

Técnicas de Biología
Molecular
Biol 3051L

Objetivos

El cortar el DNA con enzimas de restricción y hacer corridas de geles usando electroforesis es muchas veces el primer paso para estudiar un gen. En este laboratorio se hará lo siguiente:

- Exponer al estudiante a tecnología actual.
- Explicar cómo las enzimas de restricción cortan el ADN.
- Exponer a los estudiantes al uso de técnicas de separación de fragmentos de ADN mediante el uso de electroforesis.
- Familiarizarse con equipo usado en electroforesis.

Enzimas de restricción

- También conocidas como endonucleasas, cortan los enlaces fosfodiéster del material genético a partir de una secuencia que reconocen.
- Esto permite, entre otros usos, realizar modificaciones en la molécula de ADN, lo cual tiene muchas aplicaciones en la biotecnología.
- Uno de los usos es para crear ADN recombinante, por el cual se introduce el ADN de un organismo en el de otro organismo.
- Esto se puede usar para estudiar la expresión de un gen, para producir proteínas para tratamientos de enfermedades, vacunas, y con otros fines.
- Se ha usado, por ejemplo, para producir insulina.

Enzimas de restricción

- La secuencia que reconocen es una secuencia palindrómica (secuencia que se lee igual en ambas direcciones).
- Son extraídas de bacterias, donde actúan como mecanismo de defensa para degradar material genético extraño que entre en la célula.
- Las enzimas de restricción, como las que se van a usar en este laboratorio - *HindIII* y *EcoRI*, toman el nombre de las bacterias que la producen:
 - *EcoRI*: E = género *Escherichia*.
 - co = especie *coli*
 - R = cepa RV 13
 - I = primera endonucleasa aislada de esta cepa

Las enzimas de restricción al cortar ADN pueden producir dos tipos de cortes:

- Cohesivos o pegajosos: cortan a manera escalonada en dos puntos diferentes.



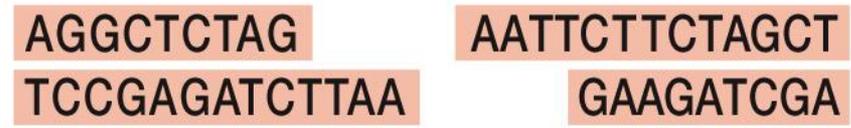
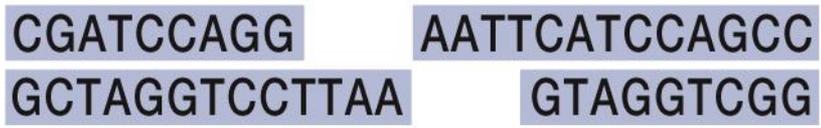
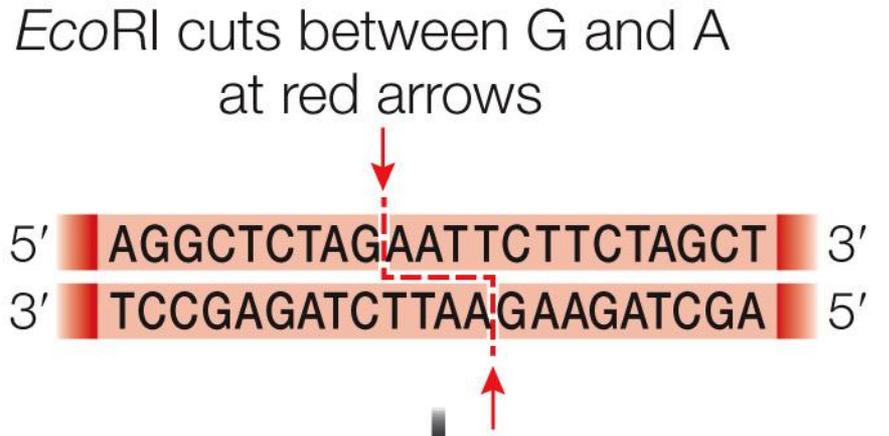
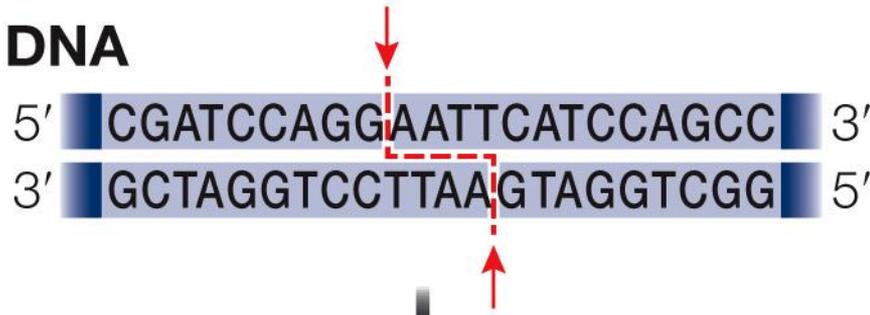
- Abruptos: cortan en un sólo punto.



