

Informe Beca de Entrenamiento para alumnos universitarios (BENTR14)  
Esteban Barila

A) Tareas realizadas

El principal conjunto de tareas fue subordinado al objetivo de producir mutaciones puntuales sobre el ADNc para el canal KCNQ<sub>x</sub> subclonado en plásmidos. Para ello comencé a familiarizarme con la técnica de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), diseñando la reacción para los distintos plantillas de ADN, cebadores y enzimas. Me instruí en la gran diversidad de estrategias que tiene la técnica y llevamos a cabo la mutagénesis de sitio dirigido (*Site-directed mutagenesis*).

Adquirí competencia en la preparación de la reacción de PCR, el pipeteo y las buenas prácticas de laboratorio. Aprendí el uso del termociclador, generando programas propios, y establecí una planilla para la disposición ordenada de su uso en el laboratorio común.

Con el propósito de hacer una evaluación cualitativa de la reacción de PCR, y obtener los productos purificados realicé corridas electroforéticas en gel de agarosa.

Empleando un transiluminador UV para revelar las bandas de ADN marcadas con bromuro de etidio y recortar aquellas que se iban a destinar a su procesamiento.

Para lograr muestras purificadas, limpias de ADN (libres de componentes de la reacción de PCR, geles, etc) realicé protocolos de limpieza con distintas marcas de reactivos con una metodología basada en cromatografía en columna.

Con el propósito de cuantificar y estudiar la calidad del material obtenido, aprendí a usar un dispositivo de cuantificación óptica (picodrop) asociado a un software.

Otra de las tareas cruciales en el desarrollo del proyecto fue ensayar las reacciones para lograr la ligación del ADN al vector plasmídico empleado. Para lograr esto estudié un modelo digital empleando un software (SnapGene) cargado con la secuencia del ADN a insertar que fue producido y aquella del vector. Con esta información se eligieron las enzimas de restricción a emplear teniendo en cuenta sus diversos parámetros.

Realicé cortes con enzimas de restricción bacterianas. Durante el proceso fui interiorizado en cuanto a la provisión del laboratorio, los catálogos disponibles, marcas y compras.

Realicé ligaciones de fragmentos de ADN cortados con enzimas de restricción utilizando la enzima T4 DNA ligasa.

Por otro lado aprendí a producir medios de cultivo sólido para bacterias (agar LB para *E. coli*) con antibióticos de selección (ampicilina), los cuales se emplearon en la transformación bacteriana de los plásmidos insertados.

Ensayé transformaciones con un protocolo de shock térmico.

El laboratorio posee líneas celulares en cultivo y fui entrenado en su amplificación y mantenimiento. Además recibí la instrucción para realizar estas tareas y otras más en una cabina de flujo laminar.

Llevé a cabo protocolos para la extracción y purificación de ADN plasmídico proveniente de colonias transformadas (*plasmid preparation*).

Participé del relevo bibliográfico del laboratorio en cuanto al tema que nos incumbe y desarrollamos el plan de trabajo para mi solicitud de beca al CONICET.

Participé en el desarrollo de los artículos, resúmenes y posters presentados por el laboratorio en el 9no Congreso Mundial de IBRO (*International Brain Research Organization*) en Rio de Janeiro, Brasil. Julio 2015. En el mismo fui co-autor de 2 trabajos presentados en modalidad de poster. Además, este trabajo voy a presentarlo en la Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Mar del Plata, 3 al 6 de noviembre de 2015.

Trabajos presentados en Reuniones Científicas:

- 1) Spitzmaul, G. ; German, O.L. ; Carignano, C. ; **Barilá, E.** and Jentsch, T.J. « Expression of voltage-activated potassium KCNQ channels in mouse retina ». Poster: 0248. 9th World Congress of the International Brain Research Organization (IBRO), Río de Janeiro, Brasil, 7 al 11 de julio, 2015.
- 2) Carignano, C.; **Barilá, E.** and **Spitzmaul, G.** "Analysis of neuronal nicotinic acetylcholine receptors  $\alpha 4\beta 2$  activation and modulation by lypd6 at the single-channel level" Poster: 1181. 9th World Congress of the International Brain Research Organization (IBRO), Río de Janeiro, Brasil, 7 al 11 de julio, 2015.
- 3) **Esteban Barila**, Camila Carignano and Guillermo Spitzmaul. "Single-channel analysis of nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 4\beta 2$  activation and modulation by Lypd6". Poster NS-P10. LI Reunión Anual de SAIB. Mar del Plata, 3 al 6 de noviembre de 2015.

