

NORMAS DE TRABAJO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y GUÍA DE PROBLEMAS HABITUALES Y SU SOLUCIÓN

1. PROCEDIMIENTOS BÁSICOS:

En este apartado pretendemos detallar algunos factores muy importantes a la hora de realizar técnicas de Biología Molecular que incluyen uso y almacenaje de medios de crecimiento bacterianos, tampones y productos químicos; preparaciones de soluciones; cálculo de concentraciones..... y una guía de consejos para evitar problemas en el desarrollo de esta tecnología.

1.1. Cálculo de concentraciones:

Acidos y bases: Ácido acético glacial con gravedad específica de 1.05 es 17.4 M
 Ácido acético 36% con gravedad específica de 1.045 es 6.27 M
 HCl con gravedad específica de 1.18 es 11.6 M
 HCl con gravedad específica de 1.05 es 2.9 M
 Hidróxido amónico con gravedad específica de 0.898 es 14.8 M

1.2. Preparación de soluciones y otras cosas básicas:

Es un hecho destacable la cantidad de investigadores que no conocen los métodos correctos de preparación de soluciones, uso de pipetas..... Las notas siguientes pueden ser de ayuda:

- **Los sólidos disueltos en líquidos ocupan volumen.** Así para preparar una solución 1M, pesa 1 mol (que es el peso molecular en gramos) de la sustancia y disuélvela en MENOS de 1 litro de solvente: llévalo a un litro cuando ya esté disuelto. Cuando prepares soluciones a un pH determinado acuérdate de dejar espacio para el ácido o álcali.

-**Molaridad.** 1 mol es el peso molecular en gramos-incluyendo el agua de cristalización. Así 82.1 g de CH_3COONa anhídrido contiene la misma cantidad de acetato sódico que 136.1 g de $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

- **La disolución de muchos componentes es endotérmica, se requiere calor.** Esto es importante cuando se preparan soluciones por ejemplo de urea y hydrochloruro de guanidina. El calor puede ser proporcionado mediante agitación prolongada a temperatura

ambiente o por un calentamiento suave. Ten en cuenta que el calor excesivo puede estropear los reactivos.

- **Preparación de mezclas complejas.** Cuando prepares mezclas de más de un componente, generalmente es más fácil preparar cada componente como solución stock, y mezclarlos después. SIEMPRE debes añadir el agua primero- ej., Si añades NaCl y SDS antes que el agua, el SDS tenderá a precipitar, dependiendo de las concentraciones de NaCl y SDS y de la temperatura. Generalmente, añade sales y tampones antes de las que las sustancias orgánicas.

- **Dilución de soluciones stock.** Cuando prepares mezclas a partir de soluciones stock, diluye *cada* componente usando la siguiente ecuación: $V_1 = V_2 C_2 / C_1$ donde V_1 es el volumen de solución stock de la concentración C_1 que debe ser añadida al volumen final (incluyendo TODOS los componentes) V_2 de concentración final C_2 . Esta fórmula funciona tanto con concentraciones en molaridad, en % y en peso/volumen.

- **Relación densidad y concentración.** Algunas sustancias se suministran como líquidos puros sin ninguna especificación de concentración, sólo con especificación de densidad – ej. mercaptoetanol. La concentración se calcula a partir de la definición de concentración molar como el número de moles de sustancia en un litro. El peso de un litro se obtiene multiplicando la densidad en g/ml por 1000, y el número de moles en un litro dividiendo este peso por el peso molecular en gramos. Por ejemplo, el peso de 1 litro de agua es 1000 g, el peso molecular es 18, por lo que la concentración molar es $1000/18 = 55.555$ M.

- **Uso de pipetas.** Las pipetas pueden ser fuente de problemas tanto con la precisión como con la contaminación. La manera correcta de usarlas es presionando el émbolo hasta el segundo tope, succionar un exceso de líquido y después dispensar hasta el primer tope. Esto evita pérdidas, especialmente de líquidos viscosos, debido a wetting on dentro de la punta. Las puntas deben introducirse en las soluciones a tan corta distancia como sea posible para evitar contaminaciones cruzadas fuera de la superficie de la punta. SIEMPRE se debe pipetear muy despacio, par evitar que se pegue líquido al interior de la punta, y para evitar generar aerosoles que contaminen el émbolo (oque el líquido toque el émbolo). Es muy fácil tener contaminaciones cruzadas debido a la mala práctica.