ADN recombinante:

- Luego de cortar un gen se pueden insertar los pedazos en otro organismo para crear un ADN recombinante.
- La enzima ADN ligasa puede “pegar” los pedazos cohesivos de pedazos de ADN con secuencias complementarias para formar una sola molécula.
- Se han usado varios organismos para actuar como vectores para crear ADN recombinante.
- Lambda es un ejemplo de un bacteriófago usado ampliamente como vector para crear ADN recombinante por su tamaño relativamente manejable (48,502 pares de bases).

DNA



El ADN se puede manipular para beneficio humano

- Con la tecnología y técnicas de biología molecular se puede insertar genes en bacterias, levaduras, células de plantas, etc.
- Las células recombinantes se pueden usar para crear grandes cantidades del producto deseado y poder ser usados para distintos fines.
- Ejemplos de usos:
 - Organismos genéticamente modificados (GMO): alimentos, producción de semillas, insecticidas
 - Vacunas
 - Otros usos en el campo de la medicina

Courtesy of the Golden Rice Humanitarian Board, www.goldenrice.org



Wild-type rice

Golden rice 1

Golden rice 2

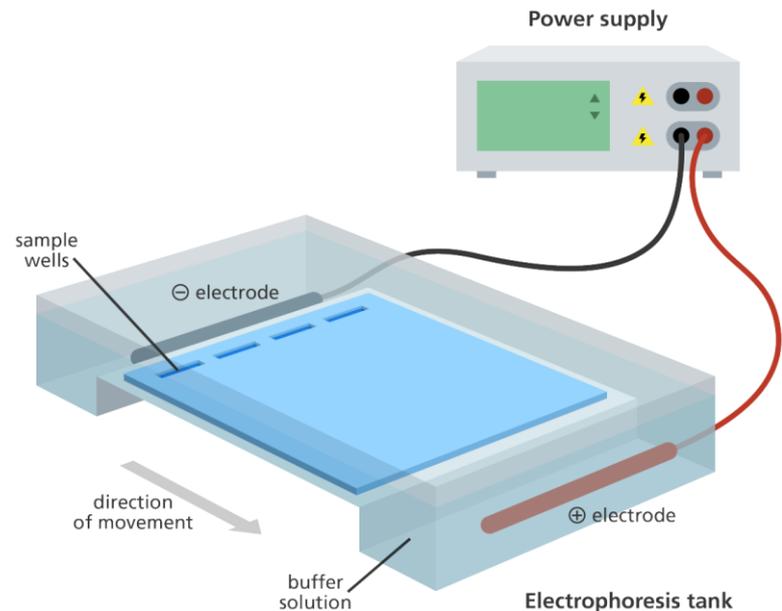
LIFE: THE SCIENCE OF BIOLOGY 11e, Figure 18.11
© 2017 Sinauer Associates, Inc.

Varias preocupaciones con la manipulación genética:

- Consideraciones éticas por mal uso o manejo.
- Preocupaciones ambientales de que organismos transgénicos afecten las poblaciones silvestres.
- Preocupaciones de efectos a corto y largo plazo de la manipulación de genes sobre los organismos a los que se le insertan genes.
- Preocupaciones sobre efectos de consumir alimentos genéticamente modificados.

Principios de electroforesis

- Técnica usada para separar y purificar macromoléculas (i.e. proteínas, ácidos nucleicos) que varían en tamaño, carga o conformación.
- Cuando moléculas cargadas son colocadas en un campo eléctrico, estas migran hacia el polo positivo (ánodo) o polo negativo (cátodo) de acuerdo a su carga.



