

LA PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN EcoRI

5 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

En esta práctica, los estudiantes purifican una endonucleasa de restricción, prueban su actividad enzimática, y visualizan los resultados con una electroforesis en gel de agarosa.

2. COMPONENTES para 5 grupos de estudiantes

COMPONENTES		Conservación
A	Extracto (liofilizado) de <i>E. coli</i> RY (Eco RI)	Nevera
B	DEAE-celulosa	Tª ambiente
C	Tampón de equilibrado 10x	Congelador
D	Glicerol 50%	Congelador
E	KCl	Tª ambiente
F	Tampón de reacción Eco RI	Congelador
G	Agua cualificada	Congelador
H	ADN Lambda	Congelador
I	Marcador Lambda/Eco RI	Congelador
J	Tampón de dilución Eco RI	Congelador
	Polvo UltraSpec-agarosa™	Tª ambiente
	Tampón de electroforesis concentrado 10x	Tª ambiente
	Tampón de carga	Tª ambiente
	Columnas cromatográficas	Tª ambiente
	Tarjetas InstaStain® Bromuro de etidio	Tª ambiente

Almacenamiento de los componentes perecederos

Esta práctica incluye componentes perecederos que son enviadas en hielo húmedo. Almacenar estos componentes a -20°C (-4°F). Por favor, tengan en cuenta qué tipo de congelador tienen y almacenar los componentes de esta práctica correctamente.

Congelador sin escarcha

La mayoría de neveras/congeladores en los hogares son libres de hielo. Esto significa que el congelador pasa por ciclos de calentamiento para eliminar la escarcha (ciclo de descongelación). Si se utiliza este tipo de congelador, mantener las enzimas en el lecho de espuma (con el ladrillo de hielo) en el que fueron enviados. Esto ayudará a mantener las enzimas a -20°C cuando el congelador pasa por el ciclo de descongelación.

NOTA: Este experimento NO CONTIENE ADN humano. Ninguno de los componentes de este kit se ha preparado a partir de material humano.

NOTA: Todos los componentes de este kit están destinados a la investigación educativa. No pueden ser utilizados con fines de diagnóstico o médicos, ni pueden ser administrados o consumidos por seres humanos o animales.

2.1 Material requerido y no suministrado

- Aparato de electroforesis horizontal
- Fuente de alimentación DC
- Micropipetas automáticas y puntas
- Balanza
- Baño de agua
- Soporte y abrazaderas
- 13 tubos de ensayo de vidrio (100 mm)
- Variedad de la cristalería de laboratorio
- Marcadores permanentes y cinta
- Tubos de microensayo (1,5 ml)
- Horno de microondas, placa caliente o quemador
- Pera de succión para pipetas
- Vasos (250 ml)
- Guantes de protección (para objetos calientes)
- Gafas de seguridad y guantes desechables de laboratorio
- Agua destilada
- Transiluminador UV

3. INTRODUCCIÓN

La purificación de la enzima de restricción EcoRI

Las endonucleasas de secuencia específica, o de Tipo II, se conocen comúnmente como **enzimas de restricción**. En contraste con las endonucleasas inespecíficas, estas enzimas generan fragmentos reproducibles de ADN específicos. Se escinden del ADN de doble cadena mediante la hidrólisis de dos enlaces fosfodiéster (uno por línea) dentro de las secuencias de nucleótidos definidas. Se han descubierto más de 3.000 enzimas desde el primer informe de H. O. Smith y colaboradores. Estas enzimas son extraídas de una gran variedad de cepas bacterianas.

El nombre de una enzima de restricción se deriva del género y especie de bacteria de la que se aísla. La primera letra del nombre del género y dos primeras letras de la especie se combinan para formar el nombre de la enzima. Esto es seguido por una designación de la cepa si procede. En muchos casos, una cepa bacteriana contiene más de una endonucleasa de restricción. Cuando esto ocurre, cada enzima se le asigna un número romano. Por ejemplo, **Bam HI** fue la primera enzima con actividad obtenida del *Bacillus amyloliquefaciens* cepa H.

La mayoría de las enzimas de restricción se componen de dos polipéptidos de subunidades iguales con pesos moleculares de 20.000-25.000 o polipéptidos individuales con pesos moleculares de 30.000-35.000. Las actividades enzimáticas se pueden diferenciar entre sí por sus característicos patrones de digestión de pequeños ADN's virales. El ADN del bacteriófago lambda es el sustrato más ampliamente utilizado para la detección de enzimas de restricción. Debido a que a menudo es difícil determinar un patrón característico de un lambda digerido se utilizan también ADN's más pequeños, como la forma replicativa del bacteriófago ØX174 y el ADN SV40. Los resultados de las digestiones del ADN con enzimas de restricción se muestran en geles de agarosa y se visualizan por tinción con bromuro de etidio.

Restriction Enzyme	Recognition Site
<i>Bam</i> HI <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5\text{'-GGATCC-3'} \\ 3\text{'-CCTAGG-5'} \\ \uparrow \end{array}$
<i>Bgl</i> I <i>Escherichia coli</i> RY13	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5\text{'-GCCNNNNNGGC-3'} \\ 3\text{'-CGGNNNNNCCG-5'} \\ \uparrow \end{array}$
<i>Eco</i> RI <i>Bacillus globigii</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5\text{'-GAATTC-3'} \\ 3\text{'-CTTAAG-5'} \\ \uparrow \end{array}$
<i>Hae</i> III <i>Haemophilus aegyptius</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5\text{'-GGCC-3'} \\ 3\text{'-CCGG-5'} \\ \uparrow \end{array}$
<i>Hind</i> III <i>Haemophilus influenzae</i> R ₄	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5\text{'-AAGCTT-3'} \\ 3\text{'-TTCGAA-5'} \\ \uparrow \end{array}$

Figura 1: Ejemplos de enzimas de restricción y sus secuencias de reconocimiento.

