DOCUMENTOS DE TRABAJO

41

Técnicas de Investigación en Biología Molecular

Ricardo Ramos Ruiz

UAM EDICIONES

DOCUMENTOS DE TRABAJO

41

Técnicas de Investigación en Biología Molecular

Ricardo Ramos Ruiz

1ª edición
3ª impresión

UAM EDICIONES

EDICIONES DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

28049 Madrid

Teléfono 91 497 42 33

Fax 91 497 51 69

servicio.publicaciones@uam.es

www.uam.es/servicios/otros/spublicaciones

I.S.B.N.: 84-7477-818-2
Depósito Legal: GU-197/2004
Impresión: Print Autoedición, S.L.

ÍNDICE

Prólogo

El libro "Técnicas de investigación en biología molecular" pretende introducir las principales técnicas que se aplican en la investigación en biología celular y molecular a una persona que comienza su trabajo en el laboratorio. Su contenido está repartido en cinco bloques que presentan, de forma resumida, la metodología relacionada con los siguientes temas: i) las propiedades de las disoluciones acuosas, en relación a su capacidad de tamponamiento, ii) las principales técnicas bioquímicas "clásicas" (espectrometría, cromatografía, electroforesis) de aplicación en el análisis de proteínas, iii) la microbiología y sus técnicas de cultivo, iv) la purificación y análisis de ácidos nucleicos y las nociones básicas de clonaje y manipulación de DNA, y, v) la metodología relacionada con el estudio de las células de los organismos superiores.

Dada la amplitud y diversificación que ha alcanzado hoy en día la biología molecular, nuestro objetivo ha sido simplemente presentar algunas de las técnicas más extendidas y universales dentro de este campo. No se pretende establecer todos los fundamentos teóricos en los que se basa cada una de las metodologías sino desarrollarlas brevemente para pasar, de forma inmediata, a describir las aplicaciones, utilidades y limitaciones que plantea cada una de ellas. En la medida de lo posible, se comparan las distintas técnicas entre sí para establecer un criterio que ayude a escoger la metodología más conveniente para cada aproximación experimental.

Los destinatarios de esta obra son alumnos que desean introducirse en el mundo del laboratorio de investigación bioquímica. En concreto, está ideado como texto de apoyo para cursos de formación de técnicos especialistas de laboratorio. En este sentido, pretendemos que cada uno de los temas pueda servir como la introducción necesaria para un aprendizaje práctico de laboratorio, donde las técnicas descritas pasen al campo de la aplicación científica.

Disociación del agua

DISOCIACIÓN DEL AGUA
Concepto del pH

DEFINICIONES

Las **disoluciones** son mezclas homogéneas de varias sustancias. Constan de dos entidades esenciales: el **soluto**, que es la sustancia capaz de incluirse y estabilizarse dentro de la estructura que forma el **disolvente**. Las propiedades de las disoluciones no son la suma de las aportadas por soluto y disolvente, sino que se generan características fisico-químicas (conductividad eléctrica, capacidad térmica, etc.) nuevas.

La cantidad de soluto dentro de una disolución suele medirse en moles. Un **mol** corresponde a la cantidad de sustancia que contiene un Número de Avogrado de partículas. El mol se define exactamente como el número de átomos presentes en 12 gr del isótopo ^{12}C de carbono y está compuesto de un número de Avogadro ($6{,}023 \times 10^{23}$) de moléculas. Por consiguiente, el peso de un mol de una sustancia es igual al peso molecular expresado en gramos de dicha sustancia. Las unidades de expresión del peso molecular serán de g/mol, denominadas **daltons**.

PROPIEDADES DISOLVENTES DEL AGUA

El agua es el medio en que están dispersos todos los componentes celulares, donde ocurren las reacciones celulares y la transferencia de energía química. Podemos decir que la vida se originó mediante la adaptación a sus características especiales como disolvente. En el agua, cada átomo de hidrógeno de una molécula comparte un par electrónico con el átomo de oxígeno. La forma de los orbitales electrónicos externos del átomo de oxígeno describen aproximadamente un tetraedro, con un átomo de hidrógeno en dos vértices y electrones sin compartir en los otros dos. El ángulo del enlace H-O-H es de 104,5°, ligeramente menor a los 109,5° de un tetraedro perfecto; los orbitales no enlazantes del átomo de oxígeno comprimen ligeramente los orbitales compartidos por el hidrógeno.

El núcleo del oxígeno atrae electrones con más fuerza que el núcleo del hidrógeno; el oxígeno es más electronegativo. Por lo tanto el H y el O comparten los electrones de forma desigual; los electrones suelen estar más cerca del átomo del oxígeno que del de hidrógeno. El resultado es la formación de dos dipolos eléctricos en la molécula de agua, uno a lo largo de cada enlace H-O. La atracción electrostática resultante entre el átomo de oxígeno de una molécula de agua y el hidrógeno de otra molécula origina un cierto grado de ordenación entre las moléculas en una disolución acuosa. Estas interacciones, aunque no covalentes, constituyen un tipo de enlace relativamente fuerte, conocido como **enlaces de hidrógeno**. El resultado de este hecho es que el agua tiene un cierto carácter polar, adoptando en su estado líquido una estructura parcialmente ordenada.

La existencia de las fuerzas de interacción interna no covalentes en la estructura del agua la capacita para disolver diversos compuestos. Los más solubles son los polares e iónicos. Su solubilidad se basa en la formación de estructuras hídricas envolventes alrededor de las sustancias que disminuyen la energía global del sistema. Además, el agua es capaz de disolver compuestos orgánicos que presenten grupos polares y sustancias anfipáticas, mientras que las sustancias hidrofóbicas se disuelven con mayor dificultad.

COEFICIENTES DIELÉCTRICOS DE VARIOS DISOLVENTES

Hexano	1,9	Acetona	21,4
Benceno	2,3	Etanol	24
Éter dietílico	4,3	Metanol	33
Cloroformo	5,1	Agua	80

UNIDADES DE CONCENTRACIÓN

Cada soluto es capaz de disolverse hasta un cierto límite, de **solubilidad**, en un disolvente dado. Es muy importante conocer con exactitud la concentración, que es la cantidad de sustancia (o sustancias) presentes en una cierta cantidad de disolvente o disolución. Las formas de expresión más frecuentes son las siguientes:

Porcentaje en relaciones peso-volumen (p/p), (p/v) o (v/v): número de gramos (p) o de mililitros (v) de soluto por cada 100 gr (p) o 100 ml (v) de disolución.

Molaridad (M): número de moles de soluto en 1 litro de disolución. Cuando el soluto se expresa en equivalentes, la concentración quedará expresada como Normalidad

Fracción molar: número de moles de soluto por mol de disolvente.

Partes por millón: número de g de soluto en 10^6 g de disolución, es decir, mg soluto por kg de disolución.

Factor de concentración: número de veces de exceso de concentración (número de veces que debe diluirse para obtener la concentración correcta).

IONIZACIÓN DEL AGUA

El agua presenta un pequeño grado de ionización, según el cual genera iones hidronio (H_3O^+) e iones hidroxilo (OH^-). La reacción de disociación del agua es una reacción reversible, en equilibrio, y por tanto se puede describir mediante una constante de equilibrio. Por facilidad, se emplea el símbolo H^+ en lugar de H_3O^+. Así, la disolución iónica es un proceso de equilibrio que suele representarse:

$$H_2O \Leftrightarrow H^+ + OH^-$$

Según la ley de acción de masas, el equilibrio puede expresarse así:

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

La concentración del agua pura es muy elevada: (densidad/Pm = 55,5 M). Como la fracción de moleculas disociadas es muy baja, podemos considerar $[H_2O]$ constante y simplificar:

$$55,5 \times K_{eq} = [H^+][OH^-]$$

La constante de equilibrio del agua se ha determinado empíricamente:

$$K_{eq} = 1,8 \times 10^{-16} M$$

Así:

$$55,5 \times (1,8 \times 10^{-16} M) = [H^+][OH^-]$$

$$K_W = 99,9 \times 10^{-16} = 1 \times 10^{-14} = [H^+][OH^-]$$

Kw el producto iónico del H_2O. En condiciones de neutralidad, $[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}$ M

Por tanto, la reacción de ionización del agua sólo afecta a un bajo porcentaje de las moléculas de H_2O (1 de cada 10^7)

<u>Definición de pH</u>:

El pH es una representación numérica sencilla de la concentración de H^+ en una disolución.

$$pH = \log \frac{10}{[H^+]} = -\log 10[H^+]$$

En una disolución neutra, la concentración de protones es igual a la concentración de iones hidroxilo: $[H^+]=[OH^-] = 10^{-7}$ M. Por lo tanto, el pH de una disolución neutra sería igual a 7.

ÁCIDOS Y BASES EN DISOLUCIÓN

Se definen respectivamente a los ácidos y las bases como las sustancias que al disolverse en agua se ionizan generando respectivamente iones hidrógeno (H^+), o aceptándolos. El resultado es que en una disolución ácida, $[H^+] > [OH^-]$ ya que el aporte de grupos H^+ por el ácido desplaza el equilibrio en ese sentido, mientras que en una disolución básica ocurre lo contrario. Por tanto, encontraremos valores de pH < 7 en las disoluciones ácidas y pH > 7 en las disoluciones básicas.

Algunos ácidos, como el clorhídrico, el sulfúrico o el nítrico, denominados comúnmente ácidos fuertes, están completamente ionizados en disoluciones acuosas diluidas; las bases fuertes NaOH y KOH también están ionizadas completamente. Sin embargo, los ácidos y bases débiles, esto es, que no se disocian completamente son frecuentes en los sistemas biológicos y juegan papeles importantes en el metabolismo y su regulación. El principal interés es que sus reacciones de protonación/desprotonación son reversibles.

$$AH \Leftrightarrow A^- + H^+$$

Donde AH actua como ácido y A^- como base.

Así, cáda ácido disociado lleva asociada una base; hablamos realmente de **pares ácido-base conjugados**.

Como la medida de la fuerza de ácidos y bases se establece en función de su capacidad para ceder o aceptar protones, cuanto más fuerte es un ácido, más débil es su base conjugada, y viceversa.

La disociación de ácidos y bases es un sistema en equilibrio que puede representarse en función de la ley de acción de masas:

$$AH + H_2O \Leftrightarrow A^- + H_3O^+$$

La constante que rige este equilibrio se denomina **constante de disociación** del ácido.

Los ácidos fuertes tienen altos valores de Ka, y, por tanto valores más bajos de pK_a ($-\log K_a$)

Existe una relación sencilla entre la K_a de un ácido y la K_b de su base conjugada:

$$pK_a + pK_b = 14$$

DISOLUCIONES TAMPÓN

Los **tampones** son sistemas acuosos que tienden a resistir cambios en su pH cuando se añaden pequeñas cantidades de ácido o base. Su funcionamiento se basa en que ocurren dos equilibrios a la vez en la misma disolución: la disociación del agua en H^+ y OH^- y el equilibrio del sistema de un ácido y su base conjugada. Siempre que se añade H^+ u OH^- a un tampón, el resultado es un pequeño cambio en la razón de las concentraciones relativas del ácido débil y de su conjugado y, por tanto, un pequeño cambio de pH. El descenso en la concentración de un componente del sistema se equilibra exactamente por un incremento del otro.

Esencialmente, un sistema tampón consiste en la presencia conjunta de un ácido débil y su base conjugada en una misma disolución y en concentraciones semejantes. La curva de titulación de un ácido tiene una zona relativamente plana próxima al valor de su pK_a. En esta zona sólo hay un cambio muy pequeño de pH cuando se adicionan cantidades de H^+ u OH^- al sistema. Esta zona plana es la región tamponante del par ácido-base del tampón. En el punto medio de la región tamponante, en donde la concentración del dador de protones es exactamente igual a la del aceptor de protones, el poder tamponante del sistema es máximo. El pH en este punto de la curva de titulación es igual al valor de su pK_a.

La relación cuantitativa entre pH, la acción tamponante de una mezcla de ácido débil con su

base conjugada, y el pKa del ácido viene dada por la ecuación de Henderson-Hasselbalch que se describe a continuación:

ácido débil: AH

Su sal: BA

$AH \Leftrightarrow A^- + H^+$ Ácido débil

$BA \rightarrow B^+ + A^-$ (la sal se encuentra completamente disociada).

Aplicando la ley de acción de masas a la disociación del ácido:

$$K = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[AH][H_2O]}$$

Considerando $[H_2O]$ como constante:

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]} \text{ o } [H^+] = K_a \times \frac{[AH]}{[A^-]}$$

Podemos asumir que [AH] es la concentración total del ácido, y que $[A^-]$ es la concentración total de sal BA:

$$[H^+] = K_a \times \frac{[acido]}{[sal]}$$

en general $[H^+] = K_a \times \frac{[aceptorH^+]}{[donadorH^+]}$

Es decir:

$$pH = pk_a + \log \frac{[sal]}{[acido]}$$

Ecuación de
HENDERSON - HASSELBACH.

pH DE ALGUNAS DISOLUCIONES Y SUSTANCIAS NATURALES

pH = 14	Sosa cáustica NaOH 1M
pH = 13	Lejía
pH = 12	Amoniaco
pH = 11	
pH = 10	
pH = 9	Bicarbonato
pH = 8	Agua marina, clara de huevo
pH = 7	Sangre, lágrimas
pH = 6	Leche, saliva
pH = 5	Café
pH = 4	Cerveza, vino, zumo de tomate
pH = 3	Cola, vinagre
pH = 2	Zumo de limón
pH = 1	Jugos gástricos
pH = 0	Ácido clorhídrico HCl 1M

Algunos criterios para elegir un tampón

El criterio de selección principal es que cumpla con una buena capacidad amortiguadora en la zona de pH requerida. Suele considerarse adecuado un rango de ± 1 Unidad de pH alrededor del valor del pK_a. Además, es aconsejable que presente las siguientes propiedades:

1. Asequible con alto grado de pureza.

2. Soluble en agua e impermeable a las membranas biológicas.

3.Estable enzimática e hidrolíticamente.

4.No tóxico ni inhibidor biológico.

5.Los complejos con los cationes deben de ser solubles.

6.No debe absorber la luz de las regiones visible y ultravioleta.

TAMPONES BIOQUIMICOS MÁS HABITUALES. VALORES DE pK_a'.

Fosfato (pKa_1)	2,12	PIPES	6,8
Glicina	2,34	MOPS	7,2
Citrato (pKa_1)	3,14	Fosfato (pKa_2)	7,21
Carbonato (pKa_1)	3,76	Tricina	8,15
Acetato	4,75	TRIS	8,15
Citrato (pKa_2)	4,76	Borato	9,24
MES	6,15	Etanolamina	9,5
Carbonato (pKa_2)	6,36	CAPS	10,4
Citrato (pKa_3)	6,4	Fosfato (pKa_3)	12,3

Tampones más usados

Atendiendo a su tamponación en diversos rangos de pH, suelen emplearse, entre otros, los siguientes sistemas: para pH ácidos: acético/acetato, para pH neutros: HEPES, MES, Fosfato, carbónico/bicarbonato; para pH básicos: Tris, bicarbonato/carbonato.

Los fluidos intra y extracelulares de todos los organismos multicelulares tienen un pH característico y casi constante, regulado por diversas actividades biológicas. Gracias a su confinamiento dentro de unos límites estrechos, próximos a su pH óptimo, las enzimas mantienen su funcionamiento. De hecho, la bajada de unas pocas décimas en el valor del pH de la sangre lleva a la muerte del organismo. El principal sistemas tamponante de la sangre es del carbónico/bicarbonato. El ácido carbónico está sujeto a dos equilibrios, uno el ácido/base cuyo par conjugado es el bicarbonato, y otro el de la disolución del gas CO_2 que depende de la presión parcial de CO_2 en la fase gaseosa. De esta doble manera el organismo es capaz de regular finamente el valor del pH de los fluidos biológicos.

MEDICIÓN DEL pH EN EL LABORATORIO

Papel indicador de pH

Una forma de medir el pH de forma muy sencilla, aunque poco exacta, es con papel indicador. Este papel, en contacto con una disolución, cambia de color según el pH del líquido. Vienen provistos de una escala cromática que permite comparar el color obtenido, y así determinar el pH.

pHmetros

Las determinaciones precisas del pH en el laboratorio químico o clínico se hacen con un electrodo, que es una membrana de vidrio o borosilicato que tiene una sensibilidad selectiva para los iones H^+ pero que es insensible al Na^+, K^+ y otros cationes. El electrodo de vidrio proporciona un potencial que depende directamente del pH de la muestra. El electrodo está acoplado a un pHmetro donde se amplifica la señal del electrodo y se compara con la señal generada por una solución de un pH conocido con exactitud.

El electrodo de referencia proporciona un potencial constante frente al que se compara el obtenido con el electrodo indicador. El sistema de referencia más utilizado es el Ag/AgCl (plata/cloruro de plata). Su electrolito es una disolución salina de elevada concentración en la que está sumergido el elemento de referencia. Los más comunes suelen ser KCl 3 M y KCl 3 M + AgCl.

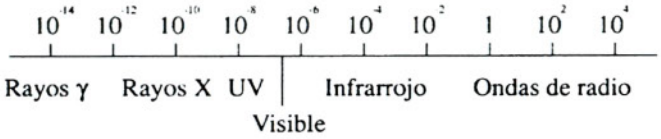
Espectrofotometría

ESPECTROFOTOMETRÍA

RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA

La radiación electromagnética supone una propagación de energía a través del espacio en ausencia de un medio "soporte" material. Tiene una naturaleza ondulatoria doble, que comprende un campo magnético y un campo eléctrico. Sus propiedades vienen definidas por dos parámetros relacionados inversamente: la frecuencia y la longitud de onda. De acuerdo con las longitudes de onda de cada oscilación, la radiación electromagnética puede resultar en ondas de radio, luces infrarroja, visible o UV, rayos X o rayos gamma. Los distintos tipos de radiaciones electromagnéticas existentes, atendiendo a sus longitudes de onda, se indican en la figura.

Longitud de Onda



A pesar de su naturaleza oscilatoria, la radiación electromagnética no puede ceder su energía más que en múltiplos discretos de energía denominados fotones, que se corresponderían con diminutos paquetes de onda de masa nula.

Cuando un átomo recibe energía externa, sus electrones pueden pasar a estados excitados donde algún electrón habrá saltado a capas más externas (de mayor energía). Existen dos mecanismos fundamentales por los cuales puede excitarse a un átomo. Uno es hacerlo colisionar con otro átomo, de forma que podrá absorber parte de la energía cinética. El otro es que absorba un fotón cuya energía sea igual a la que necesita un electrón para saltar a una órbita de mayor energía. Incluso, si la energía es suficientemente elevada, el electrón será capaz de saltar hasta el último estado de excitación, arrancado de la influencia del núcleo. En este caso el átomo pasará a ser un ión, un átomo con carga neta positiva. Por lo general, los átomos excitados tienden inmediatamente a recuperar su estado basal, liberando el exceso de energía en forma de emisión de un fotón, cuya energía será igual a la diferencia de energías entre el estado excitado y basal. Los distintos saltos de energía posibles según las energías de los orbitales que posea constituye el espectro de emisión característico de cada nucleido (según la energía algunos serán rayos Ultravioleta (UV), otros luz visible, otros rayos Infrarrojo (IR), etc.).

Todos los compuestos bioquímicos absorben energía en alguna región del espectro de radiación electromagnética. La energía a la que se produce la absorción depende de los niveles disponibles de energía electrónica, vibracional y rotacional de la molécula. Cuando la radiación incidente tiene una energía igual al existente entre dos estados de energía las moléculas son capaces de absorberla. Antes de que un nuevo fotón será absorbido, el estado "excitado" debe perder su energía y volver al estado de reposo.

Normalmente, dicha relajación es rápida ($<10^{-12}$ segundos) y tiene lugar mediante la cesión de energía por vibraciones y rotaciones de la misma molécula y, por colisiones con otras moléculas (especialmente el disolvente). La energía se cede al entorno en forma de calor. La rapidez de dicha relajación es tal que el número de fotones absorbidos es proporcional a la intensidad de la luz y es constante a lo largo del tiempo.

$$M \xrightarrow{h\nu} M^*$$
$$M^* \longrightarrow M + \text{calor}$$

La absorción de la radiación UV - visible proviene de la excitación de electrones enlazantes. En consecuencia, los saltos de energía dentro de ese rango permitidos para una molécula van a depender de los tipos de enlaces que se presenten en las moléculas en estudio. Haciendo un barrido de un continuo de longitudes de onda, aparecerá un patrón (un "es-

pectro") cuya forma exacta va a depender de la naturaleza de cada sustancia. Por tanto la espectroscopía de absorción es muy valiosa para la identificación de los grupos funcionales de una molécula.

Sin embargo, la espectrofotometría de luz UV – visible tiene una aplicación aún más amplia, que es la de poderse utilizar con finalidad cuantitativa. Para ello, es necesario que la sustancia en estudio posea algún grupo capaz de absorber luz en dicha región. También se emplean sistemas que permiten modificar químicamente dicha sustancia de forma que absorba luz a alguna longitud de onda determinada.

En algunas moléculas la pérdida de energía del estado excitado por vibración o rotación puede ser más lento. En ese caso el estado activado puede perder energía además mediante la emisión de fotones.

$$M^* \rightarrow M + h\nu$$

Esta emisión de luz puede ser de tipo fluorescente o fosforescente: para que se observe fluorescencia la vida media del estado excitado debe ser aproximadamente 10^{-9} segundos y para fosforescencia 10^{-3} segundos.

Mientras que todas las moléculas absorben fotones, relativamente pocas fluorescen o fosforescen de forma significativa a temperatura ambiente. Por eso dichas propiedades son particularmente útiles para determinar componentes minoritarios en mezclas complejas. La existencia de moléculas fluorescentes ha permitido desarrollar toda una serie de técnicas de microscopía, de gran importancia en el ámbito de la bioquímica, que son la microscopía óptica de fluorescencia, y, posteriormente, la microscopía confocal.

DETECCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

Ley de Lambert - Beer

La relación más útil en espectrofotometría de absorción se deriva de la combinación de la ley de Lambert, que dice que cada capa de igual espesor de un material absorbente, absorbe una fracción igual de la radiación que lo atraviesa; y la ley de Beer, que establece que la absorbancia de una solución es proporcional a la concentración del soluto en la muestra. Se expresa matemáticamente como:

$$A = \varepsilon \times (\text{soluto}) \times l$$

donde:

- l= es la longitud, en cm, de la cubeta
- (soluto) = es la concentración del soluto. Se emplean cubetas donde el volumen de medida es fijo, de forma que la relación entre concentración de soluto y cantidad de soluto es directa y sencilla.
- ε es el coeficiente de extinción molar del soluto. Es una propiedad inherente a cada tipo de molécula, y por tanto es un valor empírico, distinto para cada sustancia.

La ley de Lambert-Beer sólo se mantiene válida hasta un cierto valor de absorbancia. Por encima de ese valor, la propia absorción impide que la luz incidente alcance por igual a todo el recorrido de la cubeta, haciendo que se pierda la linearidad de la relación. Por tanto, medidas de absorbancias superiores a 0,7 deben ser ignoradas en determinaciones de concentración.

El valor de absorbancia de la muestra (A) depende de la relación entre la intensidad de la iluminación incidente en el detector en ausencia (I_o) y presencia (I_t) de la muestra de acuerdo con la fórmula:

$$A = \log 10 \frac{Luz\ incidente\ I_o}{Luz\ transmitida\ I_t}$$

Asociado al concepto de absorbancia, se

define el de transmitancia, como la luz que alcanza el detector.

La transmitancia (T) de la muestra viene dada por: $T = I_t/I_o$

La transmitancia puede tener cualquier valor entre 0 y 1 y se expresa a menudo como un porcentaje (0 - 100%).

Por tanto, la transmitancia y la absorbancia se relacionan mediante la siguiente fórmula:

$$A = -\log 10T$$

Elementos de un espectrofotómetro

Todos los espectrofotómetros comprenden los siguientes elementos:

a) Fuente de luz de longitud de onda apropiada. Las más comunes son de tungsteno - halógenas para utilizar entre 350 y 900 nm, y de deuterio para la región UV (200 - 400 nm).
b) Un monocromador o filtro óptico, que selecciona la longitud de onda de interés.
c) Un compartimento donde colocar la muestra objeto de estudio. Inicialmente, debe colocarse una muestra blanco en ese compartimento; en algunos casos, existen compartimentos separados para el blanco y la muestra.
d) Un detector, normalmente un fotomultiplicador, que mide la luz emitida por la muestra.
e) Asociado al tipo de espectrofotómetro, está la elección de la cubeta. Generalmente son de 1 cm de paso óptico y de 1 ml de volumen. Son prismáticas, y el recorrido de la luz se efectúa a través de 2 caras determinadas. También existen cubetas de 3 ml y de 0,5 ml para acoplar muestras preparadas en volumenes diferentes y que no deban concentrarse o diluirse. Respecto a la elección del material (vidrio, cuarzo o plástico) viene dictada por la longitud de onda a la que se realiza la medición (UV o visible). Sólo el cuarzo permite la medición por debajo de los 360 nm. Para medidas múltiples de volumenes pequeños, pueden realizarse determinaciones múltiples simultáneas en placas, donde el espetrofotómetro lee las absorbancias sobre una placa de pocillos, en lugar de en una cubeta convencional.

Posibilidades cuantitativas de las determinaciones espectrofotométricas

La medición espectrofotométrica es una técnica sensible y rápida muy adecuada para la cuantificación de biomoléculas en disolución. Si se emplea en su forma directa es una técnica no desnaturalizante que permite cuantificar la concentración de proteínas y ácidos nucleicos mediante determinación UV respectivamente a 280 y 260 nm. Se han desarrollado técnicas indirectas mucho más sensibles, basadas en la modificación química de proteínas con compuestos que cambian sus propiedades ópticas mediante la unión covalente a proteínas: el Bradford, el Lowry y el BCA, esencialmente. La rapidez de estas determinaciones hace que la detección espectrofotométrica sea la técnica más habitual, y casi la única, de cuantificar de

MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS DE DETECCIÓN DE MACROMOLÉCULAS

	Tipo de molécula	Técnica	Longitud de onda	Rango de detección
Métodos no modificantes	Proteínas	A_{280}	UV	10 µg
	Ácidos nucleicos	A_{260}	UV	5 µg
Métodos modificantes	Proteínas	Bradford	Visible	1 µg
	Proteínas	Lowry	Visible	1 µg
	Proteínas	BCA	Visible	1 µg

forma sensible, rápida y fiable la concentración de una disolución que contenga proteínas. Para mejorar la precisión del método, siempre se emplea un estándar (generalmente de albúmina) para realizar una recta patrón de referencia sobre la cual interpolar los datos empíricos de absorbancia.

Cromatografía

CROMATOGRAFÍA

EL REPARTO EN CROMATOGRAFÍA

Un objetivo esencial de la bioquímica es la separación de los compuestos biológicos. La cromatografía es una de las técnicas más efectivas para realizar este propósito, cuyo nombre hace referencia al uso para el que inicialmente se destinó, que fue la separación de pigmentos vegetales. Existen muchos tipos de cromatografía -de adsorción, de reparto, de intercambio iónico y de tamiz molecular- y muchas técnicas especializadas para usar estos diferentes tipos -cromatografía en columna, en papel, de capa fina y de gases. Cada uno de estos tipos explota las propiedades de las macromoléculas con el fin de poder realizar una separación efectiva. Además, algunas técnicas cromatográficas también pueden utilizarse como técnicas de análisis.

