

## TRABAJO DE LABORATORIO CURSO BT 51

### EXTRACCION DE DNA (LAVADO Y LISIS CELULAR)

- 1) En este práctico de laboratorio usted trabajará con una muestra biológica (sangre), por lo que debe considerarla como potencialmente contaminada y manejarla siempre con guantes.
- 2) Coloque 1 ml de muestra problema en un tubo corning de 15 ml.
- 3) Agregue un volumen de buffer de lisis en proporción 1:3.
- 4) Agite suavemente y centrifugue a 4000 rpm por 8 min.
- 5) Deseche el sobrenadante y repita el paso 3 y 4 dos veces más.
- 6) Al residuo final agregue 1 ml de solución de Chomczynski. Homogenice con la pipeta en forma suave.
- 7) Agregue 2-3 ml de etanol absoluto (frío, debiera esta a  $-20^{\circ}$  C hasta su uso)). Mezclar y dejar 2-3 minutos a  $T^{\circ}$  ambiente. Aquí debería observarse un precipitado blanco de DNA.
- 8) Centrifugue este tubo, elimine el sobrenadante, deje que el etanol se evapore. Deje secar el residuo a  $T^{\circ}$  ambiente.
- 9) Reconstituir en 200  $\mu$ l de NaOH (8 mM) y traspasar a tubo eppendorf.

### CUANTIFICACION DE DNA

- 1) Tempere el tubo con el DNA a  $37^{\circ}$ C durante 10 minutos.
- 2) El DNA que Usted ha obtenido ahora puede ser cuantificado por espectrofotometría.

## PCR

Todas las soluciones que Usted necesita para este práctico se encuentran preparadas y congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Trabaje con cuidado, elimine cada punta que utilice.

1) Prepare en una gradilla compacta, el número de eppendorfs (0,2 ml) necesarios para su muestra ( $n=3$ ; la muestra en duplicado + un blanco).

2) Un integrante del grupo de alumnos preparará en un tubo aparte (eppendorf de 1,5 ml) la cantidad necesaria de mezcla de reacción para todo el grupo.

3) El programa de ciclos que utiliza esta técnica está formado por: denaturación inicial de  $95^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos. 35 ciclos conformados por: denaturación  $95^{\circ}\text{C}$  durante 20 segundos; alineamiento a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos y extensión a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 60 segundos; con una extensión final de 5 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ .

4) Descongele los reactivos 10XPCR buffer, mezcla 2mM dNTPs y primers.

5) Sus condiciones generales de reacción serán las siguientes:

	Volumen (ul)	Concentración Final
10 X PCR Buffer	1.0	
dNTPs ( 2 mM)	0.4	
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.8	
Primer G1 (20uM)	1.0	
Primer G2 (20uM)	1.0	
Primer G3 (20uM)	1.0	
Taq DNA (5U/ul)	0.1	
-----		
DNA muestra.....	1.5 ul	
Agua destilada (para 9 ul).....	3.2 ul	

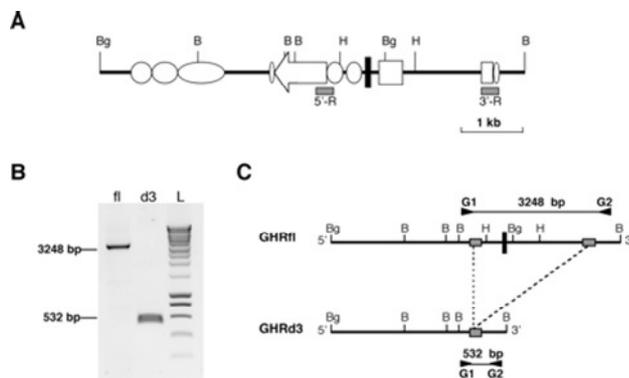
d) Coloque el tubo con el DNA en el termociclador y ejecute el programa necesario para amplificar el fragmento del gen de estudio.

e) Al finalizar la PCR, coloque directamente el producto de amplificación en un gel de agarosa al 1.5 % con bromuro de etidio y visualice en UV. Asigne un valor a cada fragmento de acuerdo a marcador de peso molecular.

## PCR múltiple

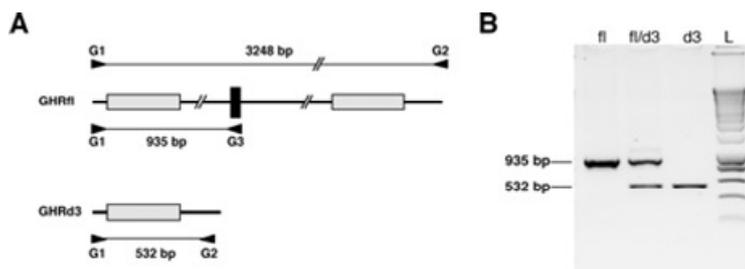
Para determinar el genotipo del exón *GHR* en el locus 3 (es decir *GHRfl/GHRfl*, *GHRfl/GHRd3*, o *GHRd3/GHRd3*) de cada individuo, realizamos un PCR con múltiple amplificación (multiplex PCR) en las muestras de DNA genómico de acuerdo a lo descrito (1). Brevemente, este ensayo, se fundamenta en el uso de tres partidores (dos partidores flanqueantes al exón 3 y un tercero localizado dentro de ese exón), esto permite discriminar entre los alelos *GHRfl* y *GHRd3* ya que son amplificados como dos productos de diferente tamaño (935 pb y 532 pb, respectivamente). Al término de cada PCR verificamos la correcta amplificación en un gel de agarosa al 1,5%.

(1) Pantel J, Machinis K, Sobrier ML, Duquesnoy P, Goossens M, Amselem S. Species-specific alternative splice mimicry at the growth hormone receptor locus revealed by the lineage of retroelements during primate evolution. *J Biol Chem* 2000, 275: 18664-18669



### **Genomic organization of the human GHR locus in the vicinity of exon 3.**

A, GHR exon 3 locus in an individual expressing full-length GHR transcripts. Exon 3 is shown as a *black box*. (Pantel J, et al. *J. Biol. Chem.*, Vol. 275, Issue 25, 18664-18669, 2000).



**Genotyping assay at the GHR-exon 3 locus.** A, schematic representation of the human GHRfl region including exon 3 (*black box*) and the repeated elements (*gray boxes*). The GHRd3 allele contains a single copy of the repeat (*gray box*). The position and orientation of primers G1, G2, and G3 used in the multiplex PCR assay are indicated by *arrowheads*. B, under specific experimental conditions (*i.e.* denaturation 94 °C, 30 s; annealing 60 °C, 30 s; and elongation 72 °C, 1 min 30 s), primers G1 and G2 allowed the amplification of GHRd3 alleles only, whereas primers G1 and G3 amplify GHRfl alleles. The homozygous GHRfl, heterozygous GHRfl/GHRd3 and homozygous GHRd3 genotypes are denoted by *fl*, *fl/d3*, and *d3*, respectively.