

Biología molecular

Objetivos

Al finalizar este laboratorio el estudiante podrá:

1. Conocer los principios básicos de la técnica de electroforesis y su aplicación al análisis del ADN.
2. Describir las funciones de las enzimas de restricción.
3. Conocer cómo las enzimas de restricción cortan el ADN.
4. Realizar una electroforesis para separar los fragmentos de ADN.
5. Observar el ADN cortado con diferentes enzimas de restricción.

INTRODUCCIÓN

La biología molecular sirve como herramienta potente para estudiar las relaciones evolutivas entre los organismos de la tierra. Además, tiene muchas aplicaciones en varios campos como la medicina y la agricultura.

El cortar el ADN con **enzimas de restricción** es frecuentemente el primer paso de los investigadores para estudiar un gen. Estas enzimas, o **endonucleasas**, se extraen de organismos procarióticos (las bacterias), donde actúan como un mecanismo de defensa para degradar material genético extraño que entre a la célula.

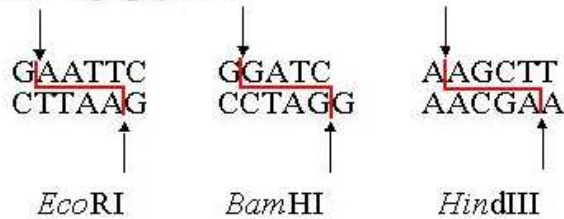
Las enzimas de restricción (o endonucleasas) *cortan o digieren* el material genético a partir de una secuencia que reconocen. La mayoría de estas secuencias son **palindrómicas** (secuencias que se leen igual en ambas direcciones). Las endonucleasas se nombran a partir de las bacterias de las que son extraídas. Su nombre está dado según el género y la especie de la bacteria de donde se aisló por primera vez esta enzima. La primera letra representa el género de la bacteria, las próximas dos indican la especie, la cuarta letra indica la cepa, y el número al final indica la cantidad de enzimas que se han aislado de esa cepa, por ejemplo:

Comment [B1]: Un ejemplo de una palabra palindrómica es "radar". ¿Puede pensar en otros ejemplos?

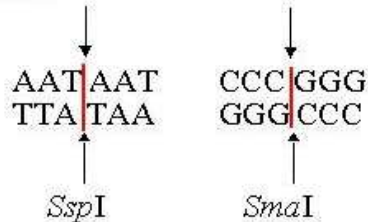
EcoRI → **E** = género *Escherichia*
co = especie *coli*
R = cepa RV 13
I = primera endonucleasa aislada de esta cepa

Al cortar el ADN, las enzimas de restricción pueden producir dos tipos de cortes: los **cohesivos** (o pegajosos) y los **abruptos**. Los cortes cohesivos o pegajosos cortan a manera escalonada, mientras que los cortes abruptos cortan a las dos cadenas del ADN en el mismo lugar.

Cohesivos o pegajosos:



Abruptos:



Luego de cortar al ADN con las enzimas de restricción, el ADN se puede usar para varias aplicaciones, tales como:

- Separación de fragmentos por electroforesis.
- Generación de fragmentos para ser subclonados en los vectores apropiados, creando un ADN recombinante.
- Hacer mapa de restricción de un **plásmido** o **bacteriófago**.

Nota: Un **plásmido** es una molécula circular de ADN que se encuentra en bacterias y levaduras, y constituye una gran parte del material genético de este organismo. Un **bacteriófago** es un virus que infecta bacterias.

Varios factores son críticos al trabajar con enzimas de restricción y estos pueden afectar la actividad de las mismas:

1. **Pureza del ADN.** El corte de la enzima de restricción depende de la pureza del ADN. Contaminantes como proteínas, fenol, cloroformo, etanol y altas concentraciones de sal inhiben la endonucleasa.
2. **Temperatura y pH.**
3. **Tipo de molécula de ADN.** Si el ADN no posee una secuencia reconocida por la enzima de restricción, esta enzima no podrá cortar el material genético.
4. **Amortiguador (*buffer*) adecuado.** Un amortiguador o *buffer* provee el ambiente necesario para que la enzima trabaje en condiciones óptimas.

