de secuenciación.

1. Se prepara un minigel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. Se funde la agarosa y se agrega, después de fundida, 5µl de una solución de bromuro de etidio 10 mg/ml, cada 100ml de agarosa. **Atención: el bromuro de etidio es un fuerte mutágeno y debe ser manejado con guantes!** Verter el gel y dejar solidificar.
2. Se agrega buffer de carga a 5 µl de las reacciones de PCR y los controles. Se siembra junto con un marcador de peso molecular adecuado. También se sembrará al lado una alícuota del ADN genómico de que se partió. Se estimará el volumen a cargar a partir de la concentración determinada en la clase anterior. ¡No olvide anotar el orden de carga!
3. Se deja migrar en buffer TAE 1X, a aproximadamente 8V/cm, hasta unos 2/3 del gel.
4. Se detiene la corrida y se visualiza bajo transiluminador de luz UV.
5. Se recorta la banda obtenida por PCR del gel de agarosa que contiene el producto amplificado.
6. Se coloca en un tubo de microcentrífuga de 0,5 ml previamente agujereado en el fondo y en el que se ha colocado lana de vidrio.
7. Se coloca el tubo de 0,5 ml en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se centrifuga a 12000 rpm durante 10 minutos. Se guarda el eluido.

### B) Técnicas de secuenciación

Fundamento teórico de las técnicas de secuenciación por el método de Sanger. Secuenciación automática (Anexo 4). CD demostrativo del funcionamiento del secuenciador automático de Fac. de Ciencias.

1. Lectura de placas autoradiográficas de secuenciación manual.
2. Resultados obtenidos en el servicio de Secuenciación Automática de la Facultad de Ciencias.

**ANEXO 1: Protocolo de extracción de ADN genómico de *A.nidulans*.**

1. El micelio obtenido a partir de un cultivo líquido de *A. nidulans* se recoge por filtración, se congela con nitrógeno líquido y se muele con mortero. 200 mg de l polvo resultante se resuspenen en 800  $\mu$ l de solución de extracción (0.2 M Tris.HCl pH 7.5; 1% SDS; 1 mM EDTA). Se incuba .15 minutos a temperatura ambiente.
2. Se extraen restos celulares y proteínas mediante una extracción con un volumen igual de fenol:cloroformo y una con cloroformo:alcohol isoamílico (25:1). En cada paso, la fase superior (acuosa) se transfiere a un tubo limpio.
3. El ADN contenido en la fase acuosa final se precipita mediante el agregado de 75  $\mu$ l de acetato de sodio 0.3 M pH 5.2 y dos volúmenes de alcohol absoluto, agregado lentamente. Se forma una madeja de ADN que se recoge con varilla de vidrio o se centrifuga, recuperando el pellet.
4. El ADN se lava dos veces con etanol 70° y se seca al aire.
5. Se agrega al ADN un volumen máximo de 0,5 ml de agua y se deja resuspendiendo a 4°C, de ser posible con un lento movimiento de rotación.

**ANEXO 2: Reactivos****Electroforesis de ADN****-TAE 1x****Solución 50X -:**

Tris base	242g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5M, pH 8.0	100 ml
Agua	c.s.p. 1litro

<b>-Buffer de carga:</b>	Glicerol	30%
	Azul de Bromofenol	0,25%
	Azul de Xilencianol	0,25%

**-Bromuro de etidio** 10mg/ml

**-Marcador de Peso Molecular**

**-Agarosa**

**PCR**

<b>-Buffer de reacción 10x :</b>	Tris.HCl	100mM pH 8,3
	KCl	500 mM
	MgCl <sub>2</sub>	15 mM

**-oligo1 PrnAS**

5´ CTTGATCCCTGCTGCAACTC 3´ (50 pmoles/ µl)

**-oligo2 PrnAA**

5´ CGGTACGTAGTGCTGTAAGATC 3´ (50 pmoles/ µl)

**-dNTPs**

dATP, dCTP, dGTP, dTTP (c/u a 2.5 mM)

**-Taq polimerasa****-Agua destilada estéril****ANEXO 3: Secuenciación (método de Sanger)**

- Se desnaturalizó 1 µg de ADN del clon recombinante con NaOH (concentración final 0,2 M) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregó el oligonucleótido adecuado (KS, SK, T3 ó T7 a 50 ng/µl) y se precipitó con Acetato de Sodio 3 M pH 5,5 y Etanol Absoluto durante media hora a -70 C.
- Se resuspendió el ADN lavado en 12 µl de agua destilada estéril.
- Se hibridizó el ADN con el oligonucleótido (en exceso) en un buffer adecuado (Tris.HCl 40 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, NaCl 50 mM, DTT 5 mM).
- Se calentó a 37°C durante 20 minutos y se permitió que alcanzara temperatura ambiente.
- Se agregó 0,5 µl de [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP de 10 mCi/ml, 1 unidad de enzima (T7 Polimerasa) y 2 µl de mezcla de marcado (1,5 µM de c/u dCTP, dGTP, dTTP en Tris.HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM).
- Se incubó durante 5 minutos a 37 C y se trasvasó alícuotas de 3,5 µl a tubos que contenían 2,5 µl de las mezclas de terminación para cada una de las bases previamente termostalizadas a 37 C.

Mezclas de terminación:

**A:** dATP 80 µM, dCTP 80 µM, dGTP 80 µM, dTTP 80 µM,  
ddATP 8 µM, NaCl 50 mM en Tris.HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM

**C:** dATP 80 µM, dCTP 80 µM, dGTP 80 µM, dTTP 80 µM,  
ddCTP 8 µM, NaCl 50 mM en Tris.HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM;

**G:** dATP 80 µM, dCTP 80 µM, dGTP 80 µM, dTTP 80 µM,  
ddGTP 8 µM, NaCl 50 mM en Tris.HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM;

**T:** dATP 80 µM, dCTP 80 µM, dGTP 80 µM, dTTP 80 µM,  
ddTTP 8 M, NaCl 50 mM en Tris.HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM.

- Se permitió que la reacción continuara durante otros cinco minutos más a 37 C.
  - Se paró la reacción por agregado de 4 µl de solución de carga (Ficoll 400 20 %, EDTA 0,1 M, SDS 1,0 %, Azul de Bromofenol 0,25 %, Xilencianol 0,25 %).
  - Las muestras se calentaron a 75°C durante 2 minutos previo a su colocación en los geles desnaturizante de Poliacrilamida (Acrilamida-Bisacrilamida, 30:1.6, al 6 % en TBE Urea 7 M) usando espaciadores de 0.2 mm. Las corridas se realizaron en TBE (Tris 89 mM, Acido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM) a 40 W de potencia constante durante toda la corrida.
  - Se fijó el gel durante 10 minutos con una solución de Ácido Acético al 10 % y Metanol al 10 %.
  - Se transfirió a papel Whatmann 3 MM y se secó cubierto con rolopac a 80°C con vacío.
  - Se expuso con placa autoradiográfica (Konica AX) a temperatura ambiente.
- Se reveló y fijo con reactivos Ceníit.

