

**DEPARTAMENTO  
DE  
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA  
PRÁCTICAS DE BIOQUÍMICA**

Curso \_\_\_/\_\_\_

**APELLIDOS:  
NOMBRE:  
GRUPO:**

PDL - dic 2023

## Normas generales

1. Las prácticas empiezan todos los días a la hora estipulada. Por favor, sea puntual.
2. El uso de la bata es obligatorio.
3. Sea cuidadoso con el material. Compruebe el primer y último día que el material está completo, según la lista que se adjunta. Si falta algo, comuníquelo a los profesores de prácticas.
4. Antes de cada práctica, lea cuidadosamente el guión que le corresponde.
5. Al final de cada práctica, lave y guarde en la taquilla todo el material que haya utilizado.
6. Los tubos y pipetas se deben lavar con abundante agua corriente en el grifo, posteriormente aclararlos con agua destilada del frasco lavador, y luego dejarlos escurrir en posición invertida y estable.
7. Cada día se deberá completar el cuaderno en el que se recojan los procedimientos, resultados y conclusiones de la práctica correspondiente. Complete todos los apartados en el laboratorio o en casa.

**8. El día del examen de prácticas, se entregará este guión al profesor CON TODAS LAS GRAFICAS REPRESENTADAS Y TODOS LOS APARTADOS CONTESTADOS. El profesor devolverá el guión a los alumnos que no lo hayan completado, y las prácticas no serán válidas.**

## Material de laboratorio

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| Pipetas de 10 o 5 ml                  | 3  |
| Pipetas de 1 o 0,5 ml                 | 3  |
| Probeta de 100 ml                     | 1  |
| Frasco lavador                        | 1  |
| Vasos de precipitados de 250 o 100 ml | 2  |
| Tubos Falcon                          | 7  |
| Gradillas                             | 2  |
| Tubos de ensayo                       | 20 |
| Pera para pipeta o propipeta          | 1  |
| Juego de 3 micropipetas automáticas   | 1  |

## Índice general

**Práctica 1.** Estudio de la composición proteica de muestras biológicas

**1A.** Determinación cuantitativa de proteína total por el método de Bradford

**1B.** Análisis de la composición proteica por SDS-PAGE

**Práctica 2.** Efecto del pH sobre la actividad de la fosfatasa

**Práctica 3.** Determinación de la  $K_M$  de la fosfatasa ácida para el para-nitrofenil-fosfato y de la  $K_I$  para su inhibición por fosfato

**Práctica 4.** Purificación del DNA plasmídico de *Escherichia coli*

**Práctica 5.** Digestión de DNA plasmídico con endonucleasas de restricción y visualización de los fragmentos mediante electroforesis en agarosa

## Práctica 1.

### Estudio de la composición proteica de muestras biológicas

En esta práctica se pretende analizar la composición proteica de muestras de origen biológico aportadas por los alumnos, como leche, saliva, lágrimas, suero sanguíneo, u otras disoluciones que se puedan conseguir en el entorno personal. Para ello, los alumnos deben aportar entre 0,2 y 0,5 ml de la muestra en un tubo suministrado por el profesor.

Los rangos de referencia para la concentración proteica de algunas de estas muestras son: clara de huevo 100-120 mg/ml; leche 25-35 mg/ml; saliva 0,3-3 mg/ml; lágrimas 5-10 mg/ml; suero sanguíneo 60-80 mg/ml.

El análisis se lleva a cabo usando dos técnicas distintas: una determinación cuantitativa de proteína total usando el reactivo de Bradford, y un análisis de la composición proteica mediante electroforesis en poliacrilamida con SDS.

### Práctica 1A.

#### Determinación cuantitativa de proteína total por el método de Bradford.

##### Introducción.

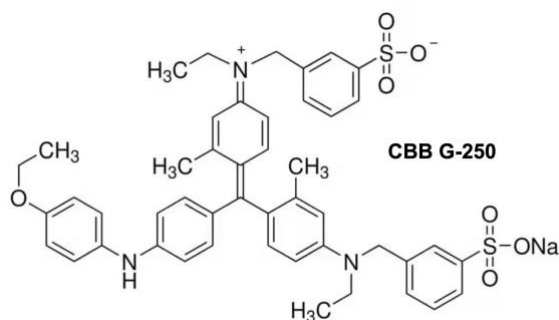
En esta práctica cada alumno determinará la concentración de proteína total en las muestras que haya aportado.

El ensayo de medida de la concentración de proteína total de la casa comercial Bio-Rad por el método de Bradford es un método colorimétrico simple, basado en que la unión de un colorante a proteínas provoca un cambio en sus características de absorción, cambio que tiene lugar de forma proporcional a la concentración de proteína presente.

El colorante más utilizado para teñir proteínas, tanto en ensayos líquidos como en geles de electroforesis, es el CBB, *Coomassie Brilliant Blue*, o *Azul de Coomassie*. El CBB R-250 y su derivado dimetilado CBB G-250 tiñen las proteínas de color azul brillante. En medio ácido se unen a ellas mediante interacciones electrostáticas con residuos aminoacídicos básicos (Lys, His y sobre todo Arg) y mediante interacciones hidrofóbicas con los residuos aromáticos.

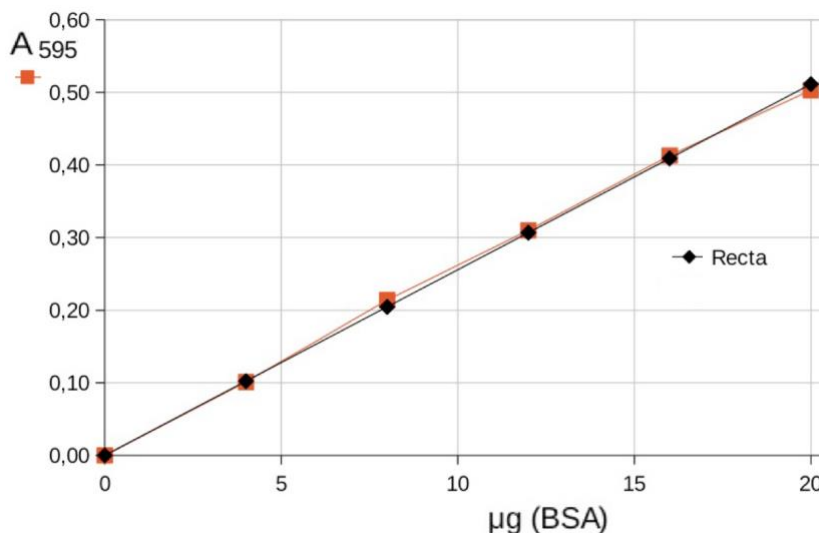
En el ensayo de Bradford, el máximo de absorbancia del colorante CBB G-250 en solución ácida cambia desde 465 nm a 595 nm cuando se une a proteínas. El coeficiente de extinción de los complejos colorante-proteína se mantiene constante durante un intervalo de concentración de 10 veces. Por lo tanto, se puede aplicar la Ley de Lambert-Beer ( $Abs = \epsilon \cdot c \cdot l$ ) para la cuantificación de la proteína presente en una muestra mediante la selección de la proporción adecuada entre volumen de colorante y el rango de concentraciones de las muestras.

Tanto el cambio de color debido a la unión del CBB G-250 a la proteína como la variación en la respuesta de color con la concentración de la misma se pueden atribuir a que el colorante presenta tres especies absorbentes: una catiónica roja, una neutra verde, y una aniónica azul. Al pH del ensayo, las moléculas de colorante están doblemente protonadas y por tanto en la forma catiónica roja. La unión del colorante a la proteína estabiliza la forma azul aniónica, que se detecta a 595 nm. Las interferencias de compuestos no proteicos con el ensayo se deben a su capacidad para desplazar el equilibrio entre las tres especies. Así, compuestos interferentes como algunos detergentes, flavonoides y tampones básicos, estabilizan la especie neutra verde mediante unión directa o mediante cambio del pH.



La medición de la absorbancia de las muestras a 595 nm, y la comparación de sus valores con los de una recta patrón de absorbancia obtenida con distintas cantidades de una proteína estándar permiten obtener una medida de la concentración de proteína. Esta medida es precisa en un amplio rango de concentraciones, aunque la respuesta no es totalmente lineal. El procedimiento de ensayo que usaremos se utiliza para muestras con cantidades entre 1 y 20  $\mu\text{g}$  de proteína.

Como sucede con otros ensayos colorimétricos de proteína, hay variación en la respuesta de color por parte de las diferentes proteínas, que interaccionan más o menos con el CBB según la abundancia de residuos básicos y aromáticos. La mejor proteína para ser utilizada como estándar para la obtención de la recta patrón es la propia proteína que se está ensayando. Como esto suele ser impracticable, se debe escoger otra proteína como estándar relativo, idealmente una que de un rendimiento de color similar a la de la proteína o proteínas que se está(n) ensayando. Si se desean sólo valores relativos de concentración proteica (para comparar entre sí muestras de naturaleza similar), cualquier proteína puede ser usada como estándar. Se usa frecuentemente albúmina de suero bovino (BSA).



### Reactivos.

- *Bio-Rad Protein Assay Dye*. Reactivo de Bradford comercial.
- Albúmina de suero bovino (BSA) 25  $\mu\text{g/ml}$ .

| Tubo   | BSA<br>25 $\mu\text{g/ml}$ | problema                        | $\mu\text{l H}_2\text{O}$ | $\mu\text{g de}$<br>proteína | Rect.<br>Bradford | $A_{595}$ |
|--------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------|------------------------------|-------------------|-----------|
| blanco | 0 $\mu\text{l}$            | -                               | 1600                      | 0                            | 400               |           |
| 1      | 160 $\mu\text{l}$          | -                               | 1440                      | 4                            | 400               |           |
| 2      | 320 $\mu\text{l}$          | -                               | 1280                      | 8                            | 400               |           |
| 3      | 480 $\mu\text{l}$          | -                               | 1120                      | 12                           | 400               |           |
| 4      | 640 $\mu\text{l}$          | -                               | 960                       | 16                           | 400               |           |
| 5      | 800 $\mu\text{l}$          | -                               | 800                       | 20                           | 400               |           |
| 6      | -                          | leche 1 (1/20) 10 $\mu\text{l}$ | 1595                      | ?                            | 400               |           |
| 7      | -                          | leche 2 (1/20) 10 $\mu\text{l}$ | 1595                      | ?                            | 400               |           |
| 8      | -                          | saliva 1 10 $\mu\text{l}$       | 1590                      | ?                            | 400               |           |
| 9      | -                          | saliva 2 10 $\mu\text{l}$       | 1590                      | ?                            | 400               |           |

### Procedimiento.

Utilizar tubos desechables de 10 ml.

