

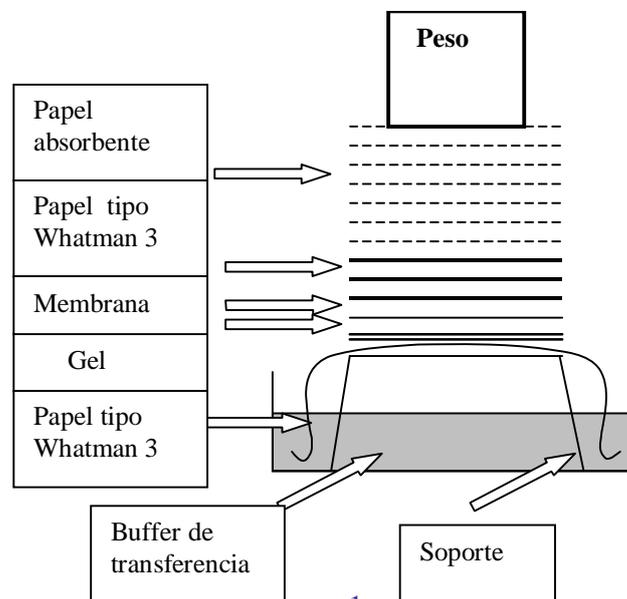
Módulo 3

Técnicas de Hibridación y Secuenciación de Ácidos Nucleicos

Con el fin de completar la caracterización de los mutantes de *prnA*, se llevará a cabo un Southern blot sobre ADN genómico de la cepa salvaje y de las tres cepas mutantes.

Día 1: Ensayo de Southern blot. Electroforesis y transferencia a membrana.

1. Discutir fundamentos teóricos de las técnicas de hibridación: marcado de sondas; condiciones de rigurosidad: temperatura; fuerza iónica; etc.
2. Se siembran en gel de agarosa al 1% los ADNs que han sido digeridos previamente por los docentes del práctico (20 uL + 4 uL buffer de carga). A modo de control, se sembrará asimismo ADN sin digerir, uno de los plásmidos con inserto obtenidos en los módulos anteriores digerido con *EcoRI* (cargar 1-2 uL) y un marcador de peso molecular adecuado.
3. Después de la electroforesis, se fotografía el gel incluyendo una regla. De esta forma se podrá luego determinar la distancia de migración de las bandas del marcador y determinar el tamaño de las bandas obtenidas luego del revelado. Durante este período, por acción de la radiación UV, los fragmentos grandes de ADN se romperán, lo cual facilitará la transferencia.
4. Introducir un corte en el gel que permita la posterior orientación.
5. Sumergir el gel por 30 minutos en solución de desnaturalización.
6. Enjuagar el gel rápidamente en agua destilada e incubar durante 30 minutos en solución de neutralización.
7. Mientras tanto montar dos dispositivos para la transferencia de la manera indicada en la figura. Para cada uno:
8. Cortar papel de filtro tipo Whatman 3 MM del tamaño del gel (por triplicado) y humedecer en buffer de transferencia.
9. Cortar papel de filtro tipo Whatman 3 MM del tamaño adecuado para permitir que el buffer de transferencia llegue al gel. Colocarlo sobre el soporte en la bandeja de transferencia permitiendo que los bordes queden sumergidos en el buffer de



transferencia. **Cuidado el buffer de transferencia no debe alcanzar el nivel del soporte.**

10. Cuando el papel de filtro que se encuentra sobre el soporte está completamente húmedo, elimine las burbujas de aire ayudado por una varilla.
11. Cortar la membrana de transferencia de un tamaño 1 mm mayor que el gel en ambas dimensiones. **Use guantes.** Efectuar la misma marca que en el punto 4. Humedecer la membrana en el buffer de transferencia.
12. Sacar el gel de la solución de neutralización. Invertirlo y colocarlo sobre el papel húmedo sobre el soporte. **Asegúrese de que no quedan burbujas de aire.** Colocar Parafilm (o Rolopac) alrededor del gel.
13. Coloque la membrana húmeda sobre el gel. **Asegúrese de que no quedan burbujas de aire.**
14. Colocar los papeles Whatmann humedecidos, y una pila de papel absorbente del tamaño del gel. Sobre esta pila colocar una placa y sobre ésta un peso de 500g.
15. Dejar que la transferencia proceda por lo menos durante 8 horas. Al cabo de ese tiempo, remover el papel absorbente y los de filtro por encima de la membrana. Marcar con lápiz las posiciones de los pocillos. Usando pinzas sin dientes quitar la membrana y dejar sobre papel tipo Whatman 3 MM seco por algunos minutos. Fijar el ADN a la membrana por horneado a 80°C durante dos horas, o 120 grados 15 minutos (según las instrucciones del fabricante de la membrana). Este paso será llevado a cabo por los ayudantes de práctico, que "scannearán" las membranas boca abajo sobre el transiluminador, de modo de verificar la calidad de la transferencia. Las membranas con el ADN fijado se guardan a temperatura ambiente entre papeles Whatman.

