



TÍTULO: Clonación de genes clave del metabolismo del carbono y el nitrógeno en cianobacterias marinas

PROFESOR RESPONSABLE: Dr. Antonio López Lozano

MACROÁREA DE CONOCIMIENTO: Ciencias Exactas y Naturales

RESUMEN: (200 palabras)

Las cianobacterias se caracterizan por su capacidad para realizar la fotosíntesis oxigénica, y como resultado, estos microorganismos desempeñan una función ecológica fundamental como fijadores fototróficos de CO₂, contribuyendo significativamente a la producción primaria y al ciclo geoquímico del carbono. Por otra parte, las cianobacterias son capaces de detectar los niveles intracelulares de carbono y nitrógeno mediante un complejo sistema en el que participan como principales reguladores el factor de transcripción NtcA y la proteína de transducción de señales P_{II}.

Las cianobacterias marinas son los organismos fotosintéticos más abundantes de la Tierra, con sólo dos géneros, *Prochlorococcus* y *Synechococcus*, como principales representantes de este grupo en el océano. Mientras que los *Synechococcus* marinos presentan una amplia distribución geográfica, *Prochlorococcus* agrupa a diferentes ecotipos adaptados a vivir a diferentes profundidades. En el proyecto de investigación que se propone, los alumnos abordarán la clonación en *Escherichia coli* de los genes codificantes de los dos reguladores principales del metabolismo del carbono y el nitrógeno, NtcA y P_{II}, en cianobacterias marinas. Para ello, se plantea un organigrama que permitirá realizar los diferentes pasos que implica este proceso experimental durante los tres días disponibles de trabajo en laboratorio.



PROFESORES PARTICIPANTES:

NOMBRE: Dr. Antonio López Lozano
CARGO: Profesor Sustituto Interino
DEPARTAMENTO: Bioquímica y Biología Molecular
FACULTAD: Facultad de Veterinaria
CONTACTO (correo y teléfono): b72lolof@uco.es / 957.21.10.75

NOMBRE: Dra. Guadalupe Gómez Baena
CARGO: Profesora Ayudante Doctora
DEPARTAMENTO: Bioquímica y Biología Molecular
FACULTAD: Facultad de Veterinaria
CONTACTO (correo y teléfono): v52gobag@uco.es / 957.21.10.75

NOMBRE: D^a. Yesica Melero Rubio
CARGO: Investigadora predoctoral
DEPARTAMENTO: Bioquímica y Biología Molecular
FACULTAD: Facultad de Ciencias
CONTACTO: b92meruy@uco.es / 957.21.83.17



OBJETIVOS: (General y específicos)

Objetivo general:

Que el alumnado se familiarice con la aplicación de una herramienta básica y ampliamente utilizada en cualquier laboratorio de las áreas de Bioquímica y Genética, como es la clonación en *Escherichia coli* del gen que codifica una proteína de interés, empleando como modelo de estudio las proteínas reguladoras del metabolismo del carbono y el nitrógeno en cianobacterias marinas: NtcA y P_{II}.

Objetivos específicos:

1. Extracción de ADN genómico a partir de cultivos de las cianobacterias marinas *Prochlorococcus* y *Synechococcus*
2. Construcción de los vectores de clonación:
 - a. Amplificación de los genes codificantes de las proteínas reguladoras NtcA y P_{II} mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa)
 - b. Visualización de los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa.
 - c. Purificación de los fragmentos de ADN
 - d. Ligación de los genes amplificados a un vector de clonación comercial
3. Transformación de células de *Escherichia coli* con las mezclas de ligación
4. Comprobación por PCR del resultado de la clonación



RECURSOS: (Aulas, laboratorios, equipamiento)

Para la realización de este proyecto se dispondrá de las siguientes instalaciones:

Laboratorios de prácticas

En el Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular hay habilitados dos laboratorios de prácticas, equipados con los instrumentos y aparatos necesarios para la manipulación y análisis de ácidos nucleicos (espectrofotómetros, sistemas para la preparación de geles de agarosa y realización de electroforesis de ácidos nucleicos, así como para la visualización de geles), la amplificación de fragmentos de ADN (termocicladores) y transformación bacteriana (termobloques, cabinas de flujo laminar, incubadores).