Para la recta patrón, a partir de la preparación de albúmina 25  $\mu\text{g/ml}$  preparar las muestras que se indican en la tabla. Respecto a las muestras problema, diluirlas 1/20 con agua destilada si es preciso, para que queden dentro del rango de medida.

Preparar las mezclas de reacción con los patrones de BSA y el blanco. Completar con agua destilada hasta un volumen final de 1600  $\mu\text{l}$ .

Dispensar en los tubos correspondientes el volumen de cada muestra problema. Completar con agua destilada hasta un volumen final de 1600  $\mu\text{l}$ .

Mezclar con el agitador Vortex y esperar 2 min.

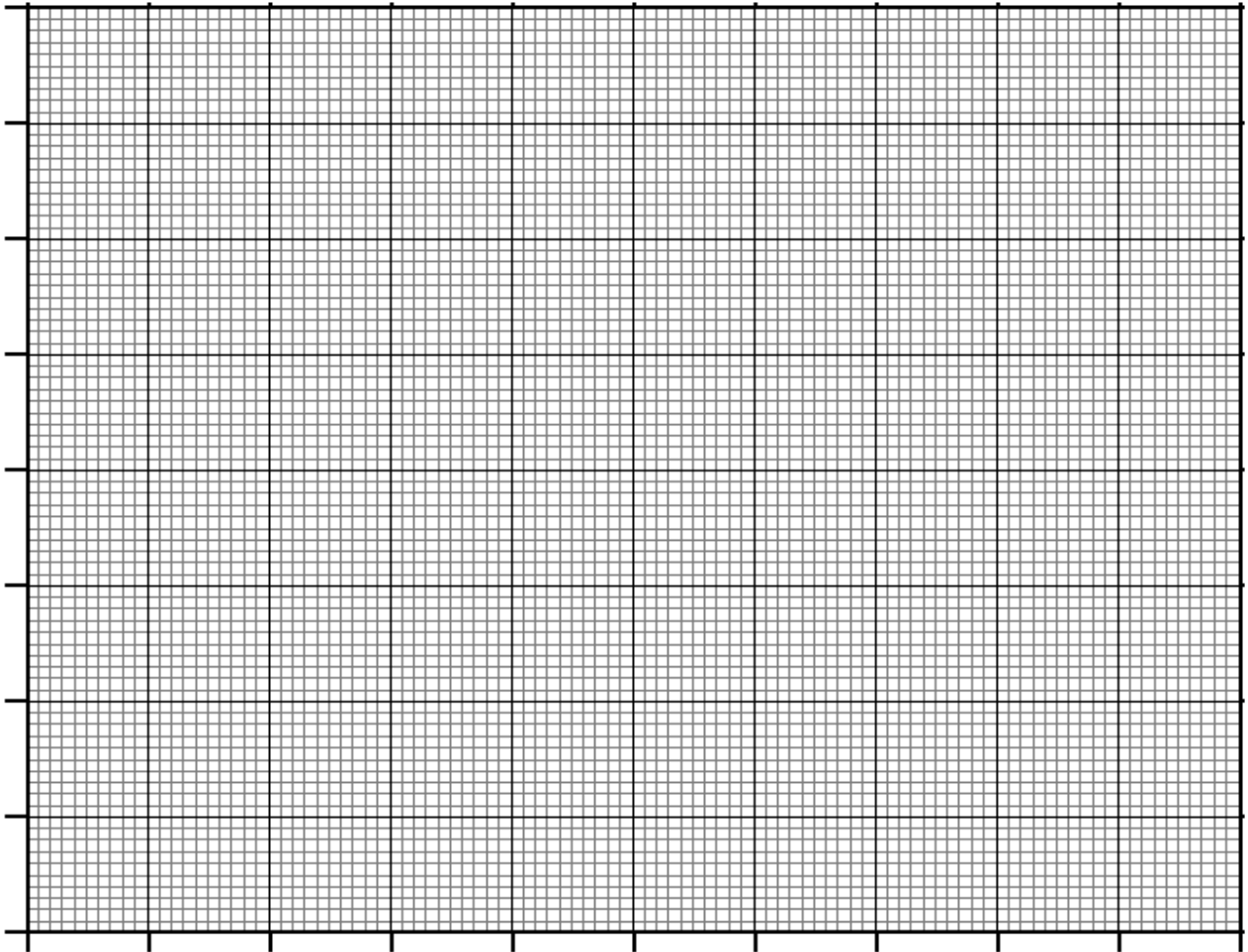
Añadir a cada tubo (**incluido el blanco**) 400  $\mu$ l del Reactivo de Bradford Bio-Rad. Mezclar bien con el Vortex.

Esperar 15 min a que se desarrolle la reacción.

Determinar la  $A_{595}$  transfiriendo cada muestra a una cubeta del espectrofotómetro. Primero ajustar a cero el aparato con el Blanco y luego medir los valores del resto de los tubos.

### Resultados.

a) Representar gráficamente los datos de la recta patrón.



b) Calcular la concentración de proteína de los problemas usando los datos de la recta patrón.

| muestra | vol. ( $\mu$ l) | $A_{595}$ | $\mu$ g prot. | conc. prot. (mg/ml) |
|---------|-----------------|-----------|---------------|---------------------|
|         |                 |           |               |                     |
|         |                 |           |               |                     |
|         |                 |           |               |                     |
|         |                 |           |               |                     |

## Práctica 1B.

### Análisis de la composición proteica por SDS-PAGE.

#### Introducción.

Una vez conocida la concentración de proteína en las muestras de interés, analizaremos su composición mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (*PAGE, polyacrilamide gel electrophoresis*), un método fácil, rápido y económico a nivel de gasto de muestra, pues para la detección de las proteínas se requieren sólo cantidades del orden de microgramos o inferior.

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de monómeros de acrilamida, que produce largas cadenas, y por el entrecruzamiento de éstas por la metilén-bisacrilamida. La polimerización es iniciada con persulfato de amonio y TEMED. Así se genera una estructura reticular tridimensional que ocupa todo el volumen de la solución en que se prepare. Los geles son transparentes, químicamente inertes, y estables en amplios rangos de pH, temperatura y fuerza iónica. La **acrilamida es neurotóxica**, por lo que al preparar los geles hay que proceder con mucha precaución.

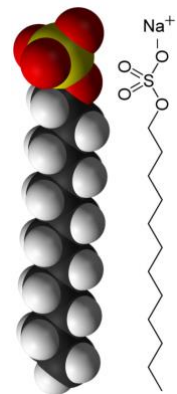
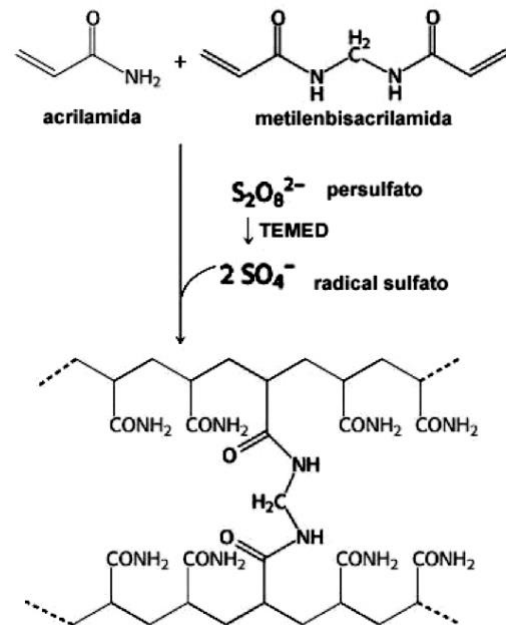
El tamaño de poro del gel, y con él su rango de separación, lo determinan las proporciones totales y relativas de acrilamida y bisacrilamida, siendo menor el poro cuanto mayor sea el porcentaje total de ambas y cuanto mayor sea la relación bisacrilamida/acrilamida. El rango de tamaños de poro está entre 0,5 y 500 nm.

Las proteínas pierden su estructura nativa funcional en presencia de agentes desnaturizantes. En la PAGE se pueden utilizar varios, como urea, clorhidrato de guanidina o detergentes iónicos. El más usado es el detergente aniónico lauril sulfato sódico o SDS (*sodium dodecyl sulfate*), de forma que la *electroforesis desnaturizante en poliacrilamida en presencia de SDS*, o *SDS-PAGE*, es el sistema más utilizado para separar proteínas. El método original fue descrito por Laemmli en 1970.

En  $[SDS] > 8$  mM la gran mayoría de las proteínas une aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos aminoácidos, formando complejos con características comunes. En esos complejos la unión del SDS provoca la desaparición de las interacciones no covalentes que mantienen la estructura de las proteínas, que se desenrollan y adoptan una forma de cadenas extendidas semirrígidas que sólo difieren en su longitud, acorde con el tamaño de cada una. Como cada molécula de SDS proporciona una carga negativa (del grupo  $SO_4^-$ ), las cargas propias de las proteínas quedan enmascaradas o anuladas y los complejos proteína-SDS están cargados negativamente de forma uniforme. Así, estos complejos se comportan como polianiones que tienen la misma forma alargada y la misma *densidad de carga* (o *relación carga/masa*), que además tiene un valor muy alto.