PRINCIPIOS DE ELECTROFORESIS

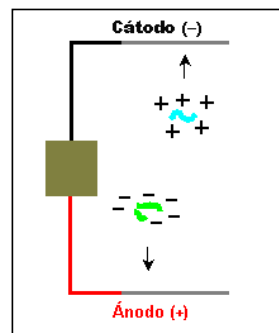
Son varias las técnicas para estudiar la estructura del **ADN** (ácido desoxirribonucleico), pero la **electroforesis** es posiblemente la más usada en el laboratorio debido a que es una técnica efectiva, bastante fácil de hacer y relativamente económica. Con esta técnica se separan macromoléculas (ej. proteínas y ácidos nucleicos) a través de un flujo de corriente eléctrica.

Los fragmentos de una molécula de ADN cortada con enzimas de restricción se separan a través de la electroforesis de acuerdo a las siguientes características:

- El tamaño de la molécula o masa.
- La forma o conformación del ADN (ej. ADN súper-enrollado vs. ADN lineal).
- El tamaño de los poros del gel.
- La magnitud de la carga neta de la molécula.

Figura 12.1

Bajo condiciones fisiológicas, los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos son ionizados y migran al electrodo positivo (**ánodo**) cuando se colocan en presencia de un campo eléctrico. La carga neta del ADN es negativa (por la presencia de los grupos fosfatos), lo que permite que migre del electrodo negativo (**cátodo**) al electrodo positivo (ánodo).



Para llevar a cabo la electroforesis, se utiliza un **gel** que puede estar hecho de agarosa o poliacrilamida. La Tabla 12.1 muestra las características de ambos geles:

Tabla 12.1 Características de geles comúnmente usados en electroforesis.

AGAROSA	POLIACRILAMIDA
1. Polisacárido extraído de algas.	1. Los geles de poliacrilamida son generados al mezclarse polímeros de acrilamida y bisacrilamida.
2. No tóxico.	2. Tóxico.
3. Se puede variar el tamaño de los poros ajustando la concentración de agarosa.	3. El tamaño de los poros depende de la concentración de acrilamida y bisacrilamida.
4. Separa fragmentos de ADN de 200 a 50,000 pb.	4. Usado para fragmentos de ADN de menos de 500 pb.
	5. Usado para separar mezclas de proteínas.

En la Figura 12.2, observe un ejemplo de un aparato que se utiliza para la electroforesis de ADN. Este aparato consiste en la cámara (o el tanque) de electroforesis, una bandeja de gel, una peñilla, y una fuente de electricidad con electrodos (*power supply*).

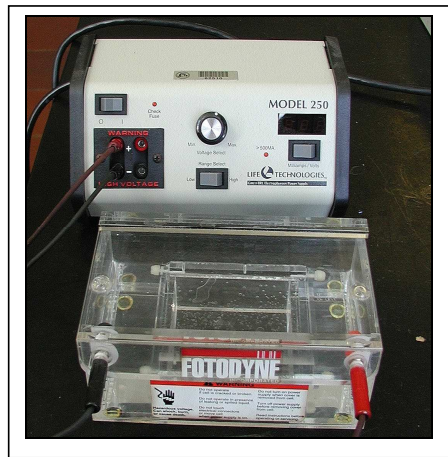


Figura 12.2

Ejemplo de un aparato de electroforesis.

Con la electroforesis, los fragmentos de ADN migrarán a una razón inversamente proporcional al logaritmo de su tamaño o peso molecular. A mayor tamaño, menor será la migración del fragmento y a menor tamaño, mayor será la migración del fragmento. El movimiento de los fragmentos de ADN va a producir un patrón de bandas, donde cada banda corresponde a un fragmento de un tamaño particular. El tamaño de cada fragmento puede ser determinado utilizando un marcador o una escalera de ADN cuyos fragmentos tienen pesos moleculares conocidos. El marcador sirve de control y migrará paralelo a las bandas de ADN que deseamos analizar.

EJERCICIO 12.1
DIGESTIÓN DE ADN

Las cantidades que manejará en éste y en el próximo ejercicio son muy representativas de lo diminutivo que es el mundo molecular. Así que antes de proceder a transferir las muestras a las fosas, practicará el manejo de los micropipeteadores y las micropipetas (instrumentos que se utilizan para cantidades minutas). Es esencial que practique esta técnica ya que un error tan pequeño como medio microlitro (μL) puede afectar y alterar grandemente los resultados.

