

INTRODUCCIÓN A LOS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Ref.ER1 (4 Prácticas)

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es desarrollar el conocimiento de los enzimas de restricción, ver como son capaces de cortar el fago Lambda en determinados puntos, y realizar una electroforesis completa para comprobar esto.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción se denominan también nucleasas de restricción, endonucleasas de restricción y en ocasiones restrictasas. Pertenecen a este grupo una gran diversidad de endodesoxirribonucleasas, descubiertas como enzimas propias de distintas bacterias. Se dispone hoy comercialmente de un gran número de ellas con elevada especificidad, estabilidad y pureza.

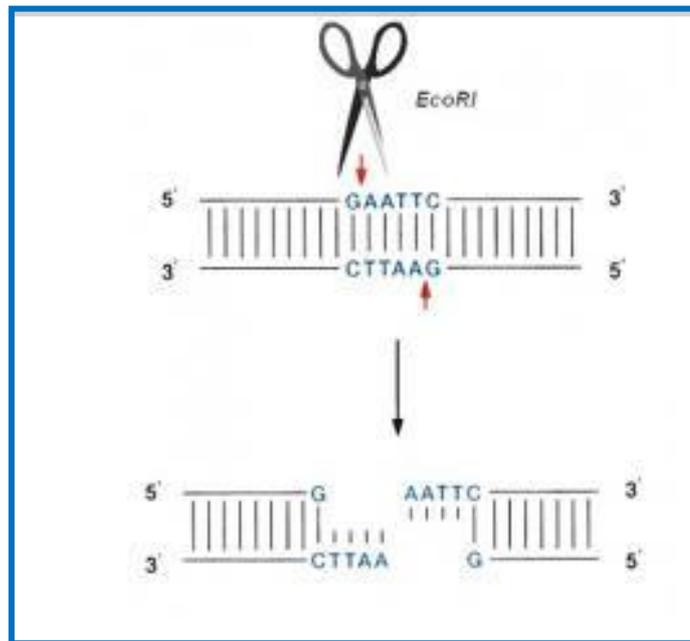
Las enzimas de restricción son nucleasas que cortan ADN de doble cadena cuando reconocen un patrón de secuencia específico. Generan fragmentos de ADN conocidos como fragmentos de restricción. Las enzimas de restricción son herramientas imprescindibles en biología molecular, ingeniería genética y biotecnología. Las enzimas de restricción son nucleasas que cortan el ADN cuando reconocen un patrón de secuencia específico.

Se nombran con tres letras del género y especie de la bacteria de la que se aislaron originalmente, seguidas a veces por una letra más, que identifica el serotipo (variante antigénica de la bacteria) y, finalmente, por un número romano que las identifica cuando en una misma variante se hayan encontrado varias enzimas con distinta especificidad.

La importancia de las enzimas de restricción radica en su gran especificidad para reconocer una secuencia corta de DNA bicatenario e hidrolizar un enlace fosfodiéster en cada hebra, siempre en la misma posición. Cada enzima se caracteriza, pues, por su **sitio o secuencia de reconocimiento o de restricción, o secuencia diana**. Los fragmentos de DNA resultantes son útiles para iniciar la clonación celular o acelular, para el análisis del DNA, para elaborar mapas físicos de restricción o para la detección de polimorfismos.

Las diversas enzimas de restricción se agrupan en tres familias, de acuerdo con sus propiedades: Tipo I, Tipo II y Tipo III.

Nos centraremos en el estudio de las enzimas de Tipo II pues, al cortar en un punto muy definido dentro de su secuencia diana, son utilizadas como herramientas en ingeniería genética.