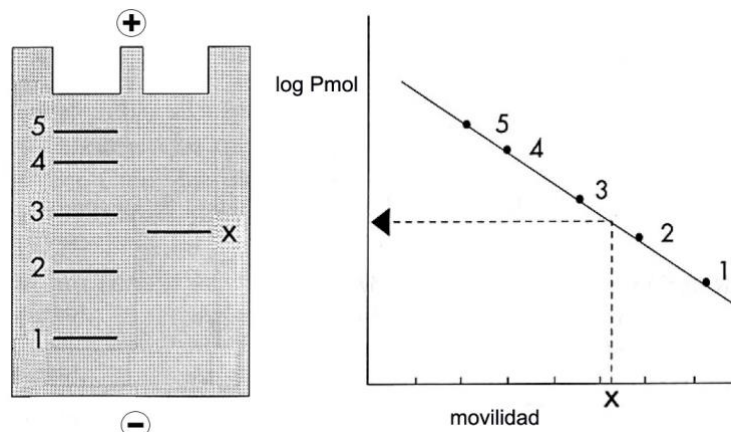
Por otra parte, en algunas proteínas hay puentes disulfuro, que son enlaces covalentes formados por la oxidación de dos grupos  $-SH$  de cadenas laterales de Cys, bien entre residuos de la misma cadena polipeptídica o de distintas cadenas. Para conseguir el desplegamiento total de las cadenas polipeptídicas, los puentes  $diS$  se deben romper mediante tratamiento de las muestras con un agente reductor como el  $\beta$ -mercaptoetanol o el ditiotreitól.

En un sistema de SDS-PAGE, la fuerte carga negativa de los complejos proteína-SDS los impulsa a moverse rápidamente hacia el polo positivo. Al usar geles con el rango adecuado de tamaño de poro, se produce el efecto de *tamiz molecular*, y se consigue la separación de las proteínas a través del gel de poliacrilamida exclusivamente en función de su Pmol: las de mayor tamaño presentarán



más resistencia a pasar por los poros del gel y migrarán más lentamente que las de menor tamaño. A menor masa mayor distancia de migración en el gel, y viceversa: hay una relación inversa entre el log del Pmol de una proteína y su movilidad electroforética.

Si se representan los valores de log Pmol frente a la movilidad de un grupo de proteínas, se obtiene una relación lineal. Así, se puede utilizar un conjunto de proteínas de Pmol conocido y someterlo a SDS-PAGE en el mismo gel en el que se analicen proteínas cuyo Pmol se desea conocer. En esas condiciones se obtiene una

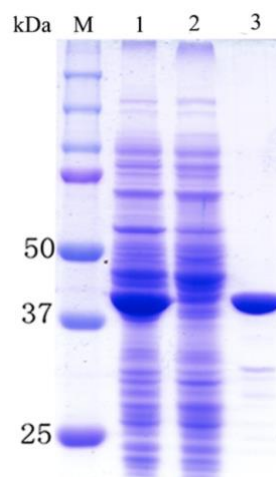


recta patrón que permite calcular el tamaño de una proteína problema.

La relación lineal entre log Pmol y movilidad se mantiene en un intervalo limitado de Pmol, que cambia para cada concentración de acrilamida. Los tamaños más habituales de las proteínas (entre 5 y 150 kDa) se separan bien en los rangos de tamaño de poro generados con concentraciones de acrilamida entre el 4% y el 15%, y la concentración más usada es el 10% (que discrimina entre ~ 15 y 70 kDa). Para mejorar la resolución en un intervalo más amplio de Pmol se usan geles con gradientes de concentración de acrilamida, como los del 4-15% que usaremos en la práctica. Como son difíciles de preparar se suelen comprar prefabricados.

Una vez separada en un gel de SDS-PAGE, para visualizar la composición proteica de una muestra, es necesario elegir un sistema de tinción o detección colorimétrica. El más habitual es el del Azul de Coomassie, que usa la variante CBB R-250 (ver pag. 4). Esta tinción es simple y relativamente rápida, y permite detectar hasta ~ 0,1 µg por banda, con respuesta cuantitativa (correspondencia entre cantidad de proteína e intensidad de la banda) hasta 15-20 µg.

El colorante no se une a la poliacrilamida con alta afinidad, pero penetra en la matriz del gel y se une con baja afinidad, por lo que se necesita también un paso posterior de destinción. Las tinciones y destinciones con CBB se emplean habitualmente en soluciones de metanol o isopropanol con ácido acético, y dan como resultado final bandas azules de proteína precipitada sobre el fondo transparente de poliacrilamida.



En resumen, la SDS-PAGE es la electroforesis más utilizada para el análisis de proteínas porque: 1) la mayoría de las proteínas interacciona de forma parecida con el SDS, con el que forman complejos que provocan la desnaturalización de las cadenas polipeptídicas; 2) si también se tratan con agentes reductores, los polipéptidos se despliegan e individualizan totalmente; 3) los complejos proteína-SDS tienen carga negativa y migran hacia el polo positivo en electroforesis; 4) su carga es muy elevada, por lo que su velocidad de migración también lo es y las electroforesis son muy rápidas; 5) la densidad de carga es la misma en todos los polipéptidos, por lo que su separación depende solamente del Pmol, cuyo log es proporcional a la movilidad, y 6) los complejos proteína/SDS se tiñen fácilmente.

Los procesos de manejo y tinción de los geles de los geles son largos y complicados para personas sin experiencia, por lo que **corren a cargo de los profesores.**



### **Soluciones.**

- Tampón de reservorios (10x): Tris 248 mM, glicina 1,92 M, SDS 1%.
- Tampón de muestra (4x): Tris-HCl 0,25 M pH 6,8; SDS 8%;  $\beta$ -mercaptoetanol 2,5%; glicerol 35%; azul de bromofenol 0,05%.
- Soluciones de tinción y de destinción.

### **Procedimiento experimental.**

Las muestras deben contener una cantidad baja de sales (si es necesario hay que dializar, precipitar, etc). Las muestras deben tener un volumen entre 5 y 30  $\mu$ l, y una cantidad de proteína entre 20 y 100  $\mu$ g. Para preparar las muestras se mezclan tres volúmenes del problema con un volumen de tampón de la muestra. (ejemplo: 9  $\mu$ l de muestra + 3  $\mu$ l de tampón de muestra). La mezcla se incuba durante 3-5 min a 95°C. También hay que tener una mezcla de proteínas patrón cuyos Pmol sean conocidos.

Leche: 1  $\mu$ l de leche + 14  $\mu$ l de agua + 5  $\mu$ l de t. de muestra.

Saliva: 15  $\mu$ l de saliva + 5  $\mu$ l de t. de muestra.

Lágrimas: 5  $\mu$ l de lágrimas + 10  $\mu$ l de agua + 5  $\mu$ l de t. de muestra.

Suero sanguíneo: 0,5  $\mu$ l de suero + 14,5  $\mu$ l de agua + 5  $\mu$ l de t. de muestra.

Clara de huevo: 0,5  $\mu$ l de clara + 14,5  $\mu$ l de agua + 5  $\mu$ l de t. de muestra.

### **Electroforesis.**

Se utilizan geles comerciales preparados (Mini-Protean TGX, de la casa BIO-RAD) con un rango de concentración de poliacrilamida del 4-15%. Cada uno tiene 10 pocillos que admiten muestras de hasta 30  $\mu$ l.

Limpiar la parte externa de los de los moldes de plástico que recubren los geles con agua destilada. Con cuidado, quitar el peine superior que hace los pocillos y **despegar la cinta adhesiva de la parte inferior**. Acoplar los moldes conteniendo los geles en el tanque de electroforesis.

Preparar 1 litro del tampón de los reservorios. Llenar con él el reservorio superior del tanque hasta que los pocillos queden sumergidos en el tampón, y verificar que no hay pérdidas a través de las zonas de contacto. Rellenar luego el reservorio inferior con tampón.

Cargar las muestras en los distintos pocillos, apuntando a cuál corresponde cada uno. Uno de los pocillos de un extremo del gel se utiliza para cargar la muestra con la mezcla de proteínas patrón de Pmol conocidos.

Conectar los cables eléctricos entre el tanque de electroforesis y la fuente de alimentación y aplicar la corriente eléctrica. Normalmente se utilizan 100 V/gel, hasta que el marcador de frente azul de bromofenol llegue al extremo inferior del gel.

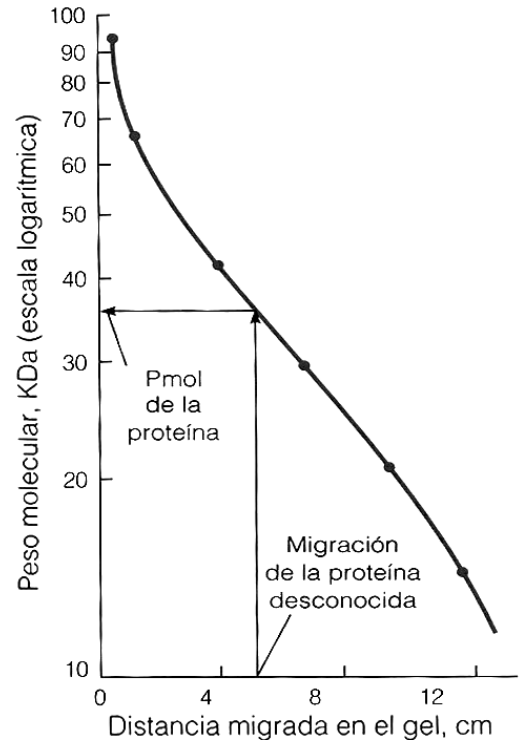
### **Tinción.**

Finalizada la electroforesis, se desarma el aparato y se separan los plásticos que contienen el gel. El gel se deposita en la solución colorante durante 20 min a 55°C en agitación. Después se recupera la solución de tinción (para usos posteriores), se lava rápidamente el gel con agua y se añade solución de destinción y trocitos de esponja para captar el colorante Coomassie Blue. Para este proceso de desteñido, el gel se incuba a 55°C en agitación hasta que el fondo del gel se aclare y permita ver las bandas de proteína.