Una secuencia de reconocimiento en el ADN dada a menudo puede ser reconocida por más de una enzima de restricción. El término "isoschizomers" describe un grupo de enzimas de restricción que reconocen la misma secuencia en el ADN. Las secuencias reconocidas por estas enzimas son en su mayor parte centrosimétricas, "secuencias palindrómicas" que son por lo general hexámeros, pentámeros o tetrámeros. Varios enzimas de restricción Tipo II reconocen una secuencia específica de ADN e hidrolizan los enlaces fosfodiéster a una distancia definida de ese sitio. Un ejemplo de este grupo de enzimas es **Bgl I**, que reconoce una secuencia que contiene dos grupos de residuos específicos separados por residuos completamente inespecíficos -GCCNNNNNGGC; por lo tanto, genera fragmentos de ADN con diferentes grupos terminales.

Existe una considerable diversidad en los extremos de los fragmentos producidos por la actividad de las endonucleasas de Tipo II que reconocen y rompen dentro de la misma secuencia. En algunos casos, la extensión 5' puede ser tan corto como dos nucleótidos o tan largo como cinco. Los puntos de corte en cada hebra pueden estar uno frente al otro; esto da como resultado extremos romos (cuadrados). Varias endonucleasas de restricción producen extensiones 3' de dos a cuatro nucleótidos. Sin embargo, todas las endonucleasas de Tipo II producen fragmentos con un fosfato 5' terminal y un residuo hidroxilo 3' terminal (**Figura 1**).

Las enzimas de restricción de la familia del tipo II pueden ser purificados mediante procedimientos cromatográficos. Después que los extractos han sido liberados de los ácidos nucleicos celulares se utiliza una matriz de intercambio iónico a un pH casi neutro para la separación. En esta etapa de la purificación, hay ensayos rápidos que hacen posible visualizar las fracciones que contienen enzimas de restricción obtenidos. Una gran variedad de enzimas se han fraccionado mediante cromatografía de afinidad. Este método aprovecha interacciones biospecíficas que no son utilizadas por los métodos de fraccionamiento convencionales. Las ventajas de la cromatografía de afinidad son la velocidad de purificación y, con frecuencia, la protección de los enzimas frente a la desnaturalización durante el fraccionamiento.

Efectos de las condiciones de reacción de las enzimas de restricción

Varios informes han descrito cambios aparentes en la especificidad de las endonucleasas de restricción asociados con cambios de las condiciones de la reacción. Entre las condiciones que pueden provocar cambios son la concentración iónica, pH del tampón de reacción y las cantidades de glicerol durante el almacenamiento y la mezcla de reacción. Por ejemplo, cuando se incubaba ADN lambda con **Eco RI** o **Bam HI** en presencia de glicerol a diversas concentraciones, se observa un cambio progresivo en el patrón de digestión de ADN.

Un cambio en el reconocimiento específico de las enzimas incluye la actividad **Bam HI** y **Eco RI**. La segunda actividad se designa como ".1" (como **Bam HI.1**). Una actividad similar se muestra por **Eco RI**. El aumento del pH de la reacción de 7,0 a 9,0 produce la ausencia de cationes monovalentes que provoca actividades alternativas. Las disminuciones en la fuerza iónica tienen un efecto similar.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

En esta práctica, los estudiantes purifican una endonucleasa de restricción, prueban su actividad enzimática, y visualizan los resultados con una electroforesis en gel de agarosa.

4.1 Precauciones

1. Se deben usar los guantes y gafas de protección de forma rutinaria como buenas prácticas de laboratorio.
2. Deben tener mucho cuidado al trabajar con equipos que utilizan calor y/o fusión de los reactivos.
3. NO PIPETEAR LOS REACTIVOS CON LA BOCA-PIPETEAR CON PERAS DE SUCCIÓN.
4. Lavarse bien siempre las manos con agua y jabón después de manipular reactivos o materiales biológicos del laboratorio.
5. Tener cuidado al usar cualquier equipo eléctrico en el laboratorio.
6. Esta práctica utiliza InstaStain® bromuro de etidio para la tinción y visualización de ADN después de la electroforesis en gel. Utilice siempre guantes para manipular las tarjetas InstaStain®. Aunque sólo hay una cantidad muy pequeña de bromuro de etidio en las tarjetas InstaStain®, es muy mutagénico. Use gafas de seguridad resistentes a los UV cuando se trabaja con luz ultravioleta, ya que puede causar daños irreparables en los ojos, también se debe evitar la exposición a la piel.

4.2 Requisitos de tiempo (aproximado) de los procedimientos de la práctica

- Preparaciones pre-práctica

El tiempo necesario para realizar las preparaciones previas a la práctica y la dispensación de productos biológicos y reactivos es de 1-2 horas, aproximadamente.

- Digestión con las enzimas de restricción

El tiempo aproximado necesario para que los estudiantes realicen la digestión con las enzimas de restricción y la preparación de las muestras para la electroforesis es de 50-75 minutos. Ampliar 60 minutos el tiempo de incubación de la digestión con la enzima de restricción ayudará a asegurar la escisión completa del ADN.

- Preparación de gel de agarosa

El tiempo necesario para la preparación previa del gel por el profesor de prácticas o los estudiantes es de aproximadamente 30-40 minutos. En general, 20 minutos de este tiempo son los necesarios para la solidificación del gel.

La realización de electroforesis

El tiempo aproximado para realizar la electroforesis puede variar de 15 minutos a 2 horas. En general, cuanto mayor sea el voltaje aplicado más rápido migrarán las muestras. Sin embargo, dependiendo de la configuración del aparato y la distancia entre los dos electrodos, las unidades de electroforesis individuales pueden presentar una velocidad de separación del ADN diferente. Siga las recomendaciones del fabricante del equipo en cuanto al tiempo y el voltaje.

Tabla 1			Tiempos y voltajes recomendados	
EDVOTEK Electrophoresis Model				
Volts	M6+		M12 & M36	
	Minimum / Maximum		Minimum / Maximum	
150	15 / 20 min		25 / 35 min	
125	20 / 30 min		35 / 45 min	
70	35 / 45 min		60 / 90 min	
50	50 / 80 min		95 / 130 min	

Tabla 1: Tiempo y voltajes recomendados.