Se descubrieron en los años 60 y su uso en biología molecular empezó en los 70 permitiendo el desarrollo de las tecnologías de ADN recombinante. Las enzimas de restricción tienen actividad endonucleasa y cortan enlaces fosfodiéster en las dos cadenas del ADN. Reconocen ciertas secuencias en el ADN. Las enzimas de restricción de Tipo I y III reconocen una secuencia específica pero cortan a una distancia variable del sitio de reconocimiento (sitio de restricción). Las enzimas de restricción de Tipo II reconocen una secuencia específica conocida como secuencia diana y siempre cortan entre los mismos nucleótidos. De ahí que generen siempre los mismos fragmentos de restricción. La secuencia diana es de tamaño variable, la mayoría de 4 y 6 nucleótidos, y con frecuencia es parcialmente palindrómica. Algunas enzimas de restricción cortan generando extremos llamados romos mientras que otras cortan generando extremos llamados cohesivos.



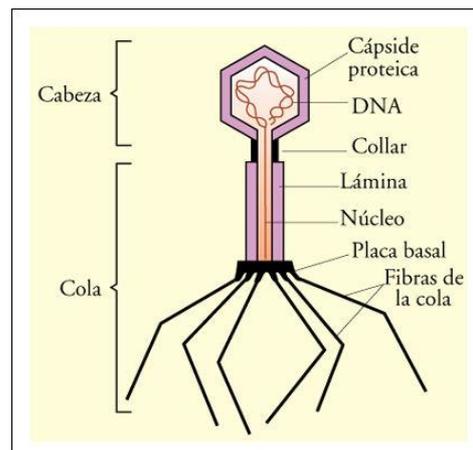
Las enzimas de restricción son una herramienta básica en Biología molecular: en laboratorios de PCR, creación de sondas para hibridación, laboratorios de secuenciación de ADN, ingeniería genética, procesos de clonación, manejo de genotecas y en muchas otras áreas de genómica.

| ENZIMA DE RESTRICCIÓN | ORGANISMO DE DONDE SE EXTRAE |
|-----------------------|------------------------------|
| EcoRI | Escherichia coli |
| EcoRII | Escherichia coli |
| HindII | Haemophilus influenzae |
| HindIII | Haemophilus influenzae |
| HaeIII | Haemophilus aegyptius |
| HpaII | Haemophilus parainfluenzae |
| PstI | Providencia stuartii |
| MaiI | Serratia marcesens |
| BamI | Bacillus amyloliquefaciens |
| BglII | Bacillus globiggi |

2.2 BACTERIÓFAGO LAMBDA

Un bacteriófago es un virus que infecta exclusivamente bacterias. Tal y como sucede con muchos otros virus que infectan a células eucariotas, los bacteriófagos o fagos también tienen una cápsula proteica que sirve principalmente para albergar el material genético que propagarán a las células que infecten.

La mayoría de los fagos poseen ADN de longitud variable como material genético. Atendiendo a la morfología que presentan pueden clasificarse en icosaédricos sin cola, virus con cola contráctil, con cola no contráctil y filamentosos.