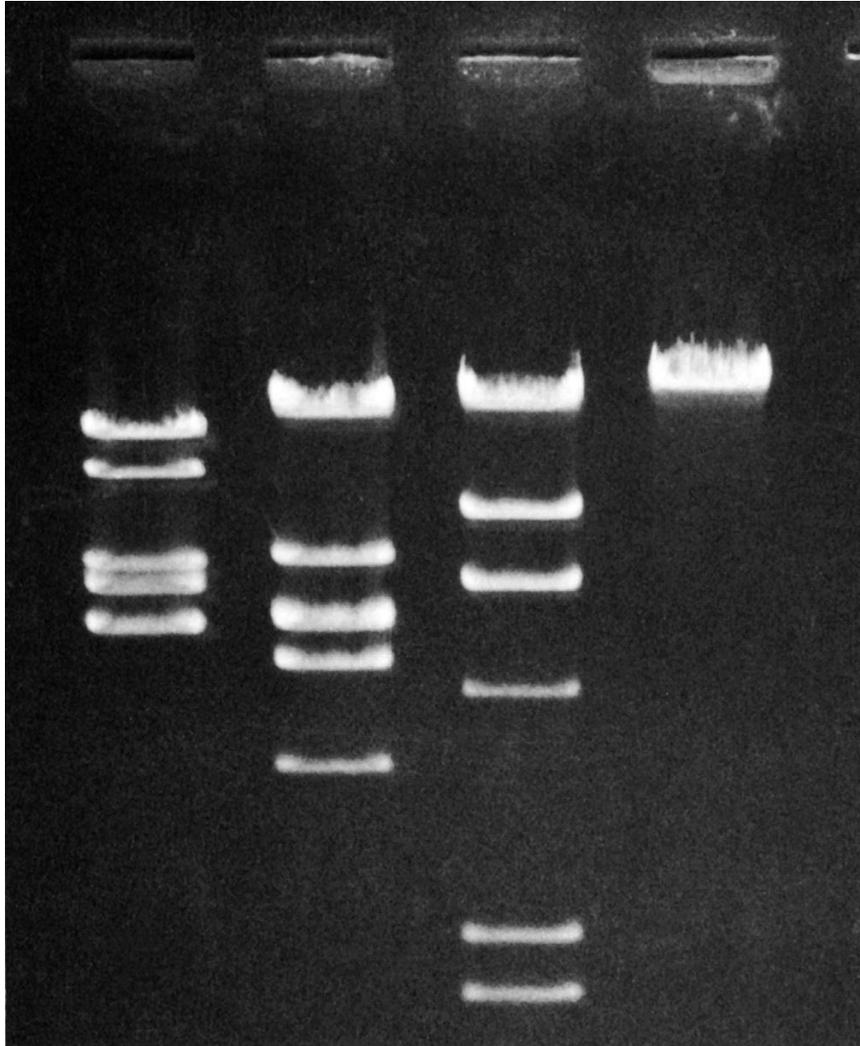
<https://www.yourgenome.org/facts/what-is-gel-electrophoresis>

Geles comúnmente usados:

- **Agarosa:** polisacárido extraído de algas. No tóxico. Poco poder de resolución pero alto grado de separación. Separa fragmentos de DNA de 200 a 50,000 pb.
- **Poliacrilamida:** polímero de acrilamida. Tóxico. Menor grado de separación pero alto poder de resolución. Usado para fragmentos de DNA de 500 pb. Usado para separar mezclas de proteínas.

Electroforesis:

- Después de cortar el ADN con las enzimas de restricción, los fragmentos son separados por su tamaño usando un gel de electroforesis.
- Luego de que la gel se “corre” el DNA se tiñe para revelar los patrones de bandas formados en el gel que corresponden a fragmentos de diferentes tamaños.



Gel luego de tinción de Lambda cortado con varias enzimas de restricción:

- Fosa 1: Lambda cortado con Bam H1
- Fosa 2: Lambda cortado con *EcoRI*
- Fosa 3: Lambda cortado con *HindIII*.
- Fosa 4: Lambda sin cortar.

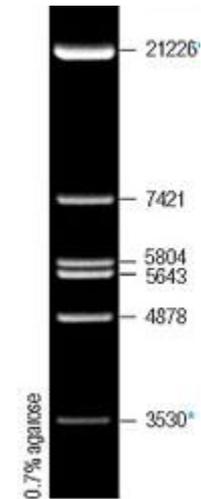
Fuente: Carolina Biological restriction enzyme dna kit.