4.3 Preparaciones previas

Nota para el profesor de prácticas

El tamaño de la clase, la duración de las clases de prácticas y la disponibilidad de los equipos son factores que deben ser considerados en la planificación e implementación de esta práctica con sus alumnos. Estas directrices pueden adaptarse para encajar en sus circunstancias específicas.

Fundamentos de la práctica: micropipetas y carga del gel

Pipetear de una manera precisa es crítico para garantizar los resultados de la práctica. Esta práctica está diseñada para estudiantes que han tenido experiencias previas con las técnicas de electroforesis en gel de agarosa y las micropipetas. Si los estudiantes no están familiarizados con el uso de micropipetas, se recomienda que los estudiantes realicen prácticas previas con micropipetas y de electroforesis.

A. Las opciones para la preparación de geles de agarosa

Esta práctica está diseñada para la tinción del ADN después de la electroforesis con InstaStain[®] bromuro de etidio. Hay varias opciones para la preparación de geles de agarosa para el experimento.

1. Gel individual: Cada grupo de práctica puede ser responsable de realizar su propio gel antes de la práctica.
2. Preparación previa de geles: Los geles se pueden preparar previamente y almacenarse para su uso posterior. Los geles solidificados se pueden guardar en la nevera durante 2 semanas.

NOTA: No guarde los geles a -20 ° C. La congelación destruirá los geles.

Los geles que han sido retirados de sus bandejas para almacenarlos, deben ser "anclados" de nuevo a la bandeja con unas gotas de agarosa calientes, fundidas antes de colocar los geles en el aparato de electroforesis. Esto evitará que los geles se resbalen en las bandejas y las cámaras.

3. Preparación de un lote de geles: Un lote de gel de agarosa se puede preparar para compartir por toda la clase. Para ahorrar tiempo, se puede preparar una mayor cantidad de UltraSpec-agarosa para compartir por toda la clase.

Concentración del gel

La concentración de gel requerido es de 0,8%. Preparar geles de 7 x 14 cm geles según **Tablas 1.1 y 1.2** en el **ANEXO 1**.

B. Purificación parcial de EcoRI

Matriz DEAE-celulosa

1. Hidratar la matriz de intercambio iónico del, DEAE-celulosa (componente B), en 35 ml de tampón de equilibrio 10x (componente C).
2. Remover o agitar suavemente de vez en cuando durante un mínimo de 30 minutos.
3. Dividir en alícuotas de 6 ml para cada uno de los cinco grupos.

DEAE-Cellulose (Matrix, B)	6 ml	on ice
Eq Buffer (1x equil buffer, diluted C)	35 ml	on ice
0.1 M KCl	6 ml	on ice
0.2 M KCl	6 ml	on ice
0.5 M KCl	6 ml	on ice
<i>E. coli</i> RY extract (A)	1 ml	on ice

Tabla 2: Tabla resumen de los reactivos.

Los tampones

4. Preparar 500 ml de tampón de equilibrado 1x (Eq) en un matraz o vaso de precipitación de 600 ml. Para prepararlo, añadir los siguientes componentes y agitar para mezclarlos bien:

- 350 ml de agua destilada
- 50 ml de tampón de equilibrado 10x (componente C)
- 100 ml de glicerol 50% (componente D)

Utilizar esta fórmula para preparar el tampón en el paso 5.

5. Para preparar los tampones Eq+KCl, mezclar los siguientes componentes:

Tampones Eq+KCl	Tampón Eq	KCl
0,1 M KCl	100 ml	0,75 g
0,2 M KCl	100 ml	1,5 g
0,5 M KCl	100 ml	3,75 g

Extracto de la célula *E. coli* que contiene el enzima de restricción Eco RI

6. Rehidratar la muestra mediante la adición de 0,5 ml de agua destilada al componente A y deje reposar durante 5 minutos.

7. Mezclar vigorosamente por agitación y transferir el contenido completo a un tubo cónico de 50 ml. Enjuagar el tubo A seis veces - cada vez con 1 ml de tampón de equilibrado 1x (componente C diluido) y añadir el material de enjuague al tubo cónico de 50 ml. Mezclar bien el tubo.

8. Marcar 5 tubos "*E. coli* extracto de RY". Alicuotar 1 ml del extracto rehidratado para cada uno de los grupos de estudiantes. Almacenar el extracto en hielo.

Análisis y cuantificación de la actividad EcoRI (primer y segundo ensayos)

La incubación de las fracciones con ADN lambda

1. Marcar 5 tubos "Agua" y dispensar 1 ml de agua cualificada (componente G) en los tubos. Almacenar en hielo.

2. Marcar 5 tubos "Tampón Eco RI Rxn" y dispensar 100 µl de tampón de reacción Eco RI (componente F) en los tubos. Almacenar en hielo.

3. Marcar 5 tubos "ADN Lambda" y dispensar 100 µl de ADN lambda (componente H) en los tubos. Almacenar en hielo.

4. Marcar 5 tubos "Tampón de carga 10x" y dispensar 100 µl tampón de carga 10x en los tubos.

5. Marcar 5 tubos "Marcador" y dispensar 45 µl de marcador Lambda/EcoRI (componente I) en los tubos.

6. Marcar 5 tubos "Tampón EcoRI Diln" y dispensar 250 µl de tampón de dilución de Eco RI (componente J) en los tubos. Almacenar en hielo.

7. Tener preparado un baño de agua a 37°C para el análisis de la actividad EcoRI.

Reagents for First & Second Assays		
Water (G)	1 ml	on ice
Eco RI Rxn Buffer (F)	100 µl	on ice
Lambda DNA (H)	100 µl	on ice
10x Gel Load	100 µl	
Marker	45 µl	
Additional Reagent for Second Assay		
Lambda DNA (H)	250 µl	on ice

Tabla 3: Tabla resumen de los reactivos.

Importante: A los estudiantes se les debe recordar que los reactivos que reciben son para dos ensayos.

