

DETERMINACIÓN DEL MAPA DE UN PLÁSMIDO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Ref:ER3

6 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es desarrollar un conocimiento del mapaje de ADN determinando los lugares de corte de los enzimas de restricción en un plásmido.

2. COMPONENTES para 6 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
A ADN plasmídico para la digestión enzimática	Congelador
B Tampón de reacción del enzima restricción	Congelador
C Agua Ultrapure	Congelador
D Tampón de dilución del enzima de restricción	Congelador
E <i>EcoRI</i> Dryzyme	Congelador
F <i>BamHI</i> Dryzyme	Congelador
G Marcador ADN estándar	Congelador

2.1 Material suministrado

- UltraSpec-Agarose™ powder. Es la agarosa para hacer el gel de electroforesis.
- Tampón de electroforesis (50x).
- Tampón de carga (10x).
- Pipeta de 1 ml.
- Microtubos 1.5 ml
- InstaStain® Blue
- Colorante FlashBlue™

2.2 Material requerido y no suministrado

- Micropipetas automáticas y puntas (5-50 µl).
- Baños de agua (37°C).
- Cubeta y fuente de electroforesis.
- Balanza.
- Hielo picado.
- Microondas o placa calefactora.
- Guantes termoprotectores.
- Gafas de seguridad.
- Guantes de laboratorio desechables.
- Vaso o Erlenmeyer de 250 ml.
- Agua destilada.

Para la tinción del gel con InstaStain® (método preferible):

- Transiluminador UV
- Gafas de seguridad UV

Para la tinción del gel con tinción líquida FlashBlue™:

- Pequeñas bandejas de plástico o pesas grandes para desteñir
- Sistema de visualización de ADN con luz blanca

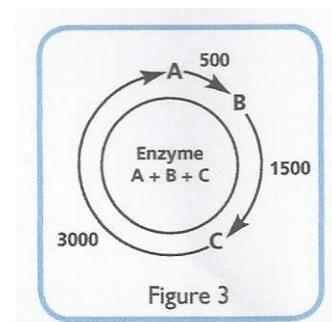
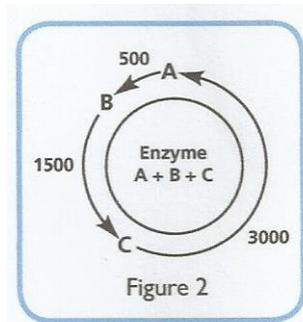
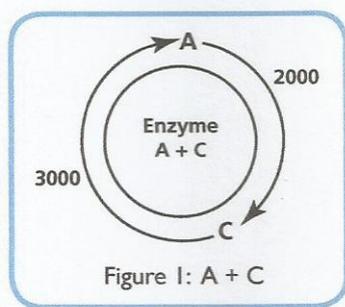
3. INTRODUCCIÓN

Los enzimas de restricción son endonucleasas que cortan el ADN en ambas cadenas en secuencias específicas. La localización de los sitios de corte de los ER es importante en análisis, mapaje de estructuras genéticas y en experimentos de clonación molecular.

El mapa de restricción determina la posición relativa de los lugares de corte con otro en la molécula de ADN. Esto se realiza determinando los tamaños de los fragmentos generados por diferentes combinaciones de ER.

Un ejemplo, considerar un plásmido circular de 5.000 pb que contiene un única diana de restricción para cada uno de los enzimas A, B y C. Cualquiera de estos ER cortará el ADN dando lugar a una molécula lineal de 5.000 pb. Utilizando diferentes combinaciones de ER en la misma reacción, lo que se llama, doble digestión, producirá los siguientes fragmentos:

A+B	A+C	B+C	A+B+C
4.500	3.000	3.500	3.000
500	2.000	1.500	1.500
			500



El fragmento de ADN más pequeño generado en una reacción representa la distancia más corta entre dos sitios de corte. El análisis de una digestión doble se puede hacer colocando arbitrariamente uno de los sitios de corte en la parte superior de un círculo. Este punto actúa como punto de referencia. El sitio de corte más cercana a este punto se puede colocar en una dirección en sentido horario o en sentido anti-horario.