Pedazos de ADN al cortar con enzimas de restriccion

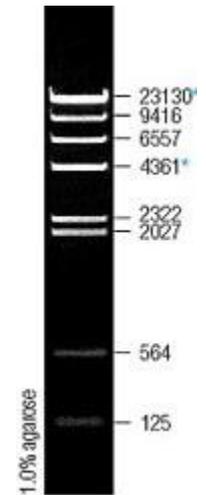
<i>Hind</i> III		<i>Eco</i> RI			<i>Bam</i> HI		
Dist.	Act. bp	Dist.	Cal. bp	Act. bp	Dist.	Cal. bp	Act. bp
	*27,491			*24,756			16,841
	*23,130			*21,226			12,275
	9,416			7,412			7,233
	6,557			*5,804			*6,770
	4,361			*5,643			*6,527
	2,322			4,878			*5,626
	2,027			3,530			*5,505
	**564						
	**125						

*Pair appears as single band.

**Does not appear on this gel.



Corte con
*Eco*RI



Corte con
*Hind*III

Práctica de uso de micropipetas:

- Apoye brazo que esté agarrando micropipeta en superficie firme.
- Utilice la mano contraria para apoyar la micropipeta
- Introduzca punta de micropipeta dentro de fosa, sin tocar el gel.
- Vierta el contenido en fosa, presionando botón de la pipeta hasta primer punto de resistencia.

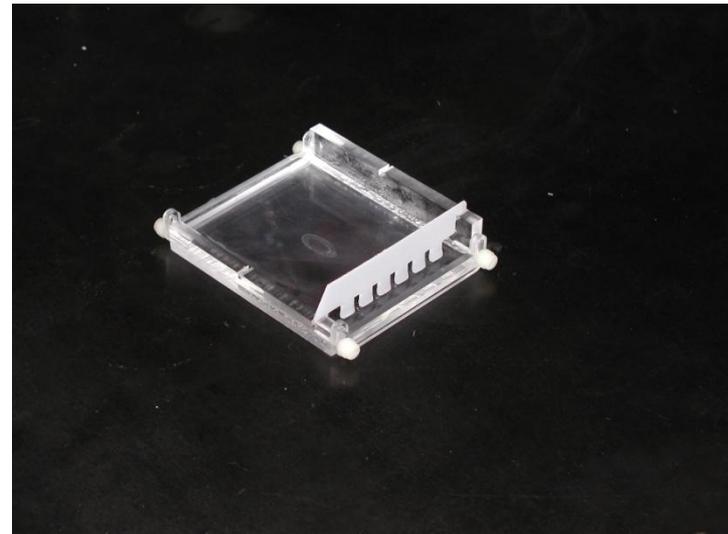
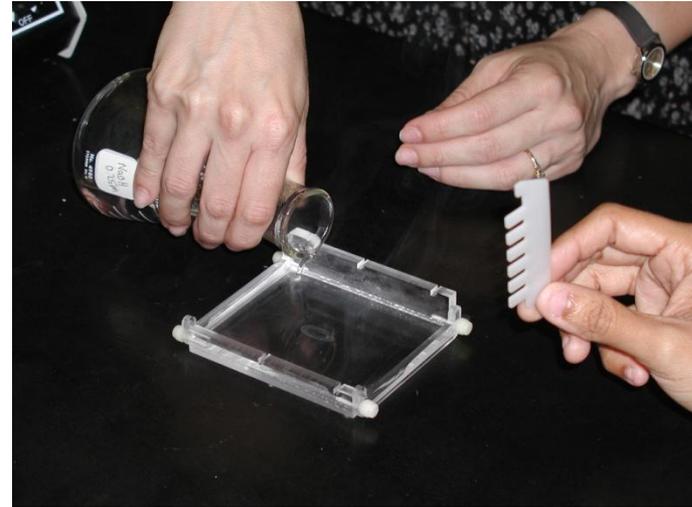


Electroforesis para separación de tintes:

- La mezcla de agarosa y buffer tiene que ponerse a calentar, agitando frecuentemente hasta que llegue al punto donde comience a hervir.



- Una vez que el frasco con la agarosa ya pueda tocarse sin quemarse, vertir con cuidado la mezcla en la bandeja.
- Poner la peinilla en el MEDIO de la cámara.
- Dejar que se torne opaco y sólido.



- Cuando la gel solidifique y se torne opaca, sacar la peinilla y poner gel en cámara de electroforésis con fosas del lado del polo negativo.
- Proceder a pipetear las muestras en las fosas.
- Correr gel.
- Teñir y desteñir.
- Observar gel en iluminador.

