

DIGESTIÓN DEL FAGO LAMBDA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Ref.ER2 (4 PRÁCTICAS)

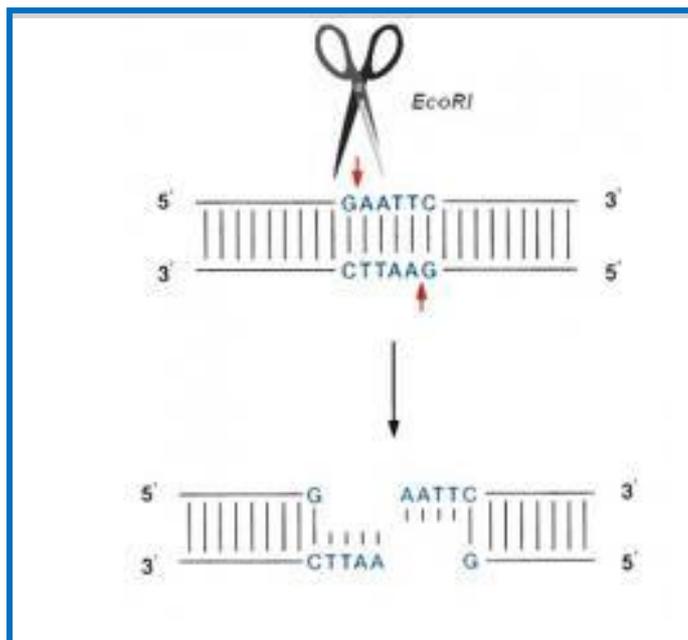
1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es introducir los principios de la digestión del ADN con enzimas de restricción y de la electroforesis en gel de agarosa, así como el conocimiento del bacteriófago lambda.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

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 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.



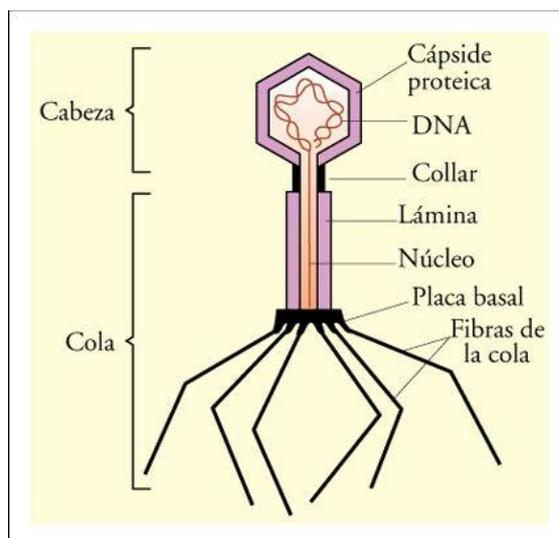
Las enzimas de restricción son una herramienta básica en biología molecular: en laboratorios de PCR, creación de sondas para hibridación, laboratorios de secuenciación de ADN, ingeniería genética, procesos de clonación, manejo de genotecas y en muchas otras áreas de genómica.

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
MspI	Serratia marcescens
BamHI	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 equivocarnos, 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.