Los datos de las digestiones dobles se pueden poner juntos en un patrón que es consistente con todos los tamaños de los fragmentos observados que son generados por la co-digestión. La triple digestión, A + B + C (Figura 3), es una prueba de confirmación para la construcción del mapa. Cuando uno compara la digestión de A + C (Figura 1) y la triple digestión, el mapa coloca sitio de corte B entre A y C. Las dos posiciones relativas diferentes de B a A y C se muestran en las Figuras 2 y 3.

Generalmente, un mapa de restricción se construye determinando primero el número de fragmentos de cada enzima produce. El tamaño y el número de fragmentos se determinan por electroforesis. Las reacciones que contienen varias combinaciones de enzimas se llevan a cabo para determinar las distancias entre los sitios de corte. El tamaño de cada fragmento producido se calcula a partir de los datos obtenidos por electroforesis en gel de agarosa.

Las posiciones relativas de los sitios de corte se ordenan de una manera que es consistente con todos los tamaños de los fragmentos observados. La determinación del orden de los lugares de corte requiere la elección de uno de los sitios de corte como punto de partida arbitrario a las 12 horas en un círculo (posición 1). Por lo general, esta es un enzima que tiene un solo sitio de corte en el ADN. Usando las distancias más cortas entre los sitios, tal como se determina en las digestiones dobles, los sitios se colocan en un círculo (o una línea, dependiendo del ADN).

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

En este experimento se determinará las localizaciones de corte de 2 enzimas de restricción en un plásmido circular de ADN. Se suministra un marcador estándar de peso molecular conocido. Los ER utilizados para cortar el plásmido son EcoRI y BamHI. El objetivo es calcular las distancias entre los puntos de corte y determinar sus orientaciones relativas.

4.1 Precauciones

1. Llevar gafas y guantes de laboratorio mientras se trabaja.
2. **NO PIPETEAR CON LA BOCA**, utilizar los dispositivos adecuados.
3. Extremar las precauciones cuando se trabajan con equipos que utilizan conjuntamente calor y mezcla de reactivos.
4. Lavarse las manos con jabón y agua después de haber trabajado en el laboratorio o utilizado reactivos o materiales biológicos.
5. Extremar las precauciones al utilizar equipos de laboratorios eléctricos.

4.2 Preparaciones Previas

REQUISITOS DE TIEMPO (aproximados) DE LAS PREPARACIONES PREVIAS

La siguiente Tabla es una guía para la implementación de esta práctica, que puede ser adaptada a las circunstancias específicas de cada clase.

Etapa	Que hacer	Cuando	Tiempo estimado
Análisis enzimas de restricción	Preparar y alicuotar reactivos	De 1 día a 30 minutos antes de la práctica	20 min
	Equilibrar la temperatura baño de agua	De 1 a 2 horas antes de la práctica	10 min
	Preparar y alicuotar los enzimas restricción	NO antes de 30 minutos antes de utilizarlos	30 min
Electroforesis geles de agarosa	Preparar tampón de electroforesis	Cualquier momento antes de la clase de prácticas	10 min
	Preparar agarosa y gel	De 1 día a 30 minutos antes de realizar la práctica	45 min
Tinción geles de agarosa	Preparar los componentes para la tinción	Durante la clase o durante la noche previa a la práctica	10 min

Muchos enzimas son lábiles, por ello se deben mantener en frío y minimizar su manipulación. No diluir los enzimas en su tampón de dilución más de 30 minutos antes de la práctica de laboratorio. Una vez diluidos, los enzimas deben ser utilizados, no pueden volverse a almacenar. Retirar los stocks de ER del congelador (seguirá siendo líquido) y ponerlos directamente en el hielo poco antes de que se requieran para los preparativos pre-práctica.

GUIA RÁPIDA PARA LA PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Microtubo	Componente	Número de tubos	Volumen por tubo (µl)
A	ADN Plásmido	6	25 µl
B	Tampón de reacción del enz. restr.	6	25 µl
C	Agua Ultrapure	6	70 µl
E	EcoRI	6	15 µl en hielo
F	BamHI	6	15 µl en hielo
G	Tampón de carga 10x	6	25 µl

PREPARACION DE LOS REACTIVOS GENERALES

Los reactivos preparados se pueden almacenar en hielo si se preparan el día de la práctica. Si se preparan con anticipación, los reactivos se deben almacenar en el congelador (-20°C). Se deberán descongelar completamente antes de usar.

