

Out of the Blue Genotyping Extension

Referencia #12012607EDU

Guía del estudiante

Nota: Se permite la reproducción total o parcial de este documento solo para uso educativo y no comercial. El uso comercial de contenidos protegidos por derechos de autor, incluido el uso en materiales didácticos por los que se recibe un pago, requiere el permiso expreso de Bio-Rad™ Laboratories, Inc. Contáctenos en explorer@bio-rad.com para obtener más información.

Para obtener asistencia técnica, llame a su oficina local de Bio-Rad o, en los Estados Unidos llame al **1-800-4BIORAD** (1-800-424-6723) opción 2.

Este producto no es para autoadministración.

BIO-RAD

Parte 1

Explicación de los resultados de la actividad del laboratorio de edición del gen *lacZ* mediante CRISPR

En la actividad de Laboratorio de edición del gen *lacZ*, introdujiste componentes de un sistema de edición **génica mediante** CRISPR-Cas9 en bacterias. Observaste la formación de colonias bacterianas en las placas experimentales y utilizaste estas observaciones como evidencia de si se había producido la edición de genes o no.

Recupera tus placas y/o los resultados del Laboratorio de edición del gen *lacZ* mediante CRISPR.

1. Escribe un argumento de por qué las acciones que realizaste en los experimentos produjeron tus resultados experimentales. Proporciona evidencia experimental para justificar tu argumento. Asegúrate de incluir todos los reactivos, las placas y los aditivos de las placas, como el X-gal, en tu justificación.
2. Busca algún argumento alternativo:
 - a. Busca otro grupo en tu clase que haya presentado un argumento alternativo que difiera sustancialmente del tuyo Y que se consistente con tus observaciones.
 - b. Si no existen tales explicaciones en los otros grupos, utiliza tus conocimientos sobre la expresión genética y la biología celular de las bacterias para llegar a tu propio argumento alternativo el cual explique el motivo de tus resultados.
 - c. Explica tu argumento alternativo en detalle y asegúrate de exponer cómo es consistente con lo que observaste, incluso si éstas no respaldan totalmente tu argumento.
3. ¿Qué información adicional te ayudaría a determinar cuál de los argumentos propuestos es el más adecuado? Explica cómo la información adicional podría ayudarte a tomar una decisión.
4. Tus argumentos actuales se basan en el color de las colonias bacterianas, el cual es una medida indirecta de la edición genética. La medición indirecta involucra la medir u observar un resultado como una forma de medir algo más. El color de las colonias bacterianas proporciona información indirecta acerca del estado del gen *lacZ*. Tomando en cuenta estos factores, ¿por qué podría ser especialmente beneficioso usar una medición complementaria para respaldar tu argumento?

Parte 2

Extracción de ADN de colonias bacterianas y PCR

Después de un experimento de edición de genes, es muy importante confirmar que el ADN fue modificado según lo esperado. Aún cuando Cas9 corte el ADN en el lugar adecuado, es posible que los mecanismos de reparación introduzcan una secuencia inesperada. Técnicas como la PCR, que son altamente dependientes de la secuencia de ADN, pueden utilizarse para verificar el resultado.

PCR multiplex

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) estándar amplifica una secuencia de nucleótidos específica (esto se conoce como amplicón) utilizando un único conjunto de iniciadores o primers (normalmente un par). La PCR multiplex consiste en la amplificación simultánea de múltiples amplicones en una sola reacción usando un solo conjunto de iniciadores o primers para cada uno de ellos (Fig. 1). Al igual que con la PCR estándar, un conjunto de iniciadores está dirigido a una secuencia de ADN concreta. La ausencia de una secuencia de PCR definida como objetivo, o la interrupción de los sitios de unión de los iniciadores impedirán la amplificación de la secuencia PCR objetivo. Si se detecta un amplicón en una muestra, a menudo mediante la electroforesis en gel de agarosa, entonces la secuencia de ADN objetivo asociada estaba presente en la muestra.