A. Práctica de uso de micropipetas

MATERIALES

- Micropipeteadores, micropipetas y micropuntas (o puntas para las micropipetas)
- Plato Petri con gel solidificado o gel preparado para la práctica
- Mezcla de agua, glicerina y tinte azul para la práctica

PROCEDIMIENTO

1. Escoge un plato Petri ya preparado con gel solidificado; este gel ya debería tener unas fosas.
2. Escoge una micropipeta y apoye el brazo que esté agarrando la micropipeta en superficie firme.
3. Utilice la mano contraria para apoyar la micropipeta.
4. Con su micropipeta, obtenga un poco de la mezcla (de agua, glicerina y tinte azul).
5. Introduzca la punta de la micropipeta dentro de la fosa, sin tocar el gel (Figura 12.3).
6. Vierta el contenido en la fosa, presionando el botón de la pipeta hasta el primer punto de resistencia.
7. Practique este procedimiento varias veces.



¡ I M P O R T A N T E !

- *Al utilizar la micropipeta, siempre utilice una punta diferente para cada muestra para evitar contaminación.*



Figura 12.3

Practicando el uso de la micropipeta.

B. Preparación de las digestiones

En este ejercicio, se realizarán varias digestiones de ADN usando enzimas de restricción.

MATERIALES

- Agua destilada
- ADN
- Amortiguador (TBE 1X)
- 1 μL de enzima (*EcoRI*)
- 1 μL de enzima (*BamHI*)
- 1 μL de enzima (*HindIII*)
- Micropipeteadores, micropipetas y micropuntas
- Hielo o nevera
- Microtubos

PROCEDIMIENTO

1. Para preparar el ADN:

- a) Añada 100 μL de agua destilada a un microtubo con ADN y deje a temperatura ambiente por 5 minutos.
- b) Agítelo y manténgalo en hielo o en una nevera mientras se usa.

2. Para preparar las digestiones:

- a) Rotule 4 microtubos de 1-4:

- 1: para ADN con enzima de restricción *EcoRI*
- 2: para ADN con enzima de restricción *BamHI*
- 3: para ADN con enzima de restricción *HindIII*
- 4: para ADN sin cortar (sin enzima de restricción)

- b) A cada microtubo, añade agua destilada, el amortiguador y el ADN (en esta secuencia) con las cantidades señaladas en la Tabla 12.2.

Tabla 12.2 Preparaciones de muestras de ADN

	Tubo 1: <i>EcoRI</i>	Tubo 2: <i>BamHI</i>	Tubo 3: <i>HindIII</i>	Tubo 4: ADN sin cortar
Agua destilada	7 μL	7 μL	7 μL	8 μL
*Amortiguador	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
ADN	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
Enzima de restricción	1 μL	1 μL	1 μL	<i>No aplica</i>
Volumen total	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL

* En la mayoría de los casos, la enzima de restricción viene preparada con el amortiguador (buffer) que le corresponde.

- c) Añada cada enzima de restricción¹ (vea Tabla 12.2) a su respectivo microtubo (excepto al microtubo #4, ya que éste no lleva enzima) y agite los ingredientes para cada tubo con la punta de su respectiva micropipeta.

Nota: El volumen total para cada microtubo es 10 μ L.

- d) Incube cada mezcla a 37° C por una hora.

EJERCICIO 12.2 PREPARACIÓN DEL GEL PARA LA ELECTROFORESIS

A. Receta para preparar gel de agarosa

En este ejercicio aprenderá a preparar un gel de agarosa.

MATERIALES

- Agarosa
- 100 mL de TBE 1X (TBE = Tris base; ácido bórico, EDTA)
- Hornilla (*hot plate*)
- Guantes resistentes al calor
- Frasco Erlenmeyer de 250 mL
- Bandejas para el gel (*gel plates*)

PROCEDIMIENTO

1. Mientras que incuben las digestiones del ejercicio anterior, proceda a preparar su bandeja de electroforesis primero y luego el gel. *Nota:* Las bandejas que se usarán vienen con unos extremos que tienen “lados” que pueden subir para tapar esa sección y evitar que se pierda el gel. De no tener ese tipo de bandeja, hay que tapar los extremos con cinta adhesiva.
2. Coloque la peinilla en la bandeja de electroforesis. La bandeja tiene unas “guías” que indican donde colocar la peinilla. De no ser así, coloque la peinilla a 1 cm del borde.

¹ Una unidad de enzima de restricción se define como la cantidad de enzima que se necesita para cortar (o digerir) 1 μ g de ADN en una hora.

- Mezcle 1 g de agarosa con 100 mL de TBE 1X en un frasco Erlenmeyer **limpio** y caliéntelo en una hornilla (*hotplate*)² (Figura 12.4). Use guantes resistentes al calor.

