



MANUAL DE PRÁCTICAS DE INGENIERÍA GENÉTICA

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE GENÉTICA

Rafael Jiménez Medina
Francisco Javier Barrionuevo Jiménez
Francisco David Carmona López

Departamento de Genética, Universidad de Granada

ÍNDICE

Genotipado de ratones transgénicos	4
Subclonación de un fragmento de ADN	9
Cuantificación de expresión de un gen mediante RT-qPCR	12

PRÁCTICAS DE LABORATORIO

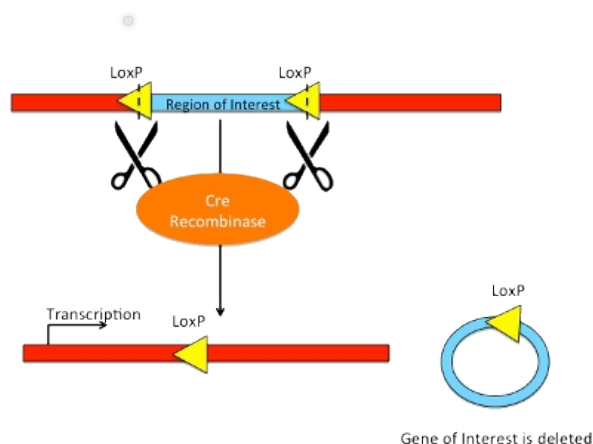
Genotipado de ratones mutantes condicionales

1. OBJETIVO

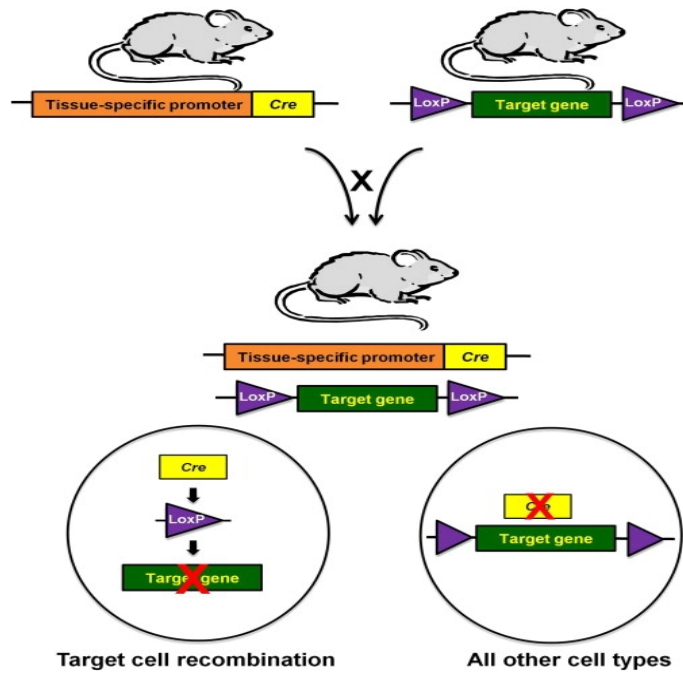
El objetivo que se persigue al realizar un genotipado de ratones mutantes condicionales es identificar qué ratones poseen en su genoma la mutación condicional y cuáles no, para poder así realizar posteriormente los cruces pertinentes que nos permitan obtener el genotipo deseado.