NOTA IMPORTANTE: Los enzimas de restricción Dryzyme™ (componentes E y F) no pueden almacenarse de nuevo una vez reconstituidos, se deberá realizar la digestión de restricción dentro de los 30 minutos posteriores a la reconstitución de las enzimas. Ver el apartado "PREPARACIÓN DE LOS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN".

1. Descongelar los tubos de ADN plasmídico (A), tampón de Reacción de Enzima de Restricción (B) y agua UltraPure (C).
2. Dispensar 25 µl del ADN plasmídico (A) para la reacción en 6 tubos de microcentrífuga marcados apropiadamente. Tapar los tubos.
3. Dispensar 25 µl del tampón de Reacción de Enzima de Restricción (B) en 6 tubos de microcentrífuga debidamente etiquetados. Tapar los tubos.
4. Dispensar 70 µl de agua UltraPure (C) en 6 tubos de microcentrífuga debidamente etiquetados. Tapar los tubos.
5. Dispensar 25 µl de Tampón de carga 10x en 6 tubos de microcentrífuga debidamente etiquetados. Tapar los tubos.

PREPARACION DE LOS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Realizar la digestión de restricción dentro de los 30 minutos posteriores a la reconstitución de las enzimas de restricción de Dryzyme™ (componentes E y F).

1. Descongelar el agua UltraPure (C) y Tampón de dilución del enzima de restricción (D) y colocarlos en hielo.
2. Asegurarse que el material sólido esté en la parte inferior de los tubos Dryzyme™ (E y F). De lo contrario, golpear suavemente el tubo sobre la mesa o centrifugar los tubos para recoger el material en el fondo de los mismos.
3. Dentro de los 30 minutos anteriores al inicio del experimento del Módulo I, agregar 75 µl de tampón de dilución de enzimas de restricción al material sólido en la parte inferior de los tubos Dryzyme™ y permitir que la muestra se hidrate durante un minuto. Mezclar la muestra vigorosamente moviendo el tubo con el dedo o agitando en vórtex durante al menos 30 segundos. Continuar mezclando hasta que el sólido parezca estar completamente disuelto. A partir de este punto, **los enzimas no pueden volver a almacenarse** y deben ser usados dentro del intervalo temporal indicado (30 minutos). Mantener los tubos en hielo hasta su uso.

4. Agregar lentamente 75 μ l de agua UltraPure (C) a cada tubo de Dryzyme™ rehidratado.
5. Después de agregar el agua, mezclar bien la muestra agitando en vórtex o pipeteando hacia arriba y hacia abajo durante veinte segundos.
6. Dispensar 15 μ l de la enzima EcoRI reconstituida en 6 tubos de microcentrífuga adecuadamente etiquetados. Repetir con BamHI. Colocar los tubos en hielo. Usar dentro de los siguientes 30 minutos después de la reconstitución de los enzimas Dryzyme™.

OTRAS PREPARACIONES PREVIAS EL DIA DE LA PRÁCTICA

1. Se debe equilibrar el baño de agua a una temperatura de 37°C para la digestión enzimática del ADN plasmídico.
2. Se debe preparar 1 vaso de precipitación u otro recipiente con hielo picado para cada grupo, o preparar uno para compartirlo por todos los grupos.

Cada grupo requiere para la digestión con los ER:

- 1 tubo de ADN del plásmido.
- 1 tubo de tampón de reacción del enzima restricción.
- 1 tubo de agua Ultrapure.
- 1 tubo con EcoRI (guardar en hielo).
- 1 tubo con BamHI (guardar en hielo).
- 1 tubo de tampón de carga 10x.
- 4 microtubos.
- Pipetas de transferencia o pipetas automáticas con puntas.

