

# Manual de técnicas experimentais en bioloxía molecular e celular

Alejandro de Carlos Villamarín

Jose Manuel Faro Rivas

África González Fernández

Vicenta Soledad Martínez Zorzano

Manuel Megías Pacheco

Pilar Molist García

Paloma Morán Martínez

Juan José Pasantes Ludeña

Manuel Ángel Pombal Diego

Humberto Quesada Rodríguez

**Jose Manuel Faro Rivas (coordinador e editor)**

Manual de técnicas experimentais en bioloxía molecular e celular / Alejandro de Carlos Villamarín ... [et al.] ; Jose Manuel Faro Rivas, coordinador e editor

Vigo : Universidade de Vigo, Servizo de Publicacións, 2014  
138 p. ; 17X24 cm. – (Manuais da Universidade de Vigo ; 63)

D.L. VG. 928-2014 – ISBN 978-84-8158-674-9

1. Biología molecular – Metodología 2. Citología – Metodología I. Carlos Villamarín, Alejandro de II. Faro Rivas, Jose Manuel III. Universidade de Vigo. Servizo de Publicacións, ed.

Edición:  
Servizo de Publicacións da Universidade de Vigo  
Edificio da Biblioteca Central  
Campus de Vigo  
36310 Vigo  
Telf.: 986 812 235  
sep@uvigo.es

© Servizo de Publicacións da Universidade de Vigo, 2014  
© Jose Manuel Faro Rivas, coordinador e editor

Printed in Spain - Impreso en España  
ISBN: 978-84-8158-674-9  
D.L.: VG 928-2014

Impresión: Tórculo Comunicación Gráfica, S.A.

Reservados tódolos dereitos. Nin a totalidade nin parte deste libro pode reproducirse ou transmitirse por ningún procedemento electrónico ou mecánico, incluídos fotocopia, gravación magnética ou calquera almacenamento de información e sistema de recuperación, sen o permiso escrito do Servizo de Publicacións da Universidade de Vigo.

## Prólogo

A redución de horas e contidos nos novos graos fai que, nalgúns casos, non se poidan abordar en profundidade aspectos fundamentais das metodoloxías de análise celular e molecular máis empregadas nas investigacións biolóxicas levadas a cabo nos laboratorios. Este Manual de técnicas experimentais en bioloxía preséntase como una síntese parcial que pretende paliar estas deficiencias. Con esta obra poñemos ao dispor dos potenciais usuarios unha colección de técnicas relacionadas con diferentes campos da Bioloxía (bioloxía celular, bioquímica, xenética, histoloxía, inmunoloxía) e os seus fundamentos. As técnicas están descritas con gran detalle por profesores-investigadores da Facultade de Bioloxía da Universidade de Vigo pensando principalmente no seu uso docente en clases de prácticas de laboratorio, pero tamén como referencia de primeira man no laboratorio de investigación. Se serve como esperamos para facilitar a ensinanza e a aprendizaxe destas técnicas a estudantes universitarios e investigadores do ámbito da bioloxía e biomedicina, o esforzo realizado cumpriría un dos seus principais obxectivos.

Os autores

## Presentación

Este Manual de Técnicas Experimentais en Bioloxía estrutúrase en dúas partes: a primeira inclúe unha pequena serie de Seminarios cun contido teórico básico e a segunda a descrición detallada de diferentes prácticas de laboratorio. Os seminarios proporcionan unha visión concisa dos fundamentos fisicoquímicos ou moleculares nos que se basea o deseño das distintas técnicas. Con eles, preténdese facilitar a comprensión do porqué dos diversos pasos dos seus protocolos. Nalgúns casos tamén se presenta unha pequena perspectiva histórica da técnica. A segunda parte do manual fornece os protocolos detallados de diversas técnicas que forman parte de prácticas de laboratorio de bioloxía celular e molecular, impartidas dende hai anos en distintas materias polos autores. Cada capítulo segue a mesma estrutura básica: Obxectivos, Introducción, Material, Procedemento, Resultados e Cuestións. Nalgúns casos tamén se inclúe un apartado de Problemas e outro de Consellos. Na maioría destes capítulos, o apartado de Resultados inclúe un conxunto de Táboas e/ou Figuras con obxecto de axudar ao alumno na comprensión da práctica, a toma de datos e/ou a representación gráfica dos mesmos.