2. INTRODUCCIÓN

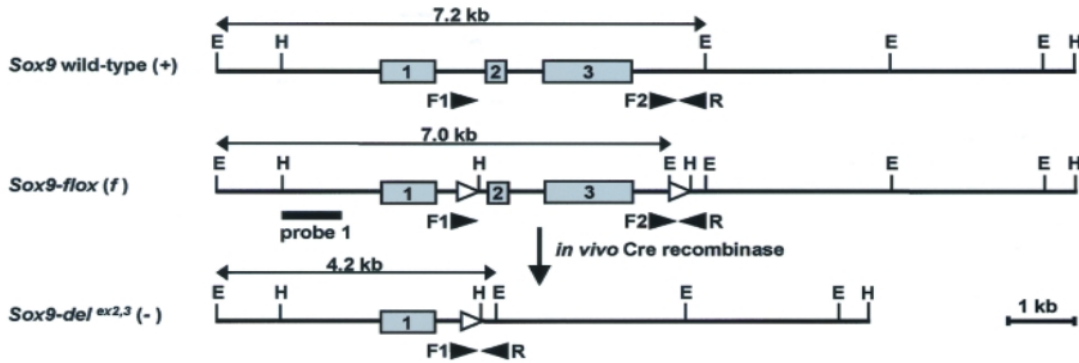
Una de las estrategias más usadas en Genética para estudiar la función de los genes es la de generar organismos en los que existe una pérdida de la función del gen. En organismos modelo como la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, el gusano, *Caenorhabditis elegans*, o el ratón, *Mus musculus*, las herramientas actuales de ingeniería genética nos permiten generar organismos mutantes con cierta facilidad. En ratón, tradicionalmente se ha usado la recombinación homóloga para eliminar el marco de lectura abierta, o una parte de él, de un gen concreto. Con esta tecnología se produce la pérdida de función del gen de interés en todo el organismo, lo que puede ser un problema para estudiar la función de un gen en determinados casos. Por ejemplo, cuando los genes son pleiotrópicos, es decir, cuando tienen funciones diferentes en tejidos diferentes. Así, si un organismo mutante para un gen pleiotrópico muere durante el desarrollo embrionario temprano, debido que es necesario para el correcto desarrollo de un órgano esencial, no se podría estudiar la función del gen en otros órganos que se desarrollasen en un momento posterior a su muerte, o la función que pudiera tener en el órgano adulto. Para solventar estas situaciones, hoy día existen diversas estrategias en ingeniería genética que nos permiten estudiar la función de un gen en un tejido concreto y en un momento determinado. Una de estas estrategias consiste en generar un ratón mutante condicional. Este sistema usa la recombinasa Cre del fago P1 que, cuando está presente en el núcleo celular, reconoce dos secuencias bien definidas y conocidas como LoxP y elimina el fragmento de ADN que hay entre ambas (ver figura).



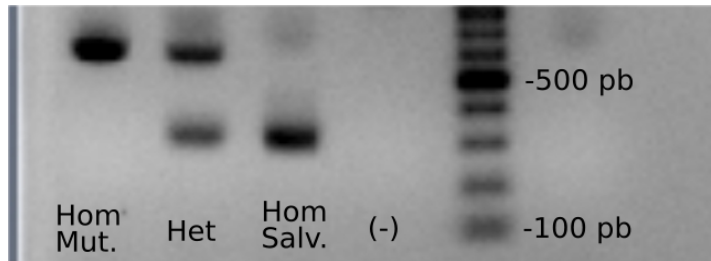
Teniendo en cuenta esto, podemos generar por un lado ratones en los que nuestro gen de interés, o parte de él, esté flanqueado por secuencias LoxP, lo que se conoce como mutante condicional y por otro lado ratones transgénicos en los que la expresión de la recombinasa Cre esté bajo el control de un promotor específico de tejido. Al cruzar ambos ratones eliminamos el gen solo en los tejidos donde se exprese la proteína Cre, es decir, en aquellos donde se expresaría el gen del que se ha obtenido el promotor, pero no se expresaría en el resto del cuerpo (ver figura).



Una vez generado un ratón mutante condicional, tenemos que distinguirlos de los ratones salvajes. Para ello se suelen emplear técnicas de genética molecular que nos permitan “genotipar” los ratones mutantes, es decir, distinguir qué ratones portan los alelos condicionales, y en caso positivo, si lo hacen en heterocigosis u homocigosis. En esta práctica vamos a genotipar ratones mutantes condicionales para el gen *Sox9* mediante el uso de la PCR. El gen *Sox9* posee tres exones y dos intrones (ver figura). Los ratones mutantes condicionales para *Sox9* que vamos a usar tienen flanqueados el segundo y el tercer exón por dos sitios LoxP (triángulos blancos). Para distinguir los ratones mutantes de los salvajes, se han diseñado dos primers, F2 y R, que están flanqueando el segundo sitio LoxP. El ratón salvaje no tiene sitio LoxP, por lo tanto, el tamaño de la banda amplificada en los ratones salvajes será menor que en los ratones mutantes.