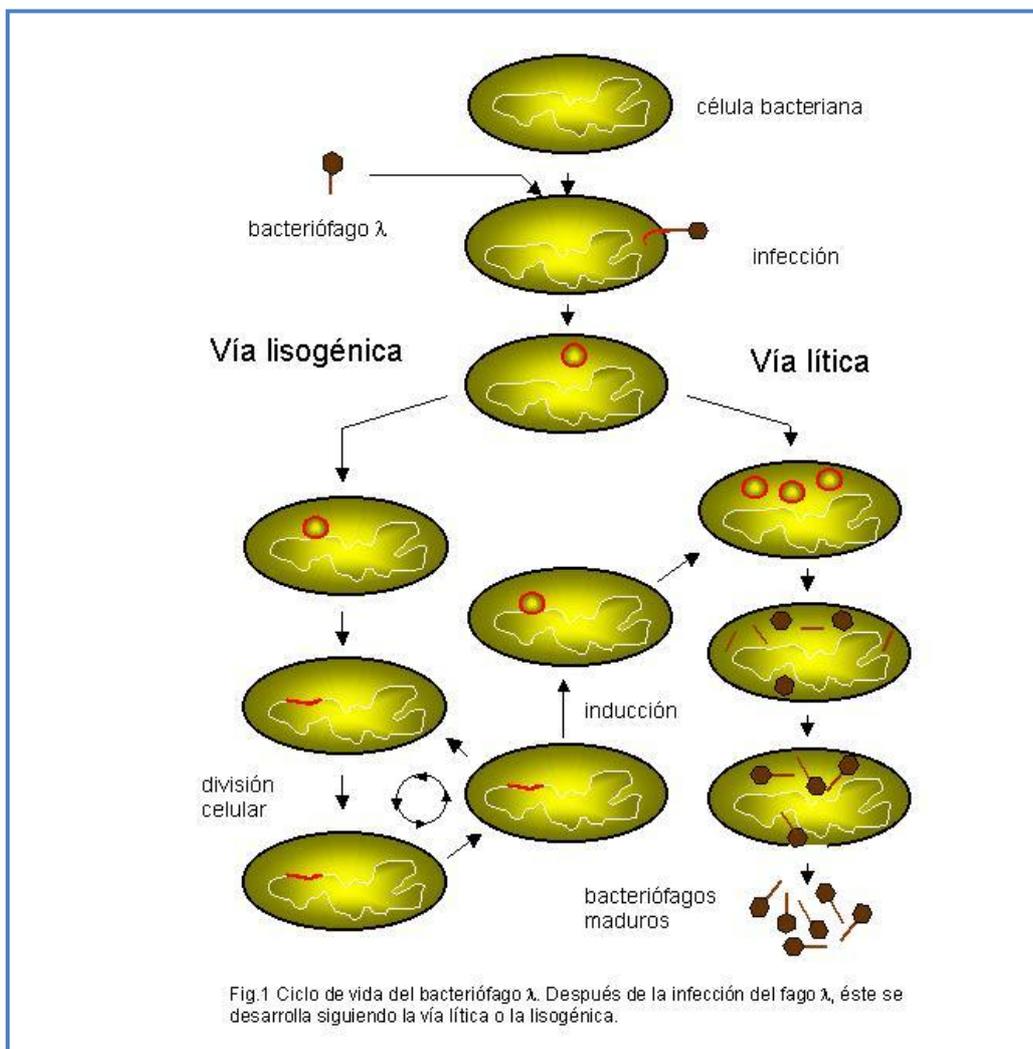
Los fagos son ubicuos y puede decirse sin miedo a equivocarse que hay fagos prácticamente en cualquier entorno en el que existan bacterias. También suele decirse que, para cualquier especie de bacteria, con toda probabilidad hay un fago correspondiente que puede infectarla.

El fago más conocido, ya que ha servido como modelo de estudio en biología molecular, es el fago lambda. También posee una estructura que podríamos denominar típica: una cápside icosaédrica que encierra el material genético, una cola contráctil y una serie de espículas que sirven para su contacto con la célula a infectar.

El acoplamiento a la bacteria se realiza mediante la unión a receptores específicos en la superficie bacteriana, lo cual determina la especificidad de infección del virus por una especie bacteriana concreta.

Los fagos pueden seguir dos posibles tipos de ciclos infectivos: **el ciclo lítico y el ciclo lisogénico**. En el ciclo lítico, la infección del fago produce la lisis de la bacteria hospedadora y la liberación de nuevas partículas de fagos. En cambio, en el ciclo lisogénico el fago inserta su material genético en el genoma bacteriano, o bien queda como plásmido independiente, replicándose en cualquier caso al mismo tiempo que el genoma de la bacteria, pero sin producir la lisis bacteriana. Podría considerarse la lisogenia como una especie de latencia aplicada a los fagos.