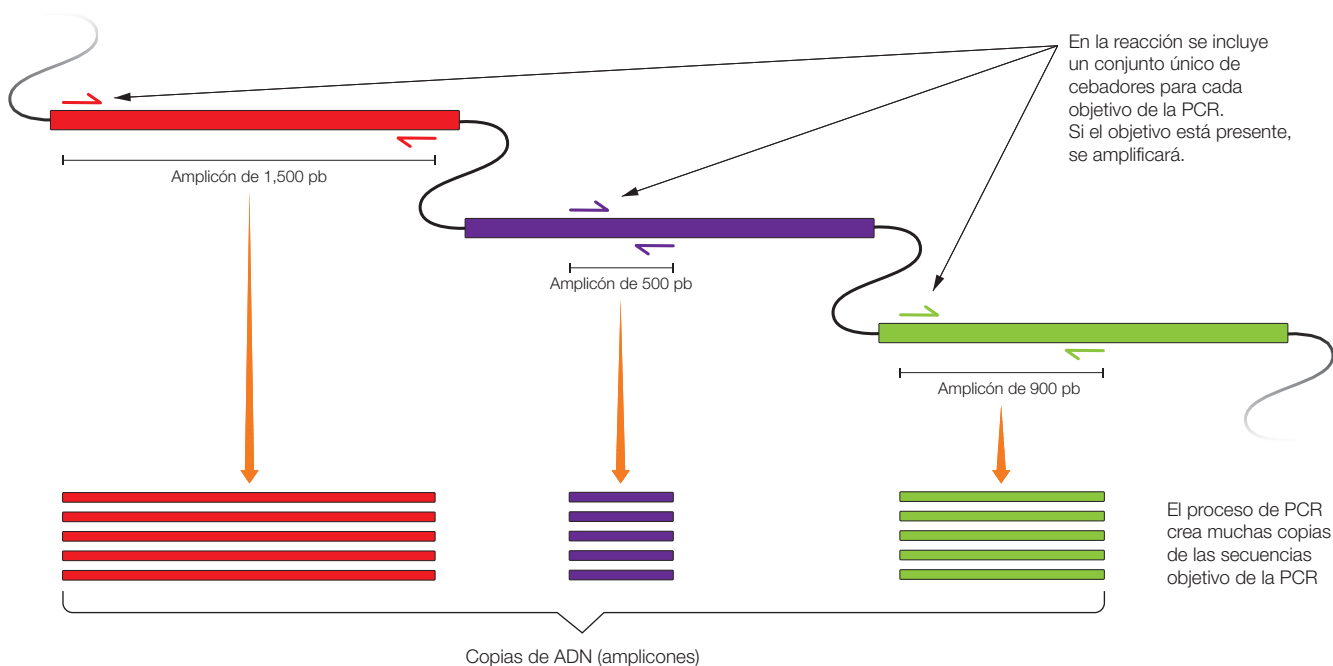


Fig. 1 Amplicones múltiples generados en una reacción de PCR multiplex. En este ejemplo, tres pares de iniciadores o primers, amplifican tres amplicones diferentes de 1500, 500 y 900 pb de longitud respectivamente.

Si no se diseñan cuidadosamente, los múltiples conjuntos de iniciadores de una muestra de PCR multiplex pueden interferir entre sí. Para garantizar el éxito, un experimento de PCR múltiple requiere una cuidadosa selección de los amplicones objetivo, del diseño de los cebadores y de los parámetros de ciclado. Esto implica un esfuerzo adicional. Sin embargo, la buena planeación se recompensa con la capacidad de analizar más de un objetivo en una sola muestra. En esta actividad, usarás la PCR multiplex para analizar varios objetivos de PCR aplicada a colonias bacterianas seleccionadas.

Uso de la PCR multiplex para detectar la edición genética

La actividad de edición del gen *lacZ* mediante CRISPR produjo un conjunto de placas con colonias bacterianas azules y/o blancas. El color de la colonia es un fenotipo visible que indica si el gen *lacZ* es funcional o no. En el experimento anterior utilizaste estas observaciones para sacar conclusiones sobre la edición de genes. La PCR multiplex puede utilizarse para confirmar dichas conclusiones a nivel del ADN. Después de hacer una rápida extracción de ADN de cada colonia, utilizarás la PCR multiplex para detectar la presencia de la inserción de la plantilla de ADN donante. La reacción de PCR múltiple incluye tres conjuntos de iniciadores o primers (Fig. 2):

- El primero, está diseñado para detectar el *lacZ* no modificado. Uno de los iniciadores o primers del conjunto se fijará directamente en el punto de corte del objetivo de Cas9. Si el punto de corte objetivo ha sido modificado, el primer no se unirá. Si el punto de corte del objetivo de Cas9 NO fue modificado, este conjunto de iniciadores producirá un amplicón de ~1,100 pb
- El segundo conjunto de iniciadores o primers, está diseñado para detectar el *lacZ* modificado. Uno de los iniciadores del conjunto se unirá al inserto de la plantilla de ADN donante. Si el punto de corte objetivo fue reparado con éxito utilizando la plantilla de ADN donante que se introdujo en la bacteria, este conjunto de iniciadores producirá un amplicón de ~650 pb
- El tercer conjunto de iniciadores, amplificará una región no relacionada, muy por debajo del gen *lacZ* como control para verificar que el ADN cromosómico esté presente en la muestra. Si el ADN cromosómico se extrajo con éxito y la PCR se realizó correctamente, ya sea que el *lacZ* se haya modificado o no, este conjunto de cebadores producirá un amplicón de ~350 pb