### Cálculo de tamaños y comparación de datos.

Medir la migración a partir del comienzo del gel analítico para cada una de las bandas de la mezcla de patrones marcadores y de las proteínas analizadas.

| Proteínas patrón |                |
|------------------|----------------|
| Pmol (kDa)       | distancia (mm) |
|                  |                |
|                  |                |
|                  |                |
|                  |                |
|                  |                |
|                  |                |
|                  |                |
|                  |                |
|                  |                |
|                  |                |
|                  |                |
|                  |                |



Representar en una gráfica semilogarítmica el logaritmo del Pmol de los marcadores (ordenadas) frente a su migración en el gel (abscisas), y establecer un recta/curva patrón.

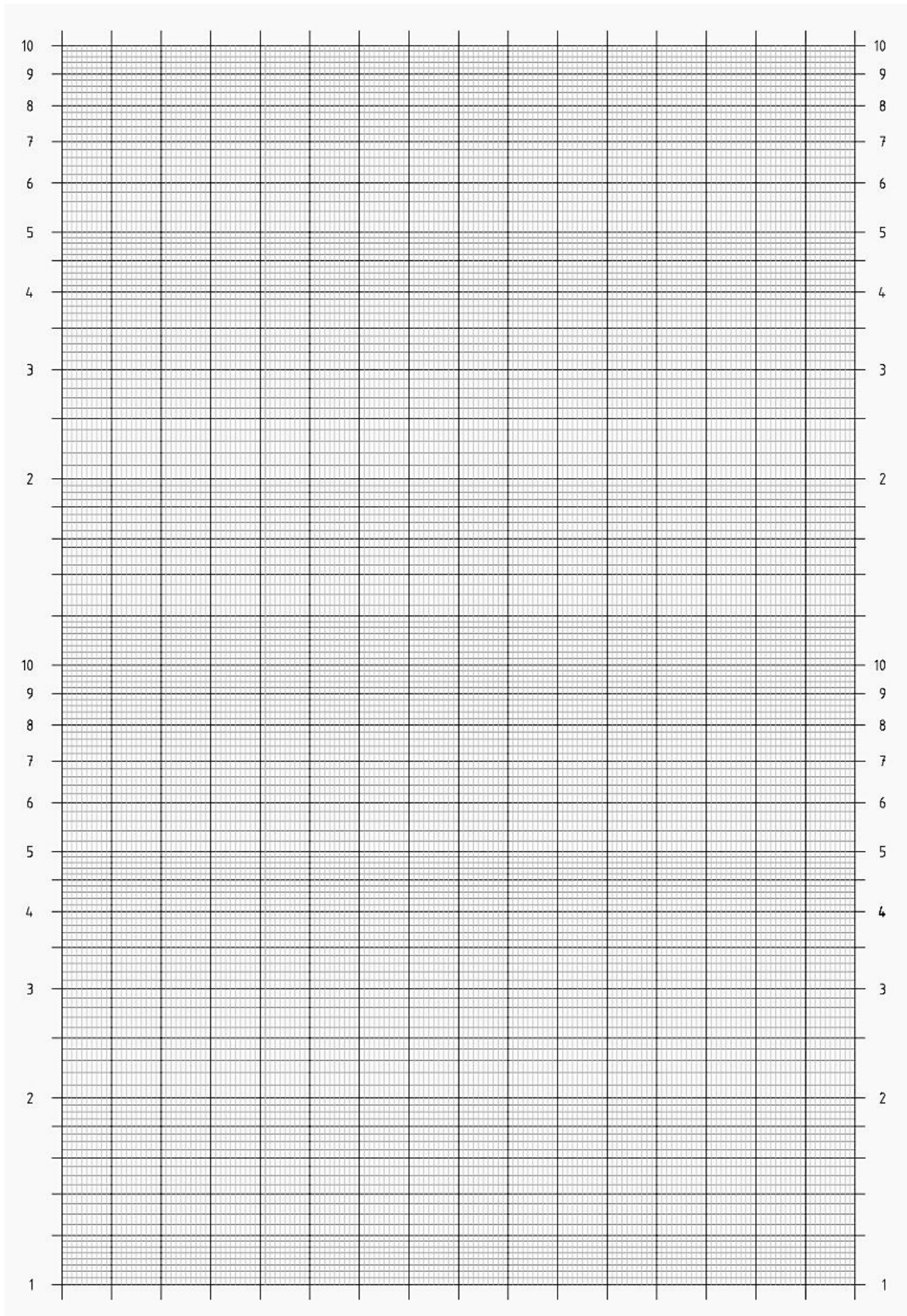
En base a su migración, calcular por interpolación con la recta patrón el Pmol aproximado de dos de las proteínas mayoritarias (más visibles) de las muestras analizadas de leche de vaca, así como las dos mayoritarias de saliva humana, lágrimas humanas y clara de huevo.

Buscar información sobre la composición proteica de la leche, saliva, lágrimas y clara de huevo e identificar las proteínas escogidas en base a su Pmol.

En base a su composición, buscar una proteína que aparece tanto en saliva y lágrimas humanas como en clara de huevo, e indicarla en el gel correspondiente.

| Proteínas mayoritarias de las muestras |                |                      |                  |
|--|----------------|----------------------|------------------|
| muestra                                | distancia (mm) | Pmol calculado (kDa) | posible proteína |
|  |                |                      |                  |
|  |                |                      |                  |
|  |                |                      |                  |
|  |                |                      |                  |
|  |                |                      |                  |
|  |                |                      |                  |
|  |                |                      |                  |
|  |                |                      |                  |

**Representación de la movilidad (en mm) de las proteínas patrón (abscisas) frente al logaritmo de su Pmol (ordenadas), y cálculo del tamaño de proteínas problema.**



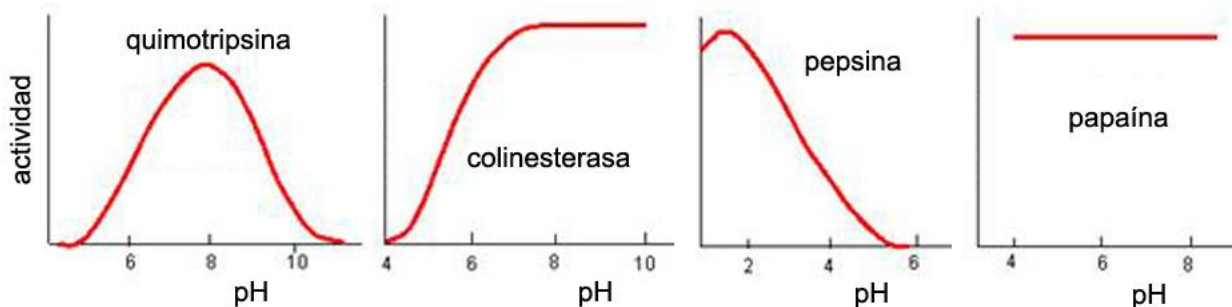
## Práctica 2.

### Efecto del pH sobre la actividad de la fosfatasa.

#### Introducción.

En una reacción catalizada por un enzima hay varios factores que pueden afectar a la actividad enzimática, incluyendo el tiempo de reacción, la concentración de enzima, la temperatura, el pH, la concentración de sustrato, la concentración de iones o la posible presencia de sustancias inhibidoras de la acción enzimática.

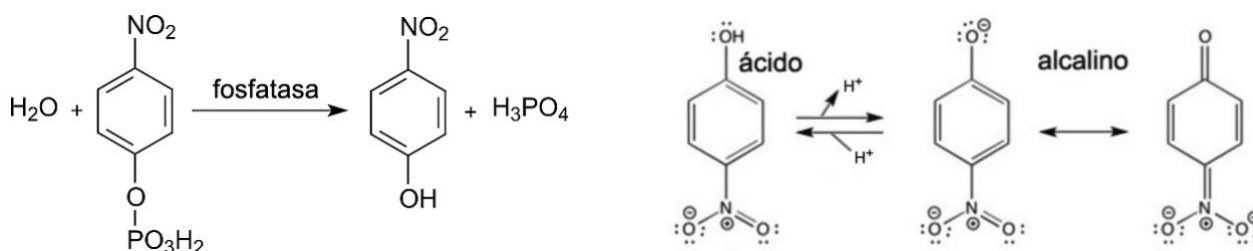
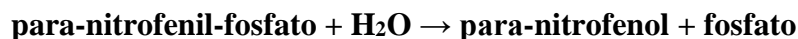
La mayor parte de los enzimas poseen un pH característico al que su actividad es máxima, llamado *pH óptimo*. En la mayoría de los casos la actividad disminuye notablemente por encima y por debajo de ese pH, aunque hay enzimas con distinto perfil de dependencia del pH. Por ejemplo, algunas presentan más de un pH óptimo y otras son insensibles al pH. Es frecuente que el pH óptimo de un enzima coincida con el del entorno fisiológico en el que suele actuar.



En esta práctica se va a averiguar el pH óptimo al que actúa la fosfatasa, un enzima que cataliza la eliminación de grupos fosfato por hidrólisis de sustratos fosforilados.

#### Determinación de la actividad de la fosfatasa.

Mediremos su actividad mediante la reacción:



El sustrato para-nitrofenil-fosfato no absorbe luz de  $\lambda = 430 \text{ nm}$ , pero el producto para-nitrofenol sí la absorbe. La forma no disociada del p-nitrofenol, presente en medio ácido, no absorbe radiación en el rango visible, mientras que la estructura quinoide, presente en el medio alcalino, sí lo hace. En esas condiciones, el p-nitrofenol tiene color amarillo, con un máximo de absorbancia a 400 nm. No obstante, la determinación se hará a 430 nm para evitar interferencias por parte del sustrato p-nitrofenilfosfato, que absorbe algo de luz a 400 nm.