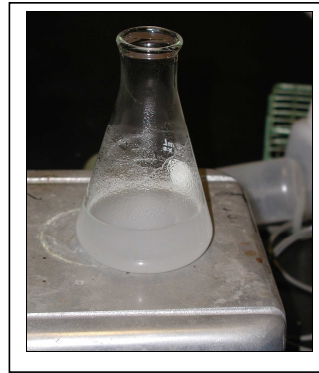


Figura 12.4

Calentando la mezcla de agarosa con el amortiguador (TBE 1X).

- Agite girando la mezcla de vez en cuando.
- Cuando empiece a burbujear, y aclare, agite constantemente hasta que hierva y se vean burbujas en la superficie.
- Asegúrese que toda la agarosa se ha disuelto.
- Remueva de la hornilla y deje enfriar hasta que lo pueda agarrar sin quemarse.
- Vierta la mezcla en la bandeja de electroforesis empezando en una esquina (Figura 12.5), y rompa las burbujas.
- Deje que se solidifique el gel (Figura 12.6), y coloque la bandeja en un lugar seguro para que no se contamine.

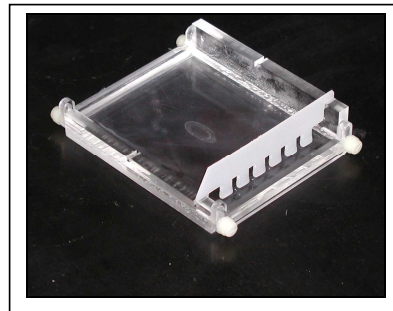
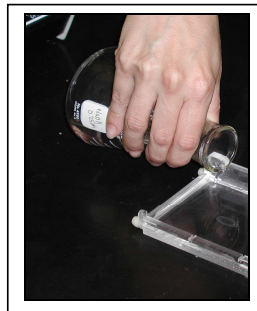
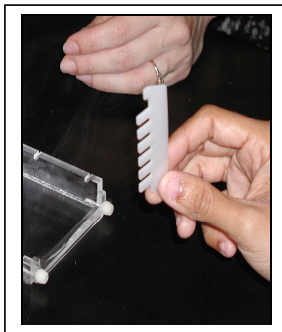


Figura 12.5

a) Coloque la peinilla en la bandeja, b) vierta con cuidado la mezcla en la bandeja y c) deje que se tome opaco y sólido.

² También se puede utilizar una microonda para calentar esta mezcla.

Para preparar 100 mL TBE 1X

Si se usa TBE 20X:

- En una probeta vierta 5 mL de TBE 20X y añada agua destilada hasta llegar a 100 mL.

Si se usa TBE 10X:

- En una probeta vierta 10 mL de TBE 10X y añada agua destilada hasta llegar a 100 mL.

EJERCICIO 12.3

CORRIDA DEL GEL DE ELECTROFORESIS

MATERIALES

- Aparato de electroforesis
- Fuente de energía (*power supply*)
- Micropipetas y micropuntas
- Muestras de ADN (Microtubos 1-4 del Ejercicio 12.1 b)
- TBE 1X
- Bandejas de gel preparadas
- Tinte (*loading dye*)

PROCEDIMIENTO

1. A cada microtubo incubado (del Ejercicio 12.1 b), añada 2 μL de tinte (*loading dye*). El volumen total de cada uno es ahora 12 μL .

Nota: El tinte (*loading dye*) que se utiliza contiene bromofenol azul y glicerol. El bromofenol azul es un tinte que se usa para observar en la corrida por donde va el ADN, y el glicerol le da peso a la muestra evitando así que ésta se salga de la fosa.

2. Con el gel ya solidificado (Figura 12.5), ponga la bandeja en la cámara de manera que las fosas queden en el lado negativo (cátodo). Esto asegura que las muestras migren del cátodo (atrae cargas $-$) hacia el ánodo (atrae cargas $+$).
3. Añada suficiente TBE 1X hasta que se cubra el gel.
4. Espere un minuto en lo que el amortiguador entra a las fosas y luego remueva *con cuidado* la peñilla del gel. *Nota:* Aunque el número de fosas creadas por la peñilla puede variar, para este ejercicio, se utilizará solamente las primeras cinco fosas.
5. Utilizando una micropipeta, cuidadosamente coloque 12 μL del tinte (*loading dye*) en la primera fosa. Para las demás muestras, coloque 12 μL en las fosas correspondientes según la

Figura 12.7. Recuerde que para cada solución o muestra, utilice una punta diferente para evitar contaminación.