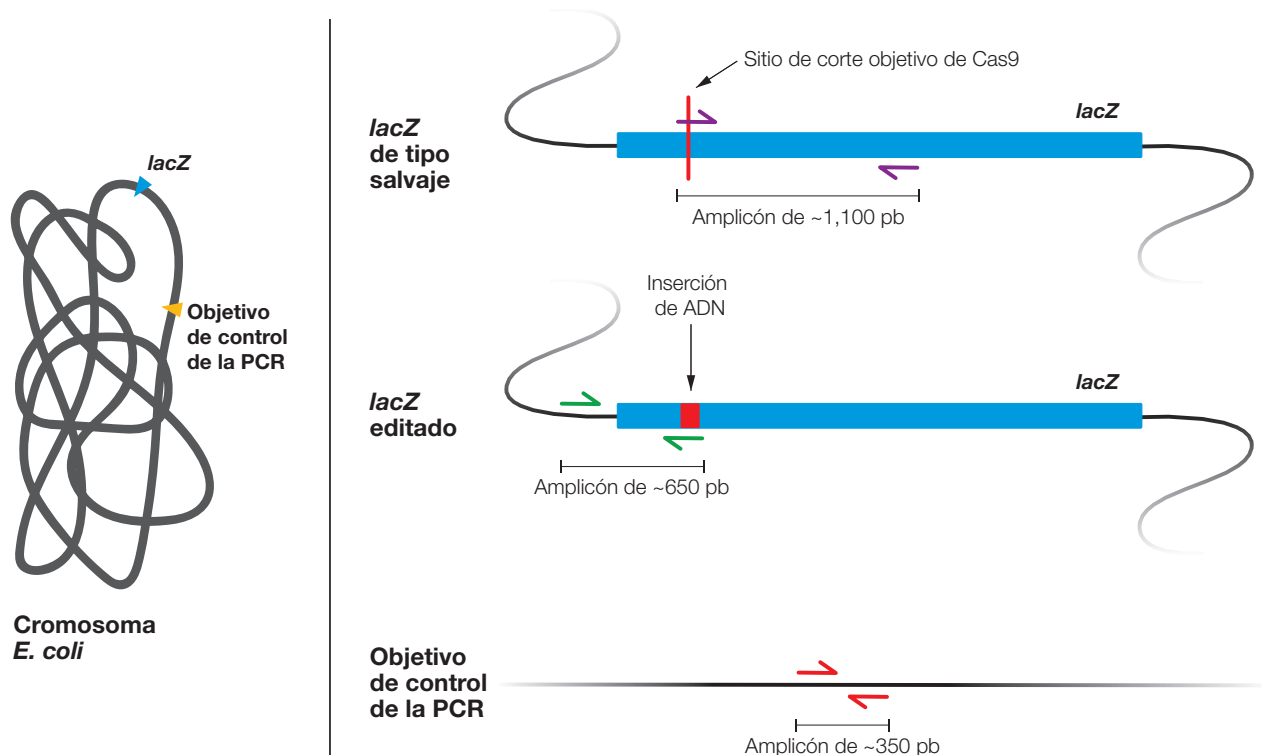


Fig. 2 Objetivos de la PCR multiplex.

Preguntas previas al laboratorio

Tabla 1. Resultados previstos de la PCR multiplex.

Placa de origen	Colonia bacteriana		Amplicones		
	Aspecto de la colonia	Estado del gen <i>lacZ</i>	1,100 bp	650 bp	350 bp
Placa IX/ARA (placa de inicio)					
Placa C					
Placa D					

Recupera tus análisis y respuestas de la actividad del Laboratorio de edición del gen *lacZ* mediante CRISPR para responder a las siguientes preguntas.

- A. En la Tabla 1, rellena los campos «aspecto de la colonia» y «estado del gen *lacZ*» con tus conclusiones actuales Acerca del gen *lacZ* en las bacterias de la placa de inicio **IX/ARA**, la placa **C**, y la placa **D** del Laboratorio de edición del gen *lacZ* mediante CRISPR. Si hubiera colonias con diferentes aspectos en la misma placa, inclúyelas todas en tu respuesta.
- B. En la Tabla 1, añade marcas de verificación para los amplicones que esperas que se generen en las muestras de PCR de cada placa de origen.
- C. Utilizando la Figura 2 como guía, explica por qué es poco probable que el amplicón de 1,100 pb y el de 650 pb se produzcan en una sola reacción en este experimento de PCR multiplex.
- D. Si solo se produjera un amplicón de 350 pb en una muestra en particular, ¿Cuál sería tu conclusión acerca del gen *lacZ* en esa muestra de ADN?
- E. Si en los resultados de una muestra particular no hubiera un amplicón de 350 bps, ¿cuál podría ser la explicación? ¿Qué información adicional podrías usar para confirmar tu explicación?