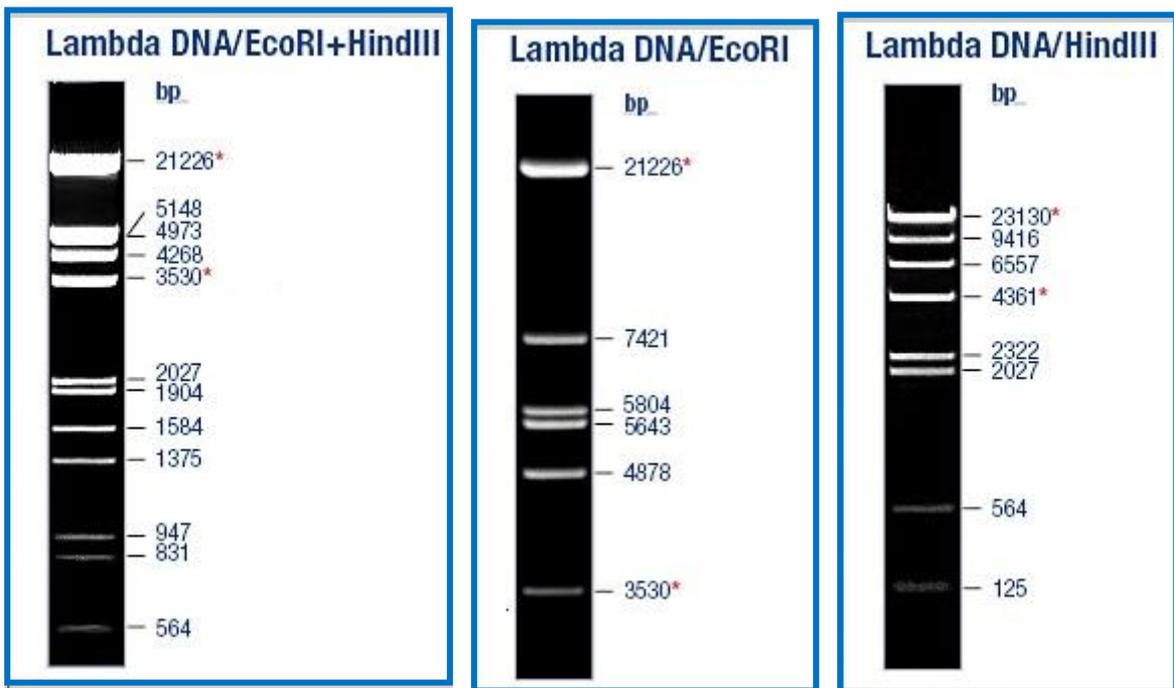
En general muy pocos fagos son capaces de realizar ambos ciclos. Los que lo hacen entran en una u otra versión dependiendo de las condiciones externas.



Los fagos han jugado y juegan un papel importantísimo como herramientas biotecnológicas. Su genoma puede aceptar la inclusión de material genético extra hasta cierto punto, razón por la cual son utilizados como vectores de clonación formando las llamadas librerías (aunque el término correcto sería bibliotecas) de fagos. En estas librerías, una población de fagos contiene, fragmentado y repartido entre los diferentes fagos que forman la población, un genoma o transcriptoma de interés. De esta forma es muy fácil manejar colecciones de genes, ya que los fagos son fáciles de reproducir y conservar. Las librerías suelen incluir sistemas que permiten amplificar o liberar el fragmento genético de interés. Esta posibilidad, combinada con la posibilidad de recombinación controlada y la capacidad de ciertos fagos de mostrar proteínas exógenas en su cubierta, es la base de la técnica de “phage display”.

2.3 MAPA DE RESTRICCIÓN BACTERIÓFAGO LAMBDA

En la secuencia de nucleótidos del fago lambda, que tiene 48502 pares de bases, podemos encontrar diferentes lugares donde las enzimas de restricción cortan. En esta práctica vamos a utilizar los enzimas **Eco RI** y **Hind III** para ver que patrón de bandas proporciona al digerir el fago lambda. Estas digestiones se preparan comercialmente con el nombre de **marcadores de peso molecular conocido o estándar** y se utilizan para determinar el tamaño de fragmentos de ADN en una electroforesis en gel de agarosa.