5. PRÁCTICA

NOTAS IMPORTANTES PARA EL INSTRUCTOR:

- Este kit contiene reactivos para 6 grupos de trabajo. **El experimento consiste en 3 partes: 1) Digestión del ADN con enzimas de restricción, seguido 2) Electroforesis en gel de agarosa y 3) Determinación de los tamaños de los fragmentos de restricción del ADN.**
- Si usted dispone de 6 unidades de electroforesis, una por grupo, puede realizar simultáneamente la electroforesis de los 6 grupos. Alternativamente, algunos grupos pueden conservar las muestras a 4°C y realizar la electroforesis en otro momento. También puede realizar geles de agarosa más grandes y colocar varios peines o en un mismo peine de 10 pocillos pueden trabajar 2 grupos.
- Las preparaciones previas de preparación y dispensar los reactivos puede llevar 1-2 horas, lo puede realizar el instructor o los alumnos.
- El tiempo aproximado requerido para que los estudiantes realicen la digestión con los enzimas de restricción es de 50 minutos. La incubación de la reacción se puede extender hasta 60 minutos.
- Preparación del gel: Lo puede preparar el instructor previamente o los estudiantes como otra práctica. 30-40 minutos, el gel requiere unos 20 minutos para su solidificación.

- Carga o siembra del gel: Si sus estudiantes o usted no está familiarizado con el uso de micropipetas y siembra de geles de agarosa, se puede realizar una práctica previa de ensayo de siembra de geles. El kit contiene un microtubo para practicar "practice gel loading solution". Se recomienda esta actividad de la siembra de un gel de prueba. Puede llevar unos 10 minutos.
- Electroforesis: El tiempo aproximado varía según el modelo de fuente de electroforesis que disponga, a 125 voltios puede tardar unos 20-30 minutos.

A) PREPARACIÓN DE LAS REACCIONES

1. MARCAR 4 microtubos del 1 al 4 para 4 digestiones enzimáticas. Colocar las iniciales o identificación del grupo.
2. AÑADIR 5 µl de ADN (A) y 5 µl de Tampón de reacción del enzima restricción (B) a cada uno de los 4 tubos de reacción (1-4)..
3. AÑADIR el agua y enzima a los 4 microtubos tal y como se describe en la siguiente Tabla. **Utilizar una punta diferente para cada reactivo.**

Tubo	ADN (A) (µl)	Tampón de Reacc. Enz. (B) (µl)	EcoRI (E) (µl)	BamHI (F) (µl)	Agua Ultrapure (C) (µl)	Volumen Reacción (µl)
1	5	5	-	-	20	30
2	5	5	5	-	15	30
3	5	5	-	5	15	30
4	5	5	5	5	10	30

NOTA IMPORTANTE: Para evitar una contaminación cruzada, asegurarse de usar una punta de pipeta nueva antes de pipetear la enzima, el ADN y la solución tampón de los tubos de stock. Mantener las enzimas en hielo cuando no se estén usando.

4. MEZCLAR las soluciones pipeteando hacia arriba y abajo o golpeando suavemente los tubos. Centrifugar brevemente todos los microtubos para recolectar todo el contenido en la parte inferior.
5. Tapar los tubos e INCUBAR las muestras en un baño de agua a 37°C durante 30 minutos.
6. Después de la incubación, AÑADIR 5 µl de Tampón de carga 10x a cada tubo de reacción. Tapar los tubos y mezclar las soluciones golpeando suavemente los tubos o agitándolos con vórtex:
7. CONTINUAR en el apartado B

PUNTO DE PARADA OPCIONAL: Una vez finalizada la digestión de las muestras se pueden almacenar a -20°C para realizar la electroforesis más tarde u otro día.

B) ELECTROFORESIS GEL DE AGAROSA

1. Preparar el gel de agarosa según las siguientes especificaciones:
 - Concentración de agarosa 0,80%.
 - Número de pocillos requeridos, 5
 - Tamaño recomendado del gel, 7 x 7 cm.

C) CARGAR O SEMBRAR LAS MUESTRAS

2. Cargar 40 μ l de cada muestra de ADN de la siguiente forma:

Pocillo	Microtubo	
1	Marcador estándar	Fragmentos marcador estándar
2	1	Tubo reacción 1
3	2	Tubo reacción 2
4	3	Tubo reacción 3
5	4	Tubo reacción 4

D) CORRER EL GEL

3. Cerrar la tapa de la cubeta de electroforesis y conectar los electrodos. Configurar la fuente al requerido voltaje y correr el gel.