Protocolo

Estación de trabajo de los estudiantes

Materiales	Cantidad
Placa de inicio IX/ARA de la actividad de edición del gen <i>lacZ</i>	1
CRISPR	
Placa bacteriana C de la actividad de edición del gen <i>lacZ</i> mediante CRISPR	1
Placa bacteriana D de la actividad de edición del gen <i>lacZ</i> mediante CRISPR	1
InstaGene Matrix (IG)	1.3 ml
Mezcla maestra más primers (MMP)	80 µl
ADN de control positivo de la PCR (+), tiene todos los objetivos de la PCR	15 µl
Control negativo de PCR (-), agua destilada	15 µl
Tubo PCR, 0.2 ml	7
Tubo cónico de 1.5 ml, tapón de rosca con junta tórica	5
Micropipeta y puntas de volumen ajustable de 2-20 µl	1
Micropipeta y puntas de volumen ajustable de 100-1,000 µl	1
Gradilla para tubos PCR (recomendada)	1
Gradilla para microtubos	1
Agitador vórtex (recomendado)	1
Marcador permanente	1

Estación de trabajo común

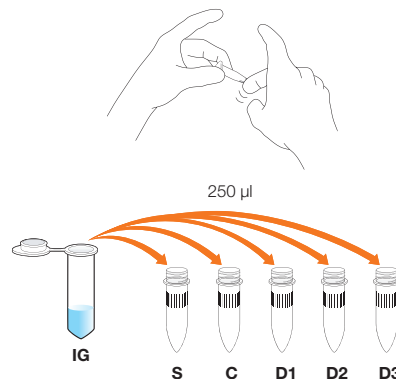
Materiales	Cantidad
Termociclador con al menos 56 pocillos	1
Baño seco o baño de agua ajustado a 56 °C	1-2
Baño seco o baño de agua ajustado a 95 °C	1-2
Centrífuga de microtubos	1-2
Adaptador de tubo PCR para centrífuga (recomendado)	1-2
Gradilla para tubos flotantes (si se utiliza el baño de agua)	8

Extraer el ADN genómico de la bacteria

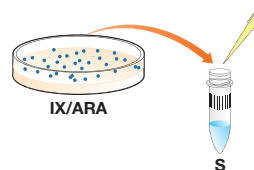
1. **Etiqueta cinco tubos con tapón de rosca S (para la placa de inicio), C, D1, D2, y D3. Añade tus iniciales a cada uno.**



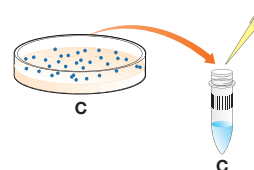
2. **Mueve la InstaGene Matrix (IG) para volver a suspender de forma uniforme las gotas y, a continuación, añade 250 µl a cada tubo.**



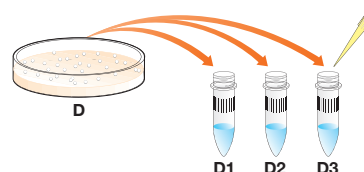
3. **Utiliza una punta de pipeta para recolectar una sola colonia azul de la placa IX/ARA. Agita la punta de la pipeta en el tubo S hasta que no queden bacterias en la punta.**



4. **Utiliza una punta de pipeta nueva para recolectar una única colonia azul de la placa C. Agita la punta de la pipeta en el tubo C hasta que no queden bacterias en la punta.**

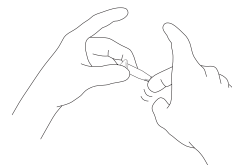


5. **Utiliza una punta de pipeta nueva para recolectar una sola colonia blanca de la placa D. Agita la punta de la pipeta en el tubo D1 hasta que no queden bacterias en la punta.**

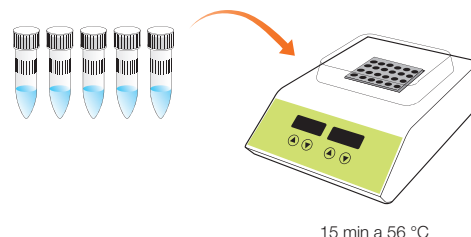


6. **Utilizando una punta de pipeta nueva cada vez, repite el paso 5 con los tubos D2 y D3 usando nuevas colonias individuales cada vez.**