- **Los reactivos químicos deben mantenerse limpios** – nada debe ser puesto dentro de una botella que haya contenido sustancias químicas, incluyendo espátulas, fibras de vidrio, etc. Una ínfima cantidad de nucleasa o proteasa dentro de un tampón de restricción puede hacer perder semanas de trabajo.

- **Lavado de sólidos.** Muchos protocolos recomiendan para bacterias, precipitación de DNA mediante etanol, etc el lavado para remover sustancias que pueden interferir para manipulaciones posteriores. La manera más eficaz de lavar un insolubles realizar tres lavados de igual volumen. Si se recoge un pellet de una solución conteniendo, por ejemplo, 1M de sal, la concentración de sal en el líquido residual es 1M: la resuspensión en solución de lavado, lo diluye. En un tubo Eppendorf, un pellet pequeño típico puede contener 10 μ l de un solvente inicial, por lo tanto cada lavado representa una dilución de 100 veces, resultando después de tres lavados una concentración de 1 μ M. Un lavado simple con 3 ml reduciría la concentración únicamente a 3.3 mM; 2 y 4 lavados con 1.5 ml y 0.25 ml respectivamente reduciría la concentración a 44.4 μ M y 2.56 μ M respectivamente.

- **Resuspendiendo pellets:** Muchos protocolos recomiendan resuspender los pellets después de centrifugar. Esto es para remover la fase líquida, como en los lavados de pellets, o para exponer el pellet a tratamientos posteriores (ej. resuspensión de las bacterias antes de lisar con lisozima). No confundas resuspensión con disolución!!!!!! La resuspensión completa separa las partículas del pellet completamente, ej. en células bacterianas individuales; si puedes ver grumos, entonces no lo has resuspendido adecuadamente. Si la sustancia que debe ser resuspendida (o disuelta) no se daña por fuerzas de fricción, la resuspensión puede ayudarse mediante el vortex.

- **Cálculo de la concentración de DNA mediante espectrofotometría:** Los ácidos nucleicos absorben luz de la región ultravioleta, con un pico de absorbancia a 260 nm. Este punto se encuentra próximo al pico de absorbancia de las proteínas (280 nm) por lo que la medida única del valor a 260 nm no es muy útil. La medida de ambas absorbancias permite estimar no sólo la concentración de DNA si no la presencia de otras sustancias en la muestra. Las soluciones puras de DNA y RNA tienen un valor de la relación A_{260} / A_{280} de 1.8 y 2.0 respectivamente.

- 1 U/ml (A_{260}) de DNA de doble cadena corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g/ml}$
- 1 U/ml (A_{260}) de DNA monocadena o RNA corresponde a 40 $\mu\text{g/ml}$
- 1 U/ml (A_{260}) de un oligonucleótido corresponde a 50 $\mu\text{g/ml}$

2. NORMAS DE TRABAJO:

Seguridad en el laboratorio:

Las normas básicas de seguridad en el laboratorio son bastante obvias, e incluyen las siguientes:

- No comer, beber, fumar, afeitarse, maquillarse...en las zonas de trabajo.
- Llevar siempre puesta una bata blanca en el laboratorio.
- No usar la bata fuera del laboratorio.
- Lavarse las manos frecuentemente, especialmente antes de marcharse del laboratorio.
- No pipetear con la boca
- Tener cuidado con todos los reactivos, químicos, soluciones, gases....
- Familiarizarse con las sustancias peligrosas y comportarse adecuadamente
- Guardar los solventes en armarios o cajas apropiados.
- Nunca guardar eter o similares en frigoríficos ordinarios.
- Comunicar a los demás investigadores del laboratorio cuando se estén manipulando sustancia tóxicas.
- Mantener el laboratorio ordenado, y limpiar la zona de trabajo antes de irse a casa. Cada cosa tiene su sitio y debe ser colocada allí inmediatamente después de su uso.
- Notificar al personal responsable del laboratorio cualquier accidente biológico o químico, por muy pequeño que sea.
- Todos los laboratorios tiene un manual de seguridad que debe ser leído antes de empezar a trabajar por primera vez.

Manipulación genética:

El concepto de ingeniería genética provoca pánico en una gran parte de la población; aunque la mayoría de manipulaciones genéticas son probablemente inocuas, es esencial seguir los procedimientos correctos para evitar otros problemas.