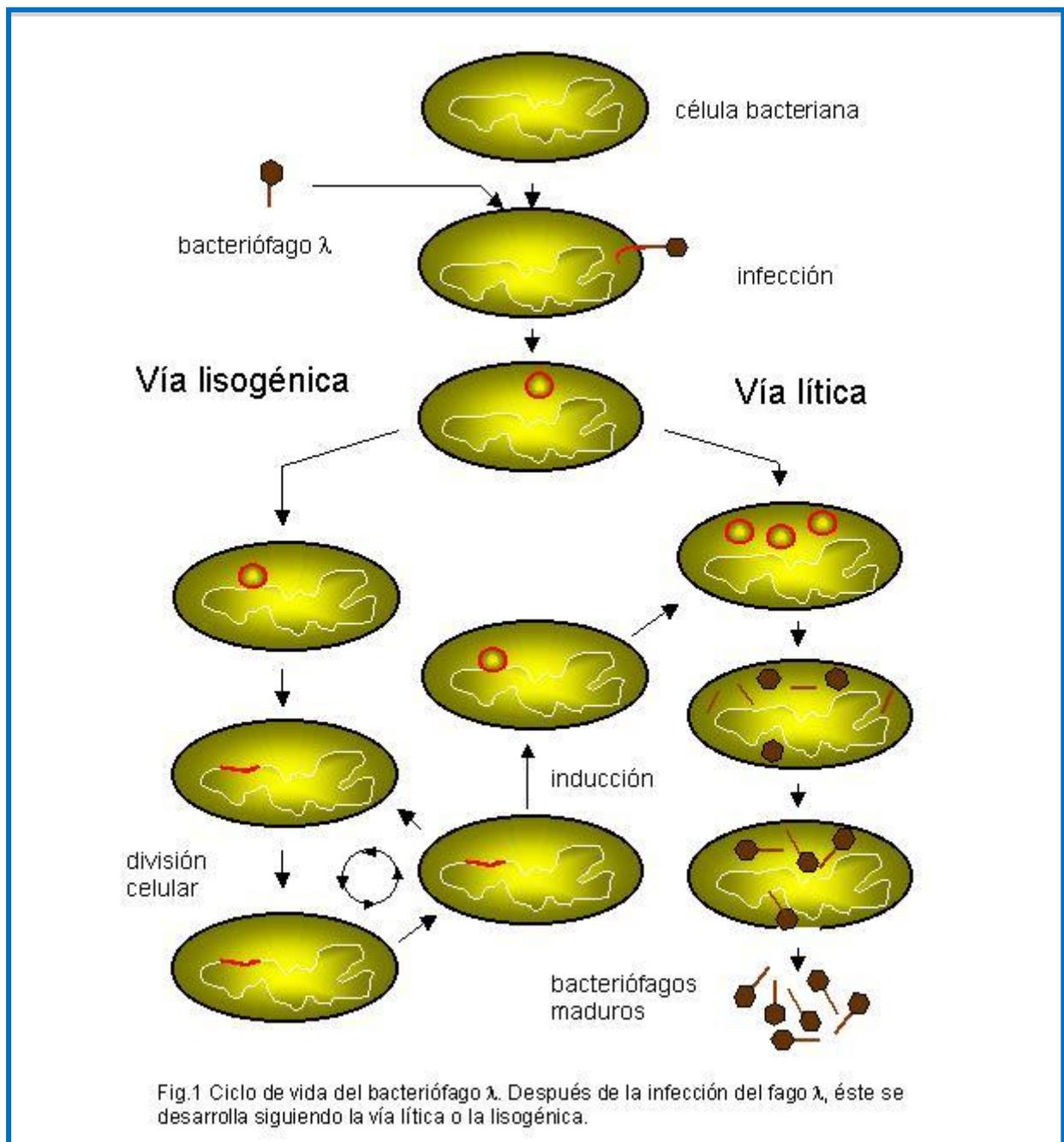
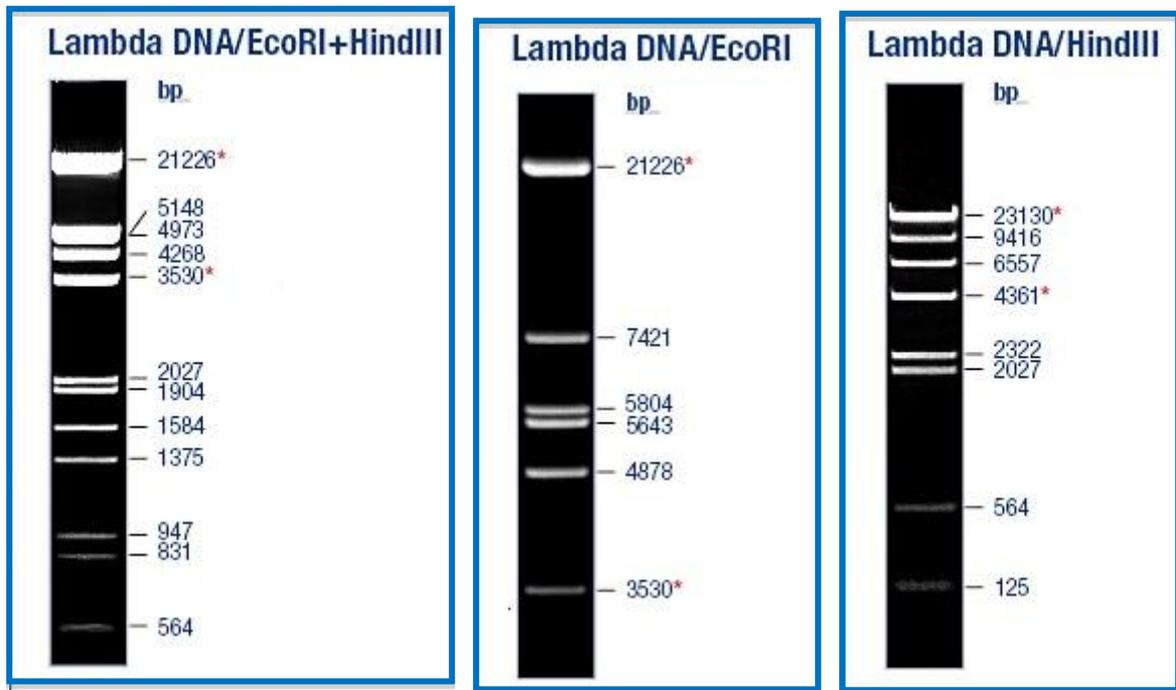