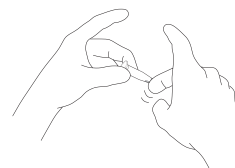
7. **Asegúrate de que las tapas de los tubos estén completamente cerradas y agita los tubos, o utiliza el vórtex durante 10 segundos para mezclarlos.**



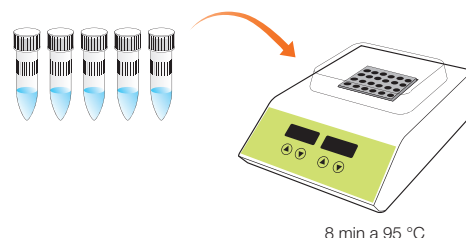
8. *Incuba los tubos en un baño seco o en un baño de agua durante 15 min a 56 °C.*



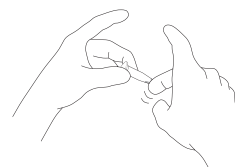
9. *Deja que los tubos se enfríen ligeramente. A continuación, agita los tubos o utiliza el vórtex durante 10 seg para mezclarlos.*



10. *Incuba los tubos en un baño seco o en un baño de agua durante 8 min a 95 °C.*

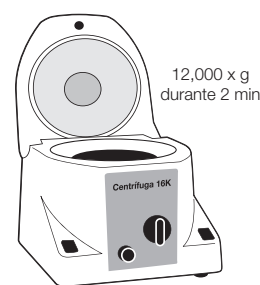


11. *Deja que los tubos se enfríen ligeramente. A continuación, agita los tubos o utiliza el vórtex durante 10 seg para mezclarlos.*



DETEN EL EXPERIMENTO EN ESTE PUNTO.
Pregunta a tu instructor si debes continuar el con el experimento ahora mismo o hasta mañana. Guarda tus muestras en el refrigerador a 4 °C hasta que debas continuar con el experimento.

12. *Centrifuga los tubos a 6000 x g durante 5 min o 12,000 x g durante 2 min.*



Preparar y amplificar las muestras de PCR

13. Etiqueta siete tubos de PCR **S, C, D1, D2, D3, (+), y (-)**, ponle a cada uno tus iniciales.

14. Añade 10 μ l de mezcla maestra plus primers (**MMP**) a cada tubo.

15. Con una punta de pipeta nueva por cada vez, añade 10 μ l de sobrenadante de cada uno de los cinco tubos con tapa de rosca en su tubo de PCR correspondiente. **NO transfieras ninguna gota de la InstaGene Matrix;** las gotas detendrán la PCR.

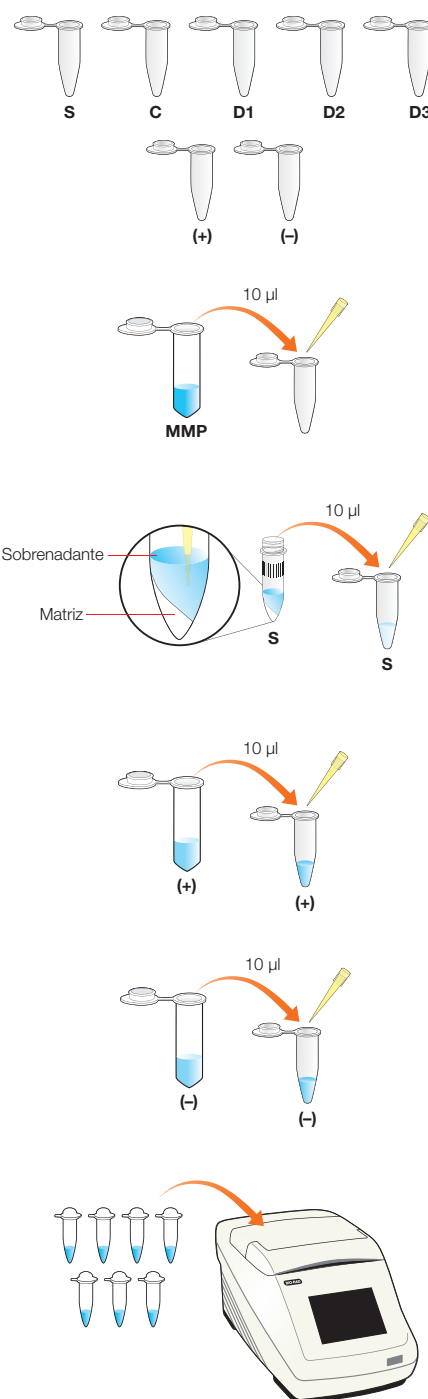
16. Con una nueva punta de pipeta, añade 10 μ l de ADN de control positivo de la PCR (+) al tubo de la PCR (+).