C. Tinción del gel y la decoloración después de la electroforesis

Esta práctica incluye InstaStain[®] bromuro de etidio para la tinción del gel después de la electroforesis. Es un método de tinción patentado que ahorra tiempo y reduce los residuos líquidos. La tinción del ADN con InstaStain[®] azul de metileno no es recomendable porque no va a dar resultados óptimos. La visualización óptima de los fragmentos de ADN en geles se obtiene mediante tinción con las tarjetas InstaStain[®] bromuro de etidio (EtBr InstaStain[®]).

- InstaStain[®] bromuro de etidio. **ANEXO 3**

Precaución:

El bromuro de etidio es muy mutagénico. El riesgo de las tarjetas InstaStain[®] EtBr, que contienen sólo unos pocos microgramos de bromuro de etidio, es mínimo en comparación con el gran volumen de los residuos líquidos generados por los procedimientos tradicionales de tinción con bromuro de etidio. Para la eliminación de las tarjetas y los geles InstaStain[®] debe seguir las pautas institucionales de eliminación de residuos químicos.

D. Documentación fotográfica del ADN (opcional)

Hay muchos sistemas disponibles de fotodocumentación, incluidos los sistemas digitales que se interconectan directamente con los ordenadores. Las instrucciones específicas variarán dependiendo del tipo de sistema de documentación fotográfica que se utilice.

4.4 Material que debe recibir cada grupo

Cada grupo de prácticas debe recibir los siguientes componentes antes de iniciar el procedimiento experimental:

- DEAE-Celulosa.
- Tampón Eq (Eq Buffer).
- 0,1 M KCl.
- 0,2 M KCl.
- 0,5 M KCl.
- Extracto de E. coli RY.
- 1 columna de cromatografía.
- 1 soporte con pinza.
- 9 tubos de ensayo (13x100 mm).
- 10 microtubos de ensayo.
- Micropipeta automática y puntas.
- Pipetas de 5 ml y peras de succión.

5. PRÁCTICA

PURIFICACIÓN PARCIAL DE EcoRI

Empaquetamiento y equilibrado de la matriz de la columna

1. Montar la columna verticalmente a un soporte de anillo. Asegúrese de que está recta.
2. Deslice el tapón de la purga de la parte inferior de la columna.
3. Mezclar bien la DEAE-celulosa (matriz de intercambio iónico) por agitación suave o removiendo la mezcla.
4. Pipetear cuidadosamente la DEAE-celulosa mezclada en el interior de la columna dejando que fluya por las paredes interiores. Si el empaquetamiento se detiene por una bolsa de aire, dejar de añadir la DEAE-celulosa y golpear suavemente las paredes de la columna hasta que se elimine el aire y la matriz vuelva a fluir hacia abajo. Continuar añadiendo la matriz.
5. Colocar un vaso vacío bajo la columna para recoger las soluciones de lavado.
6. Retirar el tapón de la purga inferior de la columna y dejar que la matriz quede empaquetada en la columna.
7. Lavar la matriz de la columna con 25 ml de la solución "tampón de equilibrado 1x". No permitir que la columna se seque.

NOTA: La carga de la columna y la posterior elución se hace a temperatura ambiente. Los tampones de elución y las fracciones recogidas se deben almacenar en hielo a medida que eluyen de la columna.

Recoger las fracciones de la columna

1. Marcar de ocho tubos de ensayo (13 x 100 mm) del 2-9 con un marcador de laboratorio. La **Tabla 4** indica que tubos utilizar para recoger las diferentes fracciones.
2. Añadir 3 ml de agua destilada en un tubo de ensayo y utilizar esto como una guía de referencia para la recogida de las fracciones eluidas.
3. Cargar lentamente la columna con 1 ml de extracto de *E. coli* RY. Dejar que el extracto entre por completo en la columna.
4. Añadir lentamente 6 ml de la solución Eq a la columna para eliminar la proteína que se encuentra atravesando la columna. Recoger dos fracciones (de 3 ml cada una) en los tubos marcados 2 y 3 y almacenar en hielo.
5. Secuencialmente eluir la columna con los tampones indicados a continuación. En cada caso, recoger fracciones de 3 ml en los tubos apropiados y almacenar las fracciones en hielo inmediatamente después de la recogida. No permitir que la columna se seque.
 - 6 ml de KCl 0,1M. Recoger dos fracciones, de 3 ml cada una, en los tubos 4 y 5. Almacenar en hielo.
 - 6 ml de KCl 0,2M. Recoger dos fracciones de 3 ml en los tubos 6 y 7. Almacenar en hielo.
 - 6 ml de KCl 0,5M. Recoger dos fracciones de 3 ml en los tubos 8 y 9. Almacenar en hielo.

Clave para identificar las fracciones	
Tube	Fraction
2	(no salt)
3	(no salt)
4	0.1 M KCl
5	0.1 M KCl
6	0.2 M KCl
7	0.2 M KCl
8	0.5 M KCl
9	0.5 M KCl

Tabla 4: Clave para identificar las fracciones

PUNTO DE PARADA OPCIONAL

Si por motivos de tiempo no es posible continuar el análisis de la actividad de *Eco RI*, es posible congelar las fracciones a -20°C y realizar los ensayos en un momento posterior. Al descongelar las fracciones a temperatura ambiente, colocar inmediatamente en hielo y continuar con el análisis de la actividad de *Eco RI*.

Análisis de la actividad *EcoRI* (primer ensayo)

El DNA del fago Lambda se incuba con las fracciones recogidas y las muestras se someten a electroforesis en un gel de agarosa para determinar el pico de actividad de endonucleasa *Eco RI*. El DNA del fago Lambda cortado con *Eco RI* produce un patrón de fragmentación característico y reconocible.

1. Marcar los tubos de microensayo del 1 al 9. Poner las iniciales y/o el número de grupo en cada tubo.
2. Cada grupo analizará *Eco RI* usando 2 μl , 4 μl , 6 μl , 8 μl ó 10 μl según asigne el profesor de prácticas. En la **Tabla 5**, la "x" es igual al volumen asignado para su análisis.