Esto nos permitirá saber si un ratón es homocigoto para el alelo mutante condicional (una banda de mayor tamaño), heterocigoto (dos bandas) u homocigoto salvaje (una banda de menor tamaño; ver figura).



3. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo el genotipado vamos a seguir los siguientes pasos:

Extracción de ADN a partir de colas de ratón

Para el genotipado, se le proporcionará a alumno un tubo eppendorf conteniendo un trozo de cola de ratón, y seguiremos el siguiente protocolo:

- En un tubo Eppendorf, añadir 100 µl tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl 1% SDS, Proteínasa K 0.5 mg/ml)
- Incubar a 55 °C en un “termomixer” con agitación hasta el día siguiente
- Centrifugar y pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo
- Añadir un volumen de isopropanol (100 ul aproximadamente) y mezclar por inversión 10 veces
- Centrifugar a 12.000 rpm durante 10 min.
- Descartar el sobrenadante y añadir 300 µl de 70% EtOH.
- Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 min.
- Descartar el sobrenadante y dejar secar el tubo Eppendorf abierto e invertido durante 10 min
- Añadir 50µl de H₂O estéril y calentar en el termomixer durante 5 min.
- Medir la concentración de ADN en el espectrofotómetro.

PCR de genotipado

En un tubo de PCR se añadirán los siguientes reactivos:

- 5.5 μ l H₂O
- 1,0 μ l ADN (50 ng)
- 1,0 μ l Tampón de reacción 10x
- 1,0 μ l Primer F2 (5 μ M)
- 1,0 μ l Primer R (5 μ M)
- 0.5 μ l Taq-Polimerasa

Se colocarán los tubos en el termociclador con el siguiente programa:

- 94 °C 1 min
- 94 °C 30 seg
- 57 °C 30 seg
- 72 °C 30 seg
- 40 ciclos
- 72 °C 3 min

Observación de los resultados

Tras la PCR, añadiremos 2 μ l de tampón de carga a cada uno de los tubos de reacción y cargaremos 10 μ l en un pocillo de un gel de agarosa. Se aplicará un voltaje de 100 voltios y transcurrido el tiempo necesario observaremos los resultados en un transiluminador.

4. CUESTIONES

- 1.- ¿Qué es un ratón mutante condicional?
- 2.- ¿Cómo podemos generar ratón un mutante para un gen que sea específico de tejido?
- 3.- Cuando genotipamos ratones mutantes condicionales para *Sox9* mediante PCR, ¿por qué los individuos heterocigóticos muestran 2 bandas?
- 4.- Imagine el porqué de usar un trocito de la cola del ratón para genotiparlo.