17. Con una nueva punta de pipeta, añade 10 μ l de control negativo de la PCR (-) al tubo de la PCR (-).

18. Tapa los tubos y colócalos en el termociclador.

19. Cuando todas las muestras de los estudiantes estén en el termociclador, ejecuta el siguiente programa:

Paso	Temp., °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1x
Desnaturalización	94	30 seg	35x
Recalentamiento	62	30 seg	
Extensión	74	1 min	
Extensión final	74	5 min	1x
Mantener	12	–	1x



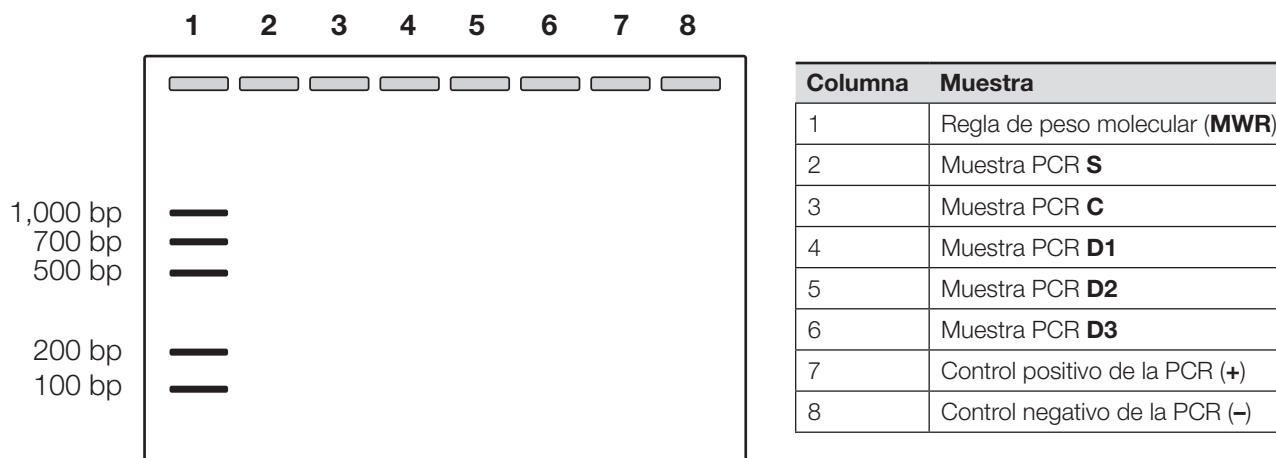
Parte 3

Electroforesis en gel y visualización

Después de la PCR, utilizarás la electroforesis en gel de agarosa para separar y visualizar los amplicones, que son los productos de la PCR. Como cada conjunto de iniciadores o primers produce un amplicón de PCR de diferente tamaño, pueden separarse por electroforesis.

Preguntas previas al laboratorio

A. Consulta tus respuestas en la Tabla 1 y dibuja los resultados esperados de la electroforesis en la siguiente ilustración del gel.



B. ¿Cómo podrían los resultados de la electroforesis confirmar que la PCR se realizó correctamente?

C. ¿Cómo podrían los resultados de la electroforesis confirmar que extrajiste exitosamente el ADN genómico de tus muestras bacterianas?

D. Identifica y resume el propósito de cada control experimental.

Protocolo

Estación de trabajo de los estudiantes

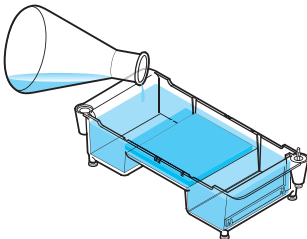
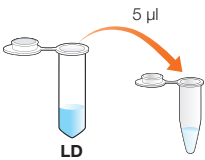
Materiales	Cantidad
Muestras de PCR de la segunda parte 2 (S, C, D1, D2, D3, (+), (-))	7
Regla de peso molecular (MWR)	15 µl
Tinte de carga (LD)	40 µl
Gel de agarosa al 1 % con 8 pocillos	1
Tampón de electroforesis TAE 0.25x.	300 ml
100x Fast Blast DNA Stain, si se utiliza	50 ml
Cámara de electroforesis en gel horizontal	1
Suministro de energía	1
Micropipeta y puntas de volumen ajustable de 2-20	1
Bandeja de tinción del gel (opcional)	1

Estación de trabajo común

Materiales	Cantidad
Microcentrífuga	4-8
Transiluminador UV (si se utiliza UView 6x Loading Dye and Stain)	1