Todas las manipulaciones genéticas deben ser organizadas detalladamente antes de comenzar el trabajo experimental, usando un esquema para estimar el riesgo que implica. En base a los resultados de este análisis, las condiciones de trabajo deben ser adaptadas .

La seguridad radica en tres factores:

- Acceso: es una medida de la probabilidad que un organismo modificado, o su DNA, entre en el cuerpo humano y sobreviva allí. El factor de acceso para bacterias con una capacidad conocida para colonizar humanos, ej. tipo salvaje de Salmonella y E. coli es 1; variantes no colonizadoras como E. coli K12, cepas B y C tienen factor de acceso de 10^{-3} ; sistemas de huésped-vector discapacitados tienen un factor de 10^{-6} - 10^{-9} ; y DNA manipulado genéticamente en células de tejido introducido como DNA que carece de capacidad infectiva tiene un factor de 10^{-12} .
- Expresión: es una medida de la expresión conocida o anticipada. Cuando es desconocida, debe ser asumido el nivel máximo. Inserciones deliberadas de DNA expresable “downstream” del promotor con la intención de maximizar la expresión da un factor de 1; inserción de un DNA expresable “downstream” del promotor con la intención de no maximizar la expresión tiene un factor de 10^{-3} ; inserción de DNA expresable no situado específicamente para facilitar la expresión da un factor de 10^{-6} ; las secuencias no expresables tienen un factor de 10^{-12} . Las proteínas de fusión cuentan como expresadas.
- Daño: estima cuánto daño puede causar la proteína expresada. La expresión de una sustancia tóxica o determinante patogénico bajo condiciones en las que es probable que tenga un efecto biológico deletéreo significativo da un daño de 1; expresión de una sustancia activa que pudiera tener un efecto deletéreo si afecta a un tejido diana conlleva un daño de 10^{-3} ; la expresión de una molécula biológicamente activa que es improbable que cause un efecto deletéreo, o donde no pueda alcanzar más del 10% del nivel normal en el organismo, da un factor de daño de 10^{-6} ; el uso de una secuencia genética en la que es muy improbable que cause efecto biológico tiene un factor de 10^{-9} ; y casos en las que el efecto biológico es prácticamente imposible, tienen un factor de daño de 10^{-12} .

Estos tres factores de riesgo se determinan y multiplican entre sí para conocer el factor de riesgo global, que es usado para determinar el nivel apropiado de contaminación biológica.

Normas específicas de Biología Molecular:

Además de las normas del apartado 1 es conveniente seguir las siguientes recomendaciones:

- Separar zonas de trabajo para evitar contaminaciones cruzadas y degradación de las muestras: de preparación de material, de extracción de ácidos nucleicos, de amplificación, de electroforesis.

- Usar bata distinta a la de uso general y guantes con cambios frecuentes.

- Evitar la acción de nucleadas que degraden el DNA, RNA de la muestra. Para ello hay que asegurarse del correcto autoclavado de soluciones y material a utilizar; procurar no almacenar mezclados soluciones autoclavadas con material no estéril; trabajar siempre en zona limpia o en campana; cuando se sacan fuera de la nevera mantener en hielo las soluciones que contengan ácidos nucleicos o enzimas.

- Es recomendable almacenar los reactivos específicos (enzimas, *primers*, nucleótidos...) en un congelador propio.

- Siempre se deben manipular con sumo cuidado los enzimas tanto de restricción, como *Taq* polimerasas dado que se inactivan fácilmente a temperatura ambiente. Hay que tenerlas fuera de la nevera el mínimo tiempo imprescindible, colocándolas inmediatamente en hielo.

- En cada experimento se deben utilizar controles tanto positivos como negativos. De esta manera nos aseguramos la veracidad del resultado.

3. MANUALES DE LABORATORIO:

En la bibliografía de la asignatura encontrarás numerosos manuales muy útiles para la realización de las técnicas que necesites y de sus correspondientes aplicaciones. Sin embargo, para el “día a día” del laboratorio te recomendamos la siguiente guía en la que encontrarás la información necesaria tanto para preparar materiales, protocolos de todas las técnicas básicas, consejos para su correcta realización e interpretación y guía de problemas y soluciones: Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Joseph Sambrook and David W. Russell. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. <http://www.MolecularCloning.com>