Fig.1 Ciclo de vida del bacteriófago λ . Después de la infección del fago λ , éste se desarrolla siguiendo la vía lítica o la lisogénica.

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	7	Conservar a -20°C
DanaBlue 0.1 %	400 µl	Temperatura ambiente
FashBlue 0.75X	125 ml	Temperatura ambiente

MUESTRAS	COMPOSICION	CANTIDAD
VERDE	FASTGREEN	20 microlitros
NEGRO	MARCADOR ECORI + HINDIII	90 microlitros
LILA	LAMBDA DNA CON TAMPÓN DE CARGA	90 microlitros
BLANCO	LAMBDA DNA	50 microlitros
AMARILLO	AGUA	50 microlitros
ROJO	EcoRI	12 microlitros
AZUL	HindIII	12 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).
- Baño de agua (37°C).
- Erlenmeyer o vaso para realizar el gel de agarosa.
- Cubeta y fuente de electroforesis.
- Balanza.
- Microondas o placa calefactora.
- Agua destilada.

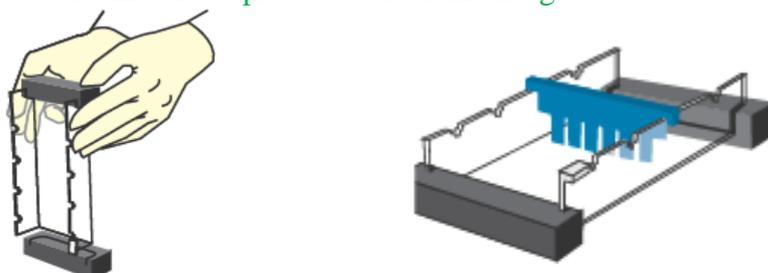
4. PRÁCTICA

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.

NOTA: En este experimento se siembra sólo 4 muestras por lo que si se usan 2 peines de 8 pocillos se puede realizar las 4 prácticas en un mismo gel.



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 0.30 gr de agarosa+ 80 µl DanaBlue 0.1 %, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa.