En general, la cromatografía es una técnica de separación en la que las sustancias se colocan en un sistema que consta de dos componentes distinguibles por métodos físicos -una **fase móvil** o y otra **estacionaria**- y las diferentes moléculas se separan debido a diferencias de distribución o reparto entre las dos fases citadas. El movimiento relativo de cada molécula es el resultado de un equilibrio entre la fuerza de transmisión (es decir, el movimiento de la fase móvil) y las fuerzas de retención. Este fenómeno viene descrito por el **coeficiente de reparto**, o sea, la tendencia relativa del soluto va a disolverse o migrar hacia las dos fases.

Dos casos típicos de cromatografía de reparto son la cromatografía en papel y la de capa fina. En los dos casos el reparto se establece entre una fase móvil y una fija, que suele ser el agua, que está adsorbida a una matriz inerte. La cromatografía de reparto también puede realizarse en columnas, utilizando una matriz que no adsorba los solutos. Los materiales de soporte más corrientes son la tierra de diatomeas (Celita), el gel de sílice, la celulosa en polvo y algunos dextranos que forman tramas (Sephadex). Probablemente el método más corriente para contener la fase estacionaria o soporte es una columna. Una columna cromatográfica consiste en un tubo que se llena con el material de la fase estacionaria, más un disolvente. A continuación se coloca un pequeño volumen (es decir, una capa delgada) de

TIPOS ESENCIALES DE CROMATOGRAFÍA

	Nombre	Base de la separación	Subtipo
REPARTO	Cromatografía de reparto (líquido o de gases)	Solubilidad	Fase normal (fase estacionaria apolar)
			Fase reversa (fase estacionaria polar)
	Filtración molecular	Penetración en poros de tamaño definido	
DE INTERACCIÓN	Intercambio iónico	Interacción electrostática	Catiónica
			Aniónica
	Cr. de afinidad	Afinidad biológica	
	Cr. de adsorción	Inespecífica	

la muestra sobre la fase estacionaria, y se le deja penetrar en la columna. El cromatograma se desarrolla entonces dejando fluir un disolvente (la fase móvil) a través de la columna. Este último proceso recibe el nombre de **elución** de la columna. Según se van moviendo las diferentes sustancias a través de la columna, se van separando y aparecen en el eluído cuando ha atravesado la columna una cantidad determinada de líquido. El volumen total de material de la columna, tanto sólido como líquido, recibe el nombre de volumen del lecho. El volumen de la fase móvil es el volumen vacío o de retención. La cantidad de líquido que debe añadirse para producir un pico de un soluto concreto en el efluente se llama volumen de elución.

La forma en la que se prepara el lecho de una columna se denomina **empaquetamiento**. Es muy importante que el lecho sea homogéneo y no presente burbujas, grietas o espacios entre las paredes. El efecto normal de este acanalamiento es la distorsión del patrón de elución, de forma que una sustancia aparece en picos múltiples, así como el engrosamiento de los picos. Ello es el resultado del movimiento rápido de la fase móvil a través de la columna en estas desigualdades, y el restablecimiento del reparto o la adsorción en un nuevo punto.

Elución

El líquido que abandona la columna (el efluente) se recoge, por lo general, en fracciones discretas utilizando un colector automático. Los componentes que ya están separados se encuentran e identifican titulando alícuotas de cada fracción -haciendo mediciones espectroscópicas, pruebas químicas, de radiactividad, etc. En los casos en que el análisis se realiza midiendo la absorción de la luz, se utiliza un espectrofotómetro de registro continuo. La muestra pasa a través de un tubo antes del fraccionamiento, se mide la absorbancia en la longitud de onda apropiada y se representan los valores en un registrador gráfico de forma continua.

Las columnas pueden ser eluidas de tres formas: el método más sencillo consiste en un **flujo continuo** del disolvente a través de la columna. Este método es de uso corriente en la cromatografía de intercambio iónico y en la cromatografía en gel.

La **elución discontinua** se utiliza, en general, cuando la columna funciona con propósitos preparativos. En este caso, la columna se eluye con una serie consecutiva de disolventes. Este método tiene la ventaja de que se pueden disponer las condiciones de forma que un material concreto pueda eluirse en un volumen bastante pequeño.

El tercer método es la **elución en gradiente**, que consiste en cambiar la relación de dos disolventes o en elevar la concentración de uno o más de los componentes del disolvente (p.e., la concentración de sales). Este último método es el más utilizado en las columnas de adsorción y de intercambio iónico.

CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

La cromatografía en papel es un tipo de cromatografía de reparto, en la que el soporte de celulosa es simplemente una hoja de papel. La celulosa contiene una gran cantidad de agua enlazada, incluso cuando ha sufrido procesos de deshidratación con lo cual el agua entra en el proceso de separación. De hecho, el reparto tiene lugar entre el agua y la fase móvil.

Método experimental de la cromatografía en papel

Acompañando a las diferencia entre los tipos de soporte (columna o papel) también tiene lugar un cambio en las metodologías. En la cromatografía en papel no hay eluyente y las sustancias se distinguen entre sí por sus posiciones relativas en el papel después de que el disolvente ha recorrido una distancia dada.

Se coloca un volumen pequeño (del orden de algunos μl) de la disolución de la mezcla que se debe separar, en un punto marcado en

una tira u hoja de papel y se seca. El punto define el origen. A continuación, el papel se coloca en una cámara cerrada y uno de sus extremos se sumerge en un disolvente apropiado (la fase móvil). La capilaridad arrastra al disolvente a través del papel y disuelve la mezcla cuando pasa por el origen, con lo que los componentes se mueven en la dirección del flujo del disolvente.

Una variante muy útil es la cromatografía bidimensional en papel. En este método, después de haberse realizado la cromatografía en una dirección, se seca el papel y se vuelve a cromatografiar en ángulo recto con respecto a la dirección original del flujo, utilizando un disolvente diferente. De esta forma las sustancias se separan en función de dos criterios distintos, aumentando enormemente la resolución de la técnica.

Detección e identificación

Las manchas en los cromatogramas de papel pueden detectarse por su color, fluorescencia, por las reacciones químicas que tienen lugar tras pulverizar el papel con distintos reactivos, o por la radiactividad de las manchas utilizando películas de rayos X. La identificación se basa, por lo general, en la comparación con un estándar de R_f conocido o por elución. En caso necesario puede llegarse a eluir cada mancha revelada, recortándola y sumergiendo el papel en un disolvente apropiado. Este proceso permite, además, cuantificar las moléculas resueltas en la cromatografía.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

La cromatografía en capa fina (TLC, "thin-layer chromatography") se desarrolló a partir de la cromatografía en papel adaptando otro tipo de materiales, distintos de la celulosa, de mayor utilidad con sustancias apolares. A nivel técnico, la cromatografía en capa fina tiene las ventajas de la realizada en papel pero ampliando su utilización a otros materiales, incluyendo sustancias inorgánicas como el gel de sílice, óxido de aluminio, tierra de diatomeas y silicato de magnesio y sustancias orgánicas como la celulosa, poliamida y polietileno en polvo. La fase estacionaria suele ser una lámina de unos 0,25-0,5 mm de adsorbente extendida de forma uniforme sobre la superficie de una placa.

En lo referente al desarrollo cromatográfico, las placas se tratan como en la cromatografía en papel. La muestra se aplica con una micropipeta y se seca. La placa de TLC se coloca en una cámara que contiene un disolvente y se desarrolla por cromatografía ascendente. Cuando el frente del disolvente ha alcanzado casi el extremo superior, se quita la placa de la cámara y se seca. Una vez seca la placa puede volverse a cromatografiar en una dirección perpendicular con un segundo disolvente para trabajos bidimensionales.

Las manchas se localizan, al igual que en la cromatografía en papel, por su color natural, por fluorescencia, o pulverizando reactivos, que al reaccionar con las sustancias que se encuentran en las manchas, producen una reacción medible. Pulverizados de este tipo que se utilizan normalmente son la ninhidrina para los aminoácidos, la rodamina B para los lípidos, el cloruro de antimonio para los esteroides y terpenoides, el ácido sulfúrico más calor para casi todas las sustancias orgánicas (produce carbonizaciones), permanganato potásico en ácido sulfúrico para los hidrocarburos, vapor de bromo para las olefinas, y así sucesivamente. El material puede eluirse del cromatograma rascando el adsorbente y eluyendo el polvo con un disolvente apropiado. Esta variación es especialmente útil para determinaciones cuantitativas cuando la sustancia que se está separando está marcada radiactivamente.

La cromatografía en capa fina se usa extensamente porque, comparada con la cromatografía en papel o en columna, ofrece las siguientes ventajas: un mayor poder de resolución debido a que las manchas son mas pequeñas, una mayor velocidad de separación, un mayor número de posibles adsorbentes, una detección fácil y posibilidad de aislamiento de las sustancias a partir del cromatograma.

CROMATOGRAFÍA DE GASES

En los tipos de cromatografía de reparto descritos hasta ahora, la muestra es arrastrada por una fase móvil líquida sobre una fase estacionaria líquida, en la que el líquido está inmovilizado por adsorción o absorción a un soporte sólido. En la cromatografía de gases (GLC, "gas-liquid chromatography") la fase móvil es un gas; la fase estacionaria es un líquido adsorbido a la superficie interna de un tubo o columna (funcionamiento tubular o capilar) o a un soporte sólido (funcionamiento en columna empaquetada) como la tierra de diatomeas, teflón en polvo o finas cuentas de vidrio. En general, el líquido se aplica como un sólido disuelto en un disolvente volátil. La muestra, que puede ser cualquier compuesto capaz de ser volatilizado sin sufrir descomposición, se introduce como líquido con un gas inerte - helio, argón o nitrógeno - y a continuación se calienta. Esta mezcla gaseosa pasa a través de un tubo. En el funcionamiento en columna empaquetada el tubo tiene 1 a 20 metros de longitud y 0,5 cm de diámetro. En el método capilar la longitud es de 30 a 100 metros. Para conseguir resoluciones muy elevadas, se utilizan sistemas capilares de dos kilómetros de tubo. Los compuestos vaporizados se redistribuyen continuamente entre la fase móvil gaseosa y la fase estacionaria líquida, de acuerdo con sus coeficientes de reparto y son, en consecuencia, cromatografiados. Al final de la columna se usa un detector apropiado, que va a indicar el orden de salida de los distintos compuestos que se separan. Si se indican con precisión las condiciones cromatográficas (flujo de gas, temperaturas, etc), la salida de cada molécula se producirá tras un tiempo determinado, cuyo valor sirve como parámetro de identificación al utilizar la cromatografía de gases como técnica analítica.

Con la cromatografía de gases se consiguen excelentes separaciones. La velocidad y la sensibilidad son extraordinarias, siendo detectables cantidades del orden de 10^{-12} gramos para muchas sustancias. Debido a que la rapidez del revelado de los cromatogramas depende de la velocidad de difusión entre las fases móvil y estacionaria, y debido a que la velocidad de difusión de los gases es mucho mayor que la de los líquidos, el cromatograma de gases puede ser realizado unas mil veces más rápido que el equivalente en la cromatografía líquida en columna, Por consiguiente, las separaciones pueden obtenerse, con frecuencia, en menos de un minuto.

Su principal utilización con muestras biológicas es la separación de alcoholes, ésteres, ácidos grasos y aminas. Por lo tanto, es de una gran utilidad en el estudio del metabolismo intermediario y en el análisis del mecanismo de acción de las enzimas. Se ha utilizado en gran escala para identificar los componentes aromatizadores de los alimentos y vinos y para la detección de pesticidas en materiales biológicos.

CROMATOGRAFÍA EN GEL

La cromatografía en gel (que algunas veces recibe el nombre de cromatografía de tamiz

VENTAJAS DE LA CROMATOGRAFÍA DE REPARTO EN CAPA FINA SOBRE LA CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

- Fase estacionaria muy finamente dividida	- Mayor rapidez de desarrollo
- Aumento de superficie entre fases móvil y estacionaria	- Mayor eficacia de separación
- Ausencia de estructura fibrosa	- Menor difusión de los solutos
- Mayor resistencia a disolventes	- Mayor versatildiad

molecular) es un tipo especial de cromatografía de reparto, en la que la separación se basa en el tamaño molecular.

La cromatografía en gel se basa en el uso de unas partículas esféricas muy finas de una sustancia inerte, que contienen poros muy pequeños. Estas particulas se empaquetan en una columna cromatográfica. Si se hace pasar una disolución con moléculas de distintas dimensiones a través de la columna, las moléculas con un tamaño mayor que el de los poros se moverán sólo en el espacio que queda entre las partículas, y por lo tanto, no sufrirán retraso en su recorrido a través del material de la columna. Sin embargo, las moléculas con un tamaño menor que el de los poros difunden hacia el interior y el exterior de las partículas con una probabilidad que aumenta a medida que disminuye el tamaño molecular. Debido a ello, su movimiento de descenso a través de la columna se hace más lento. La probabilidad de penetración es el factor principal que determina la velocidad de movimiento a través de la columna, puesto que el material que forma las partículas (es decir, el gel) no adsorbe las moléculas. Por lo tanto, las moléculas son eluídas de la columna por orden de tamaños decrecientes.

En general, el tamaño de las macromoléculas está en función de su peso molecular, por lo cual la cromatografía en gel suele separar moléculas de forma ordenada según sus pesos moleculares. Esta afirmación deja de ser cierta cuando se comparan proteínas con pesos moleculares parecidos pero de formas geométricas muy distintas (p. ej. globular y cilíndrica), en cuyo caso salen retrasadas las moléculas cuyo avance se retrasa por introducirse en los poros de las partículas.

En un análisis detallado de la cromatografía en gel, queda muy claro que este efecto estérico, aunque es el principal factor, no explica por sí solo el comportamiento cromatográfico de todas las moléculas. Otro factor importante es la carga de la molécula, aunque ésta se manifiesta sólo en condiciones de baja fuerza iónica, en las que las moléculas pequeñas, fuertemente cargadas, parecen quedar excluidas de los poros, independientemente de que su tamaño sea lo suficientemente pequeño. Este efecto se debe, con probabilidad, a la repulsión electrostática entre las moléculas, que limita el número de moléculas en un poro en cualquier momento dado. De igual manera los fenómenos de adsorción, y los de difusión, influyen sobre la migración de cada molécula.

Tipos de geles

Los geles o resinas que se utilizan como tamices moleculares constan de polímeros entrecruzados inertes, que no se unen ni reaccionan con el material analizado y que no deben presentar carga eléctrica. El espacio del interior del gel está ocupado por un líquido que rellena la mayor parte del gel.

Los geles de uso corriente son de tres tipos: dextrano, agarosa y poliacrilamida. Se utilizan para disoluciones acuosas.

El dextrano es un polisacárido que puede prepararse con diversos grados de entrecruzamiento para controlar el tamaño del poro.

La agarosa es un polímero lineal de galactosa que se disuelve en agua hirviendo y forma un gel cuando se enfría. La concentración del material en el gel determina el tamaño de los poros que son mucho mayores que los de Sephadex. Debido a ello, es útil para el análisis o la separación de grandes proteínas globulares o grandes moléculas lineales como el DNA.

Los geles de poliacrilamida se preparan entrecruzando acrilamida con N, N´metilén-bisacrilamida. En este caso el tamaño de poro también viene determinado por el grado de entrecruzamiento. Tienen la ventaja sobre los dextranos de poder obtenerse en un amplio margen de tamaños de poro.

El tamaño de poro determina el margen de pesos moleculares en los que tiene lugar el fraccionamiento. Cada tipo de partícula viene definido por un tamaño de poro, que define el rango de moléculas que cada gel es capaz de

resolver. Básicamente, establece una gradación entre las proteínas cuyo tamaño les permite entrar libremente entre los poros, las que nunca entran debido a su excesivo volumen, y las de tamaño intermedio entre esas dos situaciones.

Además, los gránulos de gel vienen en diversos tamaños: grueso, medio, fino y superfino. Cuanto mayor es el tamaño, mayor es la velocidad de flujo y menor la resolución. Por lo tanto, se utiliza el gránulo superfino si se precisa una resolución máxima (por ejemplo, para un trabajo analítico). El gránulo fino se recomienda para la mayoría de los trabajos preparativos en los que las columnas son bastantes largas y la velocidad de flujo es de cierta importancia.

Estimación del peso molecular

Se ha observado, con distintos tipos de geles, que la representación de la migración en función del logaritmo del peso molecular da como resultado una línea recta dentro de unos ciertos márgenes.

Para determinar un peso molecular desconocido sólo hay que incluir algunas moléculas de peso molecular conocido con los cuales se puede definir la línea recta, calculándose entonces el valor del peso molecular de la muestra problema por interpolación. La precisión de suele ser del orden de $\pm$ 10%.

La determinación de la distribución de pesos moleculares es, con frecuencia, importante en la caracterización de polímeros naturales y sintéticos y puede realizarse mediante la cromatografía en gel. Su principal ventaja comparada con otros métodos físicos, como la centrifugación es que no es necesario partir de preparaciones tan puras y que es posible determinar la distribución midiendo simplemente la cantidad de sustancia en función del volumen de elución.

CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Un **intercambiador iónico** es un sólido que tiene enlazados químicamente grupos cargados, a los que se unen iones por fuerzas electrostáticas; puede intercambiar estos iones por iones de una disolución acuosa. Gracias a estas propiedades, los intercambiadores iónicos pueden utilizarse en columnas de cromatografía para separar moléculas de acuerdo con su carga.

El principio básico de la cromatografía de intercambio iónico es que las moléculas cargadas se adsorben a los intercambiadores de forma reversible, de modo que dichas moléculas pueden ser unidas o desunidas cambiando el ambiente iónico. La separación mediante intercambiadores iónicos se realiza, por lo general, en dos fases: en la primera, las sustancias a separar se unen al intercambiador utilizando

TIPOS DE RESINAS MAS UTILIZADAS EN LA CROMATOGRAFÍA EN GEL

COMPUESTO QUÍMICO	NOMBRE COMERCIAL	RANGO DE SEPARACIÓN (KDa)
Dextrano	Sepadex G-25	1000 - 5000
Dextrano	Sepadex G-75	3000 - 70000
Poliacrilamida	Bio-gel P-2	200 - 2000
Poliacrilamida	Bio-Gel P-150	15000 - 150000
Agarosa	Sepharosa 4B	$3 \cdot 10^5$ - $3 \cdot 10^6$
Agarosa	Bio-Gel A-15 M	30000 - $15 \cdot 10^6$

condiciones que originan una unión fuerte y estable; a continuación, se eluye la columna con tampones de diferente pH o diferente fuerza iónica, de forma que los componentes del tampón compiten con la muestra por los sitios de unión.

Propiedades de los intercambiadores iónicos

Un intercambiador iónico es, por lo general, un retículo tridimensional o matriz que tiene grupos cargados unidos covalentemente. Si un grupo está cargado negativamente, podrá intercambiar iones positivos y será un intercambiador de cationes o catiónico. Un grupo típico que se utiliza en los intercambiadores de cationes es el grupo sulfónico, SO_3^-. Si se une un H^+ al grupo, se dice que el intercambiador se encuentra en forma ácida, y puede, por ejemplo, intercambiar un H^+ por un Na^+ o dos H^+ por un Ca^{2+}. El grupo ácido sulfónico es un intercambiador de cationes fuertemente ácido. Otros grupos de utilización corriente son el carboxilo y el hidroxilo fenólico, dos intercambiadores catiónicos débilmente ácidos. Si el grupo cargado es positivo por ejemplo, un grupo amino cuaternario es un intercambiador de aniones o aniónico básico. Los intercambiadores aniónicos débilmente básicos más corrientes son grupos amino alifáticos o aromáticos.

La capacidad aprovechable de un intercambiador es la capacidad que realmente tiene de participar en una reacción de intercambio bajo unas condiciones experimentales determinadas, (es decir, pH fuerza iónica). Por ejemplo, la extensión con la que un intercambiador iónico está cargado depende del pH. Otro factor es la fuerza iónica, debido a que los iones pequeños situados cerca de los grupos cargados compiten con las moléculas de la muestra por estos grupos. Esta competición es bastante eficaz si la muestra es una macromolécula, debido a que el elevado coeficiente de difusión del ion implica un mayor número de encuentros. Por lo tanto, conforme aumenta la concentración del tampón, la competición se hace más intensa.

Generalmente, los grupos cargados están unidos a matrices del mismo tipo que las empleadas en la cromatografía en gel. La porosidad de la matriz es una característica importante, debido a que los grupos cargados se encuentran dentro y fuera de la matriz. Las moléculas mayores pueden ser incapaces de penetrar en los poros, de forma que la capacidad disminuye según aumentan las dimensiones moleculares. Los intercambiadores iónicos vienen en distintos tamaños de partícula que reciben el nombre de tamaño de malla. Las mallas más finas presentan una mayor relación superficie-volumen y, por lo tanto, aumentan la capacidad del intercambiador. Por otra parte, las mallas finas implican una velocidad de flujo menor, con lo que puede aumentar la extensión por difusión.

Elección del intercambiador iónico

La primera elección que se debe hacer es si el intercambiador será aniónico o catiónico. Si los materiales que se deben unir a la columna tienen una única carga la elección es clara. No obstante, muchas sustancias (p.ej. proteínas) presentan cargas positivas y negativas y su carga neta depende del valor del pH. En tales casos el factor principal es la estabilidad de la sustancia a diversos valores de pH. La mayoría de las proteínas son estables dentro de un margen de pH determinado (es decir, hay un margen en el que no se desnaturalizan), en el que están cargadas positiva o negativamente. Por lo tanto, si una proteína es estable a valores de pH por encima del punto isoeléctrico, se debe utilizar un intercambiador aniónico; si es estable a valores de pH situados por debajo del punto isoeléctrico, debe utilizarse un intercambiador catiónico.

Elección del pH, tampón y condiciones iónicas

Debido a que los tampones están formados por iones, también pueden intercambiar cargas en función del pH. Para evitar estos problemas se deben utilizar tampones catióni-

cos con los intercambiadores aniónicos y tampones aniónicos con los intercambiadores catiónicos. Debido a que la fuerza iónica es un factor a tener en cuenta para la unión, debe escogerse un tampón con elevada capacidad de tamponación, de modo que su fuerza iónica pueda ser lo suficientemente baja.

El principio fundamental de la cromatografía de intercambio iónico es que la afinidad de una sustancia por el intercambiador depende de las propiedades eléctricas del material y de la afinidad relativa de otras sustancias cargadas que se encuentren en el disolvente. Por lo tanto, el material unido puede ser eluido cambiando el pH, y alterando así la carga del material, o añadiendo materiales que compitan con la muestra, por ejemplo, sales. Debido a que las diferentes sustancias tienen diferentes propiedades eléctricas, las condiciones para la liberación dependen de cada especie molecular. En general, para obtener una buena separación, los métodos de elección son la elución con un gradiente continuo de fuerza iónica o la elución por etapas. (No se utiliza un gradiente de pH porque es difícil obtener dicho gradiente sin aumentar a la vez la fuerza iónica). Para un intercambiador aniónico, se aumenta el pH y la fuerza iónica o la fuerza iónica exclusivamente. Para un intercambiador catiónico se aumentan al mismo tiempo el pH y la fuerza iónica.

CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

La cromatografía de afinidad es un tipo de cromatografía basada en la interacción entre la sustancia que debe aislarse y una molécula a la que ésta pueda unirse de forma específica (un ligando). El material de la columna se sintetiza por unión covalente del ligando (que puede se una macromolécula o una molécula pequeña) a una matriz insoluble. A partir de este momento la columna es capaz de unir de manera específica, a partir de la disolución, la sustancia que va a ser aislada. La elución se realiza cambiando las condiciones, de forma que la unión ya no tenga lugar.

Para poder llevar a cabo la cromatografía de afinidad deben cumplirse varias condiciones:

1) la matriz no debe adsorber por sí misma moléculas de forma significativa .
2) el ligando debe unirse a la matriz sin alteración de sus propiedades de unión.
3) debe escogerse un ligando cuya unión sea fuerte.
4) debe ser posible la elución sin destrucción de la muestra. Una matriz muy útil es la agarosa, debido a que presenta una adsor-

PRINCIPALES GRUPOS FUNCIONALES ASOCIADOS A LA CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

TIPO DE INTERCAMBIADOR	GRUPO QUÍMICO	NOMBRE COMERCIAL
Catiónico fuerte	Sulfopropilo	SP-Sphadex
Catiónico fuerte	Ácido sulfónico	Bio-Rex 40
Catiónico débil	Carboximetilo	CM-Celulosa
Aniónico fuerte	Dietil-(2-hidroxi-propilaminoetilo)	QAE-Sephadex
Aniónico débil	Dietil-aminoetilo	DEAE-Celulosa
Aniónico débil	Aminas terciarias	AG-3
Aniónico débil	Polietilenimina	PEI-Celulosa

ción mínima, mantiene unas buenas propiedades de flujo después del enlace químico con el ligando y tolera los extremos de pH y fuerza iónica, así como el cloruro de guanidinio 7M y la urea, que se necesitan a menudo para una elución efectiva.

El procedimiento de una cromatografía de afinidad es semejante al de la cromatografía de intercambio iónico: se hace pasar una disolución que contiene la proteína que queremos separar del resto a través de una matriz que lleva acoplado covalentemente el ligando, al cual se une. Se lava exhaustivamente la columna, en condiciones que no permiten (idealmente) la unión de ninguna molécula adicional a la columna, y a continuación se hace pasar la disolución de elución, para recuperar la molécula de interés.

En el caso de la cromatografía de intercambio iónico, la elución se hacía mediante cambio en las condiciones salinas o de pH. En la cromatografía de afinidad, generalmente se hace pasar un exceso de ligando, que compite por la sustancia problema con las moléculas iguales unidas a la columna. Por lo general, es necesario realizar un paso adicional de diálisis o filtración molecular tras la elución para eliminar el exceso de ligando en disolución de la preparación de la muestra.

La cromatografía de afinidad es seguramente la técnica cromatográfica de mayor resolución y con mejores resultados ya que aprovecha una característica biológica única (unión a su ligando) de una biomolécula en concreto. Su uso está limitado a poder disponer de un ligando que se una a dicha molécula, que esté reconocido como tal y que cumpla algunas propiedades:

- Especificidad de unión limitada a una sola molécula

- Estabilidad en disoluciones acuosas, en diversas condiciones de pH, fuerza iónica, etc.

- Capacidad de unión a la matriz inerte sin que esto altere sus propiedades químicas ni sus propiedades de unión.

- Bajo peso molecular (o, al menos, bien diferenciado de la molécula de unión) que permita la separación entre estas dos especies tras la elución.

La cromatografía de afinidad logra en un solo paso una resolución tan buena como varias técnicas distintas realizadas unas a continuación de las otras. Por lo tanto, es la técnica preparativa o analítica de elección, siempre que sea posible.

TIPOS DE CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Tipo de columna	Base de la separación	Método de elución
Filtración molecular	Peso Molecular	Gravedad
Intercambio iónico	Carga de los grupos ionizables	Gradiente de pH, gradiente de fuerza iónica
Afinidad	Especificidad de interacción entre moléculas	Exceso molar de ligando

Electroforesis

ELECTROFORESIS

La electroforesis consiste en la separación de macromoléculas biológicas cargadas, gracias a su diferente comportamiento en un campo eléctrico. En ese campo eléctrico, los cationes (+) se dirigen al cátodo (-), y los aniones (-) al ánodo (+).

Definimos la movilidad electroforética (μ) como la velocidad de la partícula por unidad de campo eléctrico (E).

$$\mu = V/E$$

La movilidad depende de varios factores. Los más importantes son:

a) Carga de la partícula (Q): a mayor carga, mayor μ.
b) Fuerza iónica del medio (I): a mayor I, menor μ.
c) Temperatura del medio (T): a mayor T, mayor μ.

El tipo más habitual de electroforesis es la llamada de zona, en la cual la migración se realiza sobre un soporte. Inicialmente fue un soporte de papel, habiéndose sustituido actualmente por la electroforesis en gel, fundamentalmente de poliacrilamida o de agarosa. La electroforesis es una técnica esencialmente analítica, que permite determinar algunas propiedades de las moléculas (peso molecular, punto isoeléctrico, movilidad) o bien el número mínimo de componentes de una mezcla. No obstante, en algunas ocasiones también puede utilizarse como técnica preparativa.