La determinación de la actividad de la fosfatasa se realiza midiendo la concentración del p-nitrofenol liberado por acción del enzima durante un período de tiempo determinado, en las condiciones de ensayo empleadas. Para ello se mide la absorbancia del p-nitrofenol, que es proporcional a su concentración según la Ley de Lambert-Beer ( $\text{Abs} = \epsilon \cdot c \cdot l$ ).

#### Determinación del pH óptimo de la fosfatasa.

Con objeto de averiguar el pH óptimo al que tiene lugar la hidrólisis del p-nitrofenil-fosfato catalizada por la fosfatasa, se incuban a 30°C concentraciones fijas de enzima y de sustrato en distintos tubos con un tampón de amplio rango ajustado a diferentes pHs. En el tubo cuyo pH sea el óptimo

para la acción de la fosfatasa, la cantidad de p-nitrofenil-fosfato hidrolizado será mayor, y por tanto, la cantidad y concentración del p-nitrofenol liberado serán más elevadas.

### Procedimiento.

Numerar nueve tubos de ensayo, colocarlos en la gradilla y poner los siguientes reactivos:

| tubo   | tampón           | enzima fosfatasa    | agua   |
|--------|------------------|---------------------|--------|
| 1      | 0,6 ml de pH = 2 | 0,2 ml de 0,2 mg/ml | —      |
| 2      | 0,6 ml de pH = 3 | "                   | —      |
| 3      | 0,6 ml de pH = 4 | "                   | —      |
| 4      | 0,6 ml de pH = 5 | "                   | —      |
| 5      | 0,6 ml de pH = 6 | "                   | —      |
| 6      | 0,6 ml de pH = 7 | "                   | —      |
| 7      | 0,6 ml de pH = 8 | "                   | —      |
| 8      | 0,6 ml de pH = 9 | "                   | —      |
| Blanco | —                | —                   | 0,8 ml |

A continuación, introducir la gradilla con los tubos conteniendo el tampón y la fosfatasa en un baño graduado a 30°C.

Añadir a todos los tubos, **incluido el blanco**, 0,2 ml de p-nitrofenil-fosfato 20 mM con un **intervalo de 30 segundos** entre tubo y tubo. Mezclar bien con un agitador Vortex (~ 5 seg) tras iniciar la reacción en cada tubo. Dejar transcurrir la reacción durante 15 min en estas condiciones.

Detener la reacción en cada tubo (**incluido el blanco**) con 3 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M, empezando en el mismo orden que en la etapa anterior, y también con intervalos de 30 seg.

Con ello paramos la reacción por el alto pH del carbonato sódico, y suministramos un medio alcalino para provocar la disociación del p-nitrofenol y la absorción de radiación.

Medir la A<sub>430</sub> en un colorímetro previamente ajustado a cero con el blanco, anotando los datos correspondientes a los distintos pHs ensayados.

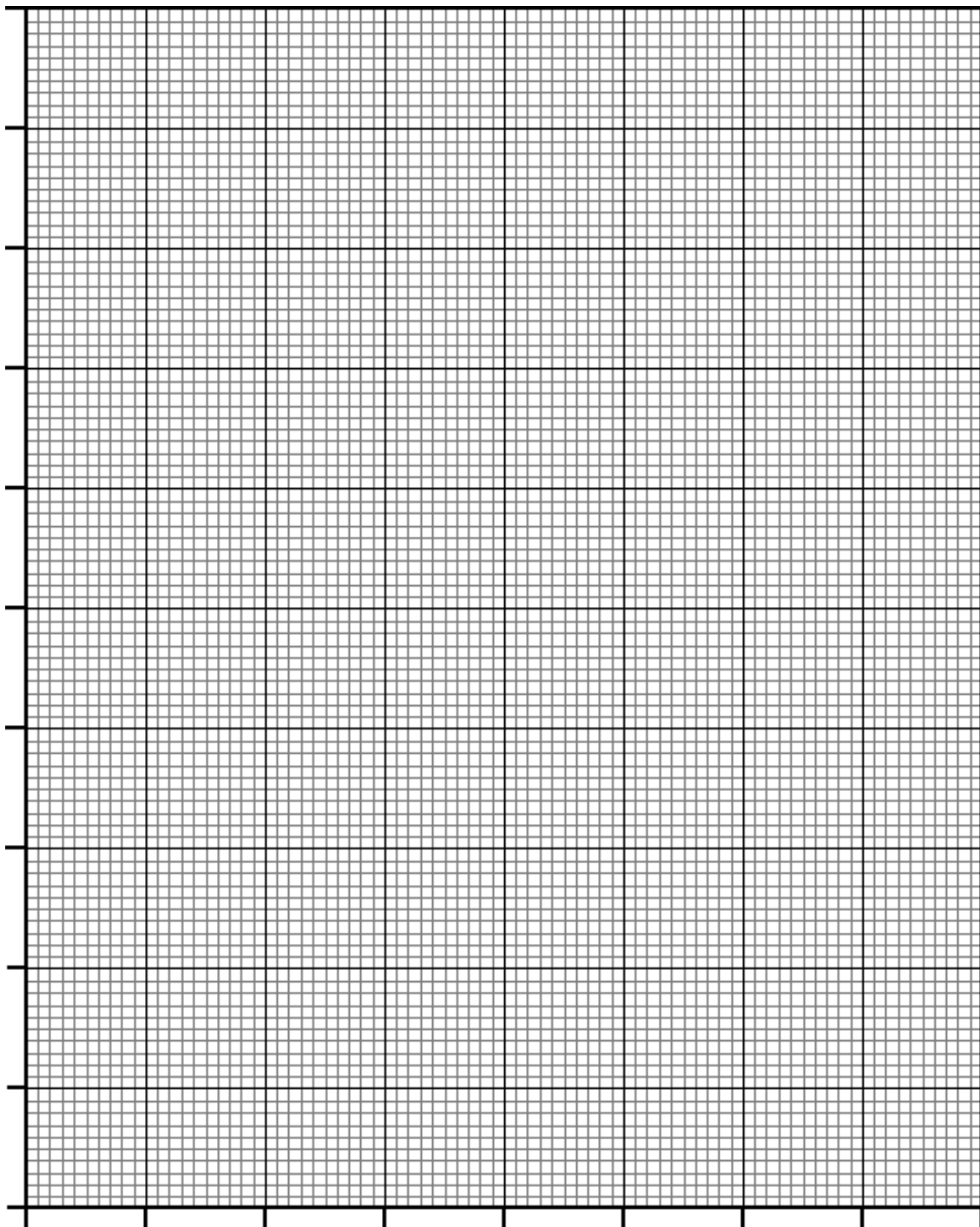
### Resultados.

Representar gráficamente los resultados, poniendo en abscisas el pH y en ordenadas los valores de absorbancia a 430 nm.

Teniendo en cuenta que el valor del coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol a 430 nm es  $\epsilon_{430} = 11.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , calcular los  $\mu\text{moles}$  de p-nitrofenol liberados por minuto (U, unidades de actividad enzimática), cuando el enzima funciona en condiciones óptimas de pH y a 30°C de temperatura.

| tubo | pH | A <sub>430</sub> |
|------|----|------------------|
| 1    | 2  |                  |
| 2    | 3  |                  |
| 3    | 4  |                  |
| 4    | 5  |                  |
| 5    | 6  |                  |
| 6    | 7  |                  |
| 7    | 8  |                  |
| 8    | 9  |                  |

**Efecto del pH en la actividad del enzima fosfatasa.**



**Cálculo de las unidades de actividad enzimática para el valor óptimo de pH:**

### Práctica 3.

## Determinación de la $K_M$ de la fosfatasa ácida para el p-nitrofenil-fosfato y de la $K_i$ para su inhibición por fosfato.

#### Introducción.

La actividad enzimática se ve afectada por varios factores, uno de los cuales es la concentración de sustrato. En la mayoría de los enzimas el aumento de la actividad enzimática a medida que aumenta  $[S]$  sigue una curva de tipo hiperbólico, con un tramo final asintótico en el que el enzima tiende a alcanzar su velocidad máxima  $V_{max}$  a  $[S]$  muy altas.

La constante de Michaelis ( $K_M$ ) se define como la concentración de sustrato para la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima  $V_{max}$ . Sirve pues para conocer la afinidad del enzima por el sustrato y saber la  $[S]$  mínima a la que hay que realizar los ensayos enzimáticos.

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_M}$$

La *inhibición enzimática* se define como la disminución de la velocidad de una reacción enzimática provocada por la presencia de una sustancia denominada inhibidor, que se une al enzima provocando un efecto *reversible* o *irreversible*. La inhibición *reversible* puede ser *competitiva*, *no competitiva*, *acompetitiva* o *mixta*, lo que se refleja respectivamente en un aumento de la  $K_M$ , una disminución de la  $V_{max}$ , o en efectos sobre ambos parámetros.

La constante de inhibición ( $K_i$ ) se define como:  $E + I \rightleftharpoons EI$        $K_i = [E] \cdot [I] / [EI]$

Cuando  $[E] = [EI]$ ,  $K_i = [I]$ . Así,  $K_i$  es la concentración de inhibidor necesaria para que esté unido al 50% de las moléculas de enzima, por lo que mide la afinidad del enzima por el inhibidor.