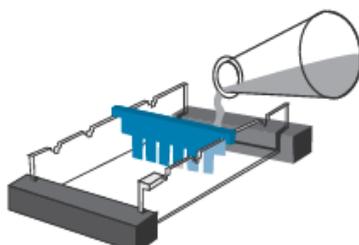
Para geles de 7 x 10 cm: Añadir 42 ml de Tampón de electroforesis 1 X más 0.40 gr de agarosa + 100 µl DanaBlue 0.1 %, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa

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 PREPARACION DE LAS REACCIONES DE RESTRICCIÓN

1) Sacar los microtubos de las muestras del congelador y dejar que se descongelen. Los enzimas de restricción siempre estarán en estado líquido y se deben mantener siempre en el congelador, sólo sacar al utilizarlos y devolverlos rápidamente al congelador.

2) Las reacciones que vamos a preparar tendrán un volumen total de 25 microlitros

REACCIÓN 1	VOLUMEN
LAMBDA DNA Tapón Blanco	10.5 microlitros
AGUA Tapón Amarillo	9.5 microlitros
FASTGREEN Tapón Verde	2.5 microlitros
EcoRI Tapón Rojo	2.5 microlitros

REACCIÓN 2	VOLUMEN
LAMBDA DNA Tapón Blanco	10.5 microlitros
AGUA Tapón Amarillo	9.5 microlitros
FASTGREEN Tapón Verde	2.5 microlitros
Hind III Tapón Azul	2.5 microlitros

3) Incubar en un baño maría a 37°C durante 15-30 minutos.

4) Sembrar las muestras en el gel de agarosa y realizar la electroforesis.

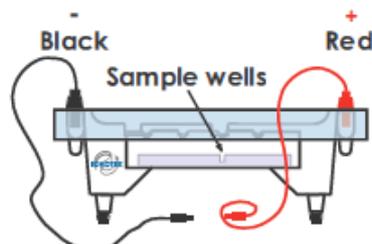
4.3 SIEMBRA DEL GEL Y ELECTROFORESIS

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.

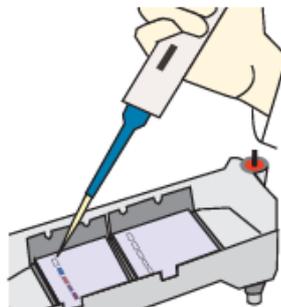
5) Sacar el peine o peines que ha formado los pocillos con mucho cuidado de no romper ningún pocillo.

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.*

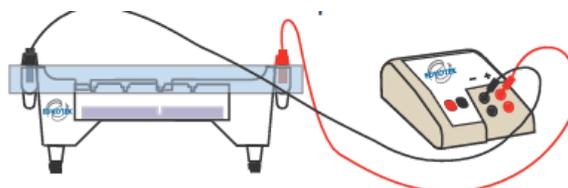
Pocillo	Muestra	Descripción	Volumen siembra
1	Negro	MARCADOR ECORI + HINDIII	20 microlitros
2	Lila	LAMBDA DNA CON TAMPÓN DE CARGA	20 microlitros
3	Reacción 1	REACCIÓN 1 Eco RI	25 microlitros
4	Reacción 2	REACCIÓN 2 Hind III	25 microlitros

1. Sembrar los microlitros indicados de cada muestra, 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).



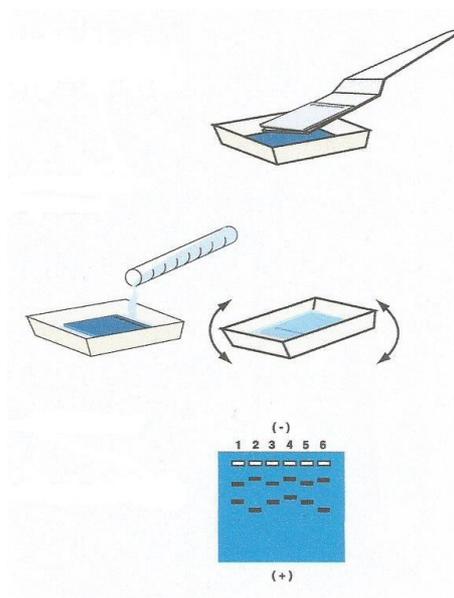
4) Configurar la fuente de corriente a **75 voltios (30 minutos) o a 150 voltios (20 minutos)**. **Vigilar el desarrollo del colorante del tampón de carga que indica cómo transcurre la electroforesis.**

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.