Secuencia para la reacción de la enzima de restricción							
Rxn Tube	Qualified Water (μl)	Eco RI Reaction Buffer (μl)	Lambda DNA (μl)	Fraction	Reaction Volume (μl)	37°C Incubation (minutes)	10x Gel Load (μl)
1	40	5	5	None	50	15	5
2	(40 - x)	5	5	x μl tube 2 (no salt)	50	15	5
3	(40 - x)	5	5	x μl tube 3 (no salt)	50	15	5
4	(40 - x)	5	5	x μl tube 4 (0.1 M KCl)	50	15	5
5	(40 - x)	5	5	x μl tube 5 (0.1 M KCl)	50	15	5
6	(40 - x)	5	5	x μl tube 6 (0.2 M KCl)	50	15	5
7	(40 - x)	5	5	x μl tube 7 (0.2 M KCl)	50	15	5
8	(40 - x)	5	5	x μl tube 8 (0.5 M KCl)	50	15	5
9	(40 - x)	5	5	x μl tube 9 (0.5 M KCl)	50	15	5

Tabla 5: Secuencia para la reacción de la enzima de restricción.

*Los volúmenes de Eco RI en las fracciones deben ser variados entre los diferentes grupos dentro del rango de 2 a 5 μl, con incrementos de 1 μl. Para ello debe ajustarse el agua de cada ensayo.

**Se añade después de la incubación a 37°C.

- Utilizar una micropipeta automática para añadir (40-x μl) de agua cualificada a cada uno de los 9 tubos.
- Utilizar una micropipeta automática para añadir 5 μl del tampón *Eco RI* Rxn y 5 μl de ADN del fago Lambda a cada uno de los 9 tubos.
- Utilizar una punta de pipeta nueva para cada fracción y añadir 2 μl, 4 μl, 6 μl, 8 μl ó 10 μl como ha asignado el profesor de prácticas, de cada fracción al tubo correspondiente.
- Cierre los tubos herméticamente y golpee suavemente sobre la poyata de laboratorio o dar un pulso ("spin" corto) a los tubos en la microcentrífuga para recoger muestras en la parte inferior de los tubos.
- Mezclar las muestras e incubar en un baño de agua a 37°C durante 15 minutos.
- Asegurarse que el conjunto de tubos de reactivos están etiquetados con las iniciales o el número del grupo correspondiente y guardar en la nevera para su uso posterior en el segundo ensayo.

9. Después de 15 minutos, añadir 5 µl de tampón de carga 10x a cada tubo para detener las reacciones.

Esto prepara los productos de la digestión de la *Eco RI* para su separación por electroforesis en gel de agarosa.

NOTA: Los reactivos enumerados en la **Tabla 6** se utilizarán para dos ensayos. Marcar los tubos de reactivos con las iniciales o número de cada grupo y almacenar los tubos de cada grupo en la nevera entre ensayos.

Reactivos para la incubación de Eco RI con DNA lambda		
Water (G)	1 ml	on ice
Eco RI Rxn Buffer (F)	100 µl	on ice
Lambda DNA (H)	100 µl	on ice
10x Gel Load	100 µl	
Marker	45 µl	

Tabla 6: Reactivos para la incubación del ADN de *EcoRI* con Lambda.

PUNTO DE PARADA OPCIONAL

Si por motivos de tiempo no es posible continuar con electroforesis en gel de agarosa en este momento, se pueden congelar las fracciones a -20°C y efectuar la electroforesis en una fecha posterior. Descongelar las fracciones a temperatura ambiente y calentar las muestras a 65°C antes de cargar el gel.

Requisitos para el gel de agarosa del primer ensayo

- Tamaño de gel recomendado: 7 x 14 cm.
- Número de pocillos de muestra requerido: 10.
- Concentración en gel de agarosa: 0,8%.

La preparación del gel de agarosa

1. Cierre de los extremos abiertos de una bandeja para el gel que esté limpia y seca (bandeja de gel) mediante el uso de unos topes de goma o cinta.
2. Coloque bien un peine (plantilla) con la primera serie de muescas para pocillos en el extremo de la bandeja para el gel. Asegurarse que el peine se asienta firme y uniformemente a través de la bandeja.
3. En un matraz o vaso de precipitación de 250 ml, añadir el polvo de agarosa y el volumen de tampón como se indica en las Tablas de Referencia (Apéndice A) proporcionadas por profesor de prácticas. Agitar la mezcla para dispersar los grumos del polvo de agarosa.
4. Con un marcador, indicar el nivel del volumen de la solución en el exterior del matraz o vaso.

5. Calentar la mezcla usando un microondas o quemador para disolver el polvo de agarosa.

6. Enfriar con cuidado la solución de agarosa a 60°C con agitación para facilitar la disipación rápida del calor. Si se ha producido una evaporación detectable, añadir agua destilada para llevar la solución hasta el volumen original marcado en el paso 4.

Después de enfriar el gel a 60°C

7. Colocar la bandeja para el gel en una superficie plana y verter la solución de agarosa enfriada en la bandeja.

8. Dejar que el gel se solidifique por completo. El gel debe estar firme y frío al tacto después de aproximadamente 20 minutos.

9. Después que se solidifique el gel, retirar los topes de goma o cinta y el peine(s) de la bandeja con cuidado de no dañar o romper los pocillos.

10. Colocar el gel (en su bandeja) en el interior de la cámara de electroforesis, orientada adecuadamente, centrada y nivelada en el interior de la cámara.

11. Llenar la cámara de electroforesis con la cantidad apropiada tampón de electroforesis diluido (1x) (consulte la **Tabla 1.3** en el **ANEXO 1**).

NOTA: Se debe calentar hasta que la solución final parece transparente (como el agua), sin ninguna partícula sin disolver. Compruebe la solución cuidadosamente. Si ve partículas de "cristal" en suspensión, la agarosa no está disuelta por completo.

Cargar las muestras

Este experimento está diseñado para la tinción con bromuro de etidio InstaStain®. La cantidad de muestra que se debe ser cargar es de 18-20 µl. Asegurarse que el gel está completamente sumergido bajo el tampón de electroforesis antes de cargar las muestras y de iniciar la electroforesis.

Recordatorio:

Antes de cargar las muestras, asegurarse que el gel está orientado correctamente en la cámara de electroforesis.