En la **inhibición competitiva**, tanto el sustrato como el inhibidor se unen al centro activo del enzima, y son mutuamente excluyentes. En presencia de un inhibidor competitivo aumenta la  $K_M^{ap}$ , pero no disminuye la  $V_{max}$ :

$$K_M^{ap} = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M^{ap} + [S]}$$

Por el contrario, en la **inhibición no competitiva** el inhibidor se une a un sitio distinto del centro activo, por lo que no compite con el sustrato por la unión. Por ello no altera la  $K_M$ , pero disminuye la  $V_{max}$ . Así, en presencia de un inhibidor no competitivo:

$$V_{max}^{ap} = V_{max} / \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad V_0 = \frac{V_{max}^{ap} [S]}{K_M + [S]}$$

#### Determinación experimental de la $K_M$ y la $V_{max}$ .

La determinación de la  $K_M$  y la  $V_{max}$  de la fosfatasa ácida para el p-nitrofenil-fosfato se realiza llevando a cabo varias reacciones en distintos tubos con una cantidad fija de enzima y en las mismas condiciones de pH (el óptimo) y temperatura (30°C), pero con diferentes concentraciones del sustrato p-nitrofenil-fosfato. Tras llevar a cabo la reacción se determina la concentración del p-nitrofenol liberado en cada caso midiendo la  $A_{430}$  en medio alcalino.

A continuación se usa la representación de Lineweaver-Burk para determinar gráficamente los puntos de corte en los ejes de abscisas y ordenadas, que dan los valores de  $-1/K_M$  y  $1/V_{max}$ , respectivamente.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

### Determinación experimental de la $K_M^{ap}$ y la $K_i$ .

La determinación de la  $K_i$  para el fosfato se realiza incubando el enzima en las condiciones anteriores, pero en presencia de una concentración constante del **inhibidor competitivo fosfato**. Una vez obtenidos los datos, se vuelve a usar la representación de Lineweaver-Burk para calcular el valor de  $-1/K_M^{ap}$ , ya que  $1/V_{max}$  debe ser el mismo.

$$\frac{1}{V_0} = \left( \frac{K_M^{ap}}{V_{max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Luego se calcula el valor de  $K_i$  con la fórmula:

$$K_M^{ap} = K_M \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

### Procedimiento.

Colocar los tubos de ensayo en la gradilla. Poner en cada tubo los siguientes reactivos:

| tubo   | agua        | p-nitrofenil-fosfato | tampón (*)  |                                       |
|--------|-------------|----------------------|-------------|---------------------------------------|
| 1      | 575 $\mu$ l | 25 $\mu$ l de 2 mM   | 200 $\mu$ l |                                       |
| 2      | 550 $\mu$ l | 50 $\mu$ l de 2 mM   | 200 $\mu$ l |                                       |
| 3      | 500 $\mu$ l | 100 $\mu$ l de 2 mM  | 200 $\mu$ l |                                       |
| 4      | 400 $\mu$ l | 200 $\mu$ l de 2 mM  | 200 $\mu$ l |                                       |
| 5      | 200 $\mu$ l | 400 $\mu$ l de 2 mM  | 200 $\mu$ l |                                       |
| 6      | 550 $\mu$ l | 50 $\mu$ l de 20 mM  | 200 $\mu$ l |                                       |
| 7      | 500 $\mu$ l | 100 $\mu$ l de 20 mM | 200 $\mu$ l |                                       |
| 8      | 400 $\mu$ l | 200 $\mu$ l de 20 mM | 200 $\mu$ l |                                       |
|        |             |                      |             |                                       |
| tubo   | agua        | p-nitrofenil-fosfato | tampón (*)  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM |
| 9      | 375 $\mu$ l | 25 $\mu$ l de 2 mM   | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l                           |
| 10     | 350 $\mu$ l | 50 $\mu$ l de 2 mM   | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l                           |
| 11     | 300 $\mu$ l | 100 $\mu$ l de 2 mM  | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l                           |
| 12     | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l de 2 mM  | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l                           |
| 13     | —           | 400 $\mu$ l de 2 mM  | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l                           |
| 14     | 350 $\mu$ l | 50 $\mu$ l de 20 mM  | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l                           |
| 15     | 300 $\mu$ l | 100 $\mu$ l de 20 mM | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l                           |
| 16     | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l de 20 mM | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l                           |
| Blanco | 600 $\mu$ l | 200 $\mu$ l de 20 mM | 200 $\mu$ l | —                                     |

(\*) Tampón acetato 0,2 M pH = 5,0, que está en la zona óptima de actividad del enzima

Seguidamente, introducir la gradilla en un baño a 30°C y añadir a cada uno de los tubos **excepto el blanco**, 200  $\mu$ l de la disolución de fosfatasa ácida 0,2 mg/ml (que contienen 0,1 U/ml de actividad enzimática), con un intervalo de 30 seg entre tubo y tubo. Agitar los tubos en el agitador, volverlos al baño e incubar durante 15 min a 30°C.

Detener la reacción en cada tubo con 3 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M (**incluido el blanco**), empezando en el mismo orden que en la etapa anterior y también con intervalos de 30 seg. Medir la A<sub>430</sub> en un colorímetro ajustado con el tubo blanco, anotando los datos correspondientes a las distintas concentraciones de p-nitrofenil-fosfato ensayadas, sin y con inhibidor.



### Resultados.

Calcular el porcentaje de inhibición ( $[A_{\text{sin I}} - A_{\text{con I}}] / A_{\text{sin I}}$ ) producida por el fosfato para cada concentración de sustrato y anotarlo en la tabla.

Representar los resultados según Michaelis-Menten, poniendo en abscisas las concentraciones iniciales (en mM) de p-nitrofenil-fosfato en la mezcla de reacción, y en ordenadas los valores de  $A_{430}$ , como medida de las velocidades de reacción  $V_0$  en las series sin y con inhibidor.

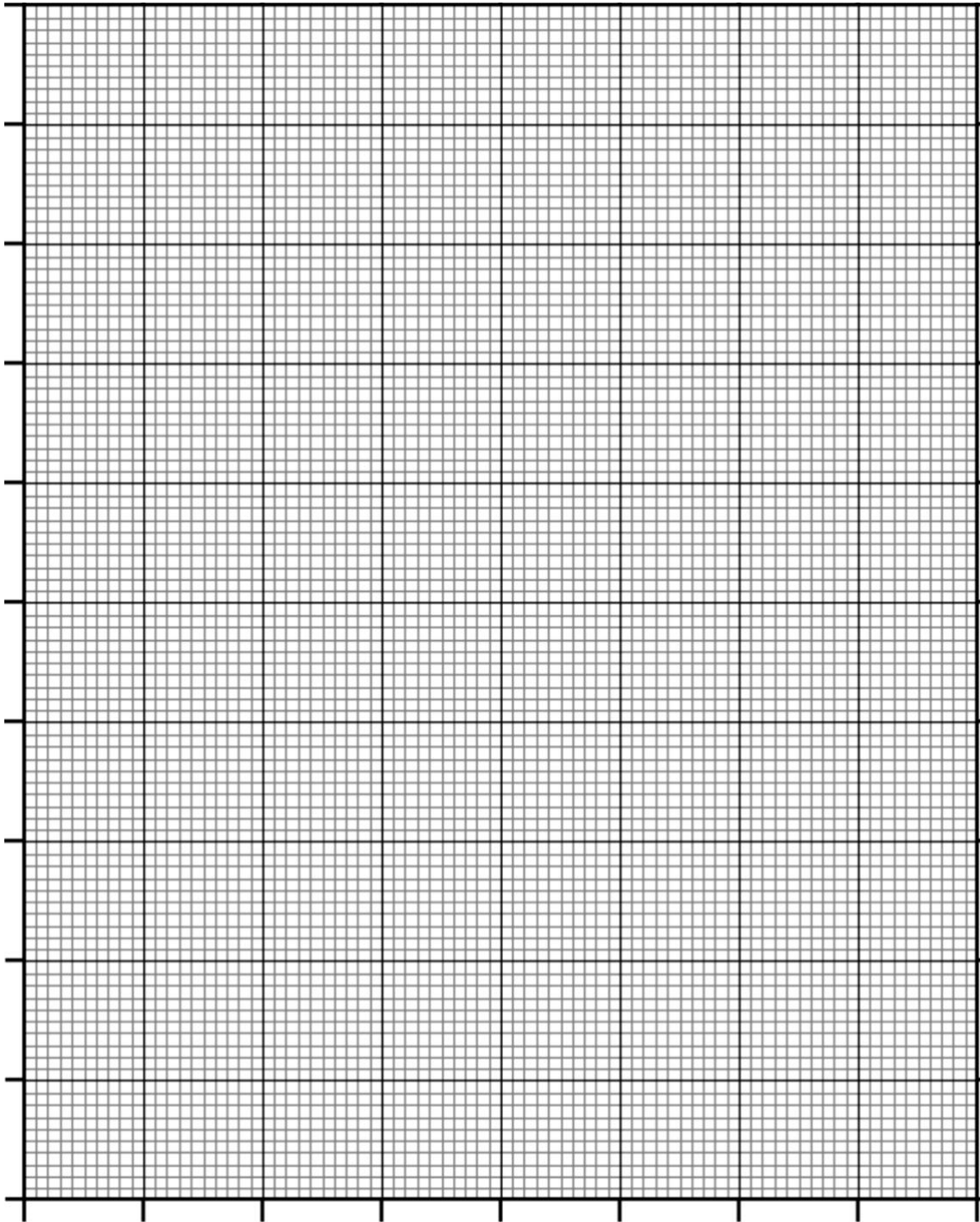
Representar los resultados según Lineweaver-Burk, con los inversos de las concentraciones en abscisas frente a los inversos de las  $A_{430}$  en ordenadas.

Calcular los valores de  $K_M$ ,  $V_{\text{max}}$ ,  $K_M^{\text{ap}}$  y  $K_i$ , a partir de los puntos de intersección con los ejes de abscisas y ordenadas obtenidos en ausencia y en presencia del inhibidor. Señalar la posición de los tres primeros en la representación de Michaelis-Menten.

