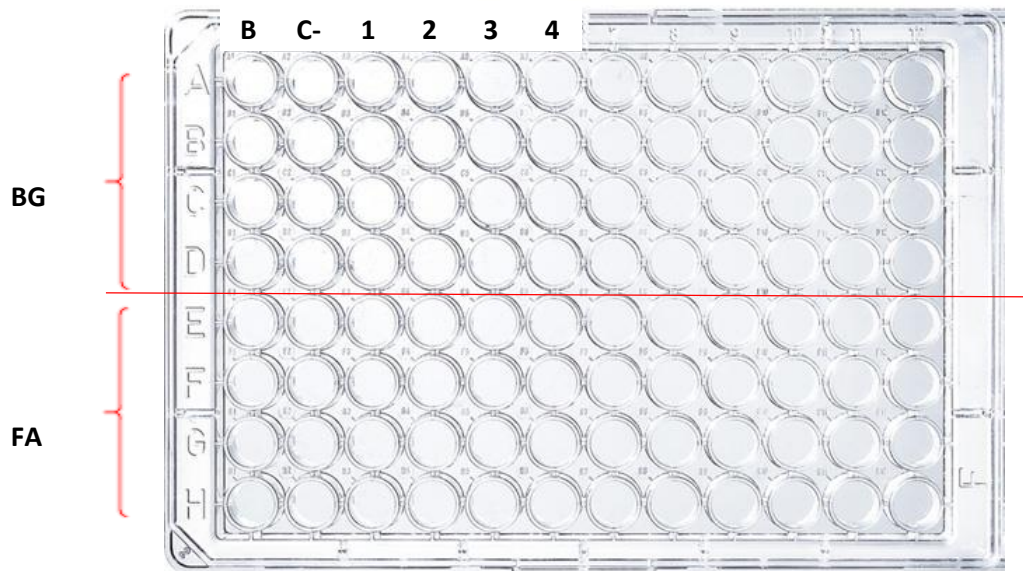


PRACTICA SOS CHROMOTEST: PARTE 2

En esta segunda parte de la practica realizaremos el ensayo enzimatico para la β -galactosidasa (β G), gen reportero y fosfatasa alcalina (FA), gen constitutivo. Este ensayo se manejará en una placa elisa como se muestra acontinuacion:



β -galactosidasa	Fosfatasa alcalina
A. Lisis celular	
135 μ L de Buffer Z y 15 μ L de células para cada tratamiento.	135 μ L de Bufer T y 15 μ L de células para cada tratamiento.
Inoculación durante 20min a temperatura ambiente.	
B. Actividad enzimática	
30 μ L de sustrato orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) 4mg/ml a los tratamientos. Blanco 30 μ L de agua estéril.	30 μ L de sustrato p-nitrofenilfosfato (PNPP) 4 mg/ml a los tratamientos. Blanco 30 μ L agua estéril.
Inoculación durante 40min a temperatura ambiente para desarrollo del color.	
C. Finalización de la actividad enzimática	
100 μ L de la solución de Na ₂ CO ₃ 1M.	50 μ L de HCl 2,5 M y posterior a 5 minutos 50 μ L de la solución TRIS 2 M.
D. Lectura de los datos a D.O. 420nm	

Después de realizar l lectura de los datos, estos se pasaran a la plantilla de Excel para ver la gráfica de los resultados.

Gen reportero: Gen cuyo producto es fácilmente detectable. Se lo usa en construcciones genéticas para verificar la transferencia del transgén a una célula o tejido, o para estudiar la actividad de promotores y otras secuencias reguladoras.

Gen constitutivo: Gen que está siempre activo. Su expresión es función de la interacción de la RNA polimerasa con el promotor, sin regulación adicional.