Cargar las muestras de PCR y realizar la electroforesis

1. **Haz girar las muestras de PCR en una centrífuga para arrastrar contenido al fondo de los tubos.** →
2. **Utilizando cada vez una punta de pipeta nueva, añade 5 µl de colorante de carga (LD) a cada muestra. Pipetea suavemente para mezclar.** →
3. **Coloca un gel de agarosa TAE al 1 % en la cámara de electroforesis. Asegúrate de que el gel esté orientado de forma que los pocillos estén más cerca del electrodo negro (-), o cátodo.**
4. **Llena la cámara de electroforesis con suficiente tampón de electroforesis TAE para que el gel quede cubierto unos 2 mm.** →



5. Utilizando una nueva punta de pipeta para cada muestra, carga muestras en los pocillos según la tabla siguiente.

Carril	Muestra	Volumen, μ l
1	Regla de peso molecular (MWR)	15
2	Control positivo de la PCR (+)	15
3	Muestra PCR (S)	15
4	Muestra PCR (C)	15
5	Muestra PCR (D1)	15
6	Muestra PCR (D2)	15
7	Muestra PCR (D3)	15
8	Control negativo de la PCR (-)	15

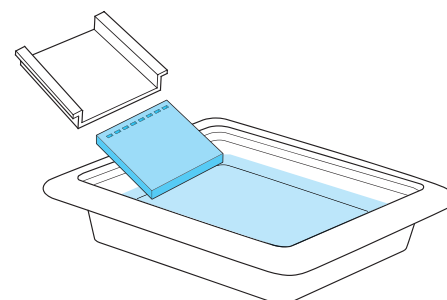
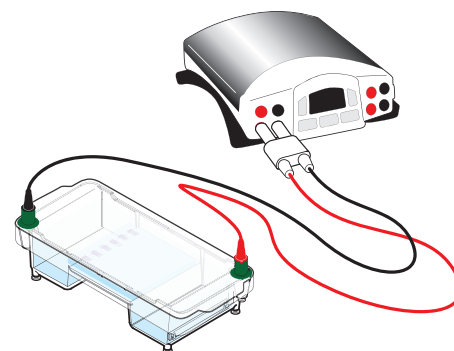
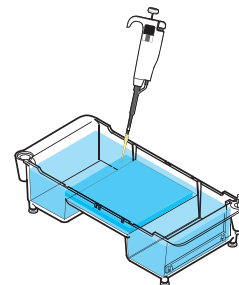
6. Vuelve a colocar la tapa de la cámara de electroforesis y conecta los cables a la fuente de alimentación, el rojo al rojo y el negro al negro.

7. Enciende la fuente de alimentación y haz funcionar el gel. Pregunta a tu instructor por las condiciones de ejecución.

Visualiza las bandas de ADN

8. Retira con cuidado el gel de la cámara y transfíerelo a una bandeja de tinción de gel (opcional).

9. Tiñe y/o visualiza tu gel según las indicaciones de tu instructor.



Parte 4

Análisis y discusión de datos

Preguntas posteriores al laboratorio

A. Prepara un esquema con los resultados de tu electroforesis. Etiqueta las bandas de la regla de peso molecular. Consulta la pág. 9 para ver los tamaños de las bandas.

1

2

3

4

5

6

7

8

Columna	Muestra
1	Regla de peso molecular (MWR)
2	Muestra PCR S
3	Muestra PCR C
4	Muestra PCR D1
5	Muestra PCR D2
6	Muestra PCR D3
7	Control positivo de la PCR (+)
8	Control negativo de la PCR (–)

B. Indica los resultados de los controles de tu experimento y describe lo que puedes concluir Acerca de ellos.

C. En la Tabla 2, agrega marcas de verificación para los amplicones que observes en cada muestra de PCR. Basándose en tus resultados, completa el campo «estado del gen lacZ» con tus conclusiones sobre el gen lacZ en cada muestra. Anota cualquier resultado que sea diferente de tus predicciones en la Tabla 1.

Tabla 2. Tabla de recopilación de resultados de la PCR.

Muestra PCR	Amplicón			Estado del gen lacZ
	1,100 bp	650 bp	350 bp	

C. ¿Los resultados de la PCR multiplex refutan alguno de tus argumentos (tu argumento original o tu argumento alternativo) de la Parte 1? Explica por qué sí o no.

D. Basándote en tus evidencias de laboratorio, escribe uno o varios argumentos nuevos acerca del rol que juega la edición del gen mediante CRISPR en la modificación del gen lacZ en las bacterias cultivadas en las placas experimentales C y D. Incluye las pruebas de tus experimentos de transformación bacteriana y de PCR multiplex.