Pocillo	Tubo	
1	Marcador	Marcador Lambda Eco RI
2	1	ADN Lambda sin cortar
3	2	Lambda + 2 (sin sal)
4	3	Lambda + 3 (sin sal)
5	4	Lambda + 4 (0,1 M KCl)
6	5	Lambda + 5 (0,1 M KCl)
7	6	Lambda + 6 (0,2 M KCl)
8	7	Lambda + 7 (0,2 M KCl)
9	8	Lambda + 8 (0,5 M KCl)
10	9	Lambda + 9 (0,5 M KCl)

La electroforesis del gel

1. Después que las muestras de ADN se cargan, orientar adecuadamente la tapa de la cámara y conectar con cuidado en los terminales de los electrodos.

2. Insertar los enchufes de los cables rojo y negro en las correspondientes entradas de la fuente de alimentación.
3. Ajustar la fuente de alimentación al voltaje requerido y realizar la electroforesis durante el tiempo determinado por su profesor de prácticas.
4. Comprobar que la corriente es va en la dirección correcta, se deben ver las burbujas que se forman en los dos electrodos de platino.
5. Una vez completada la electroforesis, desconectar la alimentación y quitar el gel de la cámara para realizar la tinción.

NOTA: La electroforesis, en condiciones óptimas, se puede completar en 15-20 minutos. Para recomendaciones de tiempo y de tensión, consultar la **Tabla 1**.

Tinción y visualización del ADN

Después de la electroforesis, los geles de agarosa requieren de una tinción para visualizar las muestras de ADN separadas. El profesor de prácticas dará las instrucciones para la tinción del ADN con InstaStain[®] bromuro de etidio.

Cuantificación de la actividad *Eco RI* (segundo ensayo)

Las unidades de actividad enzimática se definen por convenio. Una unidad de enzima de restricción se define como la cantidad de actividad de la enzima que va a digerir 1 µg de ADN de lambda a 37°C en una hora bajo las condiciones de ensayo definidas. Para determinar el total de unidades de *Eco RI* purificadas en esta práctica, analizar el conjunto ("pool") de las fracciones de la enzima en diversas diluciones de la enzima para determinar la cantidad mínima de enzima que produce la digestión completa de 1 µg de ADN lambda.

1. Juntar las fracciones de enzimas que tienen actividad de *Eco RI*, según el criterio del primer ensayo. Si una fracción tiene sólo un rastro de la actividad no juntarlo con el resto, ya que va a diluir la enzima dando como resultado una pérdida de actividad.
2. Medir y registrar el volumen del conjunto de las fracciones ("pool") de *Eco RI*.
3. Mezclar suavemente el "pool" de las fracciones para obtener una muestra representativa para realizar el ensayo.

Dilución del pool <i>EcoRI</i>			
Pooled Enzyme (µl)	Dilution Buffer (µl)	Total Volume (µl)	Dilution Factor
10	0	10	0
5	5	10	1:2
10	20	30	1:3
10	30	40	1:4
10	90	100	1:10
5	95	100	1:20

4. Diluir el "pool" de fracciones del enzima *Eco RI* con tampón de dilución *Eco RI*, utilizando los factores de dilución que se indican en la **Tabla 7**.

Tabla 7: Dilución del pool *Eco RI*.

5. Preparar cada dilución de *Eco RI* (de la **Tabla 7**) para la incubación como se indica en la **Tabla 8**. Utilizar los reactivos restantes del primer ensayo que se encuentran almacenados en la nevera.

Ensayo para determinar las unidades totales de <i>EcoRI</i>							
Rxn Tube	Qualified Water (µl)	<i>Eco RI</i> Reaction Buffer (µl)	Lambda DNA (µl)	<i>Eco RI</i> Dilution (from Table 4)	Reaction Volume (µl)	37°C Incubation (minutes)	10x Gel Load [†] (µl)
1	40	5	5	None	50	30	5
2	30	5	5	10 µl of 0	50	30	5
3	30	5	5	10 µl of 1:2	50	30	5
4	30	5	5	10 µl of 1:3	50	30	5
5	30	5	5	10 µl of 1:4	50	30	5
6	30	5	5	10 µl of 1:10	50	30	5
7	30	5	5	10 µl of 1:20	50	30	5

Tabla 8: Ensayo para determinar las unidades totales de *Eco RI*.

*Se añade después de la incubación a 37°C.

6. Después de completar las incubaciones como se indica en la **Tabla 8**, añadir tampón de carga 10x a cada tubo para detener las reacciones.

7. Separar los productos de la digestión con *Eco RI* mediante electroforesis en gel de agarosa.

NOTA: Almacenar todas las fracciones en hielo.

NOTA: Marcar las fracciones de acuerdo con los factores de dilución. Se pueden utilizar 10 µl de cada dilución como se indica en la **Tabla 8**.

Requisitos para el gel de agarosa del segundo ensayo

- Tamaño de gel recomendado: 7 x 14 cm.
- Número de pocillos de muestra requerido: 8.
- Concentración en gel de agarosa: 0,8%.

1. Preparar un gel de agarosa al 0,8% para el segundo ensayo de acuerdo con las instrucciones descritas anteriormente (**apartado**).

2. Cargar 20 µl de cada muestra de ADN de la siguiente manera:

Pocillo	Tubo	
1	Marcador	Marcador Lambda <i>Eco RI</i>
2	1	ADN Lambda sin cortar
3	2	Lambda <i>Eco RI</i> sin diluir
4	3	Lambda + 1:2 dilución
5	4	Lambda + 1:3 Dilución
6	5	Lambda + 1:4 Dilución
7	6	Lambda + 1:10 Dilución
8	7	Lambda + 1:20 dilución

3. Después de cargar las muestras, realizar la electroforesis y teñir el gel con bromuro de etidio InstaStain® para la visualización.

4. Examinar el gel o tomar una fotografía para determinar cuál de los carriles da una digestión completa, se determina de la siguiente manera:

- Es visible el ADN lambda sin digerir o parcialmente digerido.
- Son visibles todos los productos de la digestión del ADN (5 bandas).

Determinación de la actividad en Unidades

Unidad de la enzima de restricción = cantidad de actividad enzimática que digiere 1 µg de ADN lambda a 37°C en una hora.