*As Lagoas-Marcosende, Vigo, decembro de 2013*

## Índice xeral

Prólogo	5
Presentación	6
Índice xeral	7
Principais abreviaturas utilizadas	8
Seminarios	9
1. Electroforese	11
2. Cromatografía	17
3. Anticorpos	25
4. Microscopía electrónica	27
5. Hibridación de ácidos nucleicos	31
6. Obtención de células inmunitarias: técnicas de purificación celular	37
7. PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )	45
Prácticas	51
1. Electroforese en xel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	53
2. Electroforese de ADN en xel de agarosa	59
3. Cromatografía de intercambio iónico	65
4. ELISA sándwich	73
5. Microscopía electrónica	79
6. Inmunohistoquímica	89
7. Ensaio <i>dot blot</i>	101
8. Ensaio de inmunodifusión dobre (Ouchterlony)	105
9. Hibridación <i>dot blot</i>	111
10. Extracción de soro e obtención e cómputo de células inmunitarias	117
11. Amplificación do ADN mitocondrial mediante PCR	123
Bibliografía complementaria	131

## Principais abreviaturas utilizadas

ABC	técnica avidina-biotina-peroxidase
Ac	anticorpo
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADN <sub>c</sub>	ADN complementario.
ADN <sub>mt</sub>	ADN mitocondrial
Ax	antíxeno
ARN	ácido ribonucleico.
BSA	albúmina de soro bovina ( <i>bovine seroalbumin</i> ).
COI	xen mitocondrial Citocromo Oxidasa I.
dNTP	desoxirribonucleósido trifosfato.
DOP PCR	PCR cebada cun oligonucleótido dexenerado ( <i>degenerated oligonucleotide-primed</i> ).
ELISA	<i>Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay</i> .
FITC	isotiocianato de fluoresceína.
HPLC	cromatografía de alta presión ou de alta eficacia.
Ig	inmunoglobulina.
ME	microscopio electrónico.
M <sub>r</sub>	masa molecular relativa.
OVA	ovalbúmina.
PAP	técnica peroxidase anti-peroxidase.
pb	pares de bases.
PB	tampón fosfato.
PBS	tampón fosfato salino.
PCR	reacción en cadea das polimerases ( <i>polymerase chain reaction</i> ).
R <sub>f</sub>	‘factor de retardo’ ou ‘relativo ao fronte’.
RIA	radioinmunoensaio.
SDS	dodecil sulfato sódico.
SEM	microscopía electrónica de varrido ( <i>scanning electron microscopy</i> ).
TEM	microscopía electrónica de transmisión ( <i>transmission electron microscopy</i> ).
T <sub>m</sub>	temperatura á que se separan dúas cadeas de ADN ( <i>melting temperature</i> ).
UV	ultravioleta.

# **SEMINARIOS**





# 1. ELECTROFORESE

## PRINCIPIOS XERAIS

Cando se aplica un campo eléctrico a unha disolución as moléculas de soluto que teñen carga neta positiva desprázanse cara ao cátodo (–) e as que teñen carga neta negativa cara ao ánodo (+). Este desprazamento denomínaselle electroforese. Se se aplica unha diferenza de potencial a través duns eléctrodos xérase un campo eléctrico ( $E$ ) que equivale á voltaxe aplicada ( $V$ ), dividida pola distancia entre os eléctrodos ( $d$ ). Cando se aplica este campo eléctrico,  $E$ , a forza sobre unha molécula cunha carga de  $q$  culombios é de  $Eq$  N (newtons) e é a que a dirixe cara un eléctrodo. Non obstante, existe unha resistencia friccional  $f$  que retarda o movemento da molécula cargada (ver Figura 1). A resistencia friccional reflicte o tamaño e a forma da molécula, a porosidade do medio (que adoita ser un xel) e a viscosidade do fluído que conduce a corrente, denominado tampón de electroforese.

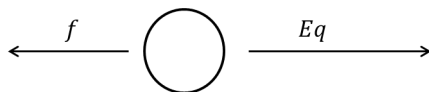


Figura 1. Forzas que actúan sobre unha molécula cargada sometida a un campo eléctrico.

A velocidade,  $v$ , dunha molécula cargada nun campo eléctrico virá dada pola ecuación:

$$v = \frac{Eq}{f'}$$

Sendo  $f'$  o coeficiente de fricción.

De maneira máis común emprégase o termo mobilidade electroforética ( $\mu$ ) que equivale á velocidade dunha molécula por unidade de campo:

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{f'} = \frac{Ze}{f'}$$

Onde  $e$  representa o signo das cargas e  $Z$  o seu número.