4. Recordar que las muestras migrarán hacia el electrodo positivo (rojo) durante la electroforesis.

5. Apagar la fuente de energía tan pronto como la electroforesis ha terminado.

E) TINCIÓN DEL GEL

6. Cuidadosamente sacar el gel de agarosa de la cubeta y colocar en una cubeta para su tinción y detectar las bandas de ADN.

7. Teñir los geles según las instrucciones de tinción suministrada en los apéndices A y B.

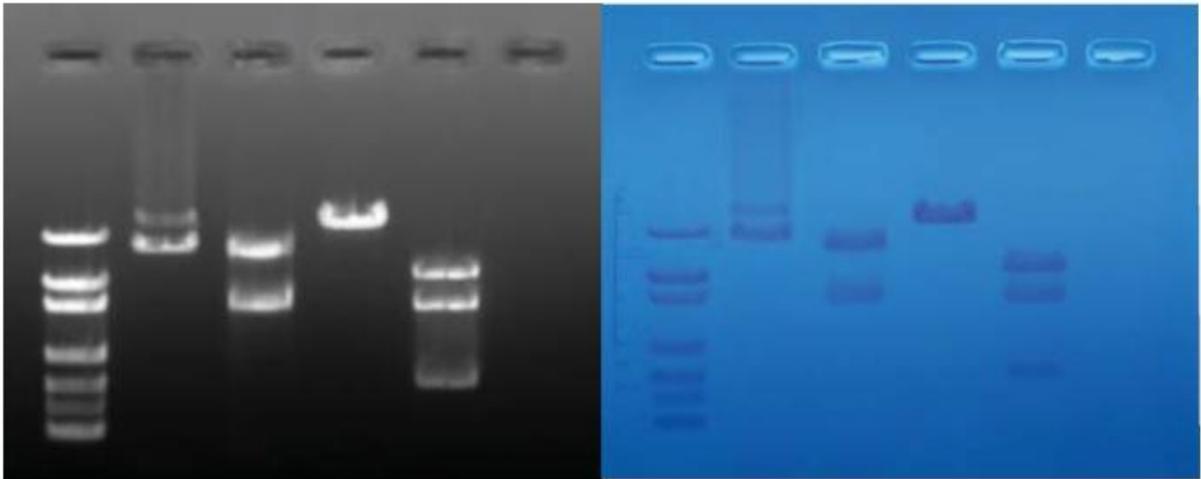
F) VER Y DETECTAR LAS BANDAS DE ADN

8. Examinar su gel y documentar los resultados del experimento.

9. Esto se puede realizar tomando una foto de su gel si dispone de un sistema de fotodocumentación o colocando el gel en un transiluminador adecuado.

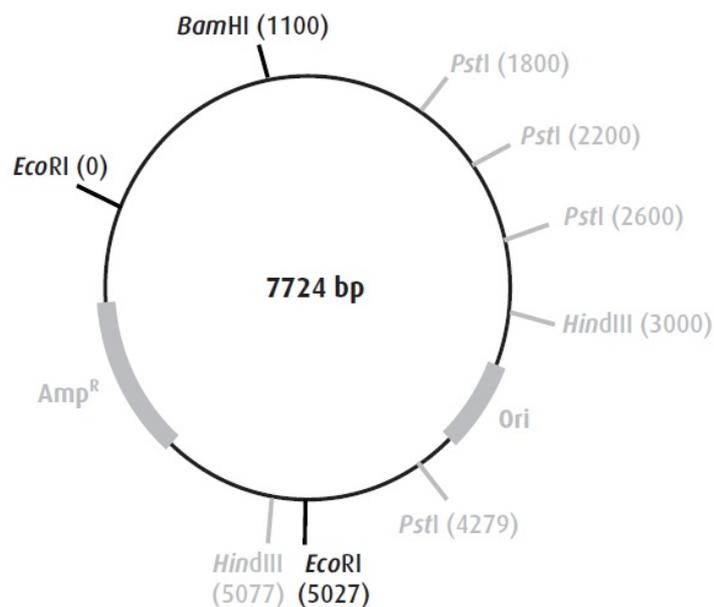
6. RESULTADOS

Crear una tabla que detalle los resultados de la práctica realizada. Usando estos datos, dibujar un mapa de restricción del plásmido.