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

Los geles se forman por una reacción química de polimerización de moléculas de acrilamida. En esta reacción intervienen las siguientes moléculas:

a) Acrilamida: Componente fundamental capaz de participar en una reacción química de polimerización.

$$CH_2 = CH - CO - NH_2$$

b) Bis acrilamida: Forma entrecruzamientos entre cadenas de acrilamida en polimerización, favoreciendo el desarrollo de una malla tridimensional.

$$CH_2 = CH - CO - NH - CH_2 - NH - CO - CH = CH_2$$

c) TEMED:

Catalizador $(CH3)_2 - N - CH_2 - N - (CH_3)_2$

d) Persulfato amónico (APS)

Iniciador: $NH_2(S_2O_8)$

En disolución acuosa, el APS se convierte en radical libre y transmite su condición a la acrilamida, que comienza a formar polímeros, junto con la bisacrilamida.

El oxígeno inhibe la reacción de polimerización de la acrilamida, por lo que el gel en formación se aisla del aire, cubriendo con una capa de agua o alcohol.

El tamaño de los poros se controla variando la concentración de acrilamida, desde el 3% hasta el 20%. A mayor concentración, menor tamaño de poro. A veces, se consigue mejorar la resolución de la electroforesis realizando un gel donde la concentración de acrilamida no es fija sino que sigue estableciendo un gradiente continuo.

Las principales ventajas de la poliacrilamida como sustancia capaz de formar geles son:

1) Elección de la forma del gel.
2) Transparentes (no absorben a 280 nm), lo que permite la densitometría.
3) Elección del electrolito.
4) No se producen fenómenos de adsorción ni electroendosmosis
5) Carreras rápidas (no hay evaporación).

6) Amplia posibilidad de tinciones.
7) Fácil elección del tamaño del poro.

Preparación de las muestras de proteínas para PAGE

Condiciones nativas:

Las proteínas se separan por tamaño y carga. La carga de las proteínas viene determinada por la composición en aminoácidos y es función del pH. En condiciones nativas, por tanto, sólo migrarán las proteínas con carga neta al pH de electroforesis. De entre ellas las proteínas de mayor tamaño encuentran más dificultades para atravesar los poros de la red de acrilamida estableciéndose un patrón de migración característico.

Condiciones desnaturalizantes:

En estas condiciones se trata de mantener una relación carga/masa constante, para que las proteínas se separen únicamente en función de su tamaño. La separación se basa en la filtración molecular, por la cual atraviesan mejor la malla las proteínas menores, y se retrasan las de mayor volumen. Este es el caso más frecuente. La composición de un tampón "estándar" que consiga desnaturalizar las muestras de proteínas para ser sometidas a electroforesis ha de incluir las siguientes sustancias:

Dodecil sulfato sódico (SDS): Detergente aniónico que se une a las proteínas, confiriendo carga negativa. La unión es constante (1,4 gr SDS/gr de proteína), lo cual consigue que la relación carga/masa sea constante.

Glicerol: Aumenta la densidad de la muestra, facilitando su carga en el gel.

Azul de bromofenol: Colorante de muy alta movilidad. Es un anión, y su movilidad marca el frente de electroforesis.

Si se trabaja con proteínas oligoméricas, o con puentes disulfuro intracatenarios, la desnaturalización completa se consigue añadiendo un agente reductor como el β-mercaptoetanol o el ditiotreitol (DTT).

Existe una relación aproximadamente lineal entre la movilidad de un componente y el logaritmo de su masa. Así, podemos obtener el peso molecular de las subunidades protéicas a partir de una recta patrón, comparando su movilidad con la movilidad de los marcadores de peso molecular conocido. Esta relación es efectiva entre aproximadamente los 8.000 Da y 200.000 Da.

La desnaturalización con SDS, además de dotar todas las proteínas de carga positiva, elimina en gran medida su estructura secundaria y terciaria así como la mayoría de las interacciones con otras proteínas, lo cual ayuda a que la separación se realice en función de cada peso molecular.

REACTIVOS QUÍMICOS NECESARIOS PARA LA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS SDS-PAGE

SDS	- Agente desnaturalizante - Aporta carga negativa homogénea
Glicerol	- Aporta densidad a la muestra
Azul de Bromofenol	- Colorante de alta movilidad - Indica la posición del frente
β–mercaptoetanol	- Agente reductor de los puentes disulfuro inter o intracatenarios

Desarrollo de la electroforesis de proteinas en geles de poliacrilamida

Continua

La electroforesis más simple se lleva a cabo en un gel de acrilamida de composición uniforme. Este tipo de electroforesis, llamada continua, presenta problemas de resolución, ya que el volumen de muestra impide que todas las moléculas inicien la electroforesis en el mismo lugar al mismo tiempo.

Discontinua

En este tipo de electroforesis se consigue que todas las moléculas empiecen a separarse al mismo tiempo, desde el mismo lugar. Se consigue, por lo tanto, una mayor resolución. Se utiliza un gel dividido en dos fases:

1) Gel de separación:

Es el gel que se polimeriza primero, y se sitúa en la parte inferior. Se polimeriza en un tampón Tris-HCl a pH 8,8 y el porcentaje de acrilamida varía según las condiciones en cada caso. En este gel es donde se realiza la separación efectiva de las moléculas.

2) Gel de concentración:

Se polimeriza sobre el gel de separación en un tampón Tris-HCl, pH 6,8. En este gel se concentran los componentes para iniciar la separación en el mismo punto. El porcentaje de acrilamida es más bajo, ya que interesa que todas las proteínas penetren por igual en el gel concentrador.

El electrolito utilizado es un tampón tris/glicina a pH 8,8, tanto en la cubeta superior como en la inferior.

Las moléculas de glicina, a pH 8,8, se encuentran cargadas negativamente. Estos aniones glicina son los encargados de transmitir la corriente eléctrica.

Cuando los aniones de glicina entran en el gel de concentración, se encuentran en un medio a pH 6,8. A este pH, la glicina pierde su carga y deja de transportar corriente eléctrica: se crea un gradiente de voltaje que compensa la caída de la intensidad de corriente. En esta zona, la únicas moléculas capaces de transmitir la corriente son las proteínas de la muestra.

El gradiente de voltaje hace que las moléculas más alejadas del gel de separación se muevan a mayor velocidad; según se acercan al gel de separación, disminuyen su velocidad. Esto hace que todas las proteínas alcancen el gel de separación prácticamente al mismo tiempo, ayudadas también por el gran tamaño de poro.

ISOELECTROENFOQUE

En esta electroforesis las proteínas se separan en función de su **punto isoeléctrico** (pI). El punto isocléctrico de una proteína es el pH en el que esa proteína tiene carga neta cero. Lógicamente, las proteínas han de estar en condiciones no desnaturalizadas y especialmente en ausencia de detergentes.

Para esta separación, la electroforesis tiene lugar en un gradiente de pH, donde se genera un campo eléctrico. En ese campo, las proteínas comienzan a moverse según su carga eléctrica y migran hasta el punto de pH igual a su pI: entonces quedan con carga neta cero y se estabilizan.

El gradiente de pH se genera con anfolitos. Estos anfolitos son compuestos inertes, solubles en H_2O y de alta conductividad.

Se usan mezclas de **anfolitos** que cubren un rango de pI determinado. Al generar un campo eléctrico se distribuyen según su pI, y confieren al entorno un pH igual a su pI.

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Es una variante de las dos técnicas anteriores isoelectroenfoque y PAGE. Su principal ventaja es que la separación en dos dimensio-

nes se establece en base a las principales parámetros que diferencian a unas proteínas de otras: el tamaño y la distribución de cargas.

Las dos electroforesis diferentes, se realizan secuencialmente, y girando la segunda 90° con respecto a la primera.

1° Isoelectroenfoque: separamos por pI. (Primera dimensión).

2° Electroforesis discontinua en condiciones desnaturalizantes: separamos por tamaño molecular. (Segunda dimensión).

El resultado es un mapa completo donde quedan separadas casi completamente la mayoría de las proteínas unas de otras. Cada tipo celular posee su propio patrón bidimensional. Estos mapas son de mucha utilidad para caracterizar proteínas de las que no se conoce su identidad.

PROCEDIMIENTOS DE TINCIÓN

Para detectar las bandas de los distintos componentes separados, es necesario teñir las proteínas presentes en el gel. En general, es deseable que los agentes de tinción tiñan por igual cualquier proteína, de forma que pueda hacerse estimaciones cuantitativas. Las técnicas más habituales son:

Azul de Coomassie: En primer lugar, hay que proceder a fijar las proteínas al gel, para evitar la difusión. Para ello, incubamos con una solución de etanol/acético. A continuación, se procede a la tinción con el colorante azul de Coomasie. Después de este paso, todo el gel aparece teñido de azul intenso. Finalmente una nueva incubación con etanol/acético elimina la tinción excepto en las zonas donde hay proteína.

La sensibilidad de este método nos permite detectar bandas con 1 μg de proteína por mm^2.

Nitrato de plata ($AgNO_3$): Se utiliza cuando se trabaja con cantidades de proteínas menores, ya que es más sensible (unas 100 veces: 10 ng/mm^2).

Fluorescencia: Se suele utilizar fluorescamina, que al reaccionar con los grupos amino libres de la proteína da lugar a un compuesto fluorescente detectable. Es un método bastante sensible, aunque presenta varios inconvenientes sobre todo la pérdida de la fluorescencia con el paso del tiempo. Este método no nos permite conocer la cantidad precisa de una proteína, ya que no es cuantitativo: a mayor número de grupos amino libres (p.ej: lisina), mayor señal.

Autorradiografía: Es el método más sensible. Puede utilizarse cuando la muestra está marcada utilizando aminoácidos radiactivos (^{32}P, ^{125}I, ^{3}H, ^{35}S), que permitirán detectar las bandas incluso con cantidades ínfimas de pro-

BASE DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS EN DISTINTOS SISTEMAS

ISOELCETROENFOQUE	pI de las proteínas
SDS-PAGE (sin agentes reductores)	Peso molecular aparente (con puentes inter e intracatenarios)
SDS-PAGE (con agentes reductores)	Peso molecular aparente de los monomeros
ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL	pI y peso molecular aparente

teína. El gel se seca y se expone con una película sensible a rayos X. Las partículas radiactivas marcan la película, permitiendo observar las muestras después de revelar.

Con isótopos que emiten con baja intensidad (^{3}H, ^{14}C, ^{35}S) podemos amplificar la señal con fluorografía: El gel desecado se incuba con un flúor que aumenta la irradiación de partículas.

TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A SOPORTES SÓLIDOS

Las proteínas separadas en un gel pueden ser transferidas a un soporte sólido (una "membrana"). La ventaja principal es la versatilidad y la estabilidad de las proteínas en el soporte: las membranas son menos frágiles permiten la incubación con reactivos específicos y la realización de experimentos tiempo después haber resuelto una mezcla de proteínas en un gel.

Las membranas usadas suelen ser de nitrocelulosa de Nylon (más resistentes), y membranas hidrofóbicas (de PVDF).

Para transferir proteínas se emplea una corriente eléctrica (electrotransferencia). Al interponer una membrana con afinidad por las proteínas entre el gel y el ánodo (+), las proteínas que migran del gel gracias a sus cargas (-) quedan atrapadas.

Análisis de la transferencia

a) Tinción: Se suele usar Rojo Ponceau. Este es un método reversible, ya que se destiñe fácilmente con agua, y no interfiere con los tratamientos posteriores.

b) Inmunodetección: Normalmente, las proteínas transferidas son detectadas con ligandos específicos. Estos ligandos reconocen exclusivamente una proteína concreta, y sirven para revelar su presencia, cuando poseen una marca adicional (radiactiva, quimioluminiscente....). En la gran mayoría de los casos, el ligando es un anticuerpo específico que reconoce la proteína en estudio. Cuando este anticuerpo no esté marcado, se emplea un anticuerpo secundario específico del primero que presente un compuesto que otorga la señal de detección.

ELECTROELUCIÓN

Es un método utilizado para extraer del gel las proteínas que hemos separado por electroforesis. Se realiza en medio líquido, en un aparato especial donde se genera un campo eléctrico.

Se corta la banda del gel y se coloca en el cátodo (-). Al aplicar un campo eléctrico, la proteína abandona el gel y se mueve hacia el

COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS GELES

MÉTODO DE TINCIÓN	SENSIBILIDAD	CARACTERÍSTICAS
Comassie	1 $\mu g/mm^2$	- Rápido y sencillo - Es el menos sensible
Nitrato de plata	10 ng/mm^2	- Más sensible - Algo laborioso
Fluorescencia	-	- Poco cuantitativo - Bastante sensible - Manejo dificil
Marcaje radiactivo.	<1 ng/mm^2	- Extremadamente sensible - Requiere equipamiento especial

ánodo (+). Las proteínas se concentran en una cámara pequeña, cerrada por una membrana de diálisis que bloquea el paso hacia el ánodo.

ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

El DNA y el RNA son moléculas cargadas negativamente. La carga es debida a los grupos fosfato presentes en cada nucleótido en función de su tamaño, por lo que la relación carga/masa es constante. Esta propiedad permite separar los ácidos nucleicos mediante electroforesis sin necesidad de desnaturalización. Para ello, se utilizan geles de agarosa, un polímero de galactosa. Estos geles presentan un tamaño de poro mucho mayor que los geles de acrilamida.

Existe una relación lineal entre la movilidad y el logaritmo de la masa molecular. De igual manera, las moléculas de DNA y RNA pueden transferirse a soportes sólidos de nylon o nitrocelulosa donde podrán incubarse con sondas específicas de su secuencia. Estas técnicas se detallan más adelante en el capítulo de Técnicas de Análisis de Acidos Nucleicos.

Principios básicos de genética microbiana

PRINCIPIOS BÁSICOS DE GENÉTICA MICROBIANA

GENOMA BACTERIANO

La mayoría de los genes bacterianos están codificados en una sola molécula circular, grande, de DNA, el **genóforo** bacteriano. En E. coli esta molécula tiene aproximadamente 1 mm de circunferencia y una masa molecular relativa de 2,56 x10^6 pares de kilobases (kb). La mayoría de las bacterias contienen genóforos que tienen aproximadamente el mismo tamaño que el de *E. coli*. Generalmente el tamaño del genóforo procariótico está en correlación con la fisiología o la complejidad morfológica de la célula.

Se ha estimado que el genóforo de *E. coli* tiene capacidad suficiente para codificar unos 3500 genes. Hasta ahora sólo se han identificado unos 1000 de esos genes. Estos genes corresponden a la mayoría de las enzimas requeridas para las reacciones de intercambio energético y de biosíntesis, así como las proteínas estructurales y las asociadas al movimiento y transporte.

No todos los genes bacterianos están codificados dentro del genóforo. Muchas bacterias, aunque no todas, contienen una o más moléculas circulares pequeñas de DNA, llamadas **plásmidos**. Estos elementos, cuyo tamaño va desde unos pocos a varios cientos de kilobases de longitud, funcionan en muchos aspectos como pequeños genóforos: se autorreplican y codifican diversas funciones celulares. Pero además de por su tamaño notablemente menor, difieren en varios aspectos de los genóforos. Así, se puede prescindir de ellos, porque los tipos de funciones que codifican sólo benefician a la célula en un conjunto limitado de ambientes y no se conoce ninguno que codifique funciones celulares esenciales. Por ejemplo, algunos plásmidos codifican enzimas que inactivan antibióticos u otros compuestos tóxicos que están presentes a veces en el entorno de la célula. Los plásmidos se diferencian también de los genóforos por no estar restringidos a un sólo hospedador. Algunos plásmidos son transferidos de unas células a otras y sólo se replican de forma estable en un pequeño grupo de bacterias relacionadas mientras que otros plásmidos tienen una gama de hospedadores mucho más amplia.

El genóforo y tantos de estos plásmidos como una bacteria contenga constituyen su **genoma**.

Ordenamiento de los genes en el genóforo

En algunos casos, los genes aparecen aislados en el genóforo; a partir de estos genes se transcribe una única especie de mRNA que se traduce a un solo tipo de proteína. Pero con frecuencia existen grupos de genes que codifican funciones relacionadas. Estos grupos se transcriben a partir de un único **promotor**, formando una molécula de **mRNA multigénico** que es traducido para formar tantas proteínas como genes hay en el grupo. Este grupo de genes se denomina **operón**. El ordenamiento de los genes en operones es típico de muchas bacterias y proporciona una economía de mecanismos reguladores.

La bacteria mejor estudiada en este aspecto (así como en la mayor parte de otros) es *E. coli*. Se han mapeado también bastantes genes en el genóforo de la bacteria *Salmonella typhimurium*. En el genóforo de *Bacillus subtilis* se han mapeado más de 300 genes y en el de *Pseudomonas aeruginosa* unos 100 genes.

MUTAGÉNESIS

Como consecuencia de la replicación normal del genóforo o de su exposición a ciertos agentes químicos o físicos denominados mutágenos, la secuencia de bases del genóforo bacteriano puede cambiar. Un cambio de este tipo se denomina **mutación**.

Los cambios que afectan al **genotipo** celular pueden ocasionar alteraciones en las carac-

terísticas y/o funcionalidad de los productos derivados de su expresión (**fenotipo**). En condiciones normales de cultivo, las mutaciones sólo ocurren raramente. Típicamente, una entre cada 10^8 células de una población contiene una mutación detectable en un gen determinado; no obstante, la exposición a ciertos mutágenos incrementa de forma espectacular la frecuencia de las células portadoras de mutaciones (p.ej: nitrosoguanidina, que aumenta 10^5 veces la frecuencia de células de una población que llevan una mutación en un determinado gen).

Dependiendo de los genes en que ocurran y su impacto sobre la actividad del producto del gen, las mutaciones pueden afectar al fenotipo de una célula de distintas maneras. Algunas mutaciones inactivan productos génicos indispensables y, por tanto, matan a la célula. Muchas otras mutaciones inactivan productos génicos que no son esenciales, de modo que la pérdida de esos productos no resulta letal. Los clones portadores de este último tipo de mutaciones pueden mantenerse en cultivo y difieren en una gran variedad de aspectos de sus progenitores no mutados o cepas salvajes. Así, una cepa que lleva una mutación que afecta a un enzima de una ruta biosintética, pierde su capacidad de sintetizar el producto final de esa ruta. Si dicho producto puede ser suministrado a la célula en las apropiadas condiciones de cultivo, el clon mutante puede crecer. Tales cepas mutantes se denominan auxótrofos, y sus progenitores protótrofos.

Tipos de mutaciones

Dependiendo de la amplitud de bases a las que afecten los cambios genotípicos, las mutaciones pueden implicar:

1- Microlesiones: afectan a sólo un par de bases del DNA celular. Pueden producirse por:

Sustitución: cambio de un par de bases por otro. Pueden ser:

- de transición: base púrica (A, G) por otra púrica ó pirimidínica (C, T) por pirimidínica.
- de transversión: base púrica por pirimidínica o al revés.

Desfase: cambio del marco de lectura por adición (inserción) o pérdida (deleción) de un par de bases.

En el caso de las **mutaciones por sustitución**, se ha de considerar que de los 20 aminoácidos que se encuentran en las proteínas, sólo dos (el triptófano y la metionina) están designados por un codón único. Así, una mutación por sustitución de un par de bases que cambie un codón a otro que codifique el mismo aminoácido, no cambiará la proteína producto del gen mutado (mutación neutra). Una mutación que cambie un codón por otro que designa un aminoácido diferente, se denomina mutación con sentido erróneo. Una mutación por sustitución también podría hacer que el codón que codifica un aminoácido de la proteína se convierte en un codón sin sentido, que determine el final de la traducción del mRNA a proteína y la liberación de una proteína truncada y catalíticamente inactiva.

Las **mutaciones por desfase**, ya sean del tipo +1 (adición de un par de bases) ó -1 (pér-

DIFERENTES TIPOS DE MUTACIONES

MUTACIONES PUNTUALES (microlesiones)

SUSTITUCIÓN

- transición
- transversión

DESFASE

- inserción
- deleción

MUTACIONES DE REGIONES DE DNA (Macrolesiones)

DELECIÓN

DUPLICACIÓN

- inserción
- inversión
- translocación

dida), cambian la pauta de lectura de todos los codones posteriores al sitio de mutación. Existe una gran probabilidad de aparición de codones sin sentido como consecuencia de las mutaciones por desfase y, por tanto, generación de proteínas incompletas e inactivas.

2- Macrolesiones: cambios en un cierto número de pares de bases o incluso genes completos. Pueden producirse por:

- Deleción: completa eliminación de un segmento de DNA. Las deleciones que eliminan por completo un gen causan obviamente la pérdida completa de la función de ese gen. No obstante, las deleciones que afectan a parte de un gen también suelen causar la pérdida de su funcionalidad.

- Duplicación: replicación en tándem de un segmento de DNA. Normalmente, estas mutaciones tienen como consecuencia la síntesis de más producto de ese gen.

- Inversión: cambio de orientación de un segmento de DNA. Normalmente suelen causar la pérdida de función. Cuando abarcan varios genes, se suele producir la pérdida de actividad de los genes de los extremos de inserción, mientras que permanece la funcionalidad de los genes localizados en el centro.

- Inserción: introducción de un segmento de DNA dentro de una secuencia ya existente. Las consecuencias de estas mutaciones están restringidas al gen en el que tiene lugar la incorporación del DNA.

- Translocación: similar a la inserción, aunque se suele mantener una copia del segmento translocado en su ubicación original (translocación replicativa).

Mutágenos más utilizados

Los mutágenos son productos químicos o agentes físicos que incrementan la frecuencia con que se producen las mutaciones durante el crecimiento de un cultivo. Estos agentes actúan bien por incorporación, asociación o reacción con el DNA, provocando mutaciones. En general, los mutágenos más empleados pueden clasificarse en cuatro grandes grupos dependiendo de su tipo de interacción con el DNA:

A) **Incorporación al DNA**. Se trata de los denominados **análogos de base**, sustancias similares a bases púricas o pirimidínicas que se incorporan al DNA causando mutaciones por sustitución (normalmente, transiciones):

- 5-bromouracilo (BU): sustitución de T: T-A→BU-A→BU-G→C-G.
- 2-aminopurina (AP): sustitución de A: A-T→AP-T→AP-C→G-C.

B) **Asociación al DNA**. Se trata de los denominados **agentes intercalantes**, sustancias que se introducen en la cadena de DNA ocasionando mutaciones por desfase. La actuación de estos agentes implica la producción de roturas en la cadena de DNA y su posterior inserción, por lo que su eficacia como inductores de mutaciones está estrechamente relacionada con los procesos de recombinación génica.

C) **Reacción con el DNA**. Se trata de sustancias que inducen cambios en la composición química de las bases del DNA. Principalmente se emplean:

- **agentes alquilantes**, sustancias que introducen radicales alquilo, dando lugar a modificaciones en el apareamiento de las bases. Entre estos agentes destaca el **gas mostaza**, el **etilmetano sulfonato** (EMS) y la **nitrosoguanidina**, el mutágeno químico más potente.

- **ácido nitroso**, que induce la aparición de mutaciones por sustitución debido a reacciones de desaminación e introducción de grupos OH. Así, por desaminación de A se forma la hipoxantina, que tiende a formar puentes de hidrógeno con C. De este modo los iniciales pares A-T→G-C.

- **hidroxilamina**, que reacciona con grupos amino de C, formando radicales hidroxilamino, de modo que los pares C-G→ T-A.

D) **Daños al DNA**. Los principales agentes capaces de causar daños al DNA son las radiaciones. Las principales:

- **Rayos X**. Ocasionan roturas en el genóforo y, con mucha frecuencia, se producen reconstrucciones erróneas que originan mutaciones incluso macroscópicas.

- **Radiaciones UV**. El DNA absorbe poderosamente la luz UV (absorción máxima a 260 nm), que mata rápidamente a las células. Entre las supervivientes se encuentran mutaciones con una frecuencia muy elevada debido a la formación de dímeros de pirimidinas (principalmente timinas), que distorsionan la molécula de DNA y a la hidratación de estos restos de pirimidinas. Las condiciones que favorezcan la reparación del DNA dañado disminuirán la frecuencia de aparición de mutaciones. Si, en cambio, se favorece la replicación y se inhibe la reparación, aumentará el número de mutaciones en las células irradiadas.

Selección y detección de mutantes

Cuando el efecto primario de una mutación es la pérdida de un producto génico estable, puede darse un retraso de varias generaciones hasta que la mutación se manifiesta fenotípicamente. Esta demora se denomina **retraso fenotípico** y refleja el tiempo requerido para la segregación de las regiones nucleares o el necesario para la dilución del producto génico activo que ya no se sintetiza.

La expresión de la mayoría de las mutaciones depende directamente de las **condiciones ambientales** o del cultivo, principalmente las que afectan a enzimas o proteínas. Así, bajo una serie de condiciones denominadas **permisivas** la mutación no se expresa y las células mutantes forman productos génicos funcionalmente equivalentes a los del fenotipo salvaje. No obstante, bajo otra serie de condiciones distintas denominadas **no permisivas o restrictivas** la mutación se manifiesta y da lugar a un producto alterado funcionalmente.

Considerando todos estos factores, normalmente se recurre a tres tipos de procedimientos para la detección y selección de mutantes:

1. Selección basada en el crecimiento relativo o selección directa.

Las células se colocan un medio cuya composición sólo permite el crecimiento del fenotipo mutante, mientras que las células paternas no se dividen o mueren. Un ejemplo característico de este tipo de selección es el cultivo de bacterias (mutantes y salvajes) en medio con antibióticos o toxinas, de modo que si la mutación implica la resistencia a estas sustancias, el fenotipo salvaje morirá y sólo sobrevivirán los clones mutantes.

2. Selección basada en la supervivencia relativa o contraselección.

La selección se basa en el crecimiento de las células en condiciones que inhiban el crecimiento de los mutantes y que eliminen a las células en crecimiento (paternas). Así, las células mutantes deseadas sobreviven al tratamiento letal, siendo transferidas a un medio apropiado de crecimiento después de su selección. Este es un método muy empleado para la selección de mutantes auxótrofos (células que requieren aportes extraordinarios de nutrientes debido a deficiencias enzimáticas), siendo la penicilina el agente de contraselección más utilizado. En este ejemplo, la penicilina inhibe la formación de enlaces transversales en el peptidoglicano de la pared celular. Como consecuencia, las células que crecen en presencia de penicilina sintetizan una capa de peptidoglicano debilitada, que es incapaz de mantener la presión osmótica intracelular y las células explotan. Sin embargo, en el medio que contiene penicilina sobreviven las células que no crecen, ya que el antibiótico no afecta al peptidoglicano formado previamente.

3. Detección visual.

Se han ideado una gran variedad de procedimientos para poder distinguir visualmente las colonias del tipo mutante deseado de las colonias de tipo salvaje. En general, se recurre al empleo de colorantes o reactivos capaces de teñir diferencialmente ambos tipos de células. Este método puede ser directo o por réplica en placa.

INTERCAMBIO GENÉTICO

La capacidad de intercambio de genes dentro de una población es un atributo casi universal de los seres vivos. En los eucariotas el intercambio se basa en que dos células haploides (gametos) se fusionan para formar un cigoto diploide sin embargo, en los procariotas sólo se transfiere una pequeña porción del genoma de una célula donadora a otra receptora, formándose un cigoto incompleto que contiene el complemento genético completo de la célula receptora (el endogenote) pero, con muy pocas excepciones, sólo una porción del complemento de la célula donadora (el exogenote).

El intercambio genético entre procariotas parece ser un proceso ocasional que ocurre por tres mecanismos muy diferentes: transformación, conjugación y transducción.