En las imágenes anteriores podemos observar 3 de los marcadores de peso molecular más utilizados en trabajos de biología molecular y como hemos comentado tiene como base la digestión del fago lambda.

Estas imágenes representan electroforesis en gel de agarosa 1% del ADN del fago lambda digerido con diferentes enzimas de restricción (los que utilizaremos en este experimento), se ha de tener en cuenta que la visualización del ADN se ha realizado con bromuro de etidio que tiene una sensibilidad mayor a nuestro método NO TÓXICO (utilizado en este kit), lo cual supondrá que en nuestro experimento no observaremos las bandas de los fragmentos más pequeños, a no ser que su laboratorio ya disponga de un método de detección del ADN

con una sensibilidad similar al bromuro de etidio como puede ser nuestro método NO TÓXICO del **GELSAFE** que necesita el uso de un transiluminador de luz UV, como el método de bromuro de etidio.

3. COMPONENTES

| | | |
|--|-----------|----------------------|
| Tampón de electroforesis concentrado 10X (2 envases 50ml) | 2 x 50 ml | Temperatura ambiente |
| Agarosa | 1.75 gr | Temperatura ambiente |
| Microtubos de muestras | 5 | Conservar a -20°C |
| DanaBlue 0.1 % | 400 µl | Temperatura ambiente |
| FashBlue 0.75X | 125 ml | Temperatura ambiente |

| MUESTRAS | COMPOSICION | CANTIDAD |
|-----------------|--------------------------------|-----------------|
| BLANCO | LAMBDA DNA CON TAMPÓN DE CARGA | 100 microlitros |
| NEGRO | LAMBDA DNA ECORI | 100 microlitros |
| AMARILLO | LAMBDA DNA HINDIII | 100 microlitros |
| LILA | LAMBDA DNA ECORI + HINDIII | 100 microlitros |
| ROJO | LAMBDA DNA StyI | 100 microlitros |

Añadir 450 ml de agua destilada a cada envase de Tampón de electroforesis 10 X para elaborar 2 x 500 ml de Tampón de electroforesis 1 X que es el Tampón de trabajo.

Material requerido y no suministrado

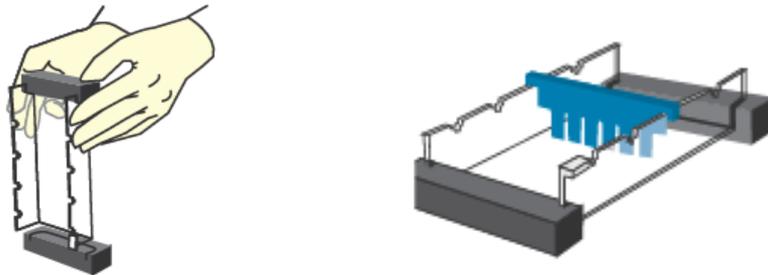
- Micropipetas automáticas y puntas (5-50 microlitros).
- Erlenmeyer o vaso para realizar el gel de agarosa.
- Cubeta y fuente de electroforesis.
- Balanza.
- Microondas o placa calefactora.
- Agua destilada.

4. PRÁCTICA

4.1 PREPARACION GEL DE AGAROSA

A) Preparación del molde

Coger el molde para hacer los geles y cerrar los extremos con los topes para que no se salga la agarosa. Después colocar los peines necesarios para formar los pocillos.



B) Preparación del gel de agarosa

Dependiendo del tiempo que se dispone para la práctica el gel de agarosa puede prepararse otro día y conservarse en nevera a 4°C. Si se dispone del tiempo necesario se puede realizar el día de la práctica antes de realizar las reacciones para dar tiempo a que solidifique y no se rompan los pocillos al extraer el peine.