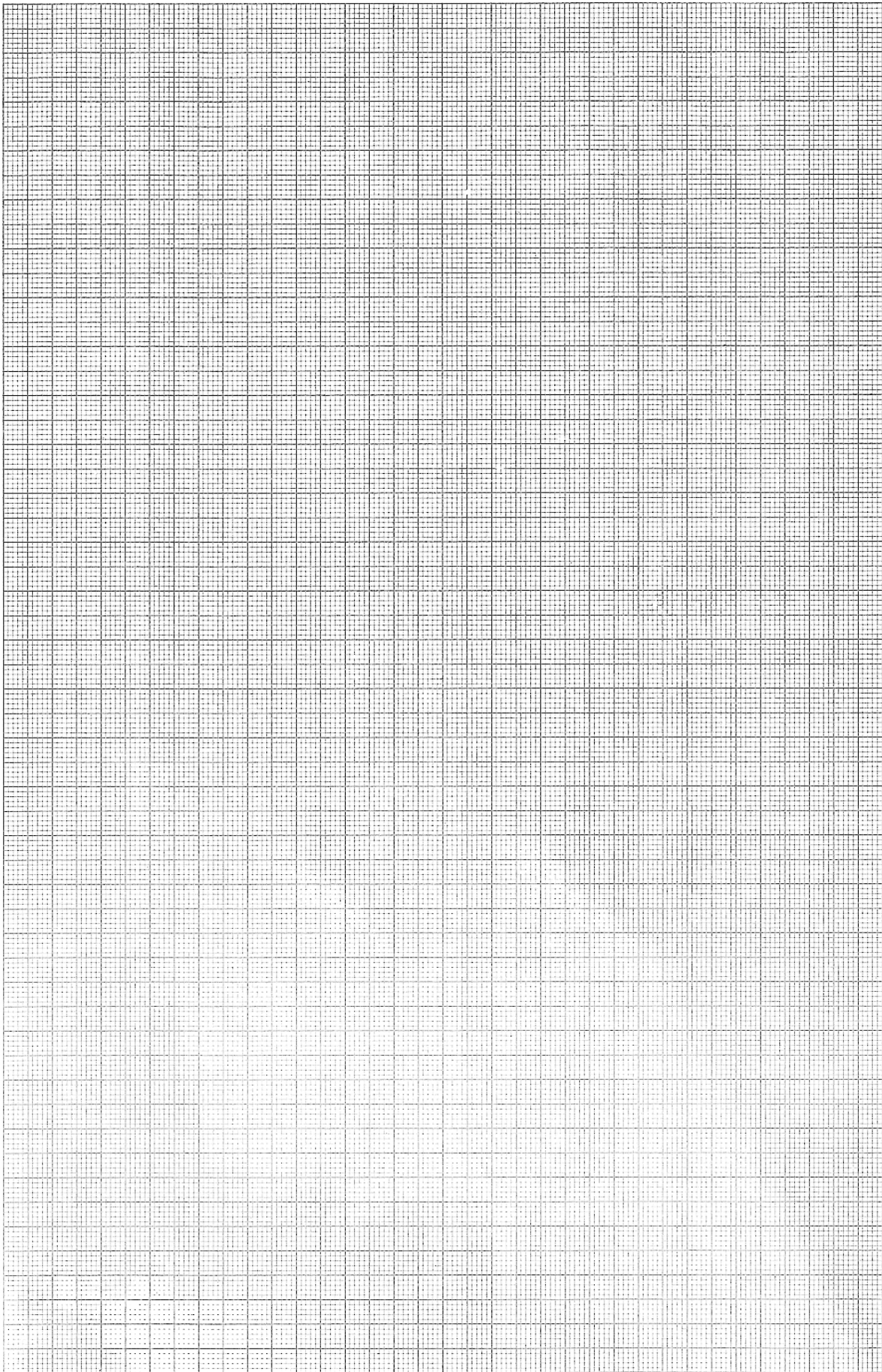
| SIN inhibidor |                   |                     |                  |                    |        |
|---------------|-------------------|---------------------|------------------|--------------------|--------|
| tubo          | [S <sub>0</sub> ] | 1/[S <sub>0</sub> ] | A <sub>430</sub> | 1/A <sub>430</sub> |        |
| 1             |                   |                     |                  |                    | —      |
| 2             |                   |                     |                  |                    | —      |
| 3             |                   |                     |                  |                    | —      |
| 4             |                   |                     |                  |                    | —      |
| 5             |                   |                     |                  |                    | —      |
| 6             |                   |                     |                  |                    | —      |
| 7             |                   |                     |                  |                    | —      |
| 8             |                   |                     |                  |                    | —      |
| CON inhibidor |                   |                     |                  |                    |        |
| tubo          | [S <sub>0</sub> ] | 1/[S <sub>0</sub> ] | A <sub>430</sub> | 1/A <sub>430</sub> | % inh. |
| 9             |                   |                     |                  |                    |        |
| 10            |                   |                     |                  |                    |        |
| 11            |                   |                     |                  |                    |        |
| 12            |                   |                     |                  |                    |        |
| 13            |                   |                     |                  |                    |        |
| 14            |                   |                     |                  |                    |        |
| 15            |                   |                     |                  |                    |        |
| 16            |                   |                     |                  |                    |        |

1. Valor de la  $K_M$  (en mM) de la fosfatasa para el p-nitrofenil-fosfato
2. Valor de  $V_{\text{max}}$  (en  $\mu\text{mol}$  de producto /  $\text{ml}\cdot\text{min} = \text{mM}/\text{min}$ ), sabiendo que  $\epsilon_{430} = 11000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
3. Valor de  $K_i$  (en mM) de la fosfatasa para el fosfato
4. Teniendo en cuenta la  $V_{\text{max}}$  y la concentración de la fosfatasa (0,2 mg/ml), calcular la actividad específica en unidades enzimáticas ( $\mu\text{moles}/\text{min}$ ) por miligramo de proteína (U/mg).

## Representación de Michaelis-Menten



**Representación de Lineweaver-Burk**



## Práctica 4.

### Purificación del DNA plasmídico de *Escherichia coli*.

#### Introducción.

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico, circulares y de pequeño tamaño, que se encuentran en muchas especies de bacterias, arqueas y levaduras, en las que se replican de forma independiente al cromosoma. A diferencia del DNA cromosómico, no son necesarios para la viabilidad general de la célula, aunque suelen contener genes de supervivencia o adaptación a condiciones especiales, como los que confieren resistencia a antibióticos o los que permiten el uso de nutrientes poco habituales.

Los plásmidos se transmiten de células madres a células hijas (transmisión vertical), pero a menudo también entre individuos compatibles entre sí, mediante el proceso de *conjugación* (t. horizontal). Este es el origen de las cepas bacterianas multirresistentes a antibióticos, que han ido incorporando, por transmisión vertical u horizontal, muchos plásmidos de resistencia. Esto supone un problema sanitario de primera magnitud y aboga por el uso responsable de los antibióticos, ya que tratamientos incompletos, así como la presencia de antibióticos en el medio ambiente, permiten seleccionar y propagar las bacterias resistentes.

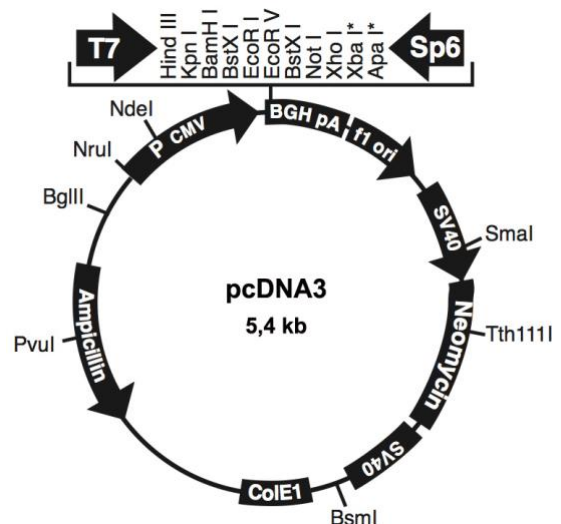
Por otra parte, la importancia de los plásmidos en Biología Molecular es enorme, porque se usan como *vectores de clonación*, es decir, como moléculas de DNA que pueden ser transferidas entre organismos y que son capaces de replicarse de forma independiente dentro de ellos, incluyendo los fragmentos exógenos de DNA que hayan sido insertados en ellas. Así, si incluimos el DNA de un gen cualquiera en un plásmido (lo que se llama *clonación del gen*), e introducimos el plásmido en bacterias en cultivo, al crecer éstas obtendremos en su interior muchas copias del plásmido con el gen de interés para su manipulación, estudio o expresión. Como sistema hospedador se suele usar una de las múltiples cepas de laboratorio de la bacteria *Escherichia coli*.

Para ser utilizado como vector de clonación en bacterias, un plásmido debe i) poseer la capacidad de replicación autónoma en ellas (para transmitirse de células madres a hijas), ii) ser lo más pequeño posible (para permitir un fácil aislamiento y manejo), iii) presentar secuencias únicas de corte por enzimas de restricción (para la inserción de fragmentos de DNA en ellos), y iv) contener marcadores genéticos selectivos, como genes de resistencia a antibióticos (para seleccionar a las células portadoras). Muchas clases de plásmidos poseen además la propiedad conocida como *replicación relajada*, lo que les permite estar presentes en un gran número de copias por célula; ello mejora mucho su productividad, y facilita su aislamiento y purificación, aspectos determinantes para su utilización como vector de clonación.

Los plásmidos naturales no cumplen todas estas condiciones, por lo que se han desarrollado múltiples *plásmidos artificiales*, combinando en una molécula pequeña características útiles procedentes de varios plásmidos naturales y cambiando algunas secuencias por mutación dirigida.