Transformación: la transformación es un mecanismo de intercambio genético basado en la absorción de DNA disperso en el medio externo.

Las células que se encuentran en un estado en el que pueden ser transformadas por el DNA que está en su ambiente, se dice que son **competentes**. La entrada al estado competente viene codificada por genes del genóforo y está marcada por condiciones ambientales. Así algunas bacterias son capaces de sufrir una transformación natural. Otras muchas bacterias no se hacen competentes bajo las condiciones ordinarias de cultivo, pero pueden entrar en el estado de competencia mediante una serie de tratamientos artificiales.

En la **conjugación**, se da intercambio genético entre dos células que se hallan en contacto directo, mediante un proceso que está codificado por genes situados en plásmidos. En concreto, un plásmido denominado plásmido F es el responsable de su propia transferencia cuando una bacteria que lo posee entra en contacto con otra que carece de él. Habitualmente, por este proceso sólo es transferido el propio plásmido desde la célula donadora a la receptora, pero a veces se transfieren también genes del genóforo.

En la **transducción**, se transfiere DNA de una célula procariótica a otra como consecuencia de la formación de un virión de un fago aberrante en el cual parte o todo su complemento normal de DNA se sustituye por DNA bacteriano. Por lo tanto, es un tipo de transferencia que requiere en intermediario, denominado vector.

LOS MÉTODOS PRINCIPALES DE INTERCAMBIO GENÉTICO EN PROCARIOTAS

NOMBRE	AGENTE DE TRANSMISIÓN GENÉTICA
Transformación	DNA desnudo
Conjugación	Plásmido; contacto directo entre bacterias
Transducción	Virus (fago aberrante)

Si el exogenote posee una secuencia de pares homóloga a un segmento del endogenote, el apareamiento se produce rápidamente, formándose de inmediato un genóforo recombinante por la integración parcial o total del exogenote con el endogenote.

Si por alguna razón se impide el apareamiento y la integración, el exogenote puede ser degradado por procedimientos enzimáticos, fenómeno conocido como **restricción por el hospedador**. En ocasiones, el exogenote es

modificado enzimáticamente por el hospedador, de manera que en adelante queda protegido contra la restricción.

Cultivos microbiológicos

CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS

TÉCNICAS DE CULTIVO PURO

El objeto de realizar un cultivo de microorganismos es disponer de una cantidad suficiente de material biológico a partir del cual poder analizar una propiedad bioquímica si el objetivo es analítico o purificar una cantidad apropiada, si el objetivo es preparativo. El ideal es poder disponer de un cultivo donde todos los individuos sean idénticos, es decir, un cultivo puro.

Los microorganismos son ubicuos, por lo que la preparación de un cultivo puro implica no sólo el aislamiento de un determinado microorganismo a partir de una población microbiana natural mixta, sino también el mantenimiento del individuo aislado y de su descendencia, en un ambiente artificial al que se impide el acceso de otros microorganismos.

El recipiente de cultivo debe estar inicialmente estéril y después de la introducción del tipo de microorganismo deseado debe estar protegido de una posterior contaminación externa. La fuente primaria de contaminación externa es la atmósfera, que siempre contiene microorganismos en suspensión. La superficie externa de un recipiente de cultivo está sometida a contaminación y el interior del matraz o del tubo puede contaminarse cuando se abre para introducir o retirar el material. Este peligro se reduce al mínimo pasando la llama de un mechero por la boca del matraz, inmediatamente después de retirar el tapón y, de nuevo, justo antes de volverlo a colocar.

Los riesgos de contaminación accidental pueden reducirse, además, transfiriendo los cultivos en una campana cerrada cuyo aire ha sido especialmente tratado para reducir su contenido en microorganismos. También pueden necesitarse campanas especiales y otras precauciones para evitar la liberación accidental del organismo, si éste causa enfermedad, o si ha sido producido utilizando las técnicas del DNA recombinante.

El **inóculo** (es decir, el material biológico utilizado para sembrar o inocular un recipiente de cultivo) se introduce generalmente con un hilo de metal o "asa" que es rápidamente esterilizada en una llama, inmediatamente antes de ser utilizada. La transferencia de cultivos líquidos puede hacerse también con pipetas.

En ciertos casos, especialmente cuando los cultivos deban proceder de un recombinante, es necesario aislar una colonia del resto de individuos, que eran semejantes a él excepto en el DNA que se ha recombinado. Generalmente se utilizan marcadores o métodos de selección por antibióticos para poder aislar individualmente a los recombinantes separados de los no recombinantes de los que procedían. En esos casos, es conveniente mantener el medio de selección para asegurar que no se pierden las propiedades genéticas del recombinante.

Aislamiento de cultivos puros por métodos de siembra en placa

La manera más fácil de obtener cultivos puros de los microorganismos que forman colonias discretas sobre medios sólidos (como por ejemplo, la mayoría de las bacterias, levaduras, muchos hongos y las algas unicelulares) se lleva a cabo utilizando una de las modificaciones del método de siembra en placa. Este método implica la separación e inmovilización de los organismos particulares sobre o dentro de un medio nutritivo solidificado por agar o algún otro agente gelificante. Cada organismo viable origina al multiplicarse, una colonia.

La **siembra por estría** es, en general, el método más útil de sembrar en placa. El asa de cultivo se esteriliza e introduce en una suspensión, convenientemente diluida, de microorganismos y se utiliza luego para hacer una serie de estrías paralelas, no superpuestas, sobre una placa de agar previamente solidificado.

Alternativamente, los aislamientos pueden hacerse con placas sembradas por **vertido** para lo cual sucesivas diluciones del inóculo se van colocando en placas de Petri estériles y se van mezclando con el medio de agar fundido, pero enfriado, que también por extensión en placa se deja entonces solidificar.

El aislamiento de bacterias anaeróbicas por los métodos de siembra en placa plantea problemas especiales. Siempre que los organismos en cuestión no mueran rápidamente al ser expuestos al oxígeno, las placas pueden prepararse de la manera habitual y luego incubarse en recipientes cerrados, de los cuales se elimina el oxígeno bien sea por absorción química o por evacuación. Para los anaerobios más sensibles al oxígeno, es preferible una modificación del método de siembra por vertido, denominado **cultivo por dilución y agitación**. Un tubo con agar fundido y enfriado se inocula y se mezcla; aproximadamente la décima parte de su contenido se transfiere a un segundo tubo el cual se mezcla a su vez y se utiliza para inocular un tercer tubo de la misma manera. Después de haber preparado de 6 a 10 diluciones sucesivas, los tubos se enfrían rápidamente y se cierran herméticamente vertiendo sobre la superficie una capa de vaselina y parafina, con el fin de evitar el acceso del aire a la columna de agar.

Los microorganismos varían enormemente en cuanto a sus requerimientos. Ningún medio y conjunto único de condiciones de crecimiento permitirá el desarrollo de todos los microorganismos presentes en una población natural. Es probable que sólo una pequeña fracción de los microorganismos inicialmente presentes sea capaz de formar colonias en cualquier medio dado. De hecho, algunas bacterias y muchos protozoos y algas no se cultivan con éxito todavía en medio sólidos. De ahí que pueda haber miles de microorganismos que se depositaron también en la superficie del agar y que, aunque no lograron un crecimiento visible macroscópicamente, sigan siendo viables. La probabilidad de que algunos de estos microorganismos sean tomados y transferidos es muy elevada. Nunca se debe tomar la colonia de una primera placa para preparar un cultivo puro. En lugar de esto, se debe sembrar por estría una segunda placa, utilizando una suspensión preparada a partir de una colonia bien aislada. Si todas las colonias de esta segunda placa resultan idénticas, una colonia bien aislada de éstas puede ya utilizarse para establecer un cultivo puro.

Ciertas bacterias flageladas móviles (Proteus, Pseudomonas, por ejemplo) pueden extenderse rápidamente por la superficie ligeramente húmeda de la placa recién preparada. Esto puede evitarse mediante el uso de placas con la superficie bien seca, en las que las células quedan inmovilizadas. En tales casos, el movimiento de los organismos en cuestión sirve de ayuda para su purificación ya que pueden separarse de otras clases de microorganismos inmovilizados en el agar.

Ciertos antibióticos son especialmente útiles para conseguir cultivos puros. Las bacterias varían mucho en cuanto a su sensibilidad al antibiótico penicilina, el cual puede utilizarse, por consiguiente, a bajas concentraciones para impedir el desarrollo de las bacterias sensibles existentes en la población inicial. A concentraciones más elevadas, la penicilina es generalmente tóxica para los organismos procarióticos, pero no para los eucarióticos. Es un agente de gran utilidad para la purificación de protozoos, hongos y algas que estén contaminados con bacterias.

En el caso de los **virus**, por supuesto nunca se puede obtener un cultivo puro, ya que estos organismos son parásitos intracelulares obligados; un cultivo binario, formado por un virus específico y su hospedador biológico, representa la meta de purificación para este grupo. Solamente a partir de un cultivo de este tipo pueden aislarse partículas víricas, por métodos bioquímicos diferentes.

Aislamiento de cultivos puros en medios líquidos

El sistema más sencillo de aislamiento en medios líquidos es el **método de las dilucio-**

nes. El inóculo se somete a una dilución en serie utilizando medio estéril y se inocula un gran número de tubos de medio con partes alícuotas de cada una de las diluciones sucesivas. El objetivo de esta operación es inocular una serie de tubos con una suspensión microbiana tan diluida que la probabilidad de introducir siquiera un sólo individuo dentro de un tubo dado es muy pequeña. Como resultado de ello, si un tubo muestra algo de crecimiento, existe una elevada probabilidad de que este crecimiento sea el resultado de la introducción de un sólo organismo.

El método de las diluciones tiene, sin embargo, una gran desventaja: sólo puede utilizarse para aislar el miembro predominante numéricamente de una población microbiana mixta. Casi nunca puede ser utilizado de manera eficaz para el aislamiento de microorganismos grandes que no crecen en medios sólidos (por ejemplo, protozoos, algas) porque, por regla general, en la naturaleza estos microorganismos se hallan en un número muy inferior al de las bacterias.

Cuando no puede aplicarse ni el método de siembra en placa ni el de las diluciones, la única alternativa consiste en recurrir al aislamiento, microscópicamente controlado, de una sola célula u organismo a partir de la población mixta.

TEORÍA Y PRÁCTICA DE LA ESTERILIZACIÓN

La esterilización es un tratamiento que deja el objeto tratado libre de todo organismo vivo. Puede lograrse mediante exposición a agentes letales físicos o químicos, o en el caso especial de las disoluciones, por filtración.

El único criterio válido de muerte en el caso de un microorganismo es la **pérdida irreversible de la capacidad de reproducirse**. Esto se determina generalmente mediante métodos cuantitativos de siembra en placa, en los que los supervivientes se detectan porque forman colonias. Cuando una población microbiana pura se expone a un agente letal, la cinética de la muerte es casi siempre exponencial: el número de supervivientes disminuye en progresión geométrica con el tiempo.

En la práctica de la esterilización, la población microbiana que ha de ser destruida es casi siempre mixta. Como los microorganismos difieren ampliamente en su resistencia a los agentes letales, los factores que se hacen significativos son el tamaño de la población inicial y la tasa de mortalidad de los miembros más resistentes de la población mixta. Éstos son casi siempre las endosporas de ciertas bacterias. Por consiguiente, para asegurarse de la fiabilidad de los métodos de esterilización, los objetos que se utilizan son suspensiones de esporas de resistencia conocida.

Esterilización por calor

El calor es el agente letal más ampliamente utilizado para la esterilización. Los objetos pueden ser esterilizados por **calor seco**, aplicado en un horno en atmósfera de aire o por **calor húmedo**, que proporciona el vapor caliente. La esterilización por calor seco requiere una duración e intensidad mucho mayores porque la conducción del calor es menos rápida en aire seco que en aire húmedo. Además, las bacterias pueden sobrevivir en estado de desecación completa y, en este estado, la resistencia intrínseca al calor de las células vegetativas bacterianas está enormemente aumentada, casi hasta el nivel característico de las esporas. Por consiguiente, la tasa de muerte es mucho más baja para las células desecadas que para las hidratadas.

El calor seco se usa principalmente para esterilizar material de vidrio y otros materiales sólidos estables al calor. Los objetos se envuelven en papel o se les protege de otra forma de la contaminación posterior y son expuestos a una temperatura de 170°C durante 90 minutos en un horno.

El vapor debe ser utilizado para la esterilización por calor de disoluciones acuosas. El tratamiento suele llevarse a cabo en un recipiente llamado autoclave, que puede llenarse

de vapor a una presión superior a la atmosférica. La esterilización puede lograrse así a temperaturas que están considerablemente por encima del punto de ebullición del agua. Los autoclaves de laboratorio se emplean generalmente a una presión de vapor de una atmósfera por encima de la presión atmosférica, lo cual corresponde a una temperatura de 120°C. Incluso las esporas que sobreviven después de varias horas sometidas a ebullición, mueren rápidamente a 120°C. Los volúmenes pequeños de líquido (hasta unos 3 litros) pueden ser esterilizados exponiéndolos durante 20 minutos; si hay que esterilizar volúmenes mayores, debe alargarse el tiempo de tratamiento.

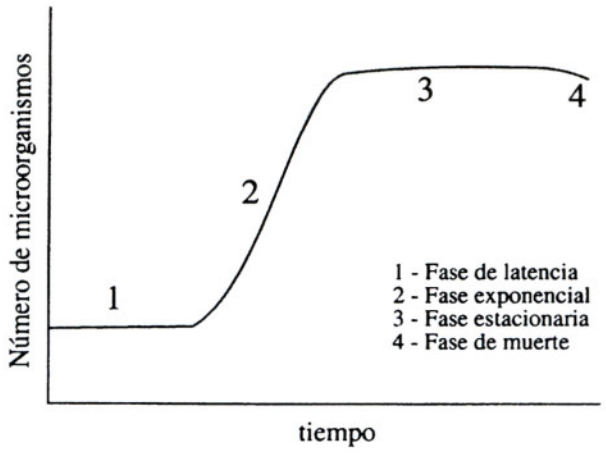
Al iniciar la operación debe ser expulsado todo el aire que originalmente estaba en el recinto del autoclave y ser reemplazado por vapor; esto se logra mediante el uso de una válvula de vapor que permanece abierta mientras está saliendo aire a través de ella. Por esta razón, un autoclave debe estar siempre equipado con un medidor de presión y un medidor de temperatura. La temperatura del interior de la cámara de esterilización puede vigilarse incluyendo entre los objetos que se van a esterilizar, papeles indicadores especiales que cambian el color si el tratamiento térmico ha sido adecuado.

Esterilización por filtración

El principal método de laboratorio usado para esterilizar disoluciones de materiales termolábiles es la filtración a través de filtros capaces de retener los microorganismos. Los microorganismos quedan retenidos en parte por el pequeño tamaño de los poros del filtro y en parte por adsorción a las paredes de los poros durante su paso a través del filtro.

Como los virus oscilan en cuanto a tamaño hasta las dimensiones de las grandes moléculas de proteína, no quedan retenidos en los filtros. Por consiguiente, nunca es posible tener certeza de que, por los métodos de filtración que dejan una disolución libre de bacterias, se van a eliminar también los virus.

CURVA DE CRECIMIENTO DE UN CULTIVO MICROBIOLÓGICO



CRECIMIENTO MICROBIANO

En cualquier sistema biológico, el crecimiento puede ser definido como el aumento ordenado de todos los componentes químicos. El aumento de masa, por sí solo, podría no indicar un crecimiento real, ya que las células podrían estar incrementando su contenido únicamente en productos de reserva. En un medio adecuado, y al cual se han adaptado perfectamente, las bacterias se encuentran en un estado de crecimiento equilibrado. Durante un período de crecimiento equilibrado, una duplicación de la biomasa va acompañada de una duplicación de todas las demás propiedades medibles de la población, por ejemplo, proteínas, RNA, DNA y agua intracelular. En otras palabras, los cultivos en crecimiento equilibrado mantienen una composición química constante. La existencia del crecimiento equilibrado simplifica la tarea de medir la velocidad de crecimiento de un cultivo bacteriano; como la velocidad de crecimiento de todos los componentes de una población es la misma, la medida de cualquier componente basta para determinar la velocidad de crecimiento.

Un cultivo microbiano en crecimiento equilibrado imita una reacción autocatalítica de primer orden; es decir, la velocidad de aumento de bacterias en un tiempo dado es proporcional al número o masa de bacterias presentes en ese tiempo.

Velocidad de aumento de las células = k (número o masa de células)

El valor de k es suficiente para definir la velocidad de crecimiento de un cultivo. No obstante, también se utilizan a menudo otros parámetros. Uno es el tiempo de duplicación promedio o tiempo de generación **(g)**, que se define como el tiempo requerido para que todos los componentes del cultivo aumenten en un factor de 2.

La ecuación predice una relación exponencial entre el número de células en la población (o cualquier otra propiedad mensurable) y el tiempo. Las poblaciones de bacterias que crecen de modo que se cumplen estas ecuaciones se dice que están en la **fase exponencial de crecimiento**.

Las poblaciones microbianas raramente mantienen un crecimiento exponencial a altas velocidades durante largo tiempo, sino que está limitado normalmente por el agotamiento de los nutrientes disponibles o por la acumulación de productos tóxicos del metabolismo. Como consecuencia, la velocidad de crecimiento disminuye y el crecimiento llega a detenerse. En este punto se dice que el cultivo está en la **fase estacionaria**. La transición entre la fase exponencial y la estacionaria implica un período de crecimiento desequilibrado, durante el cual los diversos componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades. En consecuencia, las células en la fase estacionaria tienen una composición química diferente a la de las células en fase exponencial. La composición celular en la fase estacionaria depende del factor limitante específico del crecimiento. A pesar de esto, pueden hacerse algunas generalizaciones: las células en la fase estacionaria son más pequeñas que en la fase exponencial (dado que la división celular continúa después que el incremento de masa se ha detenido), y son más resistentes a agentes físicos (calor, frío, radiaciones) y químicos adversos. Las células bacterianas mantenidas en un estado en el que no hay crecimiento llegan a morir. La muerte es consecuencia de diversos factores; uno importante es el agotamiento de las reservas celulares de energía. Al igual que el crecimiento, la muerte es una función exponencial y de aquí que en una representación semilogarítmica la **fase de muerte** venga representada por una disminución lineal del número de células viables a lo largo del tiempo.

Por otra parte, las células transferidas de un cultivo en fase estacionaria a un medio fresco de igual composición experimentan un cambio de composición química antes de ser capaces de iniciar el crecimiento. Este período de ajuste, denominado **fase de latencia** tiene una duración muy variable; en general su longitud está relacionada con la duración de la fase estacionaria precedente.

Medición del crecimiento

Para seguir el curso del crecimiento es necesario efectuar mediciones cuantitativas. Por comodidad, las propiedades habitualmente medidas son la masa celular o el número de células.

Medición de la masa celular. La única manera directa de medir la masa celular es determinar el peso seco del material celular en un volumen fijo del cultivo. Para ello, hay que separar las células del medio, secarlas y pesarlas.

La técnica más adecuada para medir la masa celular de los microorganismos unicelulares es un método óptico que consiste en medir la cantidad de luz difractada por una suspensión de células. Cuando un haz luminoso pasa a través de una suspensión bacteriana, la reducción en la cantidad de luz transmitida como consecuencia de la difracción es, pues, una medida de la masa bacteriana presente. Tales mediciones se hacen normalmente con un fotómetro o un espectrofotómetro.

Medición del número de células. El número de organismos unicelulares de una suspensión puede determinarse microscópicamente contando las distintas células que hay en un pequeño volumen medido con exactitud. Tal operación se lleva a cabo habitualmente en

unos portaobjetos especiales denominados cámaras de recuento. Estas cámaras van marcadas con cuadros de área conocida y admiten una fina capa de líquido de profundidad conocida entre el portaobjetos y el cubreobjetos. Ello permite conocer exactamente el volumen de líquido correspondiente a cada cuadrado de la cámara. El cómputo directo se denomina recuento total de células e incluye tanto las células viables como las no viables.

Para el recuento directo de células de una suspensión puede utilizarse también un instrumento llamado contador de Coulter. Se hace pasar una parte pequeña de la suspensión al interior de un tubo de vidrio a través de un orificio. Este orificio cierra un circuito eléctrico, entre un electrodo del interior y otro del exterior del tubo. La detección se basa en las diferencias de conductividad entre las bacterias y el líquido de suspensión. La conductividad disminuye cada vez que una bacteria pasa a través del orificio; esto es detectado y registrado electrónicamente.

La limitación principal del recuento microscópico directo de poblaciones bacterianas viene impuesta por la necesidad de utilizar suspensiones celulares relativamente concentradas.

El cómputo de organismos unicelulares viables puede también realizarse por recuento en placa, ya que las células viables, separadas unas de otras por dispersión sobre o dentro de un medio de agar, dan lugar al crecer a colonias independientes visibles macroscópicamente.

Eficiencia del crecimiento: rendimiento

La cantidad neta de crecimiento de un cultivo bacteriano es la diferencia entre la masa celular (o número de células) utilizada como inóculo y la masa celular (o número de células) presente en el cultivo cuando se llega a la fase estacionaria. Cuando el crecimiento es limitado por un nutriente determinado, existe una relación lineal fija entre la concentración inicial de dicho nutriente y el crecimiento neto resultante. La masa de células producida por unidad de nutriente limitante es, por consiguiente, una constante (Y) conocida como rendimiento. El valor de Y puede calcularse a partir de mediciones del crecimiento total mediante la ecuación

$$Y = \frac{X - X_0}{C}$$

donde **X** es el peso seco/ml de las células cuando el cultivo entra en la fase estacionaria , $\mathbf{X_0}$ el peso seco/ml inmediatamente después de la inoculación y **C** la concentración del nutriente limitante.

El rendimiento puede medirse para cualquier nutriente que se imponga y una vez determinado puede emplearse luego para calcular la concentración de dicho nutriente en una mezcla desconocida, midiendo sencillamente qué tasa de crecimiento es capaz de inducir una muestra de la mezcla desconocida cuando se añade a un medio de cultivo que carecía de él.

Debe observarse que el rendimiento por unidad de tiempo sólo aumenta durante la fase exponencial. Una vez alcanzada la fase estacionaria, el rendimiento neto se mantiene constante mientras que el rendimiento relativo, por unidad de tiempo, va decreciendo progresivamente

Estructura y purificación de ácidos nucleicos

ESTRUCTURA Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

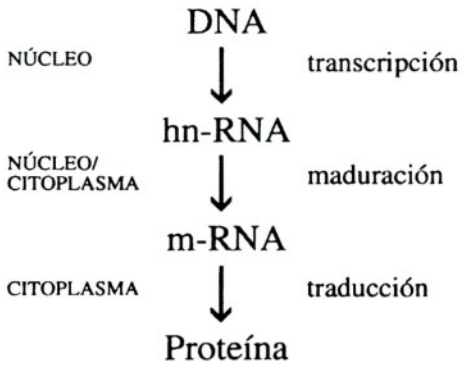
LOS ÁCIDOS NUCLEICOS EN LA CÉLULA

Los ácidos nucleicos son el material genético, es decir, son el lugar físico donde se almacena la información que se traspasa de generación en generación. También son los componentes fundamentales de los mecanismos de traducción de la información genética en señales químicas comprensibles por la célula para realizar tareas determinadas.

Existen dos categorías bien distintas de ácidos nucleicos con estructuras químicas bastante parecidas pero muy distintos a nivel funcional: DNA y RNA. El DNA es el material genético de almacenamiento de información por excelencia, mientras que el RNA está encargado principalmente de la transmisión de la información del material genético a señales bioquímicas elaboradas (normalmente proteínas).

Salvo algunas excepciones, el sentido de transmisión de la información genética es: DNA → RNA → proteína → función celular.

De acuerdo con su función, la localización subcelular de los distintos ácidos nucleicos es:



Concepto de gen

La información genética guardada en el DNA está codificada. Cada unidad de información codificada es un gen. Cada carácter heredable se corresponde por tanto con un gel.

Un genotipo "natural", también denominado "silvestre" o "wild type" (wt) puede verse afectado por diversos motivos, ocasionando un cambio respecto al gen que aparece normalmente en la naturaleza. Este cambio se conoce como **mutación**, y mutante al individuo que porta esta forma alterada. No obstante, existen diversos ejemplos de genes que de forma natural, existen en múltiples variantes, todos igualmente "normales", conocidos como polimórficos. Aunque en muchos casos resulten dañinas e incluso letales, la mutación y la existencia de formas alteradas de los genes constituye la base de la selección y la evolución de las especies.

EL CÓDIGO GENÉTICO

PRIMERA BASE	SEGUNDA BASE: U	SEGUNDA BASE: C	SEGUNDA BASE: A	SEGUNDA BASE: G	TERCERA BASE
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

CONSTITUYENTES DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Los ácidos nucleicos están compuestos por tres tipos de moléculas: bases nitrogenadas, pentosas y grupos fosfato. La unión me-

diante enlace glicosídico entre bases y azúcares origina los nucleósidos. La unión y polimerización con grupos fosfato mediante enlace fosfoester origina los nucleótidos. La única diferencia entre DNA y RNA en cuanto a su composición es que la pentosa del DNA tiene un grupo hidroxilo menos (d-ribosa) que la del RNA (ribosa), en posición 2'.

La nomenclatura de las bases, nucleósidos y nucleótidos se muestra a continuación:

Base	Nucleósido	Nucleótido
adenina	adenosina	AMP dAMP
guanina	guanosina	GMP dGMP
citosina	citidina	CMP dCMP
timina	timidina	dTMP
uracilo	uridina	UMP

Los nucleósidos son capaces de unir hasta 3 grupos fosfato mediante enlaces fosfodiéster entre el fosfato y las posiciones 5´ y 3´ de las ribosas o d-ribosas. La formación de 2 enlaces fosfodiester en las posiciones 5´ y 3´ de un mismo azúcar permite la formación de concatémeros, de forma que los ácidos nucleicos son polímeros extremadamente largos de nucleótidos y adoptan una secuencia lineal de los 4 constituyentes distintos A, C, G y T(U). El orden lineal de dichos nucleótidos constituye la secuencia del ácido nucleico.

La estructura global de los ácidos nucleicos depende en buena medida de sus constituyentes. Estos son por un lado bases nitrogenadas con carácter mayoritariamente hidrofóbico (aunque con grupos con capacidad de distribución de carga) junto con grupos fuertemente hidrofílicos. La estructura energéticamente más estable será la exposición al medio acuoso de los grupos fosfato, dejando ocultas las bases nitrogenadas

HIBRIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

La molécula de DNA es capaz de adquirir una estabilidad aún mayor gracias a los enlaces de hidrógeno, que se forman entre grupos de bases contrapuestas.

Las bases capaces de interaccionar entre sí se denominan complementarias, y son G≡C y A=(T/U). La estructura de los ácidos nucleicos sólo permite la formación de enlaces de H cuando dos hebras de DNA se sitúan en posiciones **antiparalelas**, es decir, una cadena en dirección 5´→ 3´ y la otra 3´ → 5´. Esta interación mantiene la estructura del DNA siempre como una doble hélice. El acoplamiento entre bases de cadenas antiparalelas se denomina **apareamiento** o **hibridación** y obviamente depende de la secuencia de nucleótidos de las cadenas que se enfrentan. Sólo hibridarán las secuencias de DNA que tengan enfrente secuencias complementarias. La fuerza de esta interacción también depende de la proporción entre las distintas bases. Un enlace GC aporta 3 enlaces de H mientras que un enlace AT sólo aporta 2. Así, cuanto mayor sea el contenido en GC, mayor será la fuerza de la interacción.