1.b) Utilizar un vaso o erlenmeyer de 100 ml para preparar la solución del gel.

2.b) **Para geles de 7 x 7 cm:** Añadir **32 ml de Tampón de electroforesis 1 X más 0.32 gr de agarosa + 80 µl DanaBlue 0.1 %**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa.

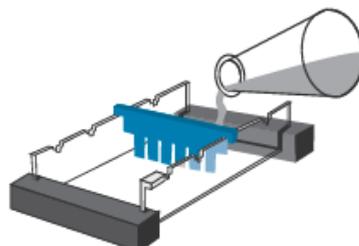
Para geles de 7 x 10 cm: Añadir **42 ml de Tampón de electroforesis 1 X más 0.40 gr de agarosa + 100 µl DanaBlue 0.1 %**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa.

Asegurarse que se ha añadido los 450 ml de agua destilada al Tampón de electroforesis 10 X y se trabaja con el Tampón 1X.

3.b) Calentar la mezcla para disolver la agarosa, el método más rápido es la utilización de un microondas, también puede utilizarse un placa calefactora, en ambos casos, para que la agarosa se disuelva se ha de llevar **la solución a ebullición**. La solución final debe aparecer clara sin partículas aparentes.

4.b) **Enfriar** la solución de agarosa más o menos a 55°C (para acelerar el proceso se puede enfriar colocando el envase debajo de un grifo de agua y agitar). Si se produce mucha evaporación del líquido, añadir tampón de electroforesis.

5.b) Añadir la solución de agarosa al molde.



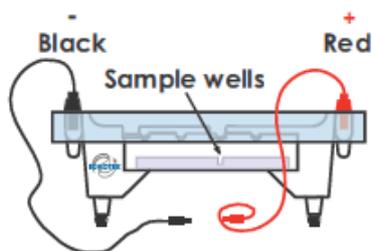
6.b) Permitir que el gel solidifique. Para acelerar el proceso se puede sembrar el gel en una nevera. (si la electroforesis se realizará al día siguiente, conservar el gel a 4°C).

4.2 SIEMBRA DEL GEL Y ELECTROFORESIS

Nota: Si usted no está familiarizado con la siembra de geles de agarosa, es recomendable que practique la siembra antes de llevar a cabo el experimento, o llevar a cabo el experimento completo antes de realizarlo con los alumnos.

A) Preparación del gel para la electroforesis

- 1) Después que el gel se ha solidificado con mucho cuidado sacar los topes.
- 2) Colocar el gel en la cámara de electroforesis correctamente orientada con los pocillos más cerca del polo negativo (color negro).

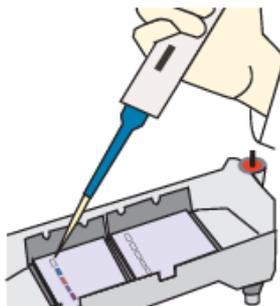


- 3) Llenar la cámara de electroforesis con **300 ml de Tampón de electroforesis 1X**. *El tampón de electroforesis se puede utilizar para 2 experimentos de electroforesis, una vez terminada la electroforesis guardar este tampón utilizado en un envase diferente al suministrado para utilizarlo en una nueva electroforesis.*
- 4) Asegurarse que el gel está completamente cubierto de tampón.
- 5) Sacar el peine o peines que ha formado los pocillos con mucho cuidado de no romper ningún pocillo.
- 6) Proceder a la siembra del gel y llevar a cabo la electroforesis.