A corrente na solución entre os eléctrodos é conducida principalmente polos ións do tampón de electroforese e unha pequena parte polos ións da mostra. Como se trata dun circuíto de corrente continua réxese pola lei de Ohm, que expresa a relación entre intensidade da corrente ( $I$ ), voltaxe ( $V$ ) e resistencia ( $R$ ):

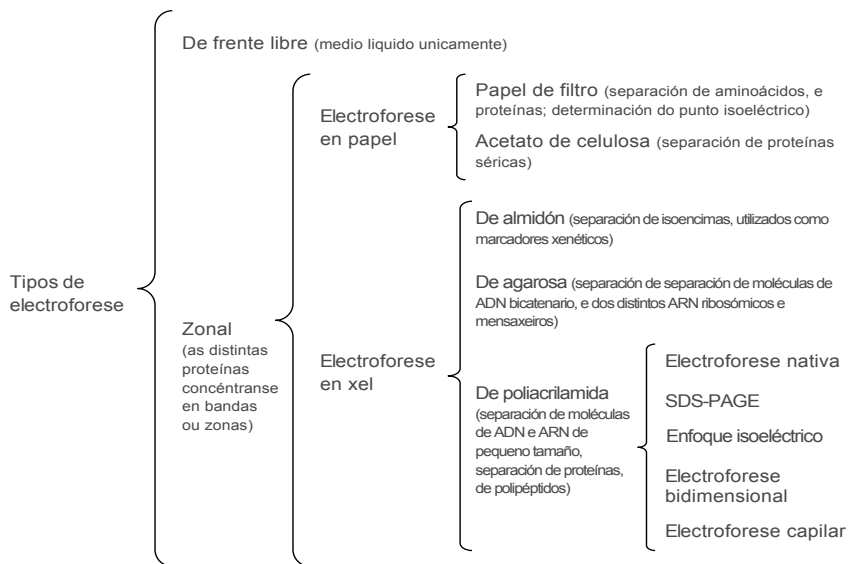
$$R = \frac{V}{I}$$

En electroforese, pódese acelerar unha separación incrementando a voltaxe aplicada, o que aumentaría a intensidade da corrente circulante reducindo o tempo de migración. Durante unha electroforese a potencia en vatios ( $W$ ) que se xera no medio vén dada pola ecuación:

$$W = RI^2$$

A meirande parte da potencia xerada disípanse en forma de calor cuxa produción excesiva ten efectos negativos sobre o resultado do proceso electroforético. O quecemento do xel e do tampón de electroforese produce a aparición de correntes de convección térmica e o incremento da taxa de difusión tanto das moléculas da mostra como dos ións do tampón de electroforese. Isto tradúcese na aparición de “rúas” máis anchas e bandas máis dispersas, interferindo coa resolución axeitada das mostras separadas. Dado que os bordos do xel disipan a calor con maior eficiencia que o centro, a viscosidade do tampón de electroforese é maior nos bordos que no centro, onde o avance da electroforese será maior, dando lugar a un efecto de fronte cambada (efecto sorriso). Finalmente, outro efecto indesexable derivado da xeración de calor consistirá na posible perda de actividade encimática no caso dalgúns tipos de electroforese en condicións non desnaturalizantes.

O seguinte esquema resume os tipos principais de electroforese:



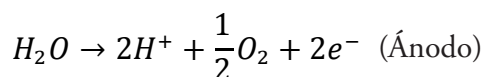
## ELECTROFORESE EN XEL

É o tipo de electroforese zonal máis empregado. Os xeles son materiais porosos que se elaboran con amidón, agarosa ou acrilamida e os poros teñen un tamaño semellante ao das moléculas. As separacións baséanse no efecto de peneirado que exerce a matriz que forma o xel sobre a migración das moléculas, de xeito que as moléculas grandes se atrasan con respecto ás pequenas. Cada molécula posúe a súa mobilidade electroforética,  $\mu$ , característica ( $H^+$ ).

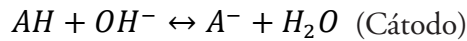
### Electroforese en xel de poliacrilamida

O monómero que se emprega para a formación do xel é acrilamida. Os catalizadores da reacción son  $N,N,N',N'$ -tetrametiletildiamina (TEMED) e persulfato amónico  $(NH_4)_2S_2O_8$ . O ion persulfato  $S_2O_8^{2-}$  disolto en auga forma radicais libres  $2SO_4^{\cdot -}$  que ao contactar coa acrilamida actívana permitindo que forme polímeros de cadea longa. Esta disolución é viscosa mais non forma un xel posto que as cadeas se deslizan unhas sobre as outras. A formación dun xel require o enlazado de cadeas de poliacrilamida entre si. Realizando a polimerización en presenza de  $N,N'$ -metilenbisacrilamida conséguese a formación dunha matriz ou rede tridimensional de cadeas de poliacrilamida. O tamaño dos poros na matriz determínase mediante dous parámetros que son a concentración de acrilamida e o grao de enlace (concentración de bisacrilamida). O rango de separación que se pode obter cun xel está relacionado co tamaño de poro e, daquela, coa concentración de acrilamida e adoita variar entre 12.000 y 100.000 Da empregando xeles do 10 ao 15%.