El DNA de doble cadena está siempre hibridado en condiciones normales. El RNA por el contrario está compuesto por una única cadena y sólo presentará zonas de hibridación allí donde existan secuencias de RNA de secuencias complementarias que puedan enfrentarse en sentido antiparalelo.

Factores que afectan la hibridación de los ácidos nucleicos

Como la hibridación de dos cadenas de DNA depende de los enlaces de hidrógeno que se forman entre las bases, no implica la formación de enlaces covalentes. Se puede definir un parámetro denominado **temperatura de fusión** (Tm) que corresponde a la temperatura, donde el 50% de las moléculas están hibridadas y el otro 50% desnaturalizadas. El DNA "normal" tiene una Tm de 80-95°C. Lógicamente un polímero AT estará por debajo y

un polímero GC estará por encima de este valor. El cambio es brusco y tendrá un valor definido para cada secuencia.

Además de la temperatura. hay otros factores que influyen sobre la desnaturalización del DNA:

pH: presencia de medios ácidos que protonan los nitrógenos de A, G y C o básicos que desprotonan los aminos de G y T. Como estos grupos ionizables intervienen en la formación de los enlaces de H, su cambio de carga hace desaparecer la estabilización entre cadenas.

Concentración salina del medio, que estabiliza en un rango y desestabiliza si se sube en exceso, mediante la formación de puentes entre los grupos cargados de los ácidos nucleicos y del agua. Del mismo modo, todos los agentes químicos que debiliten las interacciones entre las bases apareadas reducirán el grado de apareamiento entre dos hebras de DNA.

Secuencia de DNA: en concreto el porcentaje de pares GC (que aportan mayor estabilidad) y presencia de desapareamientos puntuales. Empíricamente, se ha determinado una fórmula que permite calcular la temperatura de una secuencia dada de DNA, que es: $Tm = 69,3 + 0,41\ (G + C)$ a 0,2M de Na^+, bajando aprox 1°C por cada 1 - 1,5% de desapareaminento. El contenido en GC no llega nunca al 50% en los organismos superiores. En humanos es del 40%. En los organismos menos evolucionados hay más variabilidad pudiéndose superar ese valor.

PRINCIPALES FACTORES QUE AFECTAN A LA HIBRIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

- Temperatura	- Homología de secuencia
- Fuerza iónica	- Porcentaje de G + C
- pH	- Presencia de agentes desnaturalizantes
- Longitud	- Presencia de mutaciones puntuales

La desnaturalización es reversible. Tras un tiempo adecuado, dos secuencias complementarias desapareadas vuelven a hibridar cuando las condiciones experimentales lo permiten (bajada de temperatura, concentración salina, etc), incluso en presencia de múltiples secuencias no relacionadas. La desnaturalización es fácilmente detectable en el laboratorio gracias al denominado efecto **hipercrómico**. Cuando las bases están apareadas y apiladas, no absorben tanta radiación UV como cuando no lo están, de manera que la pérdida de apareamiento se asocia con un aumento de la absorbancia (hipercromicidad) a determinadas longitudes de onda. La renaturalización puede también seguirse por pérdida de efecto hipercrómico. Este tipo de análisis llevó al descubrimiento de la existencia de secuencias de DNA muy repetidas en los organismos superiores, definidas por sus valores $cot_{1/2}$.

Gracias al fenómeno de hibridación y a su carácter reversible, pueden generarse fácilmente sondas para detectar ácidos nucleicos *in vitro*, bien en disoluciones o sobre materiales inmovilizados, como por ejemplo filtros de papel, de nylon o de nitrocelulosa. Este hecho constituye uno de los pilares técnicos básicos en la biología molecular, como se describirá en los apartados siguientes.

PREPARACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Purificación de DNA en disoluciones acuosas

A menudo es necesario purificar o concentrar una disolución de DNA antes de seguir con su análisis o manipulación. Lo más habitual es tener que eliminar proteínas presentes en dichas preparaciones. El método general para desproteinizar las disoluciones de DNA es la extracción con fenol, que desnaturaliza de forma muy eficaz las proteínas y las disuelve. Se emplea a la vez cloroformo, que estabiliza la interfase agua - fenol y hace que no se retenga agua en la fase orgánica, y alcohol isoamílico, que evita la formación de espuma en las agitaciones y ayuda a la separación de las fases.

La extracción con fenol va seguida de precipitación con alcoholes (generalmente, etanol o 2-propanol). Este paso elimina los restos de fenol y permite obtener un DNA relativamente libre de otro tipo de solutos, con lo cual permitirá cambiar las condiciones del disolvente en distintos pasos de manipulación del DNA. Para este paso de precipitación es necesaria la participación de 0,1 a 0,5 M de iones monovalentes, que luego se eliminan fácilmente por ser solubles en 70% etanol, donde el DNA se mantiene insoluble.

Preparación de DNA genómico

El principal problema que se plantea en este caso es que se debe proceder a la ruptura del tejido tan rápido como sea posible, ya que existen muchas nucleasas endógenas que pueden degradar el material genético si no se inactivan. A continuación, se digieren las proteínas con una proteasa y se eliminan proteasa y restos de proteínas por extracción orgánica. Finalmente, el DNA se purifica por precipitación con etanol o isopropanol. El método se basa en la excepcional actividad catalítica de la proteinasa K y el uso de SDS como desnaturalizante en esa digestión.

Para obtener un DNA de alto peso molecular, conveniente por ejemplo para la creación de genotecas, se puede dializar frente a un volumen grande (100 vol.) de TE durante un mínimo de 24 h en lugar de precipitar con etanol. El rendimiento esperado es de 2 mg de DNA por cada gramo de tejido.

Cuando el DNA genómico se prepara a partir de cultivos de bacterias, el procedimiento consiste en la lisis de las bacterias de un cultivo líquido, eliminando las proteínas con proteínasa K, los restos de pared bacteriana, polisacáridos y restos adicionales de proteínas con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) en presencia de alta concentración de sales, y recuperación del DNA mediante precipitación con isopropanol. Puede llegarse a un rendimiento de 0,5 a 2 mg de DNA por cada 100 ml de cultivo (a 10^8 - 10^9 células / ml).

MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Material de partida	Base de la separación	Reactivos específicos.
Disoluciones acuosas	- Sepración de fases - Precipitación selectiva	- Fenol - Etanol, isopropanol
DNA genómico de eucariotas	- Disgregación y extracción	- Proteinasa K - Fenol
DNA genómico de procariotas	- Disgregación y extracción	- Proteinasa K - Fenol - CTAB
DNA plasmídico (lisis alcalina)	- Desnaturalización	- NaOH - SDS
DNA plasmídico (método de hervido)	- Disgregación y extracción - Eliminación del DNA	- Calor - Lisozima - TritonX100
RNA celular	- Precipitación selectiva	- Agentes caotrópicos (tiocianato de guanidina) - Fenol ácido - Etanol, isopropanol
RNA poliA$^+$	- Cromatografía de afinidad	- Oligo-dT-celulosa

Preparación de DNA plasmídico

Pese a que el DNA genómico es el material genético mayoritario de las bacterias, es mucho más frecuente querer purificar el DNA presente en plásmidos, incluidos en las propias bacterias. Existen diversos procedimientos:

Procedimientos a pequeña escala o minipreps

Existen varios procedimientos basados en la ruptura de la célula bacteriana a los que se añade el uso de detergentes o condiciones que desnaturalizan el DNA haciéndole inestable en disolución y forzando su precipitación. El DNA de los plásmidos debido a su carácter pequeño y sobre todo por ser circular y estar superenrollado no llega a desnaturalizarse completamente o renaturaliza con la suficiente rapidez como para quedar solubilizado y por tanto podrá separarse por centrifugación del DNA cromosómico. Las preparaciones de DNA plasmídico obtenidas de esta manera pueden llevar también RNA, que es soluble en estas condiciones.

a) Lisis alcalina: Puede partirse de volúmenes pequeños de muchos cultivos a la vez. El procedimiento se basa en la lisis de la bacteria en una disolución que contiene SDS y NaOH, de forma que el SDS desnaturaliza las proteínas y la NaOH desnaturaliza el DNA plasmídico y cromosómico. A continuación se equilibra con KAcO, de manera que el DNA plasmídico renaturaliza mientras que el DNA cromosómico precipita rápidamente, al igual que la mayoría de las proteínas bacterianas, junto con el SDS, que forma un complejo con el potasio. El precipitado, muy aparente, se elimina por centrifugación, y el DNA se concentra por precipitación con etanol.

b) Método de hervido: Es más rápido aunque también más agresivo. Se basa en la triple acción del calor, de la lisozima (que degrada la pared bacteriana) y el detergente TritonX100. El calor y el detergente hacen roturas en la debilitada pared bacteriana de manera que escapan RNA y DNA de bajo peso molecular pero no moléculas grandes como el DNA cromosómico. El DNA cromosómico queda unido a la pared bacteriana, que precipita tras una centrifugación breve.

Preparación de plásmidos de DNA a gran escala

Básicamente se basan en los mismos métodos que a pequeña escala salvo un paso adicional de purificación por centrifugación en gradientes de cloruro de cesio o por cromatografía en columna. El rendimiento esperado es de 1-2 mg de plásmido para un cultivo de unos 500 ml.

Para la purificación por centrifugación en gradientes de CsCl-EtBr, se establece un gradiente de densidad con CsCl en el cual las moléculas de DNA se sitúan según su densidad. En presencia de EtBr, que es un agente intercalante, el DNA cromosómico (muy grande, relativamente relajado) intercala mucho EtBr, con lo cual se hace mucho menos denso, mientras que las moléculas covalentemente cerradas de los plásmidos no pueden intercalar tanto, con lo cual quedan mucho más densas, separándose fácilmente en el gradiente. Tras recoger por separado la banda de plásmido, se eliminan CsCl y EtBr y se precipita el DNA con etanol.

Para la purificación por cromatografía se aprovecha que el DNA es una molécula altamente cargada para ser purificado en columnas de intercambio aniónico donde otras moléculas no se unen. La elución se realiza después mediante cambios en las condiciones salinas que eliminan la unión del DNA a las columnas.

Preparación de RNA

El RNA tiene una localización celular esencialmente citoplasmática. Hay que tener dos cuidados especiales con el RNA. Al ser una molécula pequeña de única cadena, hay que conseguir obtenerla en su longitud completa, sin cortes. Por otro lado, las enzimas que degradan RNA (RNasas) son enzimas muy activas que no necesitan cofactores y que por

tanto son muy difíciles de inactivar. La mejor manera de trabajar con RNA es desnaturalizar las RNasas endógenas tan pronto como sea posible, trabajar deprisa, y asegurarse de no introducir RNasas contaminantes durante la preparación, para lo cual habrá que:

1- Usar guantes.

2- Utilizar material de vidrio tratado a 300°C durante 4 horas.

3- Utilizar material de plástico reservado con este fin.

4- Tratar con DEPC las disoluciones necesarias.

El agente que se emplea comúnmente en la extracción de RNA es el tiocianato de guanidina, que es uno de los agentes desnaturalizantes más potente que se conoce. Se trabaja en unas condiciones de pH (ácido) en las que el DNA y las proteínas llegan a ser más solubles en la fase orgánica o en la interfase que en la fase acuosa, permitiendo la separación entre DNA y RNA. Una vez obtenido el RNA en condiciones de reactivación de las proteínas celulares, la precipitación simple con alcoholes es el método más sencillo para obtener un RNA en condiciones de pureza y rendimiento adecuadas. El proceso de desnaturalización/precipitación puede repetirse sucesivamente si se necesita una purificación mayor.

RNA poli-adenilado

En muchas ocasiones, el estudio de los genes requiere de una mayor purificación entre los distintos tipos de RNA, siendo necesaria la separación del mRNA (que está en su mayoría modificado por poliadenilación en 3´) de los otros tipos de RNA, que son mayoritarios.

Se hace uso de la cola de poliA para que se una por afinidad a una columna de polidT acoplado a celulosa como soporte sólido, eluyendo a continuación por cambios en la condiciones iónicas del medio de incubación. Las cantidades empleadas normalmente son de aproximadamente 1 ml de oligodT-celulosa por cada 10 mg de RNA de partida, y el resultado esperable, en el mejor de los casos, es de multiplicar por 10 la concentración específica de un mensajero respecto a la masa de RNA total.

UAM DOCUMENTOS DE TRABAJO

Técnicas de análisis de ácidos nucleicos

TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La electroforesis en gel (generalmente de agarosa) es la técnica más sencilla y de mejor resolución empleada en el análisis de ácidos nucleicos, con posibilidades de uso tanto preparativo como analítico. Es capaz de resolver fragmentos de DNA en un rango entre 0,1 y 15 kilobases (kb), y aún puede ampliarse este rango hasta las 2000 kb en geles de campo pulsante o disminuirse hasta unas pocas decenas de pares de bases (pb) si se realiza la electroforesis en geles de poliacrilamida-urea. La electroforesis en geles de agarosa aprovecha que los ácidos nucleicos están fuerte y homogéneamente cargados a lo largo de toda su molécula, y de que en general éstos presentan una escasa estructuración.

La electroforesis en geles de agarosa consiste en la inclusión de los ácidos nucleicos en una matriz porosa (la agarosa) a través de la cual se obliga a circular a los ácidos nucleicos debido a la imposición de un campo eléctrico. Los factores que afectan la migración de cada molécula de DNA serán fundamentalmente:

1. El gradiente de voltaje aplicado.
2. Las condiciones salinas del medio en el que se establece la corriente.
3. La posible conformación del ácido nucleico.
4. El tamaño del poro de la matriz, que será quien definitivamente establecerá el rango efectivo de separación de las macromoléculas.

Por tanto, a igualdad de todos los demás parámetros, será el tamaño de la molécula de ácido nucleico lo que definirá su mayor o menor migración durante la electroforesis. Afortunadamente, el tamaño de poro de la matriz de agarosa se puede modificar de forma sencilla, simplemente cambiando la concentración de agarosa, con lo cual se puede definir a priori el rango de tamaños que se van a poder separar en cada gel.

Los porcentajes más adecuados de agarosa para separar distintos rangos de DNA son los siguientes:

% agarosa	Rango efectivo de resolución (en kilobases)
0,5	30 a 1
0,7	12 a 0,8
1,0	10 a 0,5
1,2	7 a 0,4
1,5	3 a 0,2

Si se necesitan resolver fragmentos de DNA menores de 200 pb, pueden también emplearse geles de poliacrilamida, donde el rango de separación efectiva oscila entre las 30-600 pb (geles al 5% de concentración de acrilamida) y hasta las 5-100 pb para geles de concentración de acrilamida del 20%.

Una vez realizada la migración de los ácidos nucleicos, puede visualizarse su posicionamiento en el gel mediante la intercalación de un compuesto, el bromuro de etidio (EtBr), que se acumula donde haya ácidos nucleicos, marcando los sitios donde ha migrado una cantidad suficiente de material (el mínimo está alrededor de los 2 ng). El EtBr intercalado entre las bases de DNA adquiere propiedades fluorescentes, emitiendo en longitud de onda visible (naranja) por lo cual es detectable fotográficamente.

Aplicaciones de la electroforesis en geles de agarosa

1- La principal aplicación de la electroforesis en geles de agarosa es determinar el tamaño aparente de un fragmento de ácidos nucleicos

o de un plásmido por referencia con fragmentos de DNA conocidos. Esta comparación puede establecerse en geles no desnaturalizantes gracias a la escasa estructuración que normalmente tienen las moléculas pequeñas de DNA. Es importante resaltar que, dado que la comparación se establece en referencia a DNA lineal, el DNA que analicemos deberá estar también en forma lineal para poder cuantificar los tamaños de DNA presentes. De hecho, los plásmidos en su forma 'ccc' (circular covalentemente cerrada) migran mucho más deprisa que los correspondientes plásmidos linearizados, y estos a su vez un poco más deprisa que las formas circulares no superenrolladas. En el caso del RNA, no hay problemas con el superenrollamiento porque las moléculas son siempre lineales, pero sí hay muchas veces zonas con posibilidad de adquisición de estructura secundaria. Para eliminar este problema, los RNAs siempre se corren en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes.

2- Otra aplicación común es la posibilidad de **cuantificación** de la cantidad de DNA. Este hecho se basa en que la unión de EtBr al DNA ocurre de forma constante de acuerdo con el número de pares de bases, por lo que cuanto mayor sea la cantidad de DNA, mayor será la cantidad de EtBr capaz de unir y mayor será la fluorescencia emitida bajo luz UV. Por comparación con cantidades conocidas de DNA corridas en paralelo en el mismo gel que nuestro DNA problema, podremos estimar la cantidad de DNA que contiene una muestra. De hecho, los marcadores de peso molecular utilizados para medir los pesos moleculares en los geles se incluyen siempre en cantidades conocidas para poder hacer esta doble estimación de tamaño y cantidad.

3- Una importante característica de la electroforesis de ácidos nucleicos es que se realiza en condiciones **nativas** no desnaturalizantes del DNA, es decir, que el DNA se puede recuperar de forma sencilla a partir de un gel de agarosa. Existen varios métodos posibles de extracción, entre ellos la elución directa, la electroelución, la electroforesis sobre papel, la extracción por congelación/descongelación o el uso enzimático de la ß-Agarasa, seguidos de purificación y eliminación de sales. El DNA recuperado, una vez limpio, puede emplearse esencialmente en cualquier tipo de experimento posterior.

4- La **purificación**. La propiedad que mejor distingue unas moléculas de ácidos nucleicos de otras es precisamente su tamaño. La mejor manera de conseguir resolver un conjunto de moléculas reunidas en una misma preparación es separarlas mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se cargan todas juntas en el pocillo del gel e irán migrando más cuanto menor sea su tamaño. Transfiriendo a continuación las distintas moléculas, ya separadas, a un soporte sólido inerte (por lo general un papel de nylon o de nitrocelulosa), tendremos las moléculas de ácidos nucleicos separadas y susceptibles de ser detectadas de forma diferencial con una sonda.

Aplicaciones más frecuentes de la electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

1. Determinación de tamaños moleculares
2. Determinación del grado de superenrollamiento
3. Cuantificación de la cantidad de ácidos nucleicos en la muestra
4. Purificación de moléculas
5. Resolución de moléculas con fines preparativos (Northem, Southern)

ANALISIS ESPECTROSCÓPICO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Los grupos más representativos de los ácidos nucleicos a nivel espectroscópico son las bases nitrogenadas. Estas presentan un espec-

tro de absorción relativamente similar entre ellas, siendo los electrones deslocalizados que realizan la transición entre los radicales π y π^* los principales responsables del espectro. El máximo de absorción de luz UV se encuentra centrado entre los 253 y los 271 nm, según los diferentes nucleótidos.

Medida de la concentración de ácidos nucleicos por espectrometría

La longitud de onda donde se presenta la máxima Absorbancia se encuentra situado hacia los 260 nm. Por consiguiente, es posible determinar la concentración aproximada de DNA por medición de la Absorbancia a dicha longitud de onda. Para una molécula de DNA determinada, la medida de Absorbancia dependerá en una cierta proporción de su secuencia, ya que no todas las bases absorben igual, pero, en media, para unas proporciones estándar de las bases, existe una relación aproximada que indica que 1 U de A_{260} corresponde con 50 µg de DNA de doble cadena, con 40 µg de RNA o DNA de cadena sencilla o con 33 µg de oligonucleótido (de longitud aproximada de 25 bases). Como se verá a continuación, el método de medición espectrofotométrico consiste en la dilución de cantidades adecuadas de DNA (en agua) y medición de la Absorbancia a 260 nm y a 280 nm. A continuación, el valor obtenido se corregirá según el factor de dilución en cada caso para calcular la concentración del ácido nucleico en la disolución original.

Medida de la pureza de ácidos nucleicos

Los principales contaminantes presentes en las disoluciones de ácidos nucleicos son las proteínas. Su espectro de absorción de luz UV varía entre las distintas moléculas, pero siempre presentan un máximo de absorción hacia los 280 nm, correspondientes a los picos de absorción de los aminoácidos aromáticos. Dada la cercanía entre los máximos de absorción de ácidos nucleicos y proteínas, ambos picos se solapan parcialmente. Sin embargo, para cada nucleótido y para las moléculas de ácidos nucleicos puros, la relación entre la A_{260} y la A_{280} nm deberá ser constante, y aproximadamente situada entre los valores A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0. Si la medida de A_{280} aumenta por la presencia de una contaminación de proteínas, la relación A_{260}/A_{280} disminuirá mucho. Por lo tanto, valores que se alejen mucho del rango 1,5-2,0 indicarán una probable contaminación con proteínas o con otros grupos capaces de absorber luz UV en esta zona del espectro como el fenol. De esta manera, la medición de absorción UV en dos longitudes de onda es una manera sencilla de determinar la concen-

PRINCIPALES DIFERENCIAS ENTRE LOS MÉTODOS DE ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y DE PROTEÍNAS

	ÁCIDOS NUCLEICOS	PROTEÍNAS
POLÍMERO BASE DEL GEL	Agarosa	Poliacrilamida
MÉTODO	Nativo	Desnaturalizante
ORIGEN DE LA CARGA	Fostatos endógenos	SDS
LÍMITE DE DETECCIÓN	ng de DNA	µg de proteína
MÉTODO DE TINCIÓN	Bromuro de etidio (fluorescencia)	Azul de Commasie (visible)
TIPO DE MONTAJE	Horizontal	Vertical
TIPO DE TRANSFERENCIA	Northern blot Southern blot	Western blot

CUANTIFICACIÓN APROXIMADA DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA

DNA (doble cadena)	1 U A_{260} = 50 µg
DNA (cadena sencilla)	1 U A_{260} = 40 µg
RNA	1 U A_{260} = 40 µg
oligonucleótidos	1 U A_{260} = 33 µg

tración y el grado de pureza de cada preparación de ácidos nucleicos obtenida. Por lo general, el análisis espectrofotométrico se complementa con un análisis electroforético analítico para comprobar la integridad, tamaño, posible degradación, presencia de superenrollamiento, etc., de las muestras de ácidos nucleicos.

Determinación de desnaturalización de DNA mediante técnicas espectrofotométricas

Un hecho importante a la hora de analizar espectrométricamente los ácidos nucleicos es que el comportamiento de los polinucleótidos no es exactamente igual que el de los nucleótidos por separado. Así, las bases vecinas a un nucleótido dado influyen sobre su capacidad de absorción de luz UV. Este efecto se denomina **hipocromicidad** y básicamente consiste en la disminución en el coeficiente de extinción molar que se observa en el paso entre nucleótidos individuales y polinucleótidos. De igual manera, el paso de DNA de doble hélice al estado de DNA desnaturalizado supone un aumento en el valor de dicho coeficiente, es decir, un fenómeno de **hipercromicidad**.

Por lo tanto, para un DNA dado, los cambios entre hipo e hipercromicidad son una manera directa y sencilla de medir el grado de desnaturalización. Del mismo modo, el cambio de hipercromicidad a una temperatura dada refleja la facilidad con que un DNA es capaz de ser desnaturalizado, lo cual es medida directa del porcentaje de G+C respecto al de A+T presente en el DNA, pudiéndose establecer una recta de calibración.

CROMATOGRAFÍA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Cromatografía de filtración

Dado el alto peso molecular de los ácidos nucleicos en general, resulta imposible separar diferentes ácidos nucleicos entre sí de forma efectiva mediante esta técnica. La aplicación más habitual de la cromatografía de filtración es la separación de nucleótidos libres y ácidos nucleicos en mezclas que contengan ambos, caso frecuente cuando se marcan isotópicamente ácidos nucleicos a partir de precursores

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS APLICADAS AL ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

TIPO DE CROMATOGRAFÍA	RESINAS	UTILIDAD FRECUENTE
Cromatografía de filtración	Sephadex G-25 Sephadex G-50	Separación de DNA y nucleótidos tras reacción de marcaje
Cromatografía de afinidad	oligodT-celulosa columnas de estreptavidina Hidroxiapatito	Captura de ácidos nucleicos biotinilados Purificación de RNA poliadenilado Separación de DNA de cadena sencilla y doble
Cromatografía de intercambio iónico	Fibra de vidrio y resinas comerciales	Lavado del DNA plasmídico tras lisis alcalina

marcados. Las columnas empleadas son sefarosas tipo Sephadex G-25 y Sephadex G-50. Todos los ácidos nucleicos quedan excluidos de la columna mientras que los nucleótidos entran en el volumen interno de la matriz. Este procedimiento también es útil para cambiar las condiciones salinas de una preparación de ácidos nucleicos, ya que las sales también entran en el volumen interno de la columna.

Cromatografía de afinidad

La más conocida aplicación de la cromatografía de afinidad sobre la preparación de ácidos nucleicos es el uso del hidroxiapatito (HA) para la separación de moléculas de DNA de cadena sencilla y de cadena doble. El hidroxiapatito es una forma de fosfato cálcico que utiliza sus grupos fosfato para unir ácidos nucleicos. Además, seguramente por efectos estéricos, es capaz de discriminar entre cadenas de DNA de cadena sencilla y de doble cadena, uniéndose más fuertemente al DNA de doble cadena por tener una estructura más rígida y organizada. La técnica de separación se basa en la unión de la mezcla de DNA de cadena doble y sencilla a la columna de HA, seguida de elución con distintas concentraciones de tampón fosfato.

Finalmente, la fibra de vidrio y compuestos similares en forma de resinas se utilizan con una frecuencia cada vez mayor para aislar ácidos nucleicos a partir de diversas preparaciones mediante cromatografía de intercambio iónico. Son la base a partir de los cuales se han desarrollado kits comerciales destinados a aislar DNA a partir de lisados bacterianos, disoluciones acuosas con múltiples componentes (p.ej. reacciones de polimerización), e incluso DNA incluido en geles de agrarosa.

Ingeniería Genética

INGENIERÍA GENÉTICA

RECOMBINACIÓN Y DNA RECOMBINANTE

Quizá el proceso biológico más relevante en el que se basa la ingeniería genética es la **recombinación**, es decir, la capacidad que muestran las moléculas de DNA de poder intercambiar entre ellas parte de su material genético, repartiéndose algunos de sus genes. La manipulación del material genético en el laboratorio, forzando los mecanismos de recombinación, transferencia de DNA, mutación, etc., es lo que se conoce como **ingeniería genética**.

La similitud de la estructura y composición del DNA y la universidad del código genético entre todos los organismos permite recombinar sin ningún problema DNA de organismos superiores en el genoma de organismos procariotas de forma rutinaria, posibilitando la obtención de verdaderas "bibliotecas" de DNA de humano u otras especies en un "soporte" bacteriano (en general, diversas cepas de la bacteria *E. coli* o de sus fagos).

REPLICACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

La principal característica que permite al DNA ser la molécula que almacena la información genética es la capacidad de autorreplicarse, es decir, servir de molde para la creación de otra molécula similar a la original. Esta duplicación molecular se conoce como **replicación**. Las células cuentan con una larga serie de enzimas para conseguir realizar esta función, de los cuales la más importante es la enzima DNA polimerasa, encargada de ir introduciendo los nucleótidos en orden, según la secuencia de la cadena complementaria que va leyendo. Los virus cuyo genoma es RNA necesitan además transformar su material genético en una molécula de DNA complementario, para lo cual disponen de una actividad adicional conocida como Reverso-Transcriptasa.

Replicación en procariotas

En los organismos procariotas es donde se ha estudiado con mayor profundidad los mecanismos de replicación de DNA, presentando algunas características particulares que merece resaltar:

1. La síntesis (polimerización) de DNA es semiconservativa, es decir, una de las dos hebras de DNA sirve de molde para generar otra cadena, de manera que la molécula resultante de DNA dúplex está compuesta por una cadena nueva y otra original.

2. La replicación se realiza siempre en la dirección 5´→ 3´.

3. Los nucleótidos que se van incorporando durante la síntesis son complementarios uno por uno a los de una cadena de DNA que actúa como molde.