B) Muestras de electroforesis: *Chequear el volumen de las muestras. Algunas veces pequeñas gotas de la muestra puede estar en las paredes de los microtubos. Asegurarse de que toda la cantidad de muestra se encuentra uniforme antes de sembrar el gel. Centrifugar brevemente los microtubos de muestra, o golpear los microtubos contra una mesa para obtener toda la muestra en la parte inferior del microtubo.*

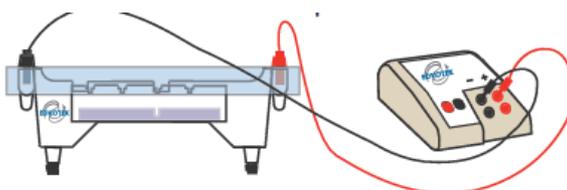
| Pocillo | Muestra | Descripción | Volumen siembra |
|---------|-----------------|--------------------------------|-----------------|
| 1 | BLANCO | LAMBDA DNA CON TAMPÓN DE CARGA | 20 microlitros |
| 2 | NEGRO | LAMBDA DNA ECORI | 20 microlitros |
| 3 | AMARILLO | LAMBDA DNA HINDIII | 20 microlitros |
| 4 | LILA | LAMBDA DNA ECORI + HINDIII | 20 microlitros |
| 5 | ROJO | LAMBDA DNA StyI | 20 microlitros |

1. Sembrar los microlitros indicados de cada muestra en el gel, utilizar para ello una micropipeta con su punta.



2) Después que se han sembrado las muestras, cuidadosamente colocar la cubierta del aparato de electroforesis en los terminales de los electrodos.

3) Insertar la clavija del cable negro en la entrada de color negro de la fuente de corriente (entrada negativa). Insertar la clavija del cable rojo en la entrada de color rojo de la fuente de corriente (entrada positiva).



4) Configurar la fuente de corriente a **75 voltios (30 minutos) o a 150 voltios (20 minutos)**. **Vigilar el desarrollo del colorante del tampón de carga que indica cómo transcurre la electroforesis.**

5) Después de 10 minutos empezará a observarse la separación de las muestras.

6) Después de que la electroforesis ha terminado, **apagar la fuente de corriente**, desconectar los cables y sacar la cubierta.

7) Colocar el gel en un transiluminador de luz blanca (si no se dispone de uno, también puede utilizarse una hoja de papel blanco). Para una correcta visualización de las bandas deberá pasarse al siguiente apartado, que es la tinción del gel para visualizar todas las bandas correctamente.

4.4 TINCIÓN DEL GEL DE AGAROSA

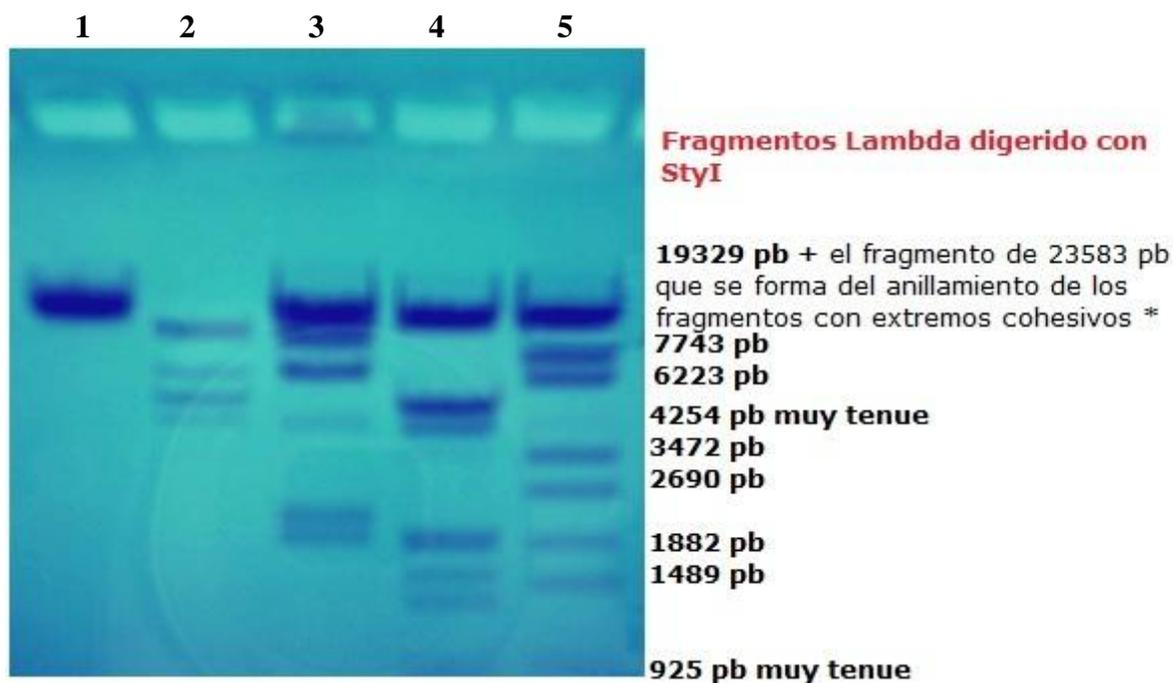
1. No teñir los geles en la cubeta de electroforesis.