Pocillo	Tubo	Muestra	Peso moleculares observados (bp)
1	--	Marcador ADN estándar	6751; 3652; 2827; 1568; 1118; 825; y 630
2	1	ADN plasmídico sin digerir	El ADN lineal es de 7720 bp. El ADN superenrollado aparecerá como una banda de más pequeña en el gel
3	2	Digestión EcoRI	5030; y 2690
4	3	Digestión BamHI	7720
5	4	Digestión EcoRI y BamHI	1100; 2690; y 3930

NOTA: Debido a la variabilidad en las mediciones de los estudiantes, los pesos moleculares calculados pueden variar de un 10-15% respecto a los valores reales.

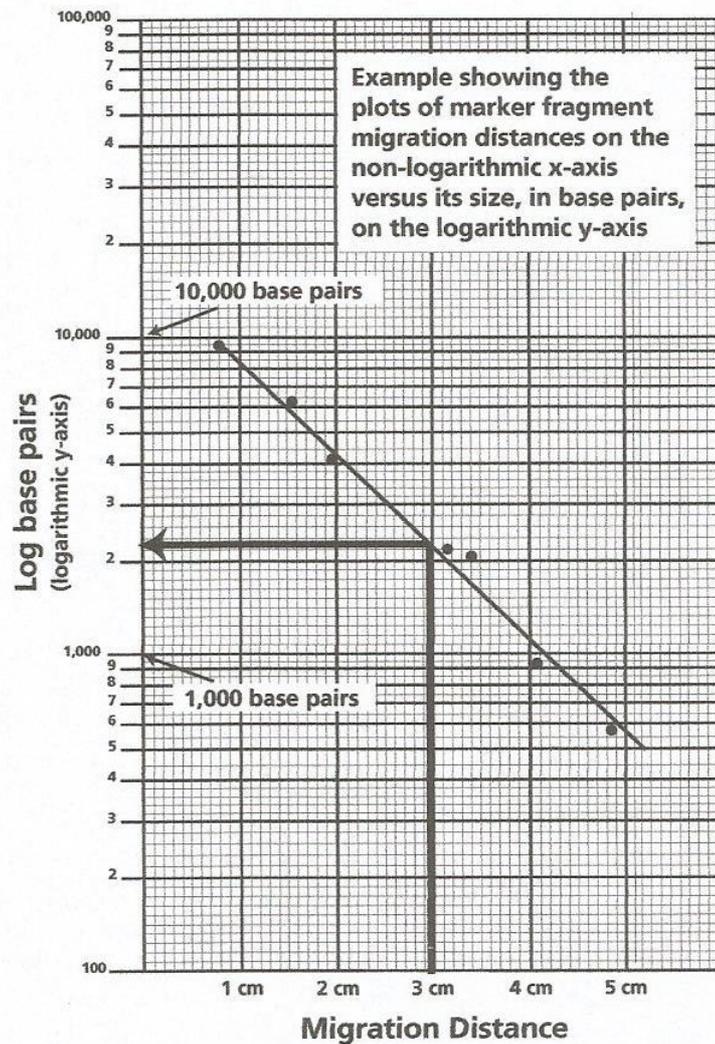


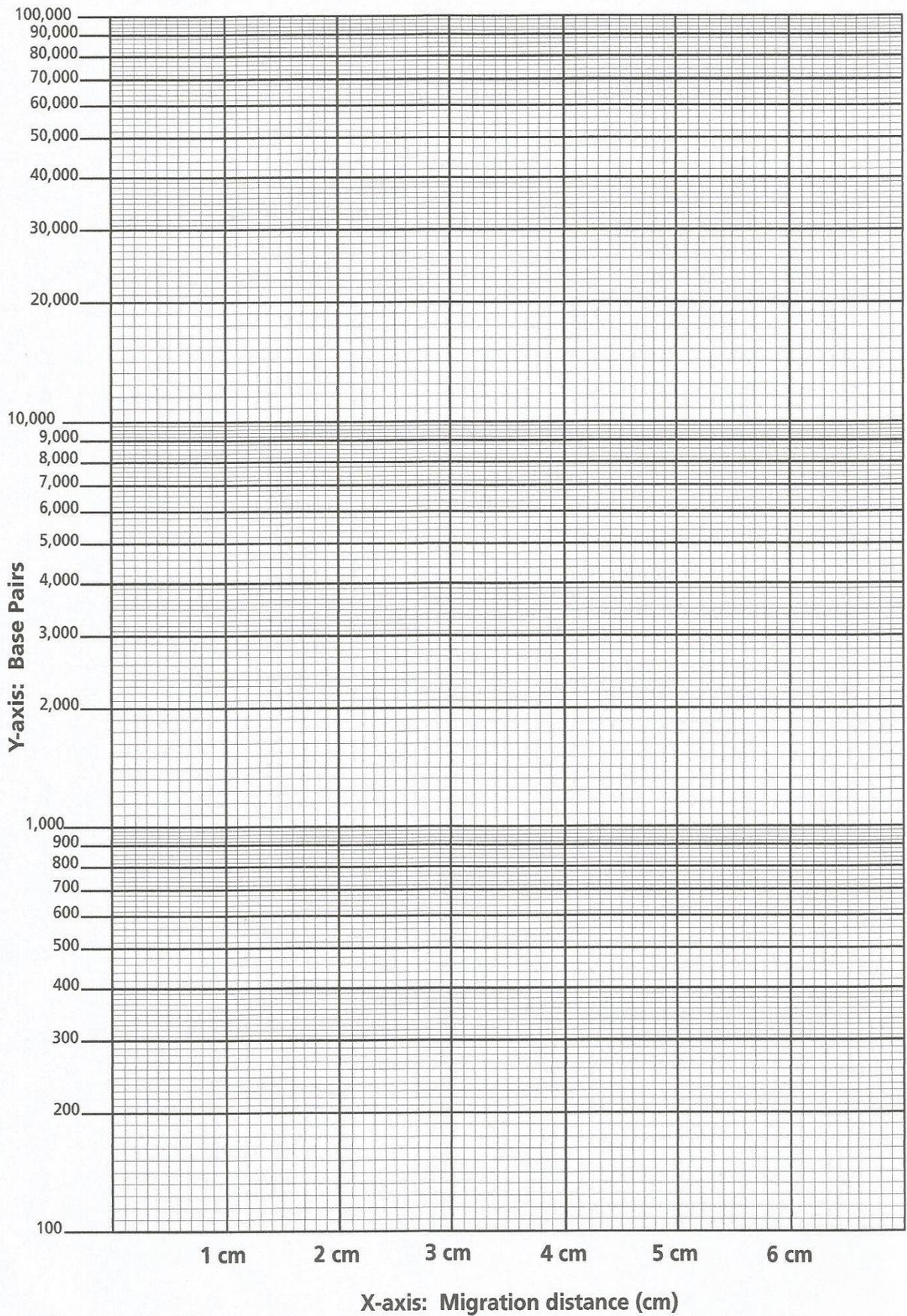
Mapa del plásmido

(Los enzimas en gris no están incluidos en esta práctica)

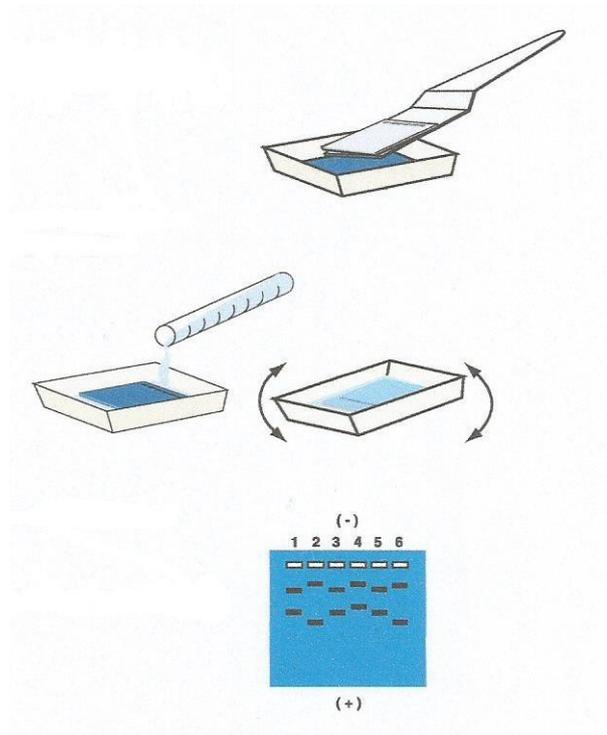
A) DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN.