Aulas del Edificio Severo Ochoa

Para la exposición de conceptos teóricos se reservarán las aulas del Edificio Severo Ochoa en el Campus de Rabanales, las cuales cuentan con equipos de proyección.



DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD: (Máximo 5 hojas)

Introducción

La cianobacteria *Prochlorococcus* constituye junto con las estirpes marinas del género *Synechococcus* el grupo de organismos fotosintéticos más abundante del planeta. Su enorme abundancia y su contribución a la producción primaria global le confieren una extraordinaria importancia ecológica. Las cianobacterias son capaces de detectar los niveles intracelulares de carbono y nitrógeno mediante un complejo sistema controlado por la concentración del metabolito 2-oxoglutarato, en el que participan como principales reguladores el factor de transcripción NtcA y la proteína de transducción de señales P_{II}.

El estudio en laboratorio de la respuesta adaptativa de estas cianobacterias marinas a la presencia o ausencia de diferentes compuestos que puedan aportarles elementos esenciales para la vida como el nitrógeno y el carbono se ve facilitado por el aislamiento de aquellas proteínas que participan en la regulación de las rutas metabólicas que les permitirán asimilarlos.

El objetivo de este proyecto será clonar en *Escherichia coli* los genes que codifican a los dos reguladores principales del metabolismo del carbono y el nitrógeno, NtcA y P_{II}, en cianobacterias marinas. La clonación de ambos genes permitiría una posterior expresión de estas proteínas en *Escherichia coli*, que tendría como resultado la obtención de una gran cantidad de ambas para su estudio individual.

Protocolos

Los protocolos que se aplicarán durante el desarrollo de la actividad incluyen:

- Recogida de células de cianobacterias marinas crecidas en cultivo
- Preparación de muestras purificadas de ADN genómico
- Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría
- Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR
- Electroforesis de ácidos nucleicos, incluyendo la preparación de geles
- Realización de un cuaderno de laboratorio

Materiales y aparatos a utilizar

- Balanzas
- Termociclador
- Micropipetas
- Espectrofotómetro
- Centrífugas
- Sistemas de electroforesis
- Sistemas de análisis de imagen
- Bloques térmicos
- Reactivos, colorantes, tampones, etc.



Resultados esperados

El proyecto está diseñado para que el alumnado conozca los pasos a seguir en la clonación de un gen de interés. Los alumnos se familiarizarán con el trabajo en laboratorio, el método científico y el diseño de experimentos. Esta experiencia les permitirá conocer cómo se obtienen extractos celulares bacterianos, cómo se procesan en el laboratorio, las diferentes técnicas para el análisis de ácidos nucleicos y su uso en la modificación genética de organismos procariontes, y cómo se realiza el análisis de los datos obtenidos.

Cronograma detallado de la actividad

Primera sesión

Presentación del proyecto por parte de los Profesores responsables del mismo.

Segunda sesión

Lugar: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (laboratorios de prácticas)

Objetivos:

- Conocer los tipos de ácidos nucleicos que pueden aislarse en una muestra biológica
- Conocer el fundamento y las diferentes aplicaciones de la amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR
- Familiarizarse con el método de cuantificación de ácidos nucleicos
- Conocer las normas básicas de seguridad e higiene en un laboratorio
- Concienciar sobre la importancia de un correcto manejo de los residuos

Recursos y consumibles necesarios:

- Material de protección: gafas de laboratorio, batas y guantes desechables
- Cultivos de cianobacterias marinas
- Micropipetas y puntas de pipeta
- Centrífugas y tubos de centrífuga
- Reactivos para el aislamiento de ADN
- Espectrofotómetro con la lámpara de luz ultravioleta para la cuantificación de ácidos nucleicos
- Termociclador y reactivos para la amplificación de ADN por PCR