4. Es necesaria la presencia de un cebador (o "primer") que se añade al sitio correspondiente de la cadena de DNA que va a ser copiada que aporte un grupo 3'-OH terminal que sirva como punto de anclaje a partir del cual se efectúa la polimerización. Por lo general este cebador se sintetiza en forma de RNA pequeño por parte de una enzima conocida como primasa.

5. Existen sitios fijos especializados en el DNA bacteriano, conocidos como orígenes de replicación, donde se inicia la replicación.

6. Las dos hebras de DNA no se sintetizan de la misma manera. Una cadena se sintetiza, en general, de forma continuada a partir del origen de replicación, según se va avanzando en la lectura de la cadena molde, mientras que la hebra complementaria se va copiando de forma rezagada en pequeños trozos que más adelante se unen covalentemente.

7. La polimerización de DNA es un proceso de baja especificidad, de manera que las polimerasas bacterianas polimerizan DNA de organismos superiores y viceversa y, por el mismo motivo, es independiente de la secuencia.

8. La polimerización del DNA necesita de la presencia de una serie de actividades enzimáticas accesorias que ayuden al propio proceso de polimerización realizando procesos como la desnaturalización parcial del DNA, el desenrollamiento de las hebras que van a ser copiadas, síntesis del cebador, etc.

La DNA polimerasa más estudiada, mejor conocida y más utilizada en el laboratorio es la DNA polimerasa I de *E. coli* (pol I). Es una proteína que tiene tres actividades catalíticas: DNA polimerasa, 5'→ 3'-exonucleasa y 3'→ 5'-exonucleasa. Las actividades polimerasa y 3'→ 5' son inherentes al proceso de replicación y al de corrección del nucleótido incorporado. De hecho, la actividad exo 3'→ 5' in vitro puede estar dirigida tanto contra DNA de doble cadena como de cadena sencilla, pero es mucho más activa cuando el apareamiento de bases se ve debilitada por efecto p. ej. de la temperatura. Por lo tanto, bases que no sean capaces de interaccionar bien con su base complementaria del molde serán eliminadas rápidamente y sólo permanecerán las que muestren un buen apareamiento es decir, las complementarias. La actividad exo 5'→ 3' degrada DNA de doble cadena y es particular de esta enzima de *E. coli*. Permite algunas actividades especiales como el desplazamiento de un punto de rotura ("nick translation") o la eliminación de una cadena de DNA estropeada por algún motivo. El fragmento de proteína mínimo activo, que contiene las dos actividades polimerasa y 3'→ 5' es el fragmento **Klenow**. Una variante de esta proteína Pol I de *E. coli* es la conocida como Taq, base fundamental de la técnica de PCR.

En *E. coli* existen otras dos DNA polimerasas caracterizadas, pol II y pol III. Este última es la principal encargada de la replicación de DNA en la bacteria en condiciones normales. En realidad, es un conjunto proteico complejo, formado por varias proteínas que aportan diversas actividades a la función global de polimerización (replicación) de DNA.

Replicación en eucariotas

Las células eucariotas utilizan polimerasas

COMPARACIÓN ENTRE LOS PROCESOS DE REPLICACIÓN DE ORGANISMOS PROCARIOTAS Y EUCARIOTAS

SEMEJANZAS	
Replicación semiconservativa	
Direccional (5'→3')	
Requiere cebador y molde	
Se incorporan los nucleótidos complementarios al molde	
Las polimerasas son complejos oligoméricos multifuncionales	
DIFERENCIAS	
PROCARIOTAS	EUCARIOTAS
Pocos sitios de inicio de replicación	Múltiples sitios de inicio de repliacación
Una única polimerasa actúa sobre cada hebra de DNA	Hay dos polimerasas, actuando cada una sobre una hebra de DNA

similares a la pol III de *E. coli*, es decir, un conjunto de proteínas en el cual se suman diversas funciones relacionadas con la polimerización del DNA y actividades accesorias. También el DNA se copia de forma diferente en una cadena lineal y otra en fragmentos y también es necesaria la participación de proteínas que hagan accesible el DNA a la maquinaria de polimerización y la presencia de actividad primasa que aporte el cebador (un ribonucleótido de unas 10 bases) a partir del cual polimerice el resto del DNA. Las principales diferencias entre los organismos procariotas y eucariotas es la presencia de múltiples sitios de iniciación de replicación en los cromosomas de los organismos superiores, en contra del sitio único del cromosoma bacteriano, y la actuación de dos polimerasas diferentes a la vez, una en cada hebra de DNA, en lugar de una única molécula actuando sobre las dos.

APLICACIÓN DE LOS PROCESOS DE REPLICACIÓN A LA SÍNTESIS DE SONDAS DE DNA

La enzima DNA-polimerasa I de *E. coli* o su fragmento Klenow se utilizan frecuentemente para la síntesis *in vitro* de DNA de secuencias conocidas. Si durante el proceso de síntesis se introduce una molécula "marcada" que podamos detectar de forma sencilla y sensible, podremos generar una "sonda" de DNA de secuencia conocida. Utilizando el fragmento Klenow, consistente en las actividades polimerasa y 3' → 5' exonucleasa, podrán marcarse sondas en presencia de nucleótidos y el tampón adecuado (gracias a la actividad polimerasa) y la actividad 3' → 5' exo servirá como correctora de errores.

Si se necesita preparar DNA marcado radiactivamente (o de alguna otra manera) de alta actividad específica, se puede bajar la concentración de uno (o dos) nucleótidos hasta 1-2 mM. Por debajo de esta concentración, se ralentiza mucho la síntesis de DNA. En ausencia de nucleótidos, esta actividad irá generando cortes en DNA de cadena sencilla o doble. Después del marcaje de los ácidos nucleicos, es conveniente separar los nucleótidos (especialmente el radiactivo) del DNA sintetizado, cosa que puede realizarse por cromatografía de exclusión en Sephadex G-25 o G-50, a través de cuyos poros entran los nucleótidos, pero no el DNA sintetizado.

Marcaje de DNA en los extremos

Se parte de fragmentos de DNA con extremos 5´-protuberantes, que quedan marcadas en el extremo 3´, según se rellena por acción de la polimerasa, con una actividad específica esperada de 10^7 cpm/mg). Una ventaja adicional del marcaje de extremos, en lugar de la molécula completa es que no se produce radiolisis de la molécula sintetizada y, salvo el decaimiento radiactivo, las sondas son estables durante meses.

También pueden marcarse extremos 3'-protuberantes. Se emplea una enzima similar a la DNA polimerasa I de *E. coli*, que es la polimerasa del fago T4. Esta enzima es mucho más activa que la bacteriana en lo referente a su actividad 3' → 5'-exonucleasa. En ausencia de nucleótidos añadidos, degrada la zona protuberante y parte de la zona del duplex (el óptimo es el 30% de la secuencia). Si se añaden entonces nucleótidos (uno de ellos marcado), la actividad polimerasa rellena la zona digerida del "dúplex", resultando en una molécula marcada.

Marcaje de sondas por "RANDOM PRIMING"

El procedimiento se basa en el uso de cebadores o "primers", que son típicamente hexanucleótidos, sintetizados con secuencias al azar. Como están sintetizadas al azar, encontrarán con cierta frecuencia secuencias "diana" donde sean capaces de hibridar y funcionar como cebadores. La hibridación es independiente de la secuencia del molde de DNA y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, extenderá el DNA a partir de estos "primers", ahora sí copiando específicamente la secuencia. El resultado es la síntesis de múltiples fragmentos relativamente largos que cubren la secuencia molde

completa y marcados homogéneamente en las dos cadenas a lo largo de toda la molécula, con una actividad específica de unos 10^8 cpm/mg

Marcaje de sondas por "NICK TRANSLATION"

En este caso, se necesitan las tres actividades polimerasa, 5'→ 3' y 3'→ 5' exo de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Se requiere partir de DNA con una mella en su secuencia (o un hueco). Si el DNA que interesa marcar no dispone de tal mella, la enzima DNasa I pancreática incluida en cantidades traza en la mezcla de reacción es capaz de originarla.

Las tres actividades de la DNA polimerasa I actúan coordinadamente de la siguiente manera: la actividad exo 5'→ 3' degrada la cadena en posición "downstream" del hueco o la mella, mientras que la actividad polimerasa reemplaza la cadena antigua por una recién sintetizada con bases nuevas y la actividad 3'→ 5' sirve de corrección de errores. Si incluimos un nucleótido marcado, obtendremos un DNA marcado homogéneamente a lo largo de toda la molécula con una actividad específica de unos 10^8cpm/mg).

Transferasa terminal

Para extremos 3', la enzima Transferasa Terminal es capaz, de forma independiente de la secuencia agregar nucleótidos (marcados o no) al extremo 3' de una cadena de DNA. Esta enzima introducirá, en condiciones óptimas, una cola de nucleótidos salvo que tengamos en el medio nucleótidos modificados que carezcan del extremo 3' a partir de los cuales crecer.

Medida de la polimerización de DNA.

La manera más sencilla de determinar el grado de replicación de una cadena de DNA es determinar si los monómeros (nucleótidos) han pasado a polímeros (cadena de DNA). Hay varias maneras de determinar este parámetro:

- Insolubilidad en ácido de la mezcla de reacción tras la polimerización. Este método se basa en que los ácidos nucleicos son insolubles en el ácido tricloro-acético, mientras que los nucleótidos (u oligonucleótidos hasta unas 10 bases) son solubles. El precipitado se recoge sobre un filtro de fibra de vidrio y, si el nucleótido está marcado, podemos seguir su incorporación determinando la radiactividad retenida en el filtro.

TIPOS DE MARCAJE RADIACTIVO DE DNA

	TIPO DE MARCAJE	ENZIMA UTILIZADA	ISÓTOPO EMPLEADO
Marcaje en 5'	Puntual	PNK	^{32}P-γ-dNTP
Marcaje para secuenciación	Varios nucleótidos en el extremo 5'	Sequenasa (T7)	^{35}S-α-dNTP
Marcaje en 3'	Varios nucleótidos en el extremo 3'	Transferasa terminal	^{32}P-α-dNTP
"Nick translation"	Homogéneo	DNA Pol I	^{32}P-α-dNTP
"Random priming"	Homogéneo	Klenow	^{32}P-α-dNTP

- Unión a columnas de intercambio aniónico, como el DEAE, capaces de unir desde polinucleótidos muy largos hasta trinucleótidos, resultando especialmente útil para determinar la polimerización de moléculas pequeñas utilizando nucleótidos marcados radiactivamente. La polimerización se puede seguir determinando la radiactividad en las fracciones retenidas y eluídas de la columna. Si no se requiere cuantificar un marcaje de manera muy exacta, bastará con separar el DNA marcado del nucleótido por cromatografía de filtración y determinar la cantidad de marca en la fracción de alto peso molecular.

- Determinación de efecto hipocrómico, según el DNA va polimerizando formando cadenas dobles.

- Determinación del incremento en viscosidad que se produce por la polimerización del DNA.

TRANSCRIPCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se conoce por transcripción al proceso por el cual la información genética almacenada en las moléculas de DNA es transmitida mediante la síntesis de moléculas de RNA. Las moléculas de RNA son de cadena sencilla, por lo que sólo una de las cadenas del DNA sirve de molde para la síntesis de una molécula de RNA. Esto no excluye que de forma excepcional a partir de un fragmento de DNA se puedan producir dos RNAs diferentes por transcripción de sus dos cadenas. Estos dos RNAs tendrán secuencias complementarias.

Un problema inherente a la transcripción es la complejidad de la maquinaria de transcripción de organismos procariotas y eucariotas, lo cual hace difícil que los genes se transcriban *in vitro* de forma reproducible y sencilla. Este problema se ha logrado solucionar gracias al uso de RNA polimerasas de los bacteriófagos T7, T3 y SP6. Las RNA polimerasas de estos fagos son enzimas monoméricas que presentan muchas ventajas para su efectividad en ensayos de transcripción *in vitro*:

1. La actividad polimerasa está presente en una única molécula, con lo cual son mucho más fáciles de purificar y de producir a gran escala.
2. Son muy procesivas, por lo que servirán para producir sin problemas tránscritos largos.
3. Reconocen una única secuencia de unos 20 pb, lo cual permite una sencillez mayor para diseñar vectores donde puedan expresarse insertos para la transcripción in vitro.
4. Son muy específicos en su reconocimiento de secuencia, con lo cual no iniciarán al azar en sitios no deseados.
5. Son polimerasas muy activas, permitiendo rendimientos muy elevados (se pueden llegar a generar 60 mg de tránscrito a partir de 2 mg de DNA en 30 min).

El RNA así preparado puede utilizarse directamente como sonda en ensayos de hibridación, como molde para ensayos de traducción *in vitro*, para su análisis en electroforesis, etc.

A diferencia de las DNA polimerasas, las RNA polimerasas no requieren un cebador para iniciar la transcripción. Los mecanismos de transcripción son bastante complejos y caen fuera del objeto de este capítulo. Baste decir que las RNA polimerasas tiene que reconocer sitios en el DNA a partir de los cuales llevar a cabo la iniciación de la transcripción. Estos sitios se denominan **promotores**. Existen también importantes mecanismos de regulación a distancia, en los que la secuencia operadora puede estar alejada en algunas kb del promotor en cualquiera de las dos direcciones. Este tipo de acción fue primero descrita en eucariotas, donde se identificaron **intensificadores** ("enhancers"), que son secuencias capaces de activar la expresión de genes que están situados a una distancia genómica considerable.

Aplicación de los mecanismos de transcripción a la síntesis de sondas de RNA.

La transcripción *in vitro* consiste en la síntesis de un RNA (de cadena sencilla) a partir de una molécula molde de DNA de doble cadena. Puede elegirse la cadena que queremos tener marcada y de generar una molécula (RNA) que hibrida con una estabilidad un poco mayor que la correspondiente secuencia de DNA. En presencia de un nucleótido marcado, podemos sintetizar una molécula de RNA marcado de forma homogénea a lo largo de toda la molécula. El hecho de resultar marcada una única cadena tiene la ventaja adicional de que a la hora de usar este producto como sonda molecular no hay posibilidad de auto-hibridación como ocurre con el DNA de doble cadena, que limita un poco la señal. Adicionalmente, la transcripción in vitro se emplea para sintetizar RNA como proceso intermedio para poder realizar una traducción *in vitro*, o para estudiar directamente la función del RNA.

MANIPULACIÓN DEL DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El avance de la ingeniería genética ha sido posible gracias a la facilidad de manipulación del DNA y a la posibilidad de generar moléculas híbridas de DNA de distintos orígenes. Unas herramientas imprescindibles para poder manejar fragmentos de DNA definidos son las **endonucleasas de restricción**.

De entre todas las enzimas que hidrolizan enlaces fosfodiéster en el DNA, las endonucleasas de restricción se caracterizan porque producen dos cortes, uno en cada cadena DNA dúplex y lo hacen de forma específica tras reconocer una secuencia "diana". Esta "diana" blanco de reconocimiento y corte de las endonucleasas de restricción generalmente es una secuencia palindrómica, lo que significa que cada una de las cadenas puede dividirse en dos mitades que son complementarias, es decir, existe un eje de simetría central.

La ruptura de cada enlace genera un extremo 3´-OH y otro 5´-fosfato. Cuando el sitio de ruptura es el mismo en las dos cadenas se producen **extremos romos**. En este caso el sitio de corte coincide con el eje del blanco. Otras veces los sitios de corte en cada cadena no coinciden y se generan **extremos cohesivos**, que pueden ser protuberantes en 3´ o en 5´. Habitualmente los cortes en las dos cadenas ocurren de forma simétrica respecto al eje de blanco.

Del tamaño de la secuencia de reconocimiento dependerá la frecuencia con que un enzima corte un DNA. En el caso más sencillo el blanco es un tetranucleótido. En este caso, dejando aparte que determinadas combinaciones de bases son más infrecuentes, podremos encontrar un sitio de corte cada 256 pb. Las endonucleasas de restricción con el blanco de mayor tamaño, reconocen y cortan octanucleótidos. Estos enzimas en teoría encuentran un blanco cada 15 kb aproximadamente y son útiles para el mapeo físico de moléculas grandes. Las enzimas más usadas reconocen hexanucleótidos.

La principal propiedad de la endonucleasas de restricción es su especificidad. Una molécula de DNA genera un conjunto constante de fragmentos al ser digerida con una endonucleasa de restricción. Si los extremos producidos son cohesivos, estos fragmentos podrán unirse entre sí o con los producidos por otra enzima que genere extremos compatibles. Si los extremos son romos la unión es posible independientemente de la enzima utilizada. La regeneración del enlace covalente requiere siempre la actuación de una **DNA ligasa**.

La principal aplicación de las enzimas de restricción es poder incluir fragmentos de DNA de forma recombinante en un sistema (normalmente un plásmido o un genoma viral) que permita su manejo, producción y análisis de forma individual. Este proceso es conocido como clonaje de fragmentos de DNA, y se expone a continuación.

CLONAJE DE FRAGMENTOS DE DNA

El objetivo final de la ingeniería genética es lograr disponer de forma ilimitada de una DNA de secuencia dada y poder manipularlo según las necesidades de cada caso. La forma en que este objetivo se logra normalmente es creando una molécula híbrida que contenga la secuencia de interés como inserto dentro de un vector, que frecuentemente será un plásmido bacteriano o un genoma viral. De esta manera, mientras mantengamos un clon de bacterias que porte el plásmido híbrido, aseguraremos la presencia de forma estable del DNA que queramos estudiar. Se han manipulado plásmidos distintos de manera que acoplen una serie de señales de utilidad, entre ellas las siguientes:

1- Resistencia a determinados antibióticos, como ampicilina o tetramicina.

2- Secuencias "poli-linker", consistentes en una serie de sitios de restricción poco comunes puestos en tándem.

3- Señales de inicio de transcripción para T3, SP6 o T7, para permitir la transcripción *in vitro*.

4- Señales de iniciación para M13 para permitir la secuenciación de cadena sencilla.

5- Sitios ColE1 para permitir la síntesis de los plásmidos en las bacterias en alto número de copia, lo cual aumenta el rendimiento de producción del plásmido por hacer la replicación independientemente del cromosoma bacteriano.

6- Secuencias marcadoras que indican si se ha introducido un inserto dentro del "poli-linker".

7- Otras específicas si los plásmidos se van a utilizar para otros propósitos, como por ejemplo para la creación de proteínas híbridas con la molécula GST o la adición de una cola de His o de secuencias de retención intracelular, llevarán la secuencia correspondiente en cada caso, o si se necesita expresar el correspondiente DNA en células de eucariota, deberán llevar un promotor (suele ser viral) capaz de ser reconocido por la RNA polimerasa-II eucariótica, señales para intensificadores e intrones para mejorar la expresión, etc.

La ligación del fragmento que queremos perpetuar ("clonar") en el vector adecuado se realiza de forma sencilla mediante la actuación de la enzima ligasa, que une fragmentos romos o cohesivos entre sí. Para ello, el único requisito es que los fragmentos que deban unirse tengan extremos compatibles. Una vez ligadas las moléculas en un único plásmido, éste se introduce en bacterias competentes y se seleccionan, gracias a la presencia de la señal de resistencia a antibióticos presente en el plásmido. A continuación, se eligen, dentro de todas las bacterias del cultivo que se ha intentado transformar, aquellos clones que contengan el inserto correspondiente. El término clonaje de DNA hace referencia a que será la única colonia o "clon" de bacterias el que porte este DNA.

Cabe resaltar que no sólo el DNA, sino también el RNA de forma indirecta, puede introducirse en un vector de forma estable. Para ello, se emplea la enzima viral **Reverso Transcriptasa**, que es una DNA polimerasa que utiliza RNA como molde y que por tanto realiza una copia del RNA a su secuencia complementaria de DNA para, a continuación, realizar una copia de la copia, resultando finalmente una molécula de DNA de doble cadena con secuencia similar a la del RNA del que procede, y que puede integrarse como inserto dentro de un vector plasmídico o viral.

La fuente del DNA a insertar puede ser variada, por ejemplo DNA genómico, digerido con enzimas de restricción o cortado en sitios distribuídos al azar, RNA transcrito en reverso o DNA ya presente en otro vector. En cada caso, la estrategia de clonaje puede variar, pero implica la ligación al DNA del vector, cosa que puede hacerse directamente mediante el uso de ligasa o de forma indirecta utilizando un adaptador (una secuencia corta de DNA de doble cadena que aporta extremos distintos

para compatibilizar dos extremos incompatibles).

Mediante el uso de estas técnicas, se han llegado a construir unas herramientas muy útiles conocidas como **genotecas** de DNA, que son mezclas de fagos o bacterias que contienen en su conjunto la secuencia completa del genoma de un organismo pero cada fago o bacteria individual sólo lleva un pequeño fragmento del total. Cada trozo de genoma ha de estar presente en varias copias para asegurar que la genoteca sea representativa de todo el genoma. Existen dos tipos básicos de genotecas:

Genotecas genómicas, cuyo DNA clonado corresponde al DNA genómico de la especie que se trate y que, tanto, es esencialmente independiente del tipo celular del que se haya obtenido la muestra de DNA.

Genotecas de expresión o de cDNA, consistentes en genotecas que portan como inserto un DNA artificial, creado a partir del RNA por la acción de una Reverso Transcriptasa y que, por tanto, es una réplica de los genes que se están expresando en una célula en un momento y en una situación determinadas. Como cada célula transcribe un conjunto limitado y específico de genes, cada genoteca de expresión será específica del origen celular y del momento del desarrollo o el tratamiento *in vitro* que el tejido haya sufrido antes de extraer el RNA copiado a DNA.

OTRAS ENZIMAS DE UTILIDAD EN INGENIERIA GENETICA

Fosfatasas.

Eliminan el grupo 5´-P del DNA o RNA dejando un grupo 5-OH. Los dos usos principales de estas enzimas son:

1- Hacer susceptibles a los ácidos nucleicos al marcaje con T4 polinucleótido kinasa que introduce un ATP -marcado o no- en extremos 5´-OH.

2- Impedir la ligación de determinados fragmentos dentro de una mezcla (normalmente, previniendo la auto-ligación de un vector) para favorecer las ligaciones de insertos en condiciones desfavorables.

Exonucleasas

Degradan los ácidos nucleicos a partir de los extremos. Existen diversas actividades, según los requerimientos del sustrato:

1- Exonucleasas de DNA de cadena sencilla (exo VII).

2- Exonucleasas de DNA de cadena doble (exo I: 5' → 3'; exo III: 3' → 5').

Endonucleasas no específicas de secuencia

Degradan los ácidos nucleicos en sitios internos de las moléculas. Entre ellas, se cuentan:

1- Endonucleasas específicas de cadena sencilla, como nucleasa S1 o, la nucleasa de judía (mung bean).

2- Endonucleasas de cadena doble, como la DNasa I.

Ribonucleasas

La mayoría son endoribonucleasas. La más comunes son:

- La RNasa A, que degrada tras C o U de forma muy activa, independientemente de si el RNA es de doble cadena o no. A concentraciones salinas mayores de 0,3 M de NaCl, es específica de RNA de cadena sencilla.
- La RNasa T1, que corta tras la G y también sobre RNA de cadena doble o sencilla, salvo a concentraciones de Na Cl superiores a 0,3 M.
- La RNasa H, que digiere el RNA presente en forma de "dúplex" con RNA, sin afectar al RNA o al DNA por separado.

Ligasas

Catalizan la reacción de unión entre un grupo 5'-P y un grupo 3'-OH. Esta actividad repara mellas en el DNA de cadena doble y une fragmentos de restricción que tengan extremos romos o extremos cohesivos compatibles. Existen dos ligasas comerciales, una de *E. coli* y otra del fago T4, ésta última mucho más activa (de hecho, ésta es la única capaz de ligar extremos romos).

LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es básicamente una reacción de polimerización de DNA, en la que se han introducido algunas modificaciones destinadas a conseguir una amplificación selectiva y muy eficaz de un fragmento pequeño (de hasta algunas kb) de DNA. La PCR está sujeta a las mismas características de la replicación del DNA, como son la necesidad de un molde y un cebador para la síntesis del DNA. Sus principales ventajas son la rapidez con que el método se lleva a cabo, evitando pasos más lentos como el clonaje, la hibridación, etc. La sencillez del proceso en su conjunto es máxima (una simple reacción en un tubo) pudiendo llegar a conseguirse un enorme grado de amplificación (de varios millones de veces o incluso más), inalcanzable con el resto de las técnicas.

El proceso implica la participación de un molde de DNA del que se quiere amplificar una región, dos oligonucleótidos (de longitud entre 20-30 bases; al menos 16), los cuatro dNTPs (50 μM), un tampón, sales y una DNA polimerasa. La reacción se inicia calentando la mezcla a temperaturas que desnaturalizan completamente el DNA molde (94°C) durante 5 minutos. Se baja la temperatura rápidamente de manera que los oligonucleótidos cebadores, cuya secuencia se ha escogido de manera que sean capaces de hibridar con los extremos de la secuencia que se quiere amplificar, hibriden con sus secuencias diana. A continuación, se deja actuar a la DNA polimerasa para que polimerice ("extienda") a partir de los cebadores.

Los cebadores deberán hibridar uno en cada cadena de DNA y de manera que los productos recién sintetizados se extiendan uno hacia la dirección del otro. Cada nueva cadena sintetizada rebasa por lo tanto la posición en la que el otro cebador se unió en la cadena complementaria, generándose dos productos de extensión de longitud indeterminada. A continuación, se vuelve a calentar la misma mezcla de reacción a 94°C, pero esta vez durante un tiempo corto, de manera que los productos hibridados de pequeña longitud se separen y sirvan ahora de molde de nuevas parejas de oligonucleótidos cebadores (que se ponen en

GRADO DE AMPLIFICACIÓN ALCANZADO MEDIANTE PCR A LO LARGO DE LOS CICLOS

CICLO	Moléculas diana (doble cadena)
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
8	64
10	256
12	1.024
14	8.192
16	16.384
18	65.536
20	262.144
22	1.048.576
24	4.194.304
26	16.777.216
28	67.108.864
30	268.435.456

exceso molar de miles de veces sobre el DNA molde). De nuevo se deja actuar a la polimerasa un tiempo suficiente sintetizándose dos productos de extensión en sentidos opuestos. La única diferencia es que, ya que ahora la cadena molde no tiene la longitud inicial de la molécula, sino que acaba donde empezó la síntesis dirigida por el otro cebador, la cadena sintetizada tiene una longitud definida, correspondiente a la distancia entre los sitios de hibridación de cada cebador. Se repite este ciclo desnaturalización/hibridación de cebadores/extensión de la polimerasa durante un número suficiente de veces (normalmente 30-35), tras lo cual se habrá amplificado varios millones de veces (2^n) la secuencia de interés.

La DNA polimerasa I de *E. coli* es una enzima que podría realizar la reacción en cadena. Sin embargo, tiene el inconveniente de inactivarse a las temperaturas necesarias para la desnaturalización del DNA, con lo cual debería añadirse enzima nueva tras cada ciclo de desnaturalización. Este problema se ha solucionado gracias al empleo de otra polimerasa similar, pero obtenida de una bacteria capaz de crecer a temperaturas muy altas, *Thermus aquaticus*, y que es mucho más resistente al calentamiento. Este hecho ha permitido automatizar la PCR sin tener que parar a cada ciclo para añadir polimerasa activa cada vez. La temperatura óptima de polimerización para la DNA polimerasa de esta bacteria (denominada Taq) es de 72°C. El empleo de esta temperatura para el paso de extensión tiene la ventaja adicional de evitar en parte la hibridación con baja especificidad de los cebadores a sitios del DNA no deseados, ya que la probabilidad de que esto ocurra es mayor cuanto menor sea la temperatura (que sería de 37°C para la polimerasa de *E. coli*). De igual manera, realizar "hot start", es decir, disparar la reacción con los componentes de la muestra precalentados a 94°C, ayuda a eliminar problemas de especificidad.