2. Colocar el gel en un recipiente con **125 ml de FlashBLue 0.75X**, de forma que quede completamente cubierto.

3. Incubar durante 15 minutos. Aumentar el tiempo de tinción conllevará a un mayor número de lavados con agua.

4. Guardar los 125 ml de FashBlue 0.75 X para otra tinción.
5. Colocar el recipiente con el gel debajo de un grifo de agua y dejar correr el agua hasta que no salga de color azul. Sujetar el gel para no perderlo. Llenar el recipiente con agua.
6. Cuidadosamente sacar el gel del recipiente y examinar el gel en un transiluminador de luz blanca (si no se dispone de uno puede servir una hoja blanca). En este paso se apreciarán las bandas pero el gel tendrá un color azul muy intenso que no permitirá apreciar bien las bandas.
7. Realizar varios lavados con agua en agitación si es posible. Se observará como cada vez se hacen más visibles las bandas y desciende el color azul de fondo.
8. Si todavía tiene un color muy intenso de fondo, es posible, dejarlo toda la noche en agua y a la mañana siguiente observar el gel.

5. RESULTADOS



Pocillo 1: Fago Lambda sin digerir.

Pocillo 2: MARCADOR EcoR I 21226* pb; 7421 pb; 5804 pb; 5643 pb; 4878 pb; 3530*pb.

Pocillo 3: MARCADOR Hind III 23130* pb; 9416 pb; 6557 pb; 4361* pb; 2322 pb; 2027 pb; 564 pb; 125 pb.

Pocillo 4: MARCADOR EcoRI + HindIII 21226* pb; 5148 pb; 4973pb; 4268 pb; 3530* pb; 2027 pb; 1904 pb; 1584 pb; 1375 pb; 974 pb; 831 pb; 564 pb.

Pocillo 5: MARCADOR StyI 19329* pb; 7743 pb; 6223 pb; 4254* pb; 3472 pb; 2690 pb; 1882 pb; 1489 pb; 925 pb; 421 pb; 74 pb.

IMPORTANTE: los fragmentos marcados con * presentan extremos cohesivos por lo que tienden a anillarse y forman fragmentos de mayor tamaño. El fragmento 3530 normalmente no suele aparecer en el gel y los fragmentos 4361 y 4254 se ven muy tenues. Estos fragmentos cohesivos se pueden separar calentando a 65°C durante 5 minutos y luego poniendo en hielo durante 3 minutos previamente a la siembra.

1. Las bandas más pequeñas es muy probable que no se observen (por debajo de 900 pb), a no ser que se utilice un método más sensible con bromuro de etidio u otros colorantes fluorescentes, o nuestro GELSAFE, método NO TOXICO, pero que utiliza un transiluminador de luz UV.

2. El fago lambda sin digerir aparece a la misma altura que la banda mayor de 23Kb, esto mismo sucede cuando se aísla ADN genómico humano, la banda aparece a esa altura de 23 Kb.