Subclonación de un fragmento de ADN

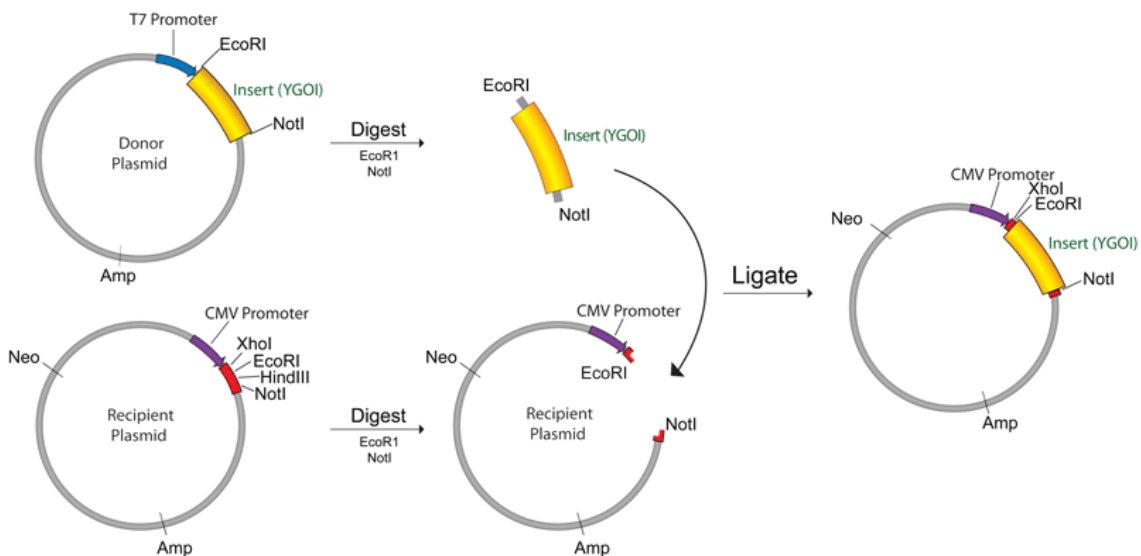
1. OBJETIVO

El objetivo que se persigue al realizar una subclonación es pasar un fragmento de ADN, previamente insertado en un vector de clonación, a otro distinto que contenga herramientas moleculares distintas del primero.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

La clonación de fragmentos de ADN, que constituyó uno de los primeros hitos de la Ingeniería Genética, fue posible gracias a la utilización de los enzimas de restricción, que permiten cortar el ADN en puntos definidos en los que encuentran las dianas específicas de dichos enzimas. Así, dos fragmentos de ADN de distinto origen pueden ser fácilmente unidos entre sí siempre que hayan sido cortados con el mismo enzima de restricción. De esta forma, si una de esos fragmentos es un vector de clonación (un plásmido, por ejemplo) y el otro es el que deseamos clonar, podremos insertar este último en el vector. Ya sólo tendríamos que transformar bacterias competentes con esta molécula recombinante para llevar a cabo la clonación.

Una vez clonado un fragmento de ADN, nos puede interesar traspasarlo a otro vector distinto que permita, por ejemplo, clonarlo en otro microorganismo o transcribir cualquiera de las dos hebras del inserto (vector de expresión). En esos casos se realiza un proceso de subclonación, que es el objeto de esta práctica (ver figura).



Se denomina vector donante al que contiene originalmente el inserto y vector receptor al que lo contendrá una vez realizada la subclonación. Tal como se observa en la figura, en este ejemplo se utilizaron los enzimas EcoRI y NotI para insertar el fragmento de ADN en el sitio de multiclonación (MCS) del vector donante. Por tanto, podemos utilizar esos mismos enzimas para escindirlo de nuevo, realizando una digestión doble. Terminada la digestión, el fragmento clonado y el inserto pueden ser separados mediante electroforesis y podemos purificar el ADN de este último recortando el taquito de gel que contiene la banda correspondiente y sometiendo a un proceso de extracción de ADN específico. Una vez purificado el inserto, podemos mezclarlo con el vector receptor previamente digerido también con EcoRI y NotI. Los extremos cohesivos propocionados por el corte de estos enzimas nos permitirán

insertar el fragmento de nuevo en la orientación deseada en el vector receptor. A continuación utilizaríamos ligasa para unir covalentemente los extremos de las hebras de ADN de vector e inserto. Ya sólo nos quedaría transformar bacterias competentes con este nuevo vector recombinante, con lo que habremos concluido el proceso de subclonación.

3. METODOLOGÍA

Digestión del plásmido donante recombinante

En un microtubo Eppendorf, añadir los siguientes reactivos en el orden indicado para conseguir un volumen de reacción final de 10µl:

- Agua estéril 7,6 µl
- ADN plasmídico recomb. 1,0 µl (a una concentración de 1µg/µl)
- Enzima EcoRI HF 0,2 µl
- Enzima NotI HF 0,2 µl
- Buffer de restricción 1,0 µl

A continuación, se colocan los microtubos en un termomixer y se incuban a 37 °C durante unos 15-20 min. Los modernos enzimas High Fidelity (HF) permiten tiempos de incubación muy inferiores a los tradicionales sin pérdida en su eficiencia de corte. Pasar las muestras brevemente por el frigorífico para que se enfríen antes de realizar la electroforesis.

Electroforesis

En un gel de agarosa al 1,5% y con cuidado de no romper los pocillos, cargar las diferentes digestiones correspondientes a cada uno de los grupos de trabajo. Para ello, añadir 5 µl de tampón de carga a los tubos en los que se realizó la digestión y, una vez mezclado con el ADN, con la ayuda de una micropipeta, cargar la mezcla en un pocillo del gel (una muestra por pocillo). Cargar en otro pocillo 4 µl de la mezcla ya preparada de marcador de peso molecular, que nos servirá de referencia para determinar el tamaño de los fragmentos del vector y del inserto. Conectar la fuente de alimentación al gel durante 30 minutos a 50V. Analizar los resultados mediante la observación en un transiluminador.