## B) Resumen de métodos y técnicas empleados:

### PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica empleada para hacer múltiples copias de un segmento de ADN. La PCR es muy precisa y puede ser usada para amplificar o copiar una región blanco del ADN de una mezcla de distintas moléculas de ADN. En primer lugar, dos secuencias cortas llamadas cebadores (*primers*) son diseñados para unirse al inicio y al final de la secuencia destinada a amplificar. Para la reacción, el ADN que contiene la región deseada se agrega a un tubo que contiene los cebadores, nucleótidos libres y una enzima, la ADN polimerasa. El tubo es introducido en un termociclador, el cual aumenta y disminuye la temperatura de la reacción en una secuencia automática y programada. Inicialmente, la mezcla se calienta para desnaturalizar, o separar la doble hélice del ADN en cadenas simples. Luego la muestra se enfría para lograr la hibridación, o unión de los cebadores a sus secuencias dentro de la molécula diana de ADN. Entonces la ADN polimerasa comienza a sintetizar nuevas cadenas de ADN a partir de los cebadores. Luego de cada síntesis, la doble hélice de ADN consiste de una cadena antigua y una nuevamente sintetizada. Luego de la primer síntesis, la PCR continua reiniciando el ciclo y repitiendo los pasos anteriormente mencionados. Las nuevas cadenas sintetizadas servirán de molde para las siguientes rondas de síntesis, permitiendo amplificar la región deseada millones de veces.

### Mutagénesis de sitio dirigido

Consiste de una reacción de PCR que requiere la síntesis de un cebador de ADN corto. Éste contiene la mutación deseada y es complementario al ADN del gen de interés en ambos lados del sitio de mutación. La mutación introducida puede ser de una sola base (mutación puntual), bases múltiples, deleciones o inserciones. El cebador es extendido usando una ADN polimerasa, copiando el resto del gen. El producto copiado incluye ahora el sitio mutado.

### Células competentes

Las células competentes son células bacterianas que poseen paredes celulares alteradas para permitir un ingreso facilitado a ADN externo. Para lograr esto, se realiza un tratamiento con cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) en frío.

### **Transformación bacteriana**

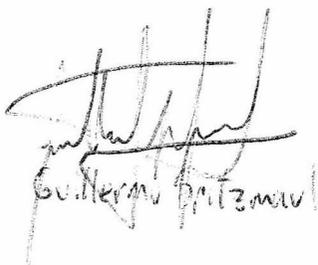
La transformación es el proceso por el cual ADN ajeno es introducido en una célula. Las bacterias son empleadas como un medio para almacenar y replicar plásmidos, es por ello que casi todos los plásmidos, incluso aquellos diseñados para usarse sobre células de mamíferos, contienen un origen de replicación bacteriano y un gen de resistencia a antibióticos, el cual se usa como un marcador de selección. En el procedimiento se emplean estirpes de bacterias creadas en el laboratorio que son más susceptibles a ser transformadas (bacterias competentes), y consiste en mezclar el ADN que se desea introducir (subclonado en plasmidos) junto con las células. La mezcla es sometida a un protocolo de shock térmico y posteriormente se cultiva en agar con el antibiótico de selección. De este modo aseguramos el crecimiento selectivo de las bacterias transformadas.

### **Electroforesis en gel de agarosa**

Técnica analítica empleada para separar fragmentos de ADN o ARN por tamaño y carga eléctrica. Las moléculas de ácidos nucleicos a ser analizadas son introducidas en el extremo de un gel de agarosa. La aplicación de un campo eléctrico induce la migración de las moléculas al ánodo debido a la carga neta negativa de pentosa-fosfato de su estructura. La separación de los fragmentos se logra explotando la movilidad diferencial de moléculas de distinto peso al atravesar el gel. Aquellas de mayor tamaño migran más lentamente por experimentar mayor resistencia del gel. Por ello, los fragmentos más pequeños culminan más próximos al ánodo.

### **Cortes con enzimas de restricción**

Comprende el uso de enzimas bacterianas que catalizan la ruptura de enlaces fosfodiéster en el interior de una cadena de ADN (endonucleasas). Cada enzima reconoce una secuencia característica (sitio de restricción) y produce cortes dejando extremos adhesivos o extremos romos. Es una técnica ampliamente usada en biología molecular para manipular ácidos nucleicos en el laboratorio. Es por ello que los diversos plásmidos o vectores de clonación disponibles para transferir los genes en estudio contienen una gran diversidad de sitios de restricción.



Guillermo Pitzman



Marta I. Aveldaño

Dra. MARTA I. AVELDAÑO  
DIRECTORA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS  
DE BAHIA BLANCA UNS - CONICET