El grado y especificidad de hibridación de los cebadores a sus sitios correspondientes es el más crítico para determinar la fidelidad y rendimiento de la reacción de PCR. Básicamente, este parámetro va a depender de dos factores: la temperatura de hibridación y la concentración de algunos iones, en concreto Mg^{2+}, que se optimizan normalmente de forma empírica (aproximadamente 1,5 mM). El factor que mejor se controla es la temperatura. La temperatura de hibridación de los cebadores depende de su secuencia (en concreto, de su porcentaje de G+C), de su longitud y de la posible presencia de desapareamientos con la secuencia diana. En general, en la mayoría de los casos está entre 50 y 65°C. Una gran ventaja del método es que permite la hibridación de oligonucleótidos que no presenten un 100% de homología con la secuencia con la que deban hibridar. Esto ocurre muy frecuentemente, por ejemplo en casos en que se quiera amplificar secuencias homólogas en otras especies cuya secuencia no se conoce completamente correspondan a sitios donde hay variantes alélicas. En estos casos, basta bajar unos grados la temperatura predicha para un 100% de homología para conseguir una buena hibridación de los cebadores. Este hecho se aprovecha con mucha frecuencia para introducir mutaciones a propósito en los genes, por ejemplo para crear moléculas mutantes que hagan perder una función a la proteína que codifican. En general, estas mutaciones se introducen en las zonas 5´ de los cebadores ya que éste es el lugar donde interfieren en menor medida con la hibridación.

LAS PRINCIPALES APLICACIONES DE LA PCR

1. Clonaje de fragmentos de DNA amplificados
2. Creación de genotecas de expresión
3. Preparación de reacciones de secuencia
4. Detección clínica de procesos malignos o infecciones
5. Detección de mutaciones

No obstante, la PCR presenta también algunos inconvenientes:

- La Taq polimerasa o algunas variantes hechas por ingeniería genética carecen de actividad correctora 3'→ 5'-exo, con lo cual presentan una tasa de incorporaciones erróneas bastante alta, del orden de $2x10^{-4}$ nucleótidos por ciclo (en torno al 0,25% de los nucleótidos incorporados). El problema puede ser especialmente grave cuando aparece alguna mutación en los primeros ciclos de la PCR, ya que quedará fija la mutación en los ciclos posteriores y aparecerá en la mayoría de las moléculas amplificadas. Existen moléculas modificadas de Taq polimerasa que presentan una mejor eficacia a la hora de incorporar un nucleótido correcto y que se emplean cuando es necesaria una máxima fidelidad de copia.

- La concentración óptima de Mg^{2+} es muy baja, y por tanto está muy sujeta a las posibles sales o quelantes que puedan estar disueltas en las preparaciones de DNA o al exceso de nucleótidos. Por tanto, hay que poner a punto las condiciones experimentales para cada caso concreto de DNA y parejas de cebadores.

- Inherente a la principal ventaja del método, que es su enorme sensibilidad, está el defecto de presentar una probabilidad muy alta de amplificación de contaminantes. Dicho de otra manera, contaminantes que en otros tipos de análisis pasarían desapercibidos, resultan evidentes en la PCR y pueden llegar a interferir con los resultados.

A pesar de estos inconvenientes, la PCR se emplea cada vez con más frecuencia. Los usos más comunes en el laboratorio son los siguientes:

1) Amplificación de secuencias de DNA o RNA con el propósito de su clonaje. Para mejorar su eficacia de clonaje, suelen introducirse sitios artificiales de restricción convenientes que permiten su clonaje direccional en un vector adecuado. Pueden incluso amplificarse regiones cuya secuencia se conoce sólo en parte utilizando cebadores de secuencias parcialmente degeneradas o bajando la temperatura de hibridación para permitir la hibridación de secuencias de homología incompleta. Si el material a clonar de partida es RNA, se requiere un paso adicional de Transcripción en Reverso para crear una molécula de DNA de cadena doble (podría servir también DNA de cadena sencilla) que sirva de molde para la PCR.

2) Creación de genotecas de expresión. Cuando se necesita conseguir una genoteca en la que estén representadas todas las moléculas de RNA de un tejido dado, se necesitarán cebadores capaces de amplificar todas las secuencias de DNA que hayan pasado a DNA por la Reverso transcriptasa. Normalmente, se introduce artificialmente una cola de dG al cDNA, de manera que con oligonucleótidos polidT y polidC se logran amplificar todos los cDNAs existentes en la mezcla formados a partir de todas las moléculas de RNA originales. En casos como éste, es especialmente necesario tener varios representantes de cada cDNA para evitar artefactos debidos a la baja especificidad de incorporación de nucleotidos por la Taq polimerasa.

3) Preparación de productos de DNA para secuenciar. La secuenciación de DNA requiere DNA de cadena sencilla, que puede prepararse por PCR mediante la técnica denominada PCR asimétrica, consistente en la sobre-presencia (de 100 veces) de un cebador respecto del otro. El menos abundante se agotará pronto en la reacción de PCR, y sólo podrá amplificarse DNA con el más abundante, resultando en un exceso molar muy grande de una cadena sobre la otra, lista para secuenciar. La propia Taq polimerasa puede servir como la propia enzima polimerasa en reacciones de secuencia realizando el marcaje a temperaturas altas, cosa especialmente útil cuando por motivos de estructura secundaria del DNA, el marcaje a temperaturas bajas es difícil.

4) Detección de infecciones o de células cancerosas. Cuando se sospecha una infección en etapas tempranas con un patógeno, o cuando el agente infeccioso está presente en cantidades tan bajas que es difícil su detección por técnicas convencionales, puede utilizarse la PCR para la detección de una sensibilidad mucho mayor. Basta analizar una muestra peque-

ña de tejido empleando oligonucleótidos específicos del patógeno en cuestión que no hibriden con ninguna secuencia del hospedador. La misma aplicación puede seguirse para detectar la eficacia de un tratamiento contra un cáncer, especialmente en los casos en los que se conozca la existencia de una translocación cromosómica o de algún defecto genético que pueda seguirse. La principal ventaja en este caso sería poder realizar este análisis antes de que, por su extensión, sea evidente macroscópicamente.

5) Detección de mutaciones. La PCR es seguramente el método más rápido de muestreo de mutaciones, acoplado a la secuenciación de fragmentos amplificados. En algunos casos, se logra hacer un muestreo aún más rápido si existen mutaciones puntuales relativamente frecuentes en un gen que correlacionen con la pérdida o aparición de un sitio de restricción dentro de una pequeña zona del fragmento amplificado. Cuando se afinan muchísimo las condiciones de hibridación de los oligonucleótidos, puede incluso detectarse la presencia de mutaciones utilizando un panel de "primers" que representen las posibles formas alélicas del gen correspondiente. Para otros tipos de mutaciones no puntuales, como inserciones o pérdida de regiones de DNA, la amplificación del DNA correspondiente a dicha región producirá fragmentos de tamaños diferentes al original, que podrán distinguirse fácilmente en geles de agarosa.

6) Creación de mutaciones dirigidas. La posibilidad de hibridar cebadores que incluyan desapareamientos puntuales respecto a las secuencias originales de amplificación permite incluir en esos cebadores cambios de manera que se originen mutaciones hechas "a medida" de acuerdo con las necesidades. Por ejemplo, se puede introducir un codón de terminación de traducción prematura, con lo cual una proteína será más corta de lo debido, perdiendo por ejemplo el sitio de anclaje a membrana, la regulación por un factor o la actividad enzimática completa. También pueden dirigirse los cambios hacia la sustitución de un aminoácido por otro, de manera que podamos estudiar la función de zonas muy concretas de una proteína, etc. A veces, las mutaciones se incluyen en el DNA simplemente con el propósito de crear sitios de restricción que permitan un clonaje direccional en un vector compatible o para poder eliminar o sustituir como un "cassette" secuencias de una proteína o de un gen en una zona similar de otra proteína o gen.

SECUENCIACIÓN DE DNA

La secuencia de nucleótidos de una molécula de DNA es la característica básica que le diferencia del resto de moléculas de DNA y es la base de su funcionalidad individual. El desarrollo de técnicas que permitan de la manera más rápida y sensible la determinación de la secuencia de DNA es un proceso fundamental para poder entender, manipular o modificar la información genética. Existen dos métodos básicos de secuenciación de DNA, uno basado en reacciones químicas y otro basado en reacciones "biológicas" enzimáticas. El método "químico" consiste en la degradación de DNA con reactivos químicos específicos de cada una de las bases. El método "enzimático" consiste en la extensión, con una polimerasa, de un cebador que hibrida en posición 5' respecto de la región que se va a secuenciar. La reacción termina progresivamente utilizando dideoxinucleótidos. La DNA polimerasa habitual "Sequenasa" puede sustituirse por Taq polimerasa, que permite realizar la reacción de secuencia a temperaturas altas, con lo que pueden evitarse problemas de secuenciación en regiones del DNA donde exista mucha estructura secundaria, que desaparece a temperaturas altas.

El resultado de los dos tipos de secuenciación es la generación de una colección de oligonucleótidos en la cadena sencilla con un extremo fijo y otro variable, diferenciándose entre sí en que cada molécula tiene un nucleótido incorporado más que la anterior, según el orden de nucleótidos de la cadena de DNA que se está secuenciando. El punto clave es que se generan cuatro tubos por separado, todos los oligonucleótidos que acaban en A, en C, en G o en T. Los cuatro conjuntos de oli-

gonucleótidos se resuelven mediante electroforesis en carriles separados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-urea, de manera que pueden compararse los tamaños de las moléculas respectivas. Estos geles han de ser capaces de distinguir fragmentos de DNA que difieran en una sola base de tamaño.

El tamaño máximo de oligonucleótidos que pueden resolverse en un gel es de unas 800 bases. Para secuenciar fragmentos mayores, puede ser útil romper el DNA en fragmentos pequeños (bien de forma dirigida o al azar) y analizar la secuencia en estos sub-fragmentos. Esto es particularmente importante en el método "químico", donde todas las moléculas presentes se degradan por acción de los reactivos correspondientes. En el método "enzimático" se pueden diseñar varios cebadores que vayan cubriendo progresivamente la secuencia de interés, separados por unas 500-800 bases de forma que la secuenciación a partir de ellos permita determinar la secuencia completa sin recurrir a la digestión del DNA de partida.

El desarrollo de la secuenciación enzimática consta de los siguientes pasos:

1) **Desnaturalización del DNA**, mediante calor o álcali e hibridación del cebador sobre el DNA desnaturalizado. En muchas ocasiones es más conveniente utilizar vectores que puedan expresarse en el fago de *E. coli* M13, que tiene un genoma circular de cadena sencilla, evitando tener que desnaturalizar el DNA y asegurando la secuenciación direccional a partir del punto deseado.

2) **Marcaje del DNA**. Para ello, se añade una mezcla de nucleótidos a bajas concentraciones, de los cuales uno estará marcado y se realiza una reacción de polimerización.

3) **Parada de polimerización específica de secuencia**. Se separa la mezcla de reacción en cuatro tubos y se añade otra mezcla de nucleótidos que contengan además respectivamente uno de los cuatro nucleótidos en su versión dideoxi, es decir 2', 3' deoxi ATP, CTP, GTP o TTP (que se incorporan con igual facilidad que las versiones "normales" 2'-deoxi). La incorporación de uno de estos dideoxi impide la incorporación de más nucleótidos en su extremo 3' y supone la terminación de la cadena en ese punto. Para cada reacción, la proporción entre las formas deoxi y dideoxi determina la mayor o menor probabilidad de que la cadena termine prematuramente y por tanto puede esco-

REACTIVOS UTILIZADOS EN LA SECUENCIACIÓN QUÍMICA DE DNA

Reactivo	Tipo de reacción	Nucleótido	Diana de reconocimiento
Dimetilsulfato (DMS)	Modificante	Guanina	N7
Ácido fórmico	Modificante	Guanina + Adenina	Nitrógenos del anillo de las purinas
Hidracina	Modificante	Timidina + Citosina	Anillos de pirimidinas
Hidracina + NaCl	Modificante	Citosina	Anillos de citosina
Piperidina	Ruptura	-	Grupos modificados

gerse una mayor proporción si se quiere secuenciar en zonas más alejadas del sitio de hibridación del cebador y viceversa.

4) **Terminación**. Por lo general, la resolución de la secuencia obtenida mejora incluyendo una reacción de terminación, consistente en la polimerización de la cadena de DNA en condiciones óptimas, por ejemplo, aumentando mucho la concentración de nucleótidos 2-deoxi, e incluso añadiendo una enzima como la Transferasa Terminal. De esta manera, las cadenas que no se hubieran elongado suficientemente, pero que carecieran de un nucleótido dideoxi en su extremo 5' se alargan hasta alcanzar una longitud que impide que entren en el gel de poliacrilamida y no interfieran con la electroforesis del resto de los fragmentos.

5) **Separación de los fragmentos** generados en un gel de electroforesis de poliacrilamida-urea en condiciones desnaturalizantes, seguido de autoradiografía.

En el caso de utilizar nucleótidos marcados con fluorescencia, puede acoplarse un sistema de electroforesis en el que se detecta en la parte final del gel la presencia de las señales de fluorescencia (una señal distinta para cada nucleótido A,C, G ó T). Es el método conocido como **secuenciación automática**, que actualmente es el que presenta las mejores características en cuanto a rapidez y resolución. En definitiva, el paso que limita básicamente el número de muestras que pueden analizarse y la longitud de DNA que puede secuenciarse en un sólo experimento radica en la resolución de la electroforesis de DNA en los geles de poliacrilamida-urea. Los avances más recientes en secuenciación han tratado sobre todo de introducir mejoras en esta técnica, acoplando sistemas de ordenadores que interpretan directamente los resultados generados en los geles o reduciendo el número de carriles en los geles necesarios para obtener la misma información, además de manipular las enzimas que participan en la reacción de secuencia o intentar dirigir específicamente la secuenciación hacia zonas codificantes del genoma. Actualmente, se pueden secuenciar de forma rutinaria del orden de mil pares de bases diarias de DNA en un laboratorio preparado.

HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Las técnicas de hibridación consisten en el apareamiento, específico de secuencia, de dos hebras de ácidos nucleicos de distintos orígenes.

Estas técnicas son hoy las más ampliamente usadas en biología molecular. Originalmente, se describió el **Southern** (llamado así por el nombre de quien lo ideó) donde el DNA se digiere con una o varias enzimas de restricción, los fragmentos obtenidos se separan por electroforesis en gel de agarosa, se desnaturalizan en el gel con álcali y se transfieren, ya desnaturalizados, a un filtro de nitrocelulosa o de nylon. Esta transferencia puede llevarse a cabo a vacío o por simple capilaridad haciendo pasar un tampon de alta fuerza iónica. El DNA se fija irreversiblemente a la nitrocelulosa por tratamiento a 80°C o por irradiación con luz ultravioleta. Este filtro se hibrida a continuación con la sonda marcada y desnaturalizada en presencia de secuencias no complementarias que evitan la unión inespecífica de la sonda al filtro (SDS, ficoll, albúmina, polietilénglicol, DNA heterólogo). Tras la hibridación el filtro se lava en tampones de fuerza iónica progresivamente menor para eliminar la sonda que no haya hibridado. Como veremos más adelante, la magnitud de la hibridación puede controlarse variando la fuerza iónica, las temperaturas de lavado e hibridación y la concentración de agentes desnaturalizantes. Tras los lavados, el fragmento de restricción que contiene secuencias complementarias a la sonda se detecta por autoradiografía si ésta es radiactiva o por un método enzimático con sustrato cromogénico, si la sonda está marcada con biotina o digoxigenina.

El DNA de fagos, plásmidos y del cromosoma bacteriano puede también transferirse a nitrocelulosa o nylon directamente desde un cultivo en placa. El filtro se coloca sobre la

placa de agar donde han crecido las bacterias que contienen los plásmidos o han sido infectadas por los fagos. El DNA se une entonces al filtro y éste se trata con álcali para desnaturalizarlo. Tras la hibridación con sonda marcada, aparecerán señales en la autoradiografía que corresponden a colonias de bacterias o zonas de lisis de fagos que contienen DNA homólogo al de la sonda empleada.

El **Northern** es una técnica equivalente al Southern pero referida al RNA. El conjunto de RNA extraídos del material biológico es fraccionado también por electroforesis en gel de agarosa que separa las moléculas de RNA según su tamaño. Como éstas tienen gran tendencia a formar estructura secundaria que dificultaría su separación correcta por tamaños, se desnaturaliza por calor antes de la electroforesis y se incorpora algún agente desnaturalizante al gel, generalmente formaldehído. Al ser los RNAs moléculas de cadena sencilla, se transfieren directamente del gel al filtro. La hibridación y el lavado son equivalentes que en el caso del Southern.

Otra técnica de hibridación es la **hibridación** *in situ* de tejidos. En ella, se detecta al RNA presente dentro de las células. El corte histológico del tejido o células crecidas en cultivo fijadas a un portaobjetos se tratan con proteinasa K para permeabilizar las células y se hibridan con la sonda entre porta y cubreobjetos. La hibridación se detecta por método enzimático o por autorradiografía según el marcaje de la sonda, pero en este caso el uso de ^{32}P está limitado por el hecho de que la radiación β que emite es demasiado energética y ofrece poca resolución si se quiere distinguir la presencia de RNAs específicos a nivel celular. Por esta razón se prefiere marcar las sondas con ^{35}S o con ^{3}H, que ofrecen mejor resolución aunque menor sensibilidad.

El resultado de un experimento de hibridación va a depender de la estabilidad de los híbridos que se produzcan. El duplex se estabiliza por complementariedad entre las bases enfrentadas y, por tanto, cuanto mayor grado de similitud entre ambas cadenas, mayor estabilidad. Pero por otro lado, un aumento moderado de la temperatura es suficiente para deshacer los puentes de hidrógeno entre las dos cadenas, lo que hará a los híbridos más inestables a temperaturas altas. Sustancias como la formamida o la urea son capaces de competir en la formación de puentes de hidrógeno con las bases del DNA o RNA y su presencia compromete la estabilidad de los híbridos.

Otra fuerza a considerar para controlar la hibridación es la repulsión electrostática entre los grupos fosfato cargados negativamente en las dos cadenas de ácido nucleico, que tiende a separar las dos cadenas del dúplex. La presencia de cationes en el medio tiende a neutralizar la carga de los iones fosfato y, por tanto, la fuerza de repulsión que generaban. A concentraciones de ión sodio por encima de 0,1 M las cargas están neutralizadas y las moléculas de doble cadena son estables. Por el contrario, los dúplex son muy inestables en agua pura (baja fuerza iónica).

Disponemos, por tanto, de tres parámetros para controlar la hibridación entre dos ácidos nucleicos:

a) La temperatura. A temperaturas altas sólo se mantienen híbridos muy estables.

b) La concentración de formamida. En presencia de formamida se inestabilizan los híbridos. Su efecto es equivalente al de temperatura.

c) La fuerza iónica. A baja fuerza iónica se van a deshacer los híbridos más inestables.

El **rigor** ("astringencia") de una hibridación se varía jugando con dichos parámetros y permite discriminar entre híbridos perfectos y los que presentan algún desapareamiento. La siguiente ecuación relaciona la temperatura de fusión de un híbrido de ácidos nucleicos (Tm), la fuerza iónica, la concentración de formamida, la temperatura de hibridación y la composición de bases del DNA para sondas mayores de 100 nucleótidos:

$$Tm = 81{,}5 + 16{,}6 \log M + 0{,}41\ (\%\ G+C) - 0{,}61\ (\%\ \text{formamida}) - 500/n$$

donde T es la temperatura en grados centígrados, M es la concentración molar de iones de sodio, (% G+C) es el procentaje de bases G y C en el DNA considerado y n el tamaño de la sonda en pares de bases.

En un experimento de hibridación realizado en condiciones "rigurosas" sólo hibridarán secuencias muy homólogas o muy similares. Si se desea que la sonda hibride con un DNA o RNA con menor grado de complementariedad se hibridará en condiciones menos rigurosas o "relajadas". En condiciones rigurosas se suele hibridar a 20-25°C por debajo de la Tm. Unas condiciones típicas en una hibridación de Sourthern o Northern donde la sonda es 100% homóloga al DNA o RNA a hibridar son: 50% de formamida, 0,6M NaCl y 42°C, o bien se puede prescindir de la formamida e hibridar a 65°C (aumentar la concentración de formamida en 1,5% equivale, aproximadamente, a aumentar la temperatura de hibridación en 1°C). Sin embargo, para detectar un gen por el método de Southern usando como sonda el gen de una especie distinta se rebajaría la concentración de formamida hasta el 10% y/o la temperatura de hibridación hasta 30°C, es decir, hibridación en condiciones "relajadas".

Biología celular e histología
Métodos de estudio

BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGÍA

La célula es la unidad funcional y estructural de los seres vivos. Aunque en un organismo como el humano existen más de 200 tipos distintos de células, la mayoría comparte una serie de características en cuanto a su arquitectura y funcionamiento. Por otra parte, la histología estudia las células y su entorno, el material extracelular, que contribuyen a formar los tejidos del cuerpo. Inicialmente, esta disciplina estaba limitada por la capacidad del microscopio óptico para descubrir detalles de los tejidos. El microscopio electrónico amplió considerablemente su campo de estudio porque es unas 1.000 veces más potente que el óptico. Aparte de esto, muchos otros instrumentos y técnicas han contribuido a ampliar aún más el campo de estudio de la biología celular, especialmente el desarrollo de las técnicas de cultivo celular que han permitido mantener y reproducir en vivo muchos tipos celulares, propagandolos *in vitro* en medios adecuados.

LOS PRINCIPALES TIPOS DE MICROSCOPÍA ÓPTICA

MICROSCOPÍA DE CAMPO CLARO
Observación directa

MICROSCOPÍA DE CONTRASTE
Tinción de estructuras
Contraste de Fase: Refracción de la luz por los objetos
Interferencia: División de la luz en dos haces; uno atrarviesa la muestra y se hace interferir con el otro.
Polarización: Refracción de la luz polarizada por objetos birrefringentes; detección de moléculas con estructuras ordenadas
Fluorescencia: Extremadamente sensible. Detección de macromoléculas fluorescentes; detección indirecta (Abs) para localizar cualquier tipo de componente

INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE ESTUDIO

Microscopios

Microscopio óptico

El microscopio óptico es un sistema de tres lentes: el condensador, el objetivo y el ocular, que colaboran a ampliar la señal óptica.

El condensador concentra la luz y proyecta un haz luminoso sobre la preparación en estudio.

El objetivo proyecta una imagen aumentada de la preparación en dirección al ocular, que de nuevo la aumenta y la proyecta sobre la retina, sobre una pantalla o sobre una placa fotográfica. La **ampliación total** proporcionada por el microscopio es igual al aumento del objetivo multiplicado por el aumento del ocular.

El factor más significativo para una buena imagen es la **resolución**, que es la mínima distancia en la que dos partículas aparecen como objetos separados. El límite de resolución de los mejores microscopios ópticos es de 0,2 µm. Lo que determina la riqueza de detalles de la imagen proporcionada por un sistema óptico es el límite de su resolución y no la ampliación del tamaño de los objetos. El límite de resolución depende esencialmente del objetivo. El ocular apenas aumenta de tamaño la imagen proyectada en su plano focal por el objetivo.

Existen diferentes especializaciones del microscopio óptico que deben destacarse:

Microscopios de contraste de fase. El estudio de los tejidos vivos al microscopio es difícil, ya que, con raras excepciones, sus componentes son incoloros y transparentes. El microscopio de contraste de fase permite estudiar muchos detalles celulares *in vivo*.

La velocidad con que la luz atraviesa un cuerpo transparente depende de la cantidad de materia presente y determina el índice de re-

fracción de ese cuerpo. Cuanto mayor sea la densidad, mayor será el **índice de refracción** y menor la velocidad con la que la luz atraviesa ese cuerpo. Dado que las distintas estructuras celulares (núcleo, mitocondrias y gránulos de secreción) presentan índices de refracción diferentes, producen retrasos diferentes de las ondas luminosas que los atraviesan, lo que da origen a diferencias de fase entre las ondas luminosas emergentes. El microscopio de contraste de fase presenta dispositivos especiales que transforman las diferencias de fase en diferencias de amplitud, dando, en consecuencia, diferencias de intensidad luminosa, a las que es sensible la retina. Es una técnica muy útil asociada a las técnicas de cultivo de células, ya que permite distinguir nítidamente dentro de ellas muchas estructuras subcelulares.

Microscopio de polarización. La luz que atraviesa un filtro de polarización se transforma en luz polarizada, es decir, pasa a vibrar en una sola dirección. Colocando un segundo filtro de polarización en el microscopio, por encima del primero y con su eje perpendicular, la luz no atraviesa el conjunto. El primer filtro de polarización se coloca encima del condensador y recibe el nombre de **polarizador**. El segundo filtro, o **analizador**, se coloca entre el objetivo y el ocular. Cuando el polarizador y el analizador están con sus ejes perpendiculares, el campo del microscopio aparece oscuro. Pero si entre ambos filtros hay estructuras que contienen determinadas moléculas, estas estructuras aparecerán brillantes sobre un fondo oscuro. Esto ocurre porque las moléculas orientadas son **anisotrópicas** o **birrefrigentes** y modifican el eje de luz recibida del polarizador. El microscopio de polarización es un instrumento útil para el estudio de estructuras celulares orientadas tales como celulosa, colágeno, microtúbulos o microfilamentos

Microscopio de fluorescencia. Cuando son excitadas por determinadas longitudes de onda, algunas sustancias absorben energía y emiten luz de mayor longitud de onda. Dichas sustancias se denominan **fluorescentes**. En microscopía se utiliza la excitación con radiación ultravioleta para que la radiación emitida caiga en la zona de luz visible. Las sustancias fluorescentes aparecen como estructuras brillantes sobre un fondo oscuro. Después del objetivo del microscopio se colocan filtros que dejan pasar la luz, pero eliminan la radiación ultravioleta para proteger los ojos del observador.

Algunos compuestos fluorescentes son constituyentes normales de las células, como la vitamina A y las porfirinas. Diversos colorantes son fluorescentes y, al tener afinidad por ciertos componentes celulares, se utilizan para su identificación. Uno de los colorantes fluorescentes más empleados es la naranja de acridina, que se une al DNA y al RNA. Observado al microscopio de fluorescencia, el complejo naranja de acridina-DNA emite una fluorescencia verde amarillenta y el complejo naranja de acridina-RNA, rojo amarillenta. Esto hace posible localizar e identificar los dos tipos de ácidos nucleicos. Asociado con técnicas inmunológicas, el microscopio de fluorescencia permite localizar estructuras o moléculas reconocidas por anticuerpos específicos a los que se ha unido un fluoróforo. Esto permite multiplicar la aplicación de la técnica haciendo prácticamente universal el tipo de estructuras que pueden detectarse.

Microscopía electrónica.

El microscopio electrónico posee una alta resolución y las imágenes obtenidas muestran una riqueza de detalles impresionante. Los electrones se producen gracias a la incandescencia en el vacío de un filamento, el cátodo, que emite electrones. Estas partículas se aceleran debido a una diferencia de potencial de 60 a 100 kV que existe entre el filamento y el ánodo. Este haz de electrones es desviado mediante lentes electromagnéticas, de manera parecida a lo que sucede con el microscopio óptico. El condensador enfoca el haz en el plano del objeto y el objetivo forma una imagen de éste, que se amplia mediante una o dos lentes (lentes proyectoras) que proyectan la imagen final sobre una pantalla fluorescente o sobre películas fotográficas.