O tampón de electroforese serve para manter o valor de pH constante nos reservorios da cubeta e no xel, e para conducir a corrente a través do campo eléctrico. As reaccións que permiten o paso de corrente son as da electrólise da auga producíndose hidróxeno no cátodo e osíxeno no ánodo segundo as seguintes reaccións:



Cando a corrente está circulando ambos eléctrodos emiten burbullas de gas; hidróxeno molecular no cátodo e osíxeno molecular no ánodo. Por cada mol de electróns que flúe a través do circuíto prodúcese un mol de  $OH^-$  no reservorio catódico e un mol de protóns ( $H^+$ ) no anódico. As posibles fluctuacións do valor de pH na cubeta debidas ao exceso de ións hidroxilo ou de protóns son neutralizadas en ambos reservorios por acción do tampón de electroforese ( $AH \leftrightarrow A^- + H^+$ ):



## Electroforese en xel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Esta técnica separa as proteínas segundo as súas masas moleculares polos efectos de peneirado do xel. Para eliminar pontes disulfuro e separar as distintas subunidades das proteínas, as mostras trátanse cun axente redutor como ditiotreitól ou  $\beta$ -mercaptoetanol.

Os xabóns e os deterxentes son moléculas anfipáticas que se comportan como axentes desnaturalizantes das proteínas. O deterxente dodecil sulfato sódico (SDS),  $CH_3-(CH_2)_{11}-OSO_3^-Na^+$ , únese ás proteínas nunha proporción constante (aproximadamente unha molécula de SDS por cada 2 residuos aminoácidos). Como o SDS posúe carga negativa, as proteínas exhiben relacións carga/masa proporcionais e formas semellantes. Por SDS-PAGE pódese determinar a masa molecular relativa ( $M_r$ ) dunha proteína con grande exactitude sometendo simultaneamente ao mesmo proceso a proteínas con valores de  $M_r$  coñecidos (marcadores) fronte á proteína problema.

As bandas resultantes da electroforese poden localizarse tinguido as proteínas con distintos axentes como son o colorante Azul brillante de Coomassie ou ións de prata ( $Ax^+$ ). As proteínas tamén poden marcarse previamente cun radioisótopo como o  $^{35}S$  subministrando ás células o aminoácido [ $^{35}S$ ]-metionina.

En SDS-PAGE descontinua as bandas de proteína resultantes son estreitas e, por iso, o poder de resolución aumenta. A electroforese prepárase engadindo o aminoácido glicina a un tampón Tris-HCl a pH 8,3 nun sistema formado por dous xeles unidos entre si. Un primeiro xel, denominado concentrador, prepárase a un pH de 6,8 onde a glicina se atopa próxima ao seu punto isoeléctrico. Un segundo xel, denominado separador, prepárase cun pH de 8,8 onde a glicina posúe carga negativa. A mostra de proteínas migra en primeiro lugar a través do xel concentrador onde os ións glicina apenas conducen a corrente e exhiben moi pouca mobilidade. Polo contrario, os ións  $Cl^-$  do tampón migran por diante das proteínas a causa do seu pequeno tamaño e carga negativa. As proteínas cargadas negativamente penetran no xel prensado a menor velocidade que os ións  $Cl^-$  pero máis rápido que os ións glicina que a pH 6,8 apenas teñen carga. O resultado é a formación dun gradiente de mobilidade electroforética dos distintos anións e neste xel ( $glicina^- \rightarrow proteínas^- \rightarrow Cl^-$ ) que conduce ás proteínas a acumularse por diante do fronte formado polos ións glicina e, eventualmente, a compilarse

en forma de bandas finas concentradas no pequeno espazo formado pola interfase entre o xel prensado e o xel separador. Este efecto vese favorecido polo feito de que o xel prensado se prepara a unha concentración de acrilamida baixa (4%). Outro efecto que ocorre neste xel é que os ións glicina apenas conducen a corrente e a resistencia,  $R$ , do circuíto aumenta. Como a corrente que pasa polo circuíto ( $I$ ) é constante, se  $R$  aumenta tamén aumentará  $V$  dado que en todo momento se cumpre que  $V = IR$ . O resultado é que no xel concentrador ocorre un incremento local de  $V$  que provoca que as proteínas migren moi rápido. Cando o fronte formado polos anións penetra no xel separador, o seu maior valor de pH (8,8) e de concentración de acrilamida (menor tamaño de poro) producen dous efectos. En primeiro lugar, un valor de pH máis alto outorga aos ións glicina maior carga negativa o que, xunto ao seu pequeno tamaño, fai que adianten ás proteínas na súa migración a través do sistema. En segundo lugar, un menor tamaño de poro incorpora un compoñente friccional maior á mobilidade individual de cada proteína presente na mostra. A combinación destes factores fará que, no xel separador, o efecto de peneirado molecular separe as proteínas polo seu tamaño.