El primer paso para hacer el mapa de los lugares de restricción es determinar la distancia de migración y el tamaño de los fragmentos generados después de la electroforesis. La asignación de los tamaños de los fragmentos de ADN separados por la electroforesis en gel de agarosa puede tener un margen de error del 10%. Los tamaños de los fragmentos desconocidos (de las 3 digestiones, pocillos 3,4 y 5) se extrapolarán con un gráfico, midiendo las distancias relativas de los fragmentos de ADN estándar (pocillo 1), los cuales conocemos el tamaño de cada fragmento.





APÉNDICE A



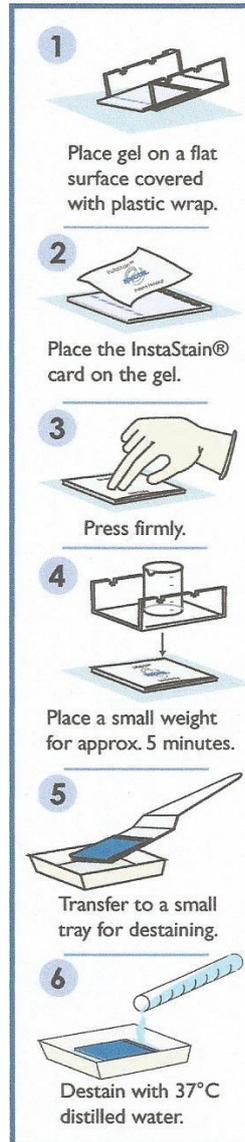
Método 1

1. Diluir **10 ml de 10X FlashBlue** con 90 ml de agua destilada en un frasco o vaso. Mezclar bien.
2. Cubrir el frasco y conservarlo a temperatura ambiente hasta el momento de teñir el gel.
3. No teñir los geles en la cubeta de electroforesis.
4. Colocar el gel en un recipiente con **75 ml de 1X FlashBlue**, de forma que quede completamente cubierto.
5. Incubar durante 5 minutos. Aumentar el tiempo de tinción conllevará a un mayor número de lavados con agua destilada.
6. Trasferir el gel a otro recipiente con 250-300 ml de agua destilada. Agitar el recipiente o colocarlo en una plataforma de agitación.
7. Desteñir el gel durante 20 minutos. Bandas de un color azul intenso serán visibles contra un "background" azul claro. Adicionales lavados con agua puede aumentar el rendimiento de visión.
8. Cuidadosamente sacar el gel del recipiente y examinar el gel en un transiluminador de luz blanca (si no se dispone, puede servir una hoja blanca)

Método 2

Diluir el FlashBlue 1:200 y sumergir el gel durante 4-5 horas o toda la noche.

APÉNDICE B



1. Colocar el gel en una superficie con un plástico o similar para protegerlo.
2. Utilizar guantes para colocar la cara azul de una hoja de InstaStain Blue encima del gel.
3. Presionar firmemente con sus dedos por toda la superficie para establecer un buen contacto entre el gel y la hoja de InstaStain Blue.
4. Para asegurarse del contacto continuo, colocar un peso encima de la hoja de InstaStain Blue.
5. Incubar durante 5-10 minutos. Después sacar la hoja, si el color del gel aparece muy claro, humedecer la superficie del gel con agua y colocar la hoja de InstaStain Blue por 5 minutos adicionales.
6. Transferir el gel a un recipiente con 100 ml de agua destilada que cubra todo el gel.
7. Repetir este proceso varias veces cambiando el agua hasta obtener una visualización óptima de las diferentes bandas.