Debido a que los electrones son fácilmente absorbidos por el objeto, resulta necesario emplear cortes muy finos de los tejidos (de 20 a 100 nm de espesor: cortes ultrafinos). Mientras que en el microscopio óptico la luz es absorbida por las estructuras teñidas, en el electrónico los electrones lo son por partes del objeto que contienen átomos de elevado peso atómico. El resultado es que las estructuras que absorben los electrones aparecen oscuras sobre la pantalla fluorescente y se llaman **electrodensas**. La capacidad de absorber los electrones depende del número atómico, por lo que, a fin de aumentar el contraste, es costumbre impregnar los cortes de tejidos con metales pesados, resultando así una imagen nítida y bien visible. Los metales más empleados para esta "tinción electrónica" son el osmio y las sales de plomo y de uranio

Además del microscopio electrónico ya descrito, llamado de **transmisión**, existe otro tipo, denominado **microscopio de barrido** o "scanning electron microscope". En este tipo de microscopio, entre la lente electromagnética y el objeto se intercala una bobina de barrido que provoca una desviación del haz de electrones de tal modo que éste va a incidir punto por punto sobre el objeto, en una secuencia determinada. El objeto, a su vez, no se deja atravesar por el haz de electrones debido a su espesor y a una capa formada sobre su superficie por la evaporación de un metal pesado (p.ej., oro). De este modo, el haz de electrones que incide sobre el objeto (llamado haz primario) sufre reflexiones, originando electrones secundarios que son captados por detectores especiales que generan una señal eléctrica, transferida a un sistema de detección.

CORTES HISTOLÓGICOS

La obtención de cortes de tejido es el método más usado para realizar estudios citológicos e histológicos al microscopio óptico. Generalmente, las muestras deben reducirse a cortes finos, lo suficientemente transparentes como para ser estudiados al microscopio. Estos cortes se obtienen con un instrumento denominado **microtomo** pero, antes de proceder a cortar los tejidos, es necesario someterlos a una serie de procesamientos que deben intentar preservar la estructura y composición química que tenían in vivo. Dicho procesamiento incluye los siguientes pasos:

1.- Fijación. A fin de evitar la destrucción de las células y de sus componentes, los tejidos obtenidos del cuerpo de un animal deben ser adecuadamente tratados de inmediato tras su obtención. Este tratamiento se denomina **fijación**. La principal función de los fijadores es **insolubilizar** las proteínas de los tejidos. Dicha insolubilización es fundamental en la fijación, ya que las proteínas son las principales responsables de la estructura de las células y los tejidos. Uno de los mejores fijadores para trabajos de rutina con el microscopio óptico es el formaldehído al 4% en solución tamponada. Además, la fijación favorece el endurecimiento de los tejidos, lo que facilita su manipulación, e incrementa los índices de refracción y, por tanto, facilita la diferenciación óptica.

Para que las imágenes de gran aumento y resolución del microscopio electrónico reflejen de la ultraestructura celular, son necesarios cuidados especiales en la fijación. Se utiliza habitualmente una fijación doble, primero con una solución tamponada de glutaraldehído y, a continuación, con una solución también tamponada, de tetraóxido de osmio.

En ocasiones es preferible la congelación ultrarrápida de los tejidos en isopentano o isopropano en nitrógeno líquido tamponados con glicerina acuosa (2-30%) con el fin de evitar la formación de cristales de hielo. De este modo el tejido se conserva intacto, ya que la congelación no inactiva las enzimas y dificulta la difusión de moléculas pequeñas.

2.- Inclusión de la muestra y obtención de los cortes. Para la obtención de los cortes que hay que estudiar al microscopio, los tejidos deben ser embebidos y rodeados de sustancias de consistencia firme. Las sustancias más utilizadas para ese fin (medios de inclusión) son la parafina y las resinas plásticas.

Antes de ser impregnados, los tejidos deben sufrir una serie de tratamientos. En la primera fase del proceso, denominada **deshidratación**, se extrae el agua de los tejidos pasándolos por baños de concentraciones crecientes de etanol, generalmente del 50%, hasta etanol puro (100%). A continuación, el etanol es sustituído por un líquido miscible con el medio de inclusión. Para la inclusión en parafina se emplean generalmente xilol o benzol. Los tejidos embebidos en esta sustancia se vuelven translúcidos, razón por la cual esta etapa se denomina **diafanización** o **aclaramiento**. A continuación se sumergen los tejidos en resina plástica a temperatura ambiente o en parafina fundida en estufa, generalmente a 60°C. Debido al calor, el xilol o el benzol se evaporan y los espacios anteriormente ocupados por ellos lo serán por la parafina. A continuación, se coloca el tejido en un molde que contiene parafina fundida y se deja solidificar a temperatura ambiente, formándose un bloque de parafina con el tejido en su interior (**inclusión**).

Los bloques incluidos son cortados en el microtomo obteniéndose, generalmente, cortes de 6 a 8 µm de grosor. Estos cortes se estiran en agua caliente y luego se colocan en los portaobjetos.

Además de la inclusión en parafina, de uso generalizado, también se emplea la inclusión en resinas sintéticas para permitir obtener cortes más finos (de 1 a 2 µm), que proporcionan imágenes mucho más definidas al microscopio óptico.

Para cortar los tejidos ultracongelados, se emplea un tipo especial de microtomo denominado **criostato**. En estos casos, los cortes se realizan a -25°C y se mantienen a bajas temperaturas hasta su utilización.

Para la microscopía electrónica se precisan cortes todavía más finos (aproximadamente de 0,02 a 0,1 µm). Para ello, los tejidos se embeben en resinas duras a base de epoxi, necesitandose navajas de vidrio o de diamante para cortarlos.

3.- Interpretación de los cortes. Al estudiar un corte histológico al microscopio, es preciso tener presente que la estructura de las células y los tejidos está alterada por el procesamiento histológico y debe considerarse la posibilidad de que durante todo el proceso se hayan producido artefactos.

Las etapas del procesamiento histológico que siguen a la fijación (deshidratación, aclaramiento, impregnación y tinción) introducen también algunas modificaciones en los tejidos, principalmente una importante retracción (disminución del volumen) de las estructuras y aparición de espacios claros. Esta retracción está producida principalmente por el calor (60 °C) necesario para la inclusión en parafina y prácticamente desaparece cuando la inclusión del tejido se hace en resina plástica.

Por otro lado, el fino espesor de los cortes obstaculiza el estudio tridimensional de los tejidos y órganos. Para llegar a comprender la arquitectura tridimensional de un órgano o tejido es necesario el estudio de cortes realizados en distintas direcciones. Los órganos pequeños o partes de órganos mayores pueden estudiarse mediante **cortes seriados**, del material en cuestión analizando ordenadamente las estructuras que existen en una determinada muestra.

CENTRIFUGACIÓN FRACCIONADA

Se denomina centrifugación fraccionada al proceso físico por el que se aplica la fuerza centrífuga para separar **orgánulos celulares**, de acuerdo con el **coeficiente de sedimentación** de cada una. El coeficiente de sedimentación de una partícula depende de su tamaño, forma y densidad, así como de la densidad y viscosidad del medio. Mediante la técnica de centrifugación es posible teóricamente aislar cualquier orgánulo celular, para poder determinar su composición química y estudiar sus funciones *in vitro* de manera separada del resto de los componentes de la célula.

El método más habitual es realizar disoluciones con mas propiedades de densidad y vis-

cosidad determinadas, que posibilitarán la separación de las distintas fracciones. Para obtener medios de densidad y viscosidad distintas pueden emplearse sacarosa y resinas plásticas solubles e inertes, de diversa composición.

Inmediatamente después de extraer el tejido u órgano en estudio y llevarlo a la disolución de densidad conocida, éste se somete a la acción de un homogeneizador, cuyo tipo más frecuente es un cilindro de vidrio dentro del cual gira a gran velocidad un émbolo unido a un motor eléctrico.

Tras este procesamiento, se inicia la centrifugación del sobrenadante, utilizando fuerzas centrífugas cada vez mayores. Las partículas más densas (orgánulos) sedimentan primero. El sobrenadante de cada centrifugación se somete a una fuerza centrífuga mayor, lo que permite separar los distintos componentes celulares en pasos consecutivos.

Al someter una célula a la acción de una fuerza centrífuga es un medio concreto, sus orgánulos se distribuyen en diferentes capas o fracciones. En cada capa se encuentra un único tipo de orgánulo y su posición dentro del tubo dependerá de su coeficiente de sedimentación.

Una variante de la centrifugación fraccionada es la **centrifugación en gradiente**. El gradiente consiste en una solución cuya concentración es máxima en el fondo del tubo y mínima en la superficie, presentando un aumento gradual. Sobre ese gradiente estabilizado se deposita el homogeneizado celular y se centrifuga. Los distintos orgánulos y componentes se detendrán allí donde se produce un equilibrio entre la acción de la fuerza centrífuga y la tendencia de fluctuación de la partícula. Esta técnica permite obtener fracciones más puras de los distintos orgánulos subcelulares.

CULTIVOS CELULARES

Las células vivas recién obtenidas del cuerpo de un animal pueden depositarse en un líquido adecuado y ser examinadas durante cierto tiempo al microscopio. Sin embargo, estas células morirán y entrarán en autolisis al cabo de poco tiempo. En determinadas condiciones, se ha logrado mantener vivas y propagar células disgregadas *in vitro* durante tiempos muy largos, una técnica que se ha determinado genéricamente **cultivo celular**.

Las disoluciones que contienen los nutrientes necesarios en los que las células se mantienen vivas se llaman **medios de cultivo**. Estos deben renovarse con frecuencia, pues los nutrientes se agotan al mismo tiempo que se acumulan los productos tóxicos del metabolismo.

Los cultivos se emplean para el estudio del metabolismo de las células normales y cancerosas, así como para experimentos con virus, los cuales solamente proliferan en el interior de las células. Los micoplasmas, y algunos protozoos han sido estudiados también en cultivos celulares porque se desarrollan en el citoplasma de células hospedadoras.

La mayoría de las células obtenidas de tejidos sanos prolifera en los cultivos durante un período de tiempo programado genéticamente. No obstante, algunas de éstas células sufren una modificación que las hace "inmortales". Este proceso se denomina **transformación** y representa la primera etapa en el camino de una célula normal hacia una célula cancerosa. Práctocamente todas las líneas celulares que se mantienen en los laboratorios de investigación están constituidas por **células transformadas**.

En general, las células poco diferenciadas hacia tipos celulares determinadas se mantienen y propagan en cultivo con mayor facilidad, mientras que ocurre lo contrario, las células que tenían en el tejido originan un mayor grado de diferenciación.

Las células normales crecen indiferenciadas como precursores, y el inicio de la diferenciación se ve acompañado de un cese de la proliferación que puede ser permanente. Por el contrario, las células transformadas o tumo-

rales han perdido la capacidad de controlar su propio crecimiento, y crecen de manera descontrolada. No presentan en algunos casos la inhibición por contacto, que induce la formación de monocapas celulares en otros tipos de células, y pueden presentan distintos grados de diferenciación.

Las condiciones que favorecen la proliferación celular son: baja densidad del cultivo, baja concentración de Ca^{2+} (100 - 600μM) y presencia de factores de crecimiento como EGF (epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor) y muchos otros, específicos de los distintos tipos celulares. Alta densidad celular, alta concentración de Ca^{2+} y presencia de determinados factores (hormonas como hidrocortisona, NGF, retinoides), favorecen la diferenciación y reducen la capacidad de crecimiento.

Fuentes de tejido

La lista de los diferentes tipos celulares que se han crecido en cultivo es muy extensa, e incluye elementos del tejido conectivo como fibroblastos, tejido esquelético (hueso y cartílago), músculo esquelético, liso y cardíaco, tejidos epiteliales (hígado, pulmón, piel, vejiga y riñón), células endocrinas (adrenales, pituitaria, islotes pancreáticos), melanocitos, células del sistema inmunitario y diferentes tipos de tumores.

En general los cultivos derivados de embriones sobreviven y proliferan mejor que los de los adultos. Esto es un reflejo del bajo nivel de especialización y la presencia de precursores o células "stem", con capacidad de división en el embrión. Los tejidos adultos tienen un menor crecimiento y una mucha mayor proporción de células diferenciadas.

Es necesario hacer constar que, pese a que puedan proceder directamente de tejidos u órganos, los cultivos celulares carecen de organización estructural, han perdido la arquitectura histológica y a menudo las características bioquímicas asociadas a ella. Pueden propagarse, expandirse y dividirse en réplicas idénticas, purificarse mediante crecimiento en medio selectivo separación física o clonaje para obtener una capa celular con uniformidad considerable, pero no tienen por qué contener todas las propiedades que presentaban *in vivo*, especialmente las relacionadas con la interacción de una células con otras del mismo tejido y con el medio extracelular.

COMPARACIÓN ENTRE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE CÉLULAS PROCARIOTAS Y EUCARIOTAS

PROCARIOTAS	EUCARIOTAS
Medio de cultivo definido	Componentes no definidos (suero) en el medio de cultivo
Tiempo de duplicación corto (minutos)	Tiempo de duplicación largo (horas)
Posibilidad de transformación con plásmidos (horas)	Posibilidad de transfección estable (semanas)
Cultivo en baño térmico con oxigenación aérea	Cultivo en incubador térmico en presencia de CO_2 (tampón bicarbonato)
Cultivo de células en suspensión	Cultivo en adherencia o suspensión
Frascos de cultivo de vidrio o plástico sin requerimientos especiales	Frascos de cultivo de plásticos especialmente adaptados al cultivo
Pase a cualquier dilución	Necesidad de pases a diluciones bajas

Subcultivo

Los cultivos aislados frescos se conocen como **cultivos primarios** hasta que son "pasados" o "subcultivados". Normalmente son heterogéneos y poseen un ritmo de crecimiento bajo, pero son más representativos de los tipos celulares del tejido a partir del cual se derivan. Tras varios "pases" una línea celular o muere o se "transforma" para convertirse en una línea celular continua estable.

El subcultivo permite la expansión del cultivo, la posibilidad de clonaje, la caracterización y preservación y supone un mayor grado de uniformidad, aunque puede causar una pérdida de células especializadas. Por supuesto, los subcultivos suponen el sobrecrecimiento de uno de los tipos celulares presentes inicialmente. El tipo celular con mayor capacidad proliferativa acaba sobrecreciendo y desplazando a los demás.

Las líneas celulares establecidas son de menor tamaño, menos adherentes, más redondeadas, con una relación núcleo/citoplasma mayor que los cultivos primarios de los que procedían. Incrementan su tasa de crecimiento (el tiempo de duplicación se reduce de 36 - 38 horas a 12 - 36 horas), muestran reducción en la dependencia de suero, un aumento en la eficiencia de clonaje, una mayor capacidad para crecer en suspensión líquida o en agar y un aumento en la tumorigenicidad, comparados con sus progenitores.

Selección del medio de cultivo

Existen diversos medios de cultivos comerciales, con diversas variaciones respecto a sus componentes. En general, consta de dos componentes diferentes: uno definido, constituido por sales, vitaminas, aminoácidos, tampones, etc., y uno indefinido, que consiste en suero obtenido a partir de animales (generalmente de ternera o suero autólogo) La selección de medio es en buena medida empírica, así como lo es el uso de un determinado tipo de suero.

Una vez se ha seleccionado un tipo de medio, ha de intentar mantenerse constante durante tanto tiempo como sea posible. Por lo general, ningún medio de cultivo definido es capaz de sustentar la vida de las células en cultivo, porque carecen de algunos factores esenciales, desconocidos en la mayoría de los casos. El suero fetal es la fuente más habitual de dichos factores adicionales. Suele utilizarse el suero fetal bovino por ser bastante limpio y poderse producir en lotes suficientemente grandes. Aun así, es necesario testar la inducción de crecimiento por cada lote de suero, para comprobar si es capaz de hacer proliferar a un tipo celular determinado.

Sustrato de los cultivos celulares

El polipropileno previamente tratado para hacerlo humedecible y con carga neta negativa es de uso común hoy en día. En casos especiales (cultivo de neuronas, células musculares, células endoteliales de capilares y algunos cultivos epiteliales) el plástico está recubierto además con gelatina, colágeno o poli-lisina, que les confiere una carga neta positiva. También puede utilizarse vidrio, pero debe ser lavado cuidadosamente con un detergente no tóxico y prácticamente no se usa nunca.

Los pocillos varían en tamaño desde "limbros" (o "multiwell plates", de 1 mm^2 de superficie y capacidad para 5 - 10 µl de medio) y placas de microtitulación (de 30 mm^2, 100 - 200 µl y 96 pocillos), hasta una gama de placas y frascos de hasta 180 cm^2, y "rollerbottles" para cultivos a gran escala.

Preservacion de lineas celulares

En la actualidad se han obtenido miles de líneas celulares diferentes a partir de tejidos humanos y de otras especies. Muchas de ellas provienen de tejidos normales y poseen una capacidad limitada de duplicación. Otras pueden propagarse de manera indefinida. Ambas pueden ser expandidas para producir gran numero de alícuotas, congeladas, y caracterizadas.

En los últimos 30 años la "American Type Culture Collection" (ATCC) viene preservando y caracterizando la mayoría de líneas celulares existentes.

Crioconservación

Los cultivos celulares pueden conservarse viables congelados durante largo tiempo para posteriormente, ser descongelados y volver a proliferar en cultivo.

El daño celular causado por la congelación y descongelación es causado por los cristales de hielo que se forman en el interior celular, que harían estallar las células. La adición de un agente crioprotector como el dimetil sulfóxido (DMSO) o el glicerol, y la selección de las tasas adecuadas de congelación y descongelación, minimizan el daño celular. Por otro lado, estos crioprotectores son tóxicos y deben eliminarse o diluirse suficientemente tan pronto como sea posible una vez que las células se han descongelado y deban volver a proliferar.

Mientras la preservación a corto plazo de líneas celulares puede realizarse en congeladores a -80°C, es necesario el almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C) o su vapor (135°C) para tiempos más largos. En estas condiciones, pueden mantenerse viales congelados de la mayoría de las líneas celulares prácticamente de forma indefinida.

Contaje de células usando un hemocitómetro

Un hemocitómetro es una cámara de contaje dividida en cuadrantes de tamaño definido específicos, a la que se añade un volumen establecido de células en suspensión y se determina el número total de células realizando unos simples cálculos. El hemocitómetro se utiliza para cuantificar el número de células de un cultivo o para determinar el número de células viables después de teñirlas con azul tripán.

El contaje de células utilizando un hemocitómetro es arduo, pero es un método que permite distinguir células vivas de células muertas (usando azul tripán). Solamente se producen errores significativos usando un hemocitómetro, cuando se cuentan pocas células (<100; preferiblemente se deben contar 300 células). El método de contaje es el más directo y sencillo para controlar el grado de crecimiento de una población celular en propagación.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

BLOQUE 1: DISOLUCIONES Y pH (TEMA 1)

Clark: Experimental biochemistry. Ed: Freeman & Co.

Fasman: Practical Handbook of biochemistry and molecular biology. Ed: CRC Press.

Fry: Biological data analysis. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Giordan y cols.: Conceptos de biología I y Conceptos de biología II. Ed: Labor.

Kerridge & Tipton: Biochemical reasoning. Ed: Benjamin, Inc.

Krogman: Molecules, measurements, meanings. A laboratory manual in biochemistry. Ed: Freeman & Co.

Lehninger, Nelson & Cox: Principles of Biochemistry. Ed: Worth.

Lehninger: Biochemistry. Ed: Worth.

Montgomery & Swenson: Quantitative problems in biochemical sciences. Ed: Reeman & Co,

Moran & Scringeour: Biochemistry resource book. Ed: Prentice-Hall.

Plummer: An introduction to practical biochemistry. Ed: McGraw-Hill.

Rawn: Biochemistry. Ed: Harper & Row Publishers.

Segel: Cálculos en bioquímica. Ed: Acribia.

Stephenson: Introducción a la bioquímica. Ed: Limusa-Wiley.

Stryer: Biochemistry. Ed: Reverté

Williams y cols.: Introduction to laboratory chemistry. Ed: Addison-Wesley publishing company.

Wood y cols.: Biochemistry. A problems approach. Ed: Benjamin Inc.

Zubay: Biochemistry. Ed: Brown Publishers.

BLOQUE 2: TÉCNICAS BIOQUÍMICAS INSTRUMENTALES (TEMAS 2-4)

Baugh: Gas chromatography. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Bollag & Edelstein: Protein methods. Ed: Wiley-Liss.

Carmona, Navarro & Hernanz: Spectroscopy of biological molecules: modern trends. Ed: Kluwer academic publishers.

Chrambach, Dunn & Radula: Advances in electrophoresis. Ed: VCH.

Ducruix & Giege: Crystallization of nucleic acids and proteins. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Dunbar: Protein blotting. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

García-Segura y cols.: Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica. Ed: Síntesis.

Harlow & Lane: Antibodies: A laboratory manual. Ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Harris & Angal: Protein purification appli-

cations. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Hawcroft: Electrophoresis: the basics. Ed: IRL Press.

Millner: High resolution chroamtography. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Rickwood & Hames: Gel electrophoresis of nucleic acids. Ed: IRL Press.

Skoog & Leary: Análisis instrumental. Ed: McGraw-Hill.

Tanarro: Radiaciones ionizantes. Instalaciones radiactivas y de rayos X. Ed: Publicaciones de la JEN.

Walker: Methods in molecular biology (43): Newprotein techniques. Ed: Humana Press.

Work & Work: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Ed: Elsevier.

BLOQUE 3. MICROBIOLOGÍA (TEMAS 5-6)

Brock y cols.: Biology of microorganisms. Ed: Prentice-Hall.

Burleson: Virology: A laboratory manual. Ed: Academic Press.

Davis y cols.: Microbiology. Ed: Lippincott.

Davis y cols.: Principles of microbiology and immunology. Ed: Harper International.

Davis, Botstein & Roth: Advanced bacterial genetics. Ed: Cold Spring Harbor Laboratories Press.

Eklund & Lankford: Laboratory manual for general microbiology. Ed: Prentice-HAll Inc.

Freifelder: Microbial genetics. Ed: Jones & Bartlett Publishers.

Ingraham & Ingraham: Introducción a la microbiología. Ed: Reverté.

Levett: Analytical microbiology. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Malek & Fenel: Theoretical and methodological basis of continuous culture of microorganisms. Ed: Academic Press.

Malek y cols.: Continuous cultivation of microorganisms. Ed: Academic Press.

Mandelstand & McQuillen: Biochemistry of bacterial growth. Ed: Blackwell Scientific Publishers.

McNeil & Harvey: Fermentation. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

O'Leary: Practical handbook of microbiology. Ed: CRC Press.

Persing y cols.: Diagnostic molecular microbiology. Ediciones de "American Society for Microbiology".

Pirt: Principles of microbe and cell cultivation. Ed: Blackwell Scientific Publishers.

Stainer y cols: Microbiología. Ed: Reverté.

Stainer: Microbiología. Ed: Reverté.

Webster & Granoff: Encyclopedia of Virology. Ed: Academic Press.

BLOQUE 4. BIOLOGÍA MOLECULAR (TEMAS 7-9)

Ausubel y cols.: Current Protocols in Mo-

lecular Biology. Ed: Wiley.

Ayala & Kiger: Modern genetics. Ed: Benjamin-Cummings.

Brown: Essential molecular biology (I y I). (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Cardiel: Los genes. Ed: Reverté.

Cotterill: Eukaryotic DNA replication. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Davis, Kuehl & Batley: Basic methods in molecular biology. Ed: Appleton & Lange.

De Robertis & De Robertis, jr.: Cell and molecular biology. Ed: Lea and Febiger.

Ducruix & Giege: Crystallization of nucleic acids and proteins. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Ehrlich: PCR technology. Ed: Stockton Press.

Freifelder: Fundamentos de biología molecular. Ed: Acribia.

Glover & Hames: DNA cloning. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Hames & Higgins: Gene probes. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Hames & Higgins: Gene transcription. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Hames & Hiigins: Nucleic acid hybridization. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Hames & Rickwood: Molecular Biology LABFAX. Ed: Blackwell Scientific Publishers.

Hartl, Freifelder & Snyder. Basic genetics. Ed: Jones and Bartlett Publishers.

Houl & Ward: Nucleic acid sequencing. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Innis y cols.: PCR protocols: A guide to methods and applications. Ed: Academic Press.

Karp: Biología celular y molecular. Ed: McGraw-Hill.

Kingsman & Kingsman. Genetic engineering. Ed: Blackwell Scientific Publishers.

Kornberg: DNA replication. Ed: Freeman.

Larrick & Burck: Gene therapy. Ed: Elsevier.

Lewin: Gene expression. Ed: Wiley.

Lewin: Genes. Ed: Wiley.

Lodish y cols.: Molecular cell biology. Ed: Freeman and Co. (Media connected)

McPhearson: Directed mutagenesis. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

McPherson, Quirke & Taylor: PCR. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Old & Primrose: Principles of gene manipulation. Ed: Wiley.

Rickwood & Hames: Gel electrophoresis of nucleic acids. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Rolfs y cols.: PCR: Clinical diagnosis and research. Ed: Springer laboratories.

Sambrook, Fritsch & Maniatis: Molecular cloning: a laboratory manual.Ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Singer & Berg: Genes and genomes. Ed: Blackwell Scientific Publishers

Spector, Goldman & Leinwand. Cells III: Subcellular location of genes and their products. Ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Srb, Owen & Edgar: Facets of genetics. Publicaciones de Scientific American.

Tormo: Problemas de genética molecular. Ed: Síntesis.

Verma. The genome. Ed: VCH.

Walker: Methods in molecular biology (4): New nucleic acid techniques. Ed: Humana Press.

Watson y cols: Recombinant DNA. Ed: Scientific American.

Watson: Molecular Biology of the gene. Ed: Benjamin.

Work & Work: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Ed: Elsevier.

BLOQUE 5. BIOLOGÍA CELULAR (TEMA 10)

Alberts y cols. Biología Molecular de la célula. Ed: Omega.

Baldock & Graham: Image processing and analysis. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Berkaloff y cols.: Biología y fisiología celular. Ed: Omega.

Butler: Mammalian cell biotechnology. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Davis: Basic cell cuture. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Delves: Antibody production. Ed: Wiley.

Doyle & Griffiths: Mammalian cell culture. Ed: Wiley.

Fogh: Contamination in tissue culture. Ed: Academic Press.

Freshney: Culture of animal cells: A manual of basic technique. Ed: Liss.

Graham & Rickwood: Subcellular fractionation. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Graham & Rickwood: Subcellular fractionation. Ed: IRL Press.

Harlow & Lane: Antibodies: A laboratory manual. Ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Harris: Electron microscopy in biology. (The practical approach series). Ed: IRL Press.

Hayat: Priniples and techniques of electron microscopy. Biological applications. Ed: Van Nostrand Reinhold Company.

Herbert & Kubitschek: Introduction to research with continuous cultures. (Biological Techniques Series). Ed: Blackwell Scientific Publishers

Larraga, Fresno & Enjuanes: Inmunología. Ed: Publicaciones del CSIC.

Liddel &Cryer: A practical guide to monoclonal antibodies. Ed: Wiley.

Muñoz: Cáncer. Ed: Hélice

Paul: Cell and tissue culture. Ed: Churchill Livingstone.

Pollack: Readings in mammalian cell culture. Ed: Academic Press.

Rose: Atlas of vertebrate cells in culture. Ed: Academic Press.

Rothblat & Cristofalo: Growth, nutrition and metabolism of cells in culture. Ed: Academic Press.

Spector, Goldman & Leinwand: Cells I:

Culture and biochemical analysis of cells. Ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Spector, Goldman & Leinwand: Cells II: Light microscopy and cell structure. Ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Thomas: Organ culture. Academic Press.

Wasley & May: Animal cell culture methods. Ed: Blackwell Scientific Publishers.

Willmer: Cells and tissues in culture methods. Biology and physiology. Ed: Academic Press.

ISBN 84-7477-818-2

9 788474 778182