Determinación de la actividad total

Las unidades totales (unidades) es la cantidad de actividad de la enzima recuperada de la preparación. No indica el nivel de pureza de la enzima.

Ejemplo para determinar las unidades totales

Pooled volume is 9 ml = 9000 µl
Eco RI volume for assay = 10 µl
Dilution factor = 4

$$\frac{9000 \mu\text{l}}{10 \mu\text{l}} \times 4 = 3600 \text{ units}$$

for a 30 minute digestion

Conversion for a 1 hour digestion assay:
Total Activity units = 3600 units X 2 = 7200

Figura 2: Para la determinación de las unidades totales.

Determinación de la actividad específicos (opcional)

La actividad específica se define como el número de unidades enzimáticas por mg de proteína total en la fracción de la enzima. Conforme menor es la proteína total contenida en la fracción *Eco RI*, más alta es su actividad específica.

- Para este experimento hemos equiparado 1,0 unidad de absorbancia a A_{280} . En 9 ml, la cantidad de proteína es de 0,2 mg/ml x 9 ml = 1,8 mg.

Ejemplo para determinar la actividad específica

Total units: 7200 units for the total volume of 9 ml
Total mg. of protein - 1.8 mg

$$\text{Specific Activity} = \frac{7200 \text{ units}}{1.8 \text{ mg}} = 4,000 \text{ units/mg}$$

Figura 3: Para determinar la actividad específica

6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

6.1 Resultados

Purificación parcial de EcoRI (primer ensayo)

La **figura 4** muestra el esquema idealizado de las posiciones relativas de los fragmentos de ADN pero no se representan a escala. El esquema representa un resultado idealizado del gel para la identificación de fracciones de la columna con la actividad de Eco RI.

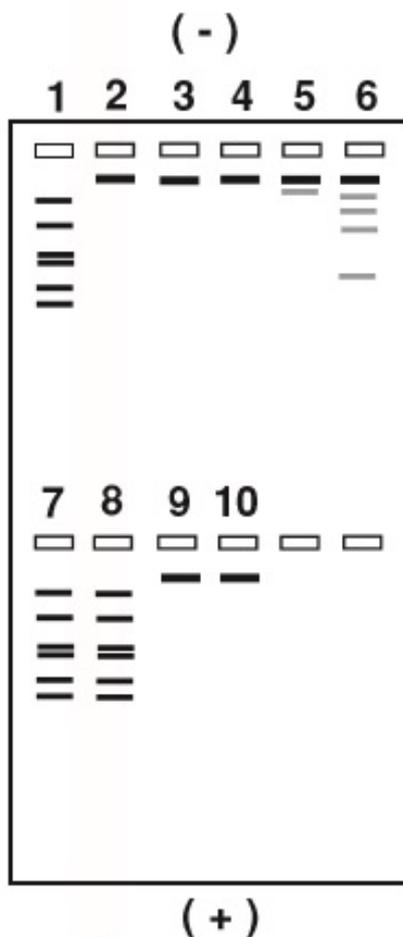


Figura 4: Esquema idealizado de los resultados.

Pocillo	Tubo	
1	Marcador	Marcador Lambda Eco RI
2	1	ADN Lambda sin cortar
3	2	Lambda + 2 (sin sal)
4	3	Lambda + 3 (sin sal)
5	4	Lambda + 4 (0,1 M KCl)
6	5	Lambda + 5 (0,1 M KCl)
7	6	Lambda + 6 (0,2 M KCl)
8	7	Lambda + 7 (0,2 M KCl)
9	8	Lambda + 8 (0,5 M KCl)
10	9	Lambda + 9 (0,5 M KCl)

*Los resultados pueden variar entre los diferentes grupos y del esquema representado en la **figura 4**. Algunas bandas pueden ser sutiles y por lo tanto difíciles de ver. También se puede ver bandas adicionales debido a la digestión parcial del ADN. La cantidad de actividad también puede variar.

Los resultados del segundo ensayo mostrarán resultados variables dependiendo de la cantidad de actividad enzimática purificada.

6.2 Preguntas

Responder a las siguientes preguntas en la libreta de prácticas:

- 1. ¿Cuál es la secuencia de reconocimiento para *Eco RI*?**
- 2. ¿Cómo se protege el ADN del huésped *E. coli* contra la acción de la endonucleasa *Eco RI*?**
- 3. ¿Cuántos sitios *Eco RI* hay en el ADN lambda?**
- 4. ¿Cuál es la diferencia entre la actividad total frente a la actividad específica?**

ANEXO 1

Tablas de referencia para la preparación del gel de agarosa 0,8% para la tinción del ADN con bromuro de etidio InstaStain®

Si se prepara el gel con tampón concentrado (50x), utilizar la **Tabla 1.1**.

Tabla 1.1

Tabla 1.1 Individual 0.8%* UltraSpec-Agarose™ Gel DNA Staining with InstaStain® EtBr				
Size of Gel (cm)	Amt of Agarose (g)	Concentrated Buffer (50X) (ml)	Distilled Water (ml)	Total Volume (ml)
7 × 7	0.2	0.5	24.5	25
7 × 14	0.4	1.0	49.0	50

* 0.77 UltraSpec-Agarose™ gel percentage rounded up to 0.8%

Si se prepara el gel con tampón diluido (1x), utilizar la **Tabla 1.2**.

Tabla 1.2

Tabla 1.2 Individual 0.8%* UltraSpec-Agarose™ Gel DNA Staining with InstaStain® Ethidium Bromide		
Size of Gel (cm)	Amt of Agarose (g)	Diluted Buffer (1x) (ml)
7 × 7	0.2	25
7 × 14	0.4	50

Para el análisis de ADN, el tampón de electroforesis recomendada es Tris-acetato-EDTA, pH 7,8. La fórmula para diluir tampón concentrado (50x) es un volumen de tampón concentrado por cada 49 volúmenes de agua destilada. Preparar tampón que sea necesario para su equipo de electroforesis.