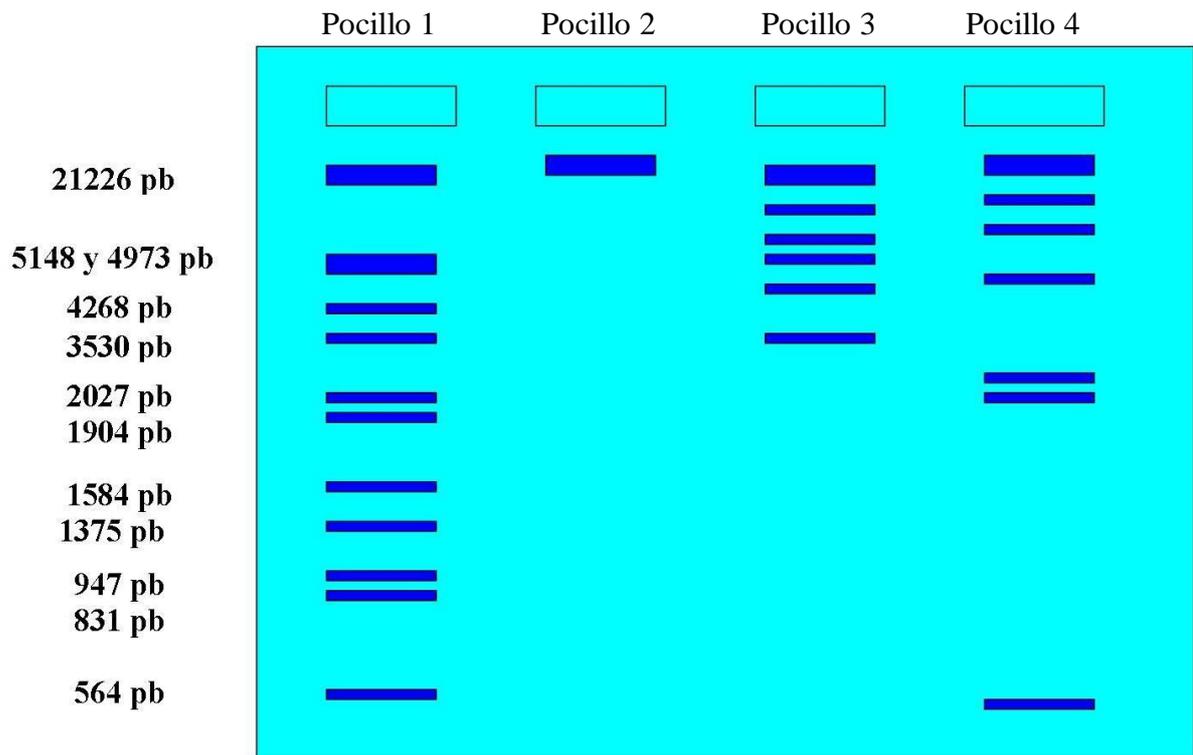
7) Colocar el gel en un transiluminador de luz blanca(si no se dispone, una hoja de papel blanco también puede utilizarse). Para una correcta visualización de las bandas deberá pasarse al siguiente apartado que es la tinción del gel para visualizar todas las bandas correctamente.

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, 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 descendiende 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: 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 2: Fago Lambda sin digerir.

Pocillo 3: Reacción 1 EcoR I 21226 pb; 7421 pb; 5804 pb; 5643 pb; 4878 pb; 3530 pb.

Pocillo 4: Reacción 2 Hind III 23130 pb; 9416 pb; 6557 pb; 4361 pb 2322 pb; 2027 pb; 564 pb; 125 pb.

1. Las bandas más pequeñas es muy probable que no se observen, 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.

Para cualquier duda o consulta adicional, por favor , contacte con nosotros bioted@arrakis.es