Día 2: : Marcado no radiactivo de la sonda y técnicas de hibridación

La sonda a emplear será un fragmento *BamHI* proveniente de un plásmido que contiene el gen *prnA* salvaje en su totalidad; este fragmento solapa con una porción del promotor del gen *prnA* y parcialmente con la región que amplificamos por PCR.

Para el marcado de la sonda se usarán guantes limpios, y se tendrá extremo cuidado de no contaminar los reactivos del kit.

16. Desnaturalizar 50 ng de ADN por calentamiento en baño de agua hirviendo por 5 minutos. Colocar inmediatamente en hielo por 5 minutos.
17. Agregar al tubo en hielo
 - 2 µl de la mezcla de hexanucleótidos
 - 2 µl de la mezcla de dNTPs
 - agua hasta 19 µl
 - 1 µl de enzima klenow.

Mezclar bien luego de cada adición, y centrifugar unos segundos al final para colectar el contenido en el fondo del tubo.

18. Incubar a 37° C durante 60 minutos. Agregar 2 µl de EDTA 0.2 M pH 8. Precipitar el ADN marcado con 2.5 µl de LiCl y 75 µl de etanol absoluto frío. Dejar precipitando 30 minutos en freezer de -80 grados.

19. Fundamentos de prehibridización, hibridización, lavados, exposición y revelado en esta técnica (explicativo).
20. Prehibridizar las membranas por dos horas a 55 grados en botella de hibridización, con *Hybridization buffer* en una concentración de 0,2 ml por cm² de membrana (demostrativo).
21. Agregar sonda marcada **desnaturalizada previamente**, a una concentración de 10 ng/ml. Tener cuidado de no verter la sonda directamente sobre la membrana. Dejar la transferencia ocurrir durante 14 horas a 55 grados (demostrativo). Este paso no se llevará a cabo durante el práctico. Las ayudantes de práctico prehibridizarán e hibridizarán la segunda de las membranas transferidas por cada grupo con la sonda correspondiente la víspera del Día 3 ya que las membranas una vez hibridizadas no se pueden guardar, debiendo procederse a efectuar los lavados y revelado de inmediato.

Día 3: Lavados y detección por color.

22. Lavar 2 X 5 minutos en solución de lavado 1 a temperatura ambiente
23. Lavar 2 X 15 minutos en solución de lavado 2 a 55 °C. Los lavados se hacen en la botella de hibridización.
24. Eliminar el exceso de líquido y colocar, boca arriba, sobre un recipiente. No dejar secar.
25. Lavar el filtro brevemente en **buffer 1**
26. Incubar 30 minutos con **buffer 2**
27. Diluir el anticuerpo conjugado en **buffer 1** 1/3000.
28. Incubar el filtro por 30 minutos con la solución de Anticuerpo diluida.
29. Remover el Anticuerpo y lavar dos veces 15 minutos cada vez con **buffer 1**.
30. Incubar la membrana dos minutos con 20 ml de **buffer 3**.
31. Colocar la membrana mojada dentro de una bolsita de detección (símil bolsita de autoclave abierta en uno de sus lados).
32. Pipetear la solución de detección (por cada 10 ml 66 uL NBT y 33 uL BCIP, preparar 3 ml) sobre la membrana. Sellar sin dejar burbujas. Incubar 5 minutos en la oscuridad
33. Durante la espera del revelado, discutir sobre otros métodos de detección y marcado.
34. Discusión de los resultados obtenidos en el ensayo de Southern blot.
35. Fundamentos teóricos de otras técnicas de hibridización (Northern blot) y rastreo de bibliotecas.
36. Análisis de placas radiográficas correspondientes a técnicas de hibridización y rastreo.

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Solución de desnaturalización

NaCl 1,5 M
NaOH 0,5 N

Solución de neutralización

Tris.HCl pH 7,4 1,0M
NaCl 1,5 M

SSC 20x

NaCl 3M
Citrato de sodio 0,3M
Ajustar pH a 7,0 con HCl

Buffer de hibridización

5 X SSC, reactivo bloqueante a una concentración final 0.5 % w/v, N laurilsarcosina 0.1 % w/v, , SDS 0.02% w/v,

Buffer de lavado 1

2 x SSC/ SDS 0.1 %

Buffer de lavado 2

0.1 x SSC/ SDS 0.1 %

Buffer 1

100mM de TrisHCl ph 7.5, 150 mM de Na Cl

Buffer 2

0.5 % de reactivo de bloqueo en buffer 1

Buffer 3

100mM de TrisHCl ph 7.5, 100 mM de Na Cl, 50 mM de MgCl₂ pH 9.5

Buffer 4

10mM de TrisHCl , 1 mM de EDTA pH 8

Solución de color . Se prepara en el momento

45 µl de solución de NBT y 35 µl de solución de X- fosfato en 10 ml de buffer 3.