Glosario

Amplicón: un trozo de ADN que se ha producido mediante amplificación, a menudo por PCR. Un producto de la PCR se llama amplicón.

Par de bases (pb): nucleótidos complementarios unidos por enlaces de hidrógeno.

Cas9: proteína 9 asociada a CRISPR; endonucleasa que forma una rotura de doble hebra (o corte) en el ADN en un sitio específico dentro de una secuencia de reconocimiento mayor, o sitio objetivo. Participa en la defensa natural de ciertas procariotas contra los virus del ADN, y también se utiliza mucho en aplicaciones de ingeniería genética para cortar el ADN en lugares especificados por un ARN guía (ARNg).

CRISPR: las repeticiones palindrómicas agrupadas y regularmente interespaciadas son secuencias en los genomas de algunas procariotas que actúan como un registro genómico de ataques virales anteriores. Junto con las proteínas asociadas con CRISPR (Cas), las bacterias utilizan las secuencias para reconocer y desarmar futuros virus invasores. Los científicos han adaptado este sistema para fines de ingeniería genética.

Cromosoma: molécula de ADN con todo o parte del material genético de un organismo.

Plantilla de ADN donante: secuencia de ADN necesaria para la reparación dirigida por homología en las aplicaciones de edición genética mediante CRISPR; puede incluir una secuencia deseada flanqueada en ambos lados por «brazos de homología» que coincidan con la secuencia antes y después al corte.

Edición de genes: manipulación del material genético en células vivas que consiste en la adición, eliminación y/o sustitución de secuencias de ADN, generalmente con el objetivo de alterar fenotipos.

InstaGene Matrix: gotitas microscópicas que unen a los cationes divalentes en solución; la unión o robo de cationes divalentes previene que queden disponibles para las enzimas que pueden degradar la plantilla de ADN.

lacZ: parte del operón lac de *E. coli*; este gen codifica la enzima β -galactosidasa. Durante décadas, los biólogos moleculares han utilizado el gen *lacZ* como sitio objetivo para la inserción de secuencias de ADN, ya que el color de la colonia bacteriana indica si las ediciones fueron exitosas.

Mezcla maestra: la principal solución reactiva utilizada en la PCR; la mezcla maestra contiene todos los componentes necesarios (dNTP, primers o iniciadores, tampón, sales, polimerasa, cofactor de la polimerasa).

PCR multiplex: amplificación simultánea de objetivos múltiples utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. En la reacción se utilizan múltiples conjuntos de cebadores, uno para cada objetivo.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): proceso de amplificación o síntesis de ADN *in vitro* a través de iniciadores o primers y de ciclos de cambio de temperatura.

Iniciador o primer: secuencia corta de nucleótidos (generalmente de entre 16 y 24 bases en longitud) que reconoce una secuencia particular de nucleótidos en la secuencia de ADN objetivo; los iniciadores para la reacción en cadena de la polimerasa se sintetizan normalmente en un laboratorio.

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, un compuesto formado por galactosa unida a un indol sustituido. Su hidrólisis por la β -galactosidasa produce un pigmento azul insoluble el cual indica la presencia de β -galactosidasa activa.

Avisos legales

BIO-RAD es una marca registrada de Bio-Rad Laboratories, Inc.

Todas las marcas comerciales aquí indicadas son propiedad de sus respectivos titulares.

© 2022 Bio-Rad Laboratories, Inc.

Este producto no es para autoadministración.



Bio-Rad
Laboratories, Inc.

Life Science
Group

Website bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 00 800 00 24 67 23 **Belgium** 00 800 00 24 67 23 **Brazil** 4003 0399
Canada 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 00 800 00 24 67 23 **Denmark** 00 800 00 24 67 23 **Finland** 00 800 00 24 67 23
France 00 800 00 24 67 23 **Germany** 00 800 00 24 67 23 **Hong Kong** 852 2789 3300 **Hungary** 00 800 00 24 67 23 **India** 91 124 4029300 **Israel** 0 3 9636050
Italy 00 800 00 24 67 23 **Japan** 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Luxembourg** 00 800 00 24 67 23 **Mexico** 52 555 488 7670
The Netherlands 00 800 00 24 67 23 **New Zealand** 64 9 415 2280 **Norway** 00 800 00 24 67 23 **Poland** 00 800 00 24 67 23 **Portugal** 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 **Singapore** 65 6415 3188 **South Africa** 00 800 00 24 67 23 **Spain** 00 800 00 24 67 23 **Sweden** 00 800 00 24 67 23
Switzerland 00 800 00 24 67 23 **Taiwan** 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 2 651 8311 **United Arab Emirates** 36 1 459 6150 **United Kingdom** 00 800 00 24 67 23