Actividades que desarrollar:

- Aislamiento de ADN genómico a partir de un cultivo de cianobacterias marinas
- Amplificación de los genes codificantes de las proteínas NtcA y P_{II} de cianobacterias marinas mediante PCR



Tercera sesión

Lugar: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (laboratorios de prácticas)

Objetivos:

- Conocer las bases teóricas de la electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa
- Conocer la necesidad de emplear un tampón adecuado para que una enzima pueda desarrollar su actividad catalítica
- Familiarizarse con las bases teóricas de la modificación genética de un organismo
- Concienciar sobre la importancia de un correcto empleo de los organismos modificados genéticamente desde un punto de vista ecológico y social

Recursos y consumibles necesarios:

- Material de protección: gafas de laboratorio, batas y guantes desechables
- Sistemas de electroforesis de ácidos nucleicos con fuente de alimentación
- Micropipetas y puntas de pipeta
- Centrífugas y tubos de centrífuga
- Reactivos para la preparación de geles de agarosa
- Balanzas
- Sistema de análisis de imagen
- Bloques térmicos
- Reactivos para la purificación de fragmentos de ADN y construcción de vectores de clonación
- Células competentes de *Escherichia coli*
- Incubador
- Material y reactivos para la preparación de placas de cultivo

Actividades que desarrollar:

- Electroforesis en geles de agarosa de los genes amplificados mediante PCR
- Aislamiento de los fragmentos de ADN separados mediante electroforesis
- Ligación de los genes amplificados a un vector de clonación y transformación en *Escherichia coli*

Cuarta sesión

Lugar: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (laboratorios de prácticas)

Objetivos:

- Conocer los diferentes métodos de análisis de estirpes bacterianas modificadas genéticamente
- Conocer las bases teóricas de la expresión de proteínas exógenas en una bacteria transformada



- Interpretación de los resultados obtenidos en la electroforesis de los productos amplificados

Recursos y consumibles necesarios:

- Material de protección: gafas de laboratorio, batas y guantes desechables
- Sistemas de electroforesis de ácidos nucleicos con fuente de alimentación
- Micropipetas y puntas de pipeta
- Centrífugas y tubos de centrifuga
- Reactivos para la preparación de geles de agarosa
- Balanzas
- Sistema de análisis de imagen
- Bloques térmicos
- Termociclador y reactivos para la amplificación de ADN por PCR

Actividades a desarrollar

- Selección de colonias de *Escherichia coli* transformadas
- Comprobación mediante PCR de la presencia de los genes introducidos en las colonias transformadas
- Electroforesis en geles de agarosa de los fragmentos de ADN amplificados

Quinta sesión

Los alumnos participarán primero en una sesión específica en las que se les enseñará a tratar, analizar y presentar los resultados obtenidos de acuerdo con el método científico. Posteriormente, en formato powerpoint, los alumnos presentarán al resto de participantes los resultados obtenidos en su trabajo, comentando sus impresiones sobre la experiencia desarrollada.

Día	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
P L A N	Inauguración campus Presentación Proyectos	Trabajo en los laboratorios de prácticas	Trabajo en los laboratorios de prácticas	Trabajo en los laboratorios de prácticas	Trabajo en aula convencional y/o de informática
O B J E T O	Organización de los grupos de trabajo	Aislamiento de ADN y amplificación de genes mediante PCR	Obtención fragmentos de ADN y transformación de <i>E. coli</i>	Selección y comprobación de colonias transformadas por PCR	Aprender a tratar, analizar y presentar los resultados



REFERENCIAS

Forcada-Nadal A, Llácer JL, Contreras A, Marco-Marín C and Rubio V (2018) The PII-NAGK-PipX-NtcA Regulatory Axis of Cyanobacteria: A Tale of Changing Partners, Allosteric Effectors and Non-covalent Interactions *Front. Mol. Biosci.* 5: 91.

Sambrook J and Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press.