

PRÁCTICA N°14

Corte de ADN plasmídico con enzima de restricción

Las enzimas de restricción, también conocidas como endonucleasas de restricción, son enzimas que reconocen secuencias de ADN específicas y cortas, muchas veces palindrómicas. Ellas cortan la doble hebra de ADN (ADNdc) en sitios específicos dentro o adyacentes a la región de reconocimiento y por lo tanto se han utilizado para la generación de ADN recombinante (Fig. 1) mediante ingeniería genética o clonación molecular, permitiendo la creación de moléculas de ADN que de otra forma no se encontrarían en la naturaleza. Las enzimas de restricción se han utilizado desde 1970, cuando Hamilton Smith aisló la primera enzima de restricción (HindIII) de la bacteria *Haemophilus influenzae* y demostró que reducía la viscosidad de preparaciones de ADN de bacteriófagos y otras bacterias, mientras que no afectaba la viscosidad de su propio ADN. El descubrimiento de las enzimas de restricción y su aplicación en a solucionar problemas de genética molecular le valió a él, junto con Werner Arber y Daniel Nathans, el premio Nobel en medicina de 1978.

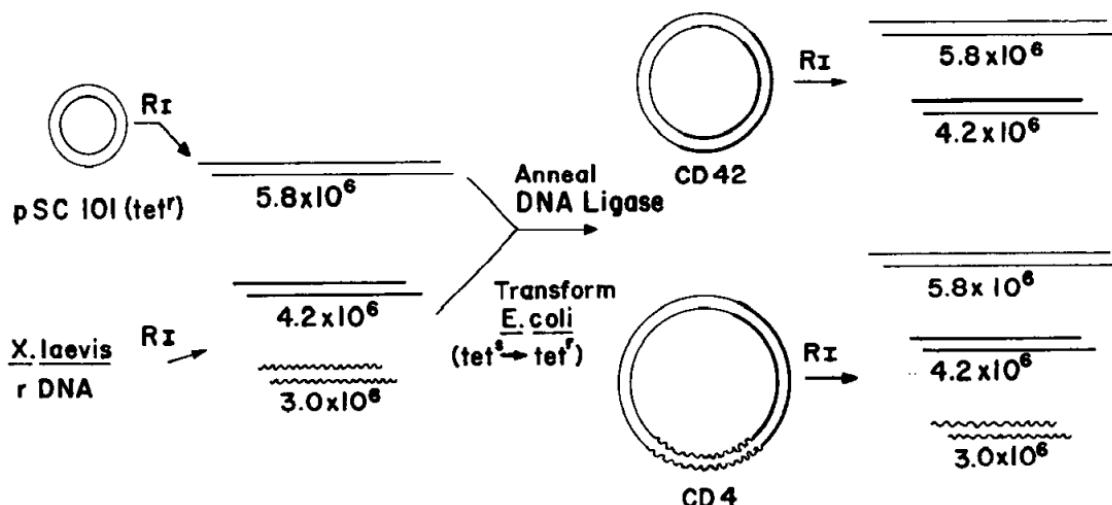


Figura 1. Uso de una enzima de restricción (RI) para la clonación de un fragmento del ARN ribosomal 16S de *Xenopus laevis* en el plásmido pSC101, ambos cortados con la misma enzima. Fuente: *Annual review of biochemistry*, 44(1), 273-293.

La mayoría de las enzimas de restricción no pueden cortar el ADN que está metilado en una o ambas hebras del sitio de reconocimiento, mientras que algunas requieren un ADN metilado para cortar. Cada enzima tiene requerimiento óptimo de actividad, como temperatura, pH, cofactores y fuerza iónica, que afectan la actividad y estabilidad de la estructura tridimensional de la enzima (Fig. 2). Los sustratos para las enzimas de restricción pueden ser ADN lineal (bacteriófago Lambda, productos de PCR, oligonucleótidos), ADN plasmídico circular y ADN genómico. También, es importante reconocer que algunas enzimas de restricción requieren una cierta cantidad de nucleótidos rodeando el sitio de reconocimiento, por lo que podría ser un problema cuando se desea cortar un oligonucleótido o producto de PCR que tiene los sitios de reconocimiento en los extremos. Por lo tanto, la estrategia para clonar un fragmento de ADN lineal debe incluir el uso de primers para PCR que tienen suficiente ADN rodeando el sitio de reconocimiento. La pureza del ADN es otro factor que debe ser considerado en el uso de enzimas de restricción, ya que la muestra podría contener contaminantes que afecten la digestión, como otros tipos de ADN, nucleasas, sales e inhibidores de la enzima.

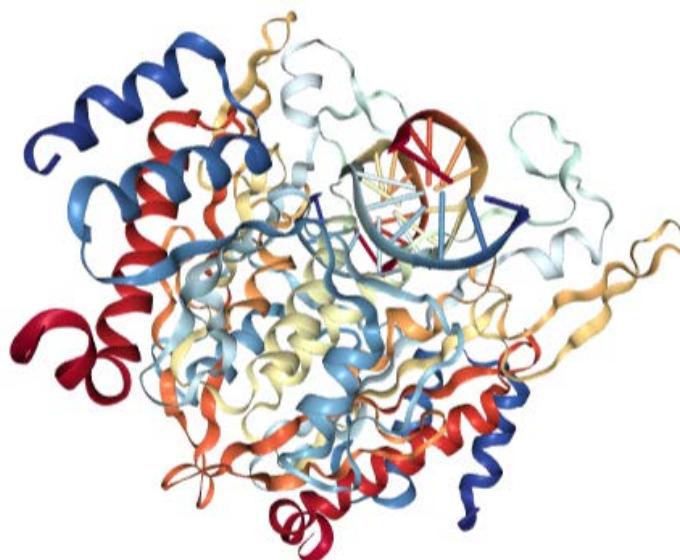


Figura 2. Estructura tridimensional de una enzima de restricción, EcoRI, en un complejo con el ADN de reconocimiento determinada por rayos X. Fuente: <http://www.rcsb.org/3d-view/1ERI/1>