Extracción del ADN de la banda correspondiente al inserto

Una vez terminada la electroforesis e identificada en el transiluminador la banda correspondiente al inserto, procederemos a purificar el ADN de la misma realizando el siguiente protocolo:

- En el transiluminador y utilizando un escalpelo, recortamos un pequeño taco de gel que contenga exactamente la banda (no incluir un exceso de gel de agarosa), con cuidado de no dañar el filtro del transiluminador.
- Retiraremos al taquito de gel con la banda del inserto y lo colocaremos en un tubo Eppendorf con el que previamente habremos tarado una balanza de precisión.
- Pesamos el tubo con el gel para calcular su volumen (el número de microlitros será aproximadamente igual al de miligramos de gel).
- Añadimos un volumen de tampón QG igual al triple del volumen de gel calculado.
- Incubar a 50 °C durante 10 min. O hasta que el gel se haya disuelto por

completo. Mezclar en el vortex cada 2-3 min. para ayudar a la disolución del gel)

- Una vez disuelto el gel, comprobar que el color de la solución continúa siendo amarillo, lo que indica que el pH permanece por debajo de 7,5 (a pH superior el ADN no se adherirá a la membrada sílicea de la columna que utilizaremos en el paso siguiente). Si la solución se ha tornado naranja o violeta, añadir 10µl de solución 3M de acetato sódico a pH=5.
- Añadir un volumen de isopropanol igual al volumen del gel y mezclar invirtiendo el tubo varias veces.
- Pasar la solución a una columna QG con filtro síliceo colocada sobre un tubo de recogida de 2ml y centrifugarla durante 1 min. A 10.000 rpm. o más.
- Descartar el líquido que ha pasado al tubo inferior y poner la columna de nuevo en él.
- Añadir 500µl de tampón QG y volver a centrifugar como antes.
- Descartar el líquido que ha pasado al tubo inferior y poner la columna de nuevo en él.
- Para lavar, añadir 750µl de tampón PE y volver a centrifugar de igual forma.
- Descartar el líquido que ha pasado al tubo inferior y poner la columna de nuevo en él.
- Volver a centrifugar en seco y de igual manera.
- Colocar la columna en un tubo Eppendorf nuevo y añadir 10µl de agua estéril para eluir el ADN.
- Centrifugar de nuevo. La solución de ADN estará contenida en el tubo inferior.

Esta solución de ADN del inserto así obtenida se puede utilizar para ser insertada de nuevo en el vector receptor de nuestra elección, utilizando el procedimiento seguido en la práctica de clonado realizada el curso anterior en la asignatura de Genética.

4. CUESTIONES

1.- Indique un ejemplo en el que puede interesarnos llevar a cabo la subclonación de un fragmento de ADN.

2.- Para realizar la subclonación, ¿es absolutamente imprescindible usar exactamente los dos enzimas de restricción utilizados en la clonación original?

3.- ¿En qué casos se puede incubar la reacción de digestión durante un tiempo corto? (15 min. por ejemplo)

4.- Durante el protocolo de extracción del ADN de la banda correspondiente al inserto, ¿cómo podemos saber que el tampón QG no ha variado su pH?

Cuantificación de la expresión de un gen mediante RT-qPCR

1. OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es analizar los niveles de expresión de genes que intervienen en el desarrollo de gónadas de ratones neonatos en los que el gen *Sox9* se ha inactivado condicionalmente en las células de Sertoli embrionarias usando las líneas de ratones *Amh-Cre* y *Sox9^{flox/flox}*.

