

## 13. ANEXOS

### MEDIOS DE CULTIVO

#### 1. Medio mínimo enriquecido con lignina:

Compuesto	Cantidad
$K_2HPO_4$	1.73 g
$KH_2PO_4$	0.68 g
$(NH_4)_2SO_4$	0.83 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.10 g
Solución de elementos traza	1 mL
Solución stock de vitaminas	0.1 mL
Lignina	0.2%
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL
pH = 5	

- Solución de elementos traza:

Compuesto	Cantidad
$CaCl_2 \cdot H_2O$	1 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.3 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g
$EDTA \cdot 7H_2O$	0.2 g
Agua destilada	100 mL

- Solución stock de vitaminas:

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
Pantotenato de calcio	40 mg
Ácido fólico	2 mg
Inositol	200 mg
Ácido nicotínico	40 mg
p-aminobenzoico	40 mg
Piridoxina	40 mg
Riboflavina	20 mg
Tiamina	40 mg
Agua destilada	100 mL

2. Medio glucosado de Sabouraud:

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
Glucosa	20 g
Peptona	10 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL
pH = 5	

3. Medio de agar papa-dextrosa (PDA):

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
Papa	250 g
Glucosa anhidra	1%
Peptona de carne	1%
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL
pH = 5	

4. Medio líquido YEPD:

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
Extracto de levadura	5 g
Peptona	5 g
Glucosa	10 g
Agua destilada	500 mL
pH = 5	

SOLUCIONES

5. Buffer LET para extracción de RNA y DNA:

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
Tris-HCl	0.1 M
LiCl	0.1 M
Na <sub>2</sub> EDTA	0.1 M
pH = 7.4	

6. Buffer TNES (10X) para extracción de RNA y DNA:

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
Tris-HCl	0.5 M
NaCl	1.4 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	50 mM
SDS	1%
pH = 7.4	

7. Solución TE:

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
Tris-HCl	10 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM
pH = 8	

8. Solución TAE (50X) para electroforesis:

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
Na <sub>2</sub> EDTA	100 mL
pH = 8	

9. Solución de GTC 4M

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
GTC	4 M
Citrato de sodio pH 7.0	25mM
N-lauroil sarcosina	0.50 %
2-mercaptoetanol	0.1 M

10. Solución PBS-A

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
KCl	0.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
NaCl	8 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g
Agua desionizada	1 L

11. Solución PCIA

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
Fenol	25mL
Cloroformo	24 mL
Alcohol isoamílico	1 mL
Buffer de extracción sin SDS	50 mL

12. Buffer de extracción

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
NaCl	0.5 M
TRIS pH = 7.6	0.2 M
EDTA	0.01 M
SDS	1%
DEPC	0.1%

13. Loading buffer para electroforesis:

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
Azul de bromofenol	0.25 %
Xileno cianol FF	0.25 %
Glicerol	0.30 %

#### 14. Agua-DEPC (dietil pirocarbonato)

- Agregar a una alícuota de agua bidestilada el DEPC a una concentración final de 0.1% y mezclar bien.
- Incubar por lo menos durante 4 horas
- Esterilizar en el autoclave en ciclo normal
- El agua-DEPC es ahora libre de RNAsas

#### TINCIONES

##### 15.Tinción de GRAM:

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
Cristal violeta	1 gota
Lugol	1 gota
Etanol-acetona	1 gota
Safranina	1 gota

## TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

### 16. Extracción de DNA con el protocolo de Piper

- Centrifugar las células, decantar y resuspender en 0.2 mL de buffer de extracción con SDS y transferir a 1.5 mL en tubo Eppendorf (las células pueden ser congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  por algunas semanas).
- Adicionar 0.2 mL de PCIA y 0.4 g de perlas lavadas con ácido nítrico.
- Vortex por 2 minutos.
- Adicionar 0.3 mL de PCIA y 0.3 mL de buffer de extracción con SDS, vortex por 1 minuto y centrifugar por 5 minutos.
- Remover la fase acuosa en un tubo nuevo y repetir la extracción si la interfase es turbia.
- Adicionar 2 volúmenes de etanol 95% con 0.05% de dietilpirocarbonato. Guardar a  $-70^{\circ}\text{C}$  por una hora. Centrifugar a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos.
- Lavar el pellet 2 veces con 0.5 mL de etanol al 75% con 0.05% de DEPC. Secar
- Resuspender en 100  $\mu\text{L}$  de agua tratada DEPC.

### 17. Extracción de RNA utilizando tiocianato de guanidinio (GTC 4 M)

- Purificar las células y resuspender el botón celular en 60  $\mu\text{L}$  de PBS-A
- Agregar la suspensión rápidamente a 600  $\mu\text{L}$  de GTC 4M.
- Mezclar vigorosamente en el vortex para reducir la viscosidad.
- Agregar al lisado 60  $\mu\text{L}$  de NaAc 2 M pH 4.0 y mezclar bien.
- Agregar 500  $\mu\text{L}$  de fenol ácido y mezclar bien
- Agregar 120  $\mu\text{L}$  de cloroformo y mezclar bien
- Incubar durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$
- Centrifugar a 12500 rpm durante 5 min

- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo
- Extraer con 600  $\mu$ L de fenol/cloroformo
- Transferir a un tubo nuevo
- Extraer con 600  $\mu$ L de cloroformo
- Transferir a un tubo nuevo
- Agregar 1 mL de etanol y mezclar bien
- Incubar durante 2 h mínimo a  $-20^{\circ}\text{C}$  o hasta su uso
- Centrifugar a 12500 rpm durante 15 min
- Eliminar el sobrenadante
- Lavar el precipitado con 1 mL de 75% de etanol helado
- Secar el precipitado al aire y tapado con un papel ligero durante 15 min.
- Disolver el precipitado en 50  $\mu$ L o más de agua-DEPC
- Almacenar el RNA hasta su uso a  $-20^{\circ}\text{C}$

#### 18. Extracción de RNA utilizando una lisosima

- Purificar las células y resuspender el botón celular en 60  $\mu$ L de PBS-A
- Agregar la suspensión rápidamente a 600  $\mu$ L de GTC 4M.
- Mezclar vigorosamente en el vortex para reducir la viscosidad.
- Agregar 1  $\mu$ L de lisosima, mezclar vigorosamente en vortex.
- Agregar al lisado 60  $\mu$ L de NaAc 2 M pH 4.0 y mezclar bien.
- Agregar 500  $\mu$ L de fenol ácido y mezclar bien
- Agregar 120  $\mu$ L de cloroformo y mezclar bien
- Incubar durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$
- Centrifugar a 12500 rpm durante 5 min
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo



- Extraer con 600  $\mu$ L de fenol/cloroformo
- Transferir a un tubo nuevo
- Extraer con 600  $\mu$ L de cloroformo
- Transferir a un tubo nuevo
- Agregar 1 mL de etanol y mezclar bien
- Incubar durante 2 h mínimo a  $-20^{\circ}\text{C}$  o hasta su uso
- Centrifugar a 12500 rpm durante 15 min
- Eliminar el sobrenadante
- Lavar el precipitado con 1 mL de 75% de etanol helado
- Secar el precipitado al aire y tapado con un papel ligero durante 15 min.
- Disolver el precipitado en 50  $\mu$ L o más de agua-DEPC
- Almacenar el RNA hasta su uso a  $-20^{\circ}\text{C}$