Otros contaminantes que interfieren con la actividad de las enzimas de restricción son los solventes orgánicos, las sales, detergentes y agentes quelantes que se usan en la purificación de ADN, si es que son acarreados en la solución final de ADN. Por lo tanto, se recomienda utilizar ADN de alta pureza, o adicionar suero fetal bovino acetilado (BSA) a una concentración final de 0,1 mg/ml para mejorar la eficiencia de la digestión con enzimas de restricción de ADN no puro, y algunos fabricantes recomiendan usar este reactivos en todas las digestiones realizadas.

Objetivo

Esta práctica pretende que el estudiante realice una digestión de un plásmido con una enzima de restricción, para que reconozca su aplicación en los procedimientos de ingeniería genética y la biología sintética que permiten la clonación de fragmentos de ADN en vectores.

Procedimiento

A. Reacción de restricción

1. Combine los siguientes reactivos en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. La enzima se agrega al final, y debe mantenerse en congelación cuando no se use y en hielo o bloque frío al momento de usarla.

Componente	Volumen (ul)
Agua desionizada, estéril	16,3
Buffer de restricción 10X	2
BSA acetilada, 10 ug/ul	0,2
ADN, 1 ug/ul	1

Mezclar con micropipeta y luego agregue:

Enzima de restricción, 10 U/ul	0,5
Volumen final	20

2. Mezcle de manera gentil utilizando la micropipeta, nunca realice vortex pues puede inactivar la enzima.

3. Cierre los tubos y realice una centrifugación rápida (spin). Incube la reacción a la temperatura optima de la enzima (37 °C) de 1–4 horas.
 4. Para desactivar la enzima luego de la digestión, incube la reacción a 70 °C por 15 minutos.
 5. Mezcle una parte de la reacción con buffer de carga 6X con Gel Red y proceda a la electroforesis de ADN para analizar los resultados.
- B. Electroforesis en gel de agarosa
1. Prepare la cámara de electroforesis de acuerdo con la cantidad de muestras a analizar y coloque 1 ó 2 peines.
 2. Mida el volumen de buffer SB 1X de acuerdo con la capacidad de la cámara en una probeta (30 ml camara pequeña, 60 ml cámara grandes).
 3. Pese en la balanza la cantidad apropiada de agarosa, de acuerdo con la concentración y volumen requerido (Cuadro 2).
 4. Disuelva la agarosa en un microondas teniendo cuidado de que no hierva. Verifique que la agarosa se haya disuelto completamente. Si observa granos de agarosa, agite un poco y continúe calentando en el microondas hasta que se disuelva completamente.
 5. Una vez que la solución esté tibia (menor a 60 °C) dispense el gel en la cámara de electroforesis y elimine cualquier burbuja formada usando una punta de micropipeta.
 6. Espere que el gel solidifique (20-30 minutos) y retire el peine.
 7. Colóquelo aun en la cámara sobre la base del tanque y llénelo con la solución buffer SB 1X.
 8. En un fragmento de Parafilm limpio agregue 2 μ l de buffer de carga 6X con Gel Red por cada muestra de ADN que cargará.
 9. Utilice 2-5 μ l de muestra de ADN genómico, el cual se mezcla con el buffer de carga pipeteando hacia arriba y hacia abajo un par de ocasiones.
 10. Coloque en cada pozo las muestras respectivas (recuerde anotar en la bitácora la posición de cada muestra en el gel).
 11. Reserve el primer carril del gel para el marcador de peso molecular (escalera), en este caso utilice 125-250 ng de un marcador de peso molecular como el GeneRuler 1 kp Plus (Thermo), agregando 5 μ l de marcador a una concentración de 25 ng/ μ l.
 12. Coloque la tapa y conecte los cables a la fuente de poder. Asegúrese de colocar bien las polaridades (recuerde que el cátodo es de color negro y el ánodo es de color rojo). Los ácidos nucleicos tienen carga negativa y migran hacia el polo positivo.
 13. Programe la fuente de energía en 130 V por 60 minutos. Si al instalarlo inicia un burbujeo en el cátodo esto indicará que está bien colocado. Calcule el campo eléctrico, $CE = V/cm$, debe estar entre 5-10 V/cm.
 14. Corra las muestras y observe la migración de azul de bromofenol y del xileno cianol para estimar el avance de la corrida.
 15. Una vez que termina la corrida, apague la fuente de poder, quite los cables y la tapa, saque la cámara y coloque el gel sobre el equipo de documentación, observe y fotografíe el gel.

Referencias

- Smith, H. O., & Welcox, K. W. (1970). A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*: I. Purification and general properties. *Journal of molecular biology*, 51(2), 379-391.
- Sambrook J. y Russell D. (2001). Molecular cloning A laboratory manual. Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Nathans , D., & Smith, H. O. (1975). Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annual review of biochemistry*, 44(1), 273-293.