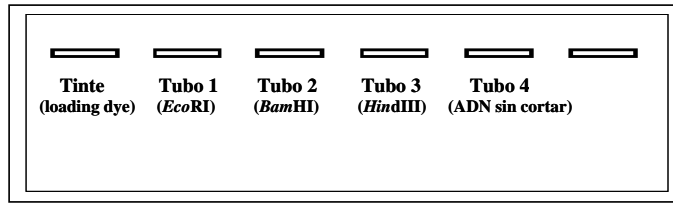


Figura 12.7

Las muestras correspondientes a cada fosa en el gel.

¿Cuál de las muestras en la Fig. 12.7 representa el grupo control, y porqué es importante incluirlo en este experimento?

6. Coloque la tapa sin mover la cámara (el tanque) de electroforesis.
7. Se sugiere colocar un papel oscuro debajo de la cámara antes de servir las muestras. Esto le ayudará a percatarse por dónde están migrando las bandas.

8. *Para correr el gel.*

- a) Conecte la cámara a una fuente de energía (*power supply*) y encienda el aparato a una razón de 10V por cada cm del gel (se correrá a aproximadamente 80 voltios).
- b) Asegúrese que el aparato esté leyendo en voltímetros y NO en miliamperios.
- c) Verifique que vea burbujas formándose en el amortiguador, y que NO se esté calentando.
- d) Verifique el voltaje para que no suba y ajuste de ser necesario.
- e) Deje migrar las muestras hasta que la línea del tinte se encuentre aproximadamente un centímetro y medio del extremo positivo.
- f) Apague el equipo.

Luego de que termina la electroforesis, el ADN se tiñe para revelar los patrones de bandas formados en el gel que corresponden a fragmentos de diferentes tamaños.

9. *Para teñir el gel.*

- a) Saque su gel y colóquelo en la bandeja de tinción.
- b) Cubra el gel con tinte (*loading dye*) (Figura 12.8 a).
- c) Deje por media hora, y agite de vez en cuando.
- e) Saque el gel usando guantes desechables (para no teñir sus manos) y colóquelo en agua para lavar hasta que destiña bastante. NO BOTE EL TINTE. El mismo se reusará.
- f) Saque el gel y colóquelo en el iluminador (Figura 12.8 b).
- g) Observe su gel y prepare un diagrama de lo que se observa, señalando las distintas bandas (Figura 12.9).
- h) Descarte el gel en el recipiente correspondiente.

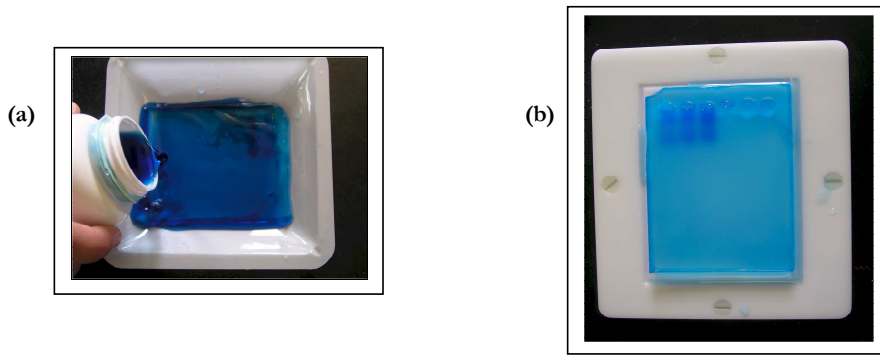


Figura 12.8

a) Cubriendo el gel con tinte. b) Colocando el gel en el iluminador.

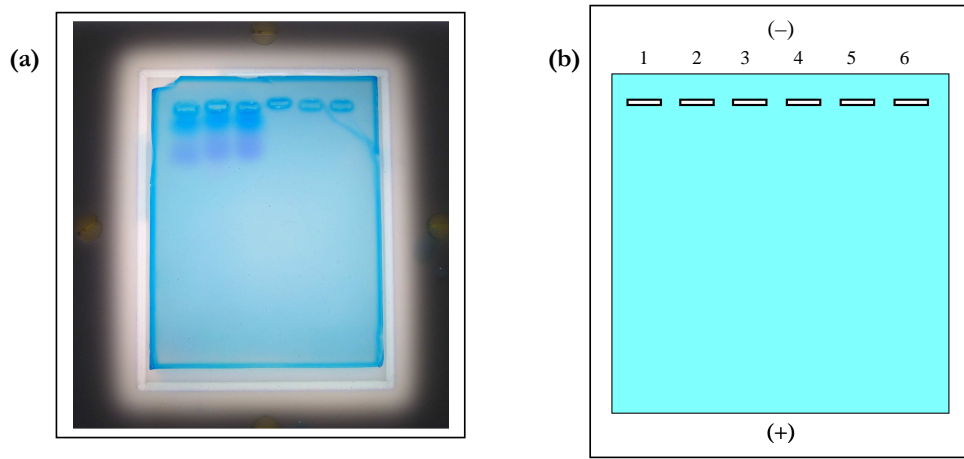


Figura 12.9

a) Ejemplo de un gel iluminado. b) Dibuje las bandas que se observan en su gel en esta figura.