2. INTRODUCCIÓN

SOX9 es un factor de transcripción involucrado en el control de rutas genéticas durante el desarrollo embrionario de multitud de órganos, entre los que se incluye el desarrollo testicular. En mamíferos, cuando este gen está mutado antes del momento de la determinación sexual se produce reversión sexual XY. En cambio, si *Sox9* es mutado condicionalmente después de la determinación sexual en las células de Sertoli recién diferenciadas, el desarrollo testicular es normal y los ratones son inicialmente fértiles. Esto último se consigue cruzando un ratón en el que la proteína CRE está expresada bajo el control del promotor de un gen que se expresa en células de Sertoli embrionarias, el gen de la hormona anti-mulleriana (ratón *Amh-Cre*), con el ratón *Sox9^{flox/flox}*, descrito anteriormente, en la práctica de genotipado de ratones mutantes condicionales. Aunque los ratones *Amh-Cre;Sox9^{flox/flox}* son inicialmente fértiles, a los 5 meses de edad muestran problemas en la espermatogénesis, indicando que pueden haber anomalías a nivel genético. Teniendo en cuenta esto, en esta práctica pretendemos estudiar los niveles de expresión de un gen implicado en el desarrollo testicular, el gen *Sf1* en gónadas de ratones neonatos, tanto controles como mutantes *Amh-Cre;Sox9^{flox/flox}*.

Para ello, vamos a usar la técnica de la RT-qPCR, que, entre otras utilidades, permite medir los niveles de transcritos para un gen determinado entre dos condiciones. Para realizar esta técnica hay que seguir los siguientes pasos: a) extracción de ARN total a partir del órgano indicado (gónada, en este caso), b) retrotranscripción (o transcripción inversa) del ARN para generar ADN complementario (o ADNc), y c) PCR cuantitativa (qPCR, o PCR en tiempo real), en la que en cada pocillo y en cada ciclo de la reacción se genera una cantidad de fluorescencia que es directamente proporcional a la cantidad de ADN sintetizado. La intensidad de fluorescencia es medida por una cámara CCD incorporada al termociclador, lo que nos permite saber al final de la reacción la cantidad relativa ADN sintetizado en cada momento. Estas cantidades serán proporcionales a los niveles de transcritos presentes en el tejido de partida, lo que nos permite calcular los niveles relativos de expresión entre dos condiciones.

3. METODOLOGÍA

Día 1: *Extracción del RNA y retro-transcripción*

Extracción de RNA:

Los grupos 1, 2 y 3 realizarán la práctica con muestras de ratones salvajes.
Los grupos 4, 5 y 6 realizarán la práctica con muestras de ratones mutantes.

- Añadir 350 μ l de buffer lisis y homogeneizar en el molino de bolas.
- Centrifugar y pasar el sobrenadante a un eppendorf limpio.
- Añadir 350 μ l de EtOH 70% y mezclar por inversión.
- Transferir a una columna.
- Centrifugar 1 min a max. velocidad.
- Digestión del ADN: añadir 80 μ l de solución de DNasa I, 10 min a temperatura ambiente.
- Añadir 700 μ l de buffer RW1, centrifugar 1 min max. velocidad, desechar sobrenadante.
- Añadir 500 μ l de buffer RPE, centrifugar 1 min max. velocidad, desechar sobrenadante.
- De nuevo, añadir 500 μ l de buffer RPE, centrifugar 2 min max. velocidad, desechar sobrenadante.
- Colocar la columna en un eppendorf limpio. Añadir 30 μ l de agua RNase free, esperar 4 min, centrifugar 2 min a max. velocidad.

Retrotranscripción:

- Preparar en un tubo de 0.2 ml:

RNA (400 ng)	4 μ l
Agua DEPC	5 μ l
10 mM dNTP mix	2 μ l
Oligo (dT)	1 μ l
Total	12 μ l

- Desnaturalizar el ARN: incubar a 65 °C, 5 min y poner en hielo. Dar un spin.
- Añadir los siguientes reactivos al tubo:

5x cDNA buffer de	4 μ l
0.1M DTT	2 μ l
RNAse inhibitor (rRNasin)	1 μ l
Transcriptasa inversa	1 μ l

- Incubar a 42 °C, 50 min.