Tabla 1.3

Tabla 1.3 Electrophoresis (Chamber) Buffer			
EDVOTEK Model #	Total Volume Required (ml)	Dilution 50x Conc. Buffer (ml) + Distilled Water (ml)	
M6+	300	6	294
M12	400	8	392
M36 (blue)	500	10	490
M36 (clear)	1000	20	980

Las recomendaciones de tiempo y voltaje para los equipos EDVOTEK se resumen en la **Tabla 1**. El tiempo aproximado para la electroforesis variará entre 15 minutos y 2 horas, dependiendo de varios factores. El profesor de prácticas indicará el tiempo de duración de la electroforesis.

ANEXO 2

Tablas de referencia de las cantidades para la preparación del gel de agarosa 0,8%

Para ahorrar tiempo, el tampón de electroforesis y la solución del gel de agarosa se pueden preparar en grandes cantidades para compartir por toda la clase. El tampón diluido no utilizado se puede utilizar en un momento posterior y el gel de agarosa solidificado puede fundirse.

Bulk del tampón de electroforesis

Las cantidades ("bulk") para preparar 3 litros de tampón de electroforesis 1x se resume en la **Tabla 2.1**.

Tabla 2.1 Bulk Preparation of Electrophoresis Buffer			
Concentrated Buffer (50x) (ml)	+	Distilled Water (ml)	= Total Volume (ml)
60		2,940	3000 (3 L)

Tabla 2.1

Preparación de un lote de geles de agarosa (0,8%)

Las cantidades para la preparación (por lotes) de geles de agarosa 0,8%, véase la **Tabla 2.2**.

Tabla 2.2 Batch Preparation of 0.8%* UltraSpec-Agarose™					
Amt of Agarose (g)	+	Concentrated Buffer (50x) (ml)	+	Distilled Water (ml)	= Total Volume (ml)
3.0		7.5		382.5	390

*0.77% UltraSpec-Agarose™ gel percentage rounded up to 0.8%

Tabla 2.2

1. Utilice un matraz o vaso de precipitados de 500 ml para preparar el tampón de gel diluido.
2. Verter 3,0 gramos de UltraSpec-agarosa™ en el tampón preparado. Agitar para dispersar los grumos.
3. Con un marcador, indicar el nivel de volumen de la solución en el matraz o vaso.

4. Calentar la solución de agarosa como se describe anteriormente para la preparación de un gel individual. El tiempo de calentamiento requerirá un ajuste debido a que el volumen total de la solución tampón de gel es más grande.
5. Enfriar la solución de agarosa a 60°C con agitación para facilitar la disipación del calor. Si la evaporación es elevada, añadir agua destilada para llevar la solución hasta el volumen original marcado en el matraz en el paso 3.
6. Dispensar el volumen de solución de agarosa enfriada necesaria para realizar cada gel. El volumen requerido depende del tamaño del gel.
7. Dejar que el gel se solidifique por completo. Se vuelve duro y frío al tacto en aproximadamente 20 minutos. A continuación, proceder con la preparación del gel para electroforesis.

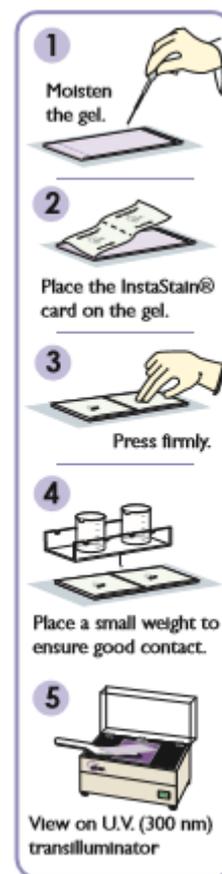
Nota: El componente del kit UltraSpec-agarosa™ es a menudo marcado con la cantidad que contiene. En muchos casos, todo el contenido del envase es de 3,0 gramos. Por favor, lea cuidadosamente la etiqueta. Si no se especifica la cantidad de agarosa o si el sello de plástico del envase se ha roto, pesar la agarosa para asegurarse de que se está utilizando la cantidad correcta.

ANEXO 3

Tinción y visualización del ADN

Tarjetas Instastain[®] bromuro de etidio.

1. Después de la electroforesis, colocar el gel en un pedazo de plástico sobre una superficie plana. Humedecer el gel con unas gotas de tampón de electroforesis.
2. Usando guantes de protección, quitar la lámina protectora de plástico transparente, y colocar la cara no impresa de la tarjeta InstaStain[®] EtBr sobre el gel.
3. Pasar los dedos, firmemente, por toda la superficie de la tarjeta InstaStain[®] EtBr. Hacer esto varias veces.
4. Colocar la bandeja del gel y un pequeño vaso vacío en la parte superior para asegurar que la tarjeta InstaStain[®] se mantiene un contacto directo con la superficie del gel. Mantener la tarjeta InstaStain[®] EtBr sobre el gel durante 10-15 minutos.
5. Después de 10-15 minutos, retirar la tarjeta InstaStain[®] EtBr. Transferir el gel a un transiluminador ultravioleta (300 nm) para su visualización. Asegurarse de usar gafas de protección UV.



Precaución: El bromuro de etidio es muy mutagénico.

Eliminación de InstaStain[®]

La eliminación de las tarjetas y los geles InstaStain[®] debe seguir las normas de eliminación para los residuos químicos.

Notas adicionales sobre la tinción

- Si aparecen bandas débiles, o si no está utilizando EDVOTEK UltraSpec-agarosa[™], los geles pueden necesitar más tiempo para teñirse con InstaStain[®] EtBr. En caso necesario, repetir la tinción y aumentar el tiempo de tinción otros 10-15 minutos.
- Los geles teñidos con InstaStain[®] azul de metileno o azul de metileno líquido pueden perder la tinción con el tiempo. Volver a teñir el gel para visualizar las bandas de ADN.
- Los marcadores de ADN de 200 pb deben ser visibles después de la tinción incluso si las muestras de ADN amplificadas son débiles o inexistentes. Si los marcadores no son visibles, deben existir problemas con la separación durante la electroforesis.

NOTA No utilizar el aparato de electroforesis para la tinción de los geles.