¿Cuántos cortes o fragmentos fueron producidos por cada enzima de restricción? Compare sus resultados con información que encuentra en la Internet. Por ejemplo, ¿cuántos fragmentos normalmente se producen por cada enzima de restricción?

INFORMACIÓN ADICIONAL

<http://highveld.com/f/protocols.html>

<http://linkage.rockefeller.edu/outside/list.html>

Comment [B2]: La *catalasa* se encuentra en casi todas las células aeróbicas, donde acelera el rompimiento de peróxido de hidrógeno (producto tóxico de las células). A veces, la reducción de oxígeno al agua es incompleta y se produce “superóxido”, una sustancia sumamente tóxica. Una enzima rompe el “superóxido” y forma agua y peróxido de hidrógeno, que es menos tóxico. La catalasa entonces rompe el peróxido de hidrógeno para producir agua y oxígeno.

LABORATORIO 12: BIOLOGÍA MOLECULAR

PLAN DE ENSEÑANZA PARA LOS INSTRUCTORES

Destrezas que el estudiante adquirirá a partir de este laboratorio:

1. Tendrá conocimiento de la tecnología actual y podrá describir el equipo y procedimiento para realizar una electroforesis de ADN.
2. Cortará el ADN con enzimas de restricción.
3. Comparará el patrón de bandas al cortar ADN con distintas enzimas de restricción.
4. Distinguirá entre ADN que ha sido o no cortado con enzimas de restricción.

Manejo del laboratorio:

- Previo al laboratorio se debe pesar la agarosa y tenerla separada para cada sección.
- Antes del laboratorio cotejen que el laboratorio tenga agua destilada y hielo. Es buena idea poner los microtubos con las restricciones y el ADN en hielo, en lo que se trabaja.
- Separen en bandejas los microtubulos con los colores diferentes que corresponden a las enzimas de restricción. Hay dos bandejas por color y un microtúbulo para cada sección.
- Aseguren que los estudiantes trabajen con cuidado para evitar contaminación de muestras.
- Aseguren que los estudiantes optimicen el tiempo:
 - Deberían practicar el pipetear primero y luego, preparar las restricciones.
 - En lo que están listas las restricciones, los estudiantes deberían preparar lo que haga falta.
 - En lo que se realiza la electroforesis, los estudiantes deberían lavar, limpiar y recoger.
- REUSEN el tinte.
- REUSEN los platos Petri para practicar el pipetear.
- En otra bandeja está el ADN y el tinte (*loading dye*). Por favor, aseguren que los estudiantes no malgasten ninguno de ellos.
- Dejen preparadas las cámaras de electroforesis, las bandejas para preparar el gel y los iluminadores.
- El TBE se debe diluir según las indicaciones (ver Ejercicio 12.1 b).
- Si sobra ADN y enzimas de restricción, identifíquelos y guárdelos en la nevera.
- REUSEN el amortiguador (*buffer*) de corrida.
- Aseguren que los estudiantes limpien y recojan todo bien.
- Recuerden a los estudiantes de la prueba corta de la próxima semana (si así lo decide el instructor).

Manejo del tiempo:

1. Prueba corta (si no se dió asignación).....(10 minutos)
2. Presentación de objetivos.....(5 minutos)
3. Ejercicio 12.1: Digestión de ADN
 - A. Práctica de uso de micropipetas 30 minutos
 - B. Preparación de digestión de ADN
(incubar por una hora)..... 40 minutos
4. Ejercicio 12.2: Preparación del gel para la electroforesis
 - A. Receta para el gel de agarosa 35 minutos
5. Ejercicio 12.3: Corrida del gel de electroforesis 45 minutos
5. Conclusiones del laboratorio..... .15 minutos

Give credit to the following people:

Se le agradece a Omayra Rivera Denizard e Idaris de Jesús Maldonado por revisar y proveer los protocolos de electroforesis.