Día 2: PCR cuantitativa**Preparación de las reacciones:**

Usaremos Sensimix (Bioline), que contiene ADN polimerasa, nucleótidos y SyBR-green. Las cantidades para una reacción individual (tanto de la curva estándar como de las muestras problema) son las siguientes:

Sensimix	10 μ l
Primers (5 μ M)	1 μ l
cDNA	8 μ l
H ₂ O	1 μ l

Preparación de la curvas estándares:

Hay que preparar 2 curvas estándares. Una para el gen "housekeeping", gliceraldehído-3-fosfato deshidro- genasa (*Gapdh*), y otra para el gen de interés, *Sf1*. Para la realización de la curva estándar se harán las siguientes diluciones seriadas:

1/10	5 μ l cDNA salvaje + 5 μ l cDNA mutante + 90 μ l H ₂ O
1/40	20 μ l dilución 1/10 + 60 μ l H ₂ O
1/160	20 μ l dilución 1/40 + 60 μ l H ₂ O
1/480	20 μ l dilución 1/160 + 40 μ l H ₂ O

Las reacciones se harán por duplicado.

Se harán 2 "mastermixs", una para el gen *Sf1* y otra para el gen *Gapdh*. Las "mastermixs" se harán para 10 reacciones cada una (2 más de las necesarias para que no falte).

Para ello pondremos:

Sensimix	100 μ l
Primers (5 μ M)	10 μ l
H ₂ O	10 μ l

En cada tubo pondremos:

- 8 μ l de ADN de la dilución correspondiente.
- 12 μ l de "mastermix".

Los grupos 1, 2 y 3 harán la curva estándar para el gen *Sf1*.

Los grupos 4, 5 y 6 harán la curva estándar para el gen *Gapdh*.

Preparación de las muestras problema:

Las muestras se harán por triplicado. Usaremos una dilución 1/40 (el segundo punto de la curva estándar). Para ello haremos la siguiente dilución:

5 μ l cDNA + 195 μ l H₂O.

Cada grupo tiene que hacer 3 reacciones para el gen *Sf1* y otras 3 reacciones para el gen *Gapdh*. Por lo tanto, hay que hacer una "mastermix" para cada uno de estos genes (prepararemos cada "mastermix" para 4 reacciones para que no falte).

Sensimix	40 μ l
Primers (5 μ M)	4 μ l
H ₂ O	4 μ l

En cada tubo pondremos:

- 8 μ l de ADN.
- 12 μ l de "mástermix"

Los tubos con las reacciones se introducirán en el termociclador Chromo4 de Bio-Rad, siguiendo la disposición detallada en el apéndice I. Programa:

- 94 °C 1 min
- 94 °C 30 seg
- 59 °C 30 seg
- 72 °C 30 seg
- Lectura de la fluorescencia
- 40 ciclos
- 72 °C 3 min
- 10 °C hasta sacar del termociclador

Día 3: *Fundamentos teóricos y análisis de datos*

- Principios de la RT-qPCR.
- El método de SyBR-green
- Curva estándar
- Curvas de melting
- Análisis estadístico de datos en para cuantificación relativa: El método $\Delta\Delta C_t$

Bibliografía: *Real-time PCR*. T. Dorak. 2006. Ed. Taylor & Francis Group.

Apéndice I. Colocación de las muestras en el termociclador

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	C SF [1]	C SF [2]	C SF [3]	M SF [4]	M SF [5]	M SF [6]			S GA (1/10)	S GA (1/10)
B	C SF [1]	C SF [2]	C SF [3]	M SF [4]	M SF [5]	M SF [6]			S GA (1/40)	S GA (1/40)
C	C SF [1]	C SF [2]	C SF [3]	M SF [4]	M SF [5]	M SF [6]			S GA (1/160)	S GA (1/160)
D	C GA [1]	C GA [2]	C GA [3]	M GA [4]	M GA [5]	M GA [6]			S GA (1/480)	S GA (1/480)
E	C GA [1]	C GA [2]	C GA [3]	M GA [4]	M GA [5]	M GA [6]			S SF (1/10)	S SF (1/10)
F	C GA [1]	C GA [2]	C GA [3]	M GA [4]	M GA [5]	M GA [6]			S SF (1/40)	S SF (1/40)
G									S SF (1/160)	S SF (1/160)
H									S SF (1/480)	S SF (1/480)

- C, control; M mutante; S, curva estándar.
- SF, *Sf1*; GA, *Gapdh*.
- Entre corchetes se indica el número del grupo.
- Entre paréntesis se indica la dilución de la muestra para la curva estándar.