## Enfoque isoelectrico

As cadeas laterais dos aminoácidos que forman as proteínas poden exhibir distintos estados de carga. A valores de pH ácidos (baixos) os aminoácidos gañan protóns de modo que os grupos ácido carboxílico tenden a quedar sen carga ( $\text{COOH}$ ) e os grupos amino tenden a cargarse totalmente ( $\text{NH}_3^+$ ) contribuíndo a que as proteínas teñan carga neta positiva. A valores de pH básicos (altos) os grupos ácido carboxílico tenden a ceder o seu protón cargándose negativamente ( $\text{COO}^-$ ) e os grupos amino tenden a estar sen carga ( $\text{NH}_2$ ) polo que as proteínas teñen carga neta negativa. Ao seu pH isoelectrico, o número de cargas positivas e negativas dunha proteína están compensados e a ese valor de pH a proteína non migrará cara ningún dos dous polos (ánodo ou cátodo) formándose unha banda de proteína “enfocada”.

## Electroforese bidimensional

En ocasións, unha banda obtida mediante SDS-PAGE pode conter varias proteínas distintas (polo tanto, deben ter un valor de  $M_r$  similar). Nese caso a mostra inicial sométese en primeiro lugar a unha separación por enfoque isoelectrico (esperando que proteínas con  $M_r$  similar posúan distinto pH isoelectrico) e denomínase “primeira dimensión”. Rematada esta, a mostra sométese a SDS-PAGE no que se denomina “segunda dimensión”. A mestura de proteínas foi finalmente resolta combinando dúas propiedades distintas de cada proteína como son os seus valores de pH isoelectrico e de masa molecular.

## Electroforese capilar

Esta técnica lévase a cabo en tubos capilares longos (50 cm) e moi delgados (20-100  $\mu\text{m}$ ) de cuarzo, vidro ou plástico. Estes capilares disipan a calor eficientemente e permiten a aplicación de campos eléctricos elevados (800 V/cm ata 30.000 V). A electroforese estándar non permite aplicacións maiores de 15-40 V/cm polo perigo de quecemento excesivo e isto fai que a electroforese capilar reduza o proceso de separación a minutos en lugar de horas. Coa ausencia de quecemento excesivo minimízanse os fenómenos de convección e difusión de modo que as bandas de proteína resultantes son moi estreitas e se detectan mediante varridos de luz UV, que se representan graficamente como unha serie de picos. Dada a sensibilidade da detección espectrofotométrica (en lugar dunha tinguidura) poden detectarse cantidades mínimas de proteínas ou ácidos nucleicos.

## ELECTROFORESE DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Os ácidos nucleicos, ADN ou ARN, pódense separar, identificar e purificar mediante electroforese en xeles de agarosa (ver Práctica 2) ou poliacrilamida. Os xeles de poliacrilamida son máis axeitados para separar fragmentos pequenos de ADN (5 a 300 pares de bases [pb] que equivalen a 3.000 – 200.000 Da). O seu poder de resolución é moi alto podendo distinguirse dúas bandas formadas por moléculas que difiren entre si tan só en 1 pb. A desvantaxe é que a preparación destes xeles é máis complexa e consume máis tempo. Os xeles de poliacrilamida adoitan desenvolverse en configuración vertical.

A agarosa é un polímero natural que se obtén de algas dos xéneros *Gelidium* e *Gracilaria*. Está formado por subunidades do disacárido agarobiosa (D-galactosa e 3,6-anhidro-L-galactopiranososa). Os xeles de agarosa teñen menor poder de resolución que os de poliacrilamida pero posúen maior rango de separación. Segundo a concentración de agarosa do xel, é posible separar moléculas de ADN nun rango de 200 pb a 50.000 pb (que equivalen a masas moleculares que abranguen de 130.000 Da ata  $3 \times 10^7$  Da) variando a concentración de agarosa entre 0,7% e 2%. A visualización das bandas formadas polas moléculas de ADN ou ARN realízase habitualmente por tinguidura con axentes intercalantes como é o colorante fluorescente bromuro de etidio e posterior transiluminación con luz ultravioleta de 302 nm.