El plásmido **pcDNA3** es uno de los plásmidos artificiales que más popularidad ha alcanzado como vector de clonación. Las características más importantes de este plásmido comercial son las siguientes:

- tamaño relativamente pequeño: 5446 pb
- origen de replicación de tipo relajado para obtener múltiples copias del plásmido en cada célula
- genes de resistencia a los antibióticos ampicilina y neomicina, como marcadores genéticos de selección en bacterias y en células animales, respectivamente. Así, la presencia de ampicilina en el medio permite seleccionar las bacterias que portan este plásmido gracias a su capacidad de crecer en presencia de dicho

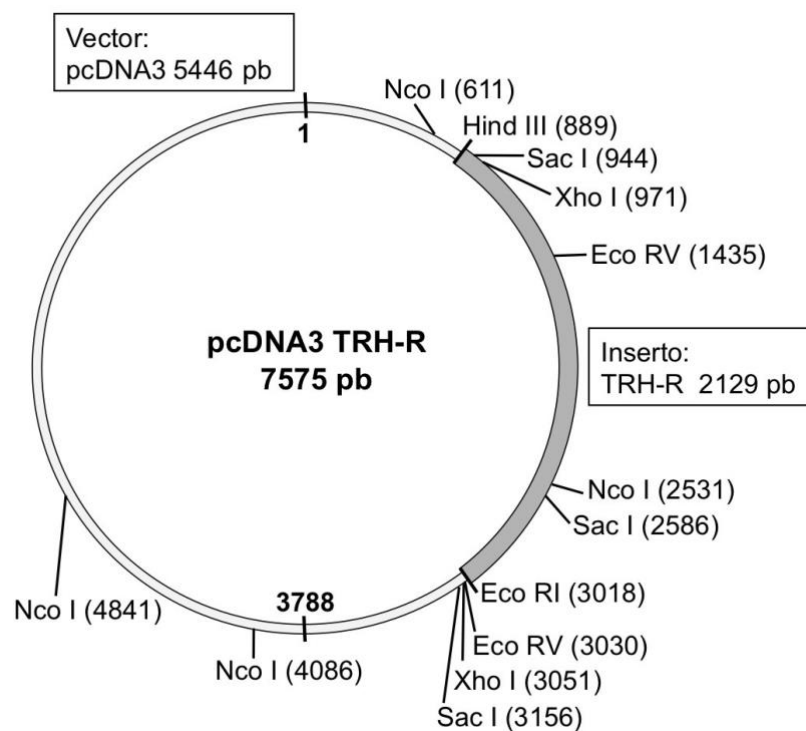


antibiótico. Si se desea expresar el plásmido en células animales, la presencia de neomicina permite seleccionar aquellas que lo portan

- sitios únicos de reconocimiento para varios enzimas de restricción agrupados en un sitio múltiple de clonación, en los que se pueden insertar fragmentos de DNA exógenos, previo corte con el enzima correspondiente y unión gracias a una ligasa

Adicionalmente, el plásmido pcDNA3 permite la expresión de genes en células animales, ya que contiene el promotor eucariota CMV, y además permite llevar a cabo la síntesis *in vitro* de RNA a partir del DNA insertado, al contener los promotores de las RNA polimerasas virales SP6 y T7, de disponibilidad comercial.

El objetivo de esta práctica consiste en la purificación del plásmido **pcDNA3-TRHR**, un derivado del vector pcDNA3 que contiene clonado entre los sitios HindIII y EcoRI un *inserto* o fragmento de DNA de 2129 pb que contiene el gen que codifica el receptor de TRH (TRH-R). El plásmido está contenido en la bacteria *Escherichia coli*, de la que se ha crecido un cultivo que se usa como material de partida.



El método con el que se llevará a cabo la purificación se denomina *lisis alcalina*, que se basa en la desestructuración de la membrana y la pared celular y la desnaturalización selectiva del DNA cromosómico mediante tratamiento con SDS y NaOH. En estas condiciones el DNA plasmídico permanece en su estructura nativa. Después de neutralizar la mezcla, el DNA cromosómico forma un precipitado insoluble, y gran parte de las proteínas y del RNA también precipitan por tratamiento con SDS y alta concentración de sales. Tras un proceso de centrifugación se descarta el precipitado y se obtiene el DNA plasmídico a partir del sobrenadante, mediante precipitación con etanol en presencia del acetato potásico, y posterior centrifugación.

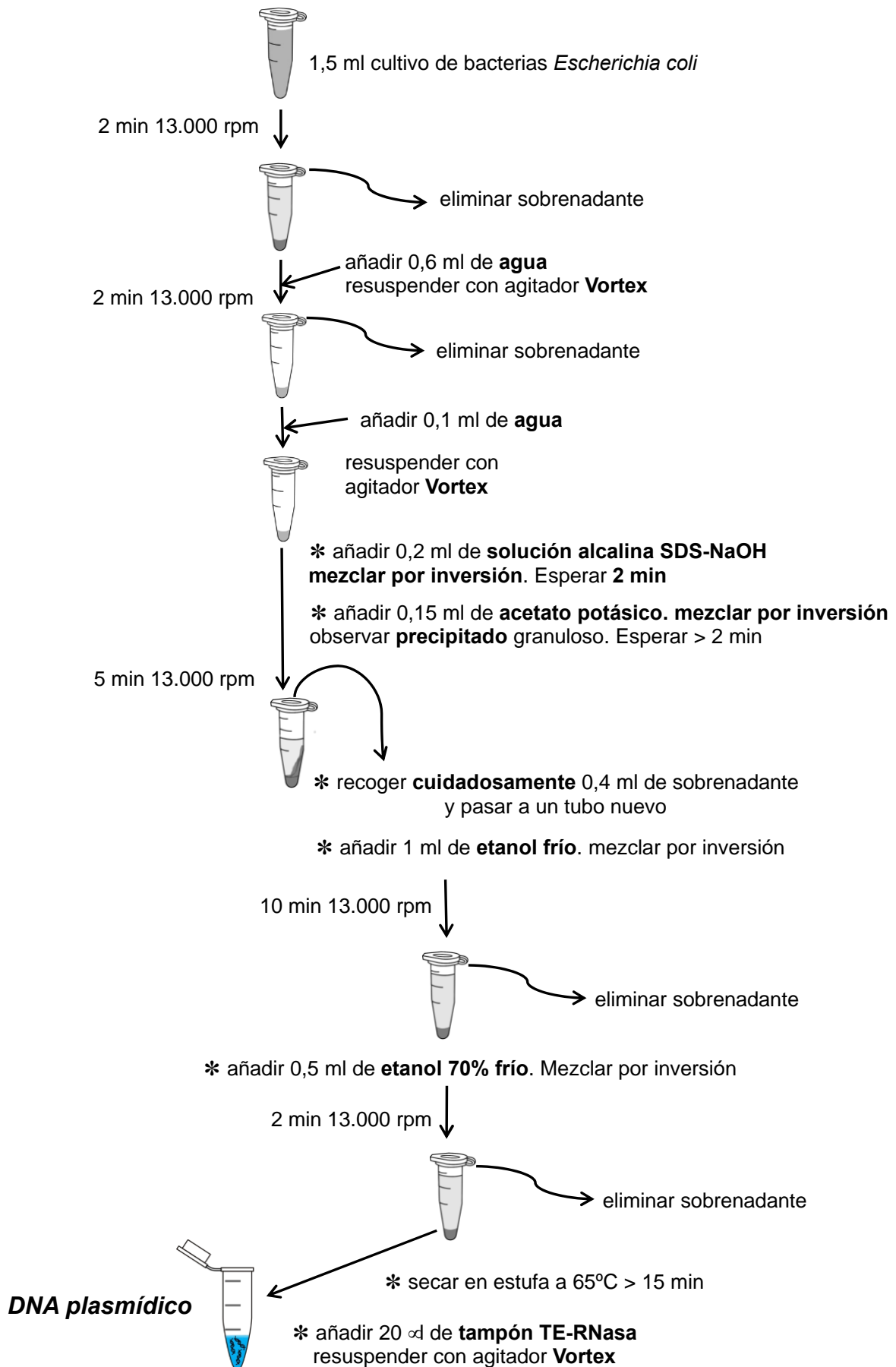
### **Procedimiento.**

El protocolo a seguir para la purificación del plásmido pcDNA3-TRHR es el siguiente:

1. Poner en un tubo eppendorf 1,5 ml de un cultivo de bacterias *Escherichia coli* sembrado el día anterior, cuyas células contienen múltiples copias del plásmido. Centrifugar dicho tubo 2 min en una microcentrífuga a 13000 rpm. A continuación, eliminar el sobrenadante con el medio de cultivo, dejando el sedimento de células lo más seco posible.
  2. Añadir 0,6 ml de agua, resuspender las células totalmente con el agitador, centrifugar 2 min y quitar el sobrenadante.
  3. Resuspender el sedimento de células en 100  $\mu$ l de agua destilada usando el agitador.
  4. Añadir al tubo 200  $\mu$ l de la *disolución alcalina* (SDS 1%, NaOH 0,2 M), que lisa las células (el SDS es un detergente que rompe la membrana bacteriana; el NaOH sirve para desnaturalizar el DNA cromosómico). Mezclar invirtiendo el tubo varias veces. La muestra debe quedar clara y viscosa. Dejarlo incubar 3 min a temperatura ambiente. Si se incuba más tiempo, parte del DNA plasmídico se desnaturaliza.
  5. Neutralizar con 150  $\mu$ l de acetato potásico 3 M, pH 5. Mezclar por inversión. Aparecerán agregados blancos al precipitar el DNA cromosómico. Incubar 2–3 min a temperatura ambiente.
  6. Centrifugar 5 min en la microcentrífuga a 13000 rpm.
  7. Pasar cuidadosamente utilizando una micropipeta (preferentemente de tipo P200) el sobrenadante (aproximadamente 400  $\mu$ l) a otro tubo eppendorf, evitando tocar el sedimento. En este sobrenadante se encuentra el DNA plasmídico.
  8. Precipitar el DNA añadiendo 1 ml de etanol absoluto frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Mezclar por inversión.
  9. Centrifugar durante 10 min a 13000 rpm.
  10. Eliminar el sobrenadante utilizando una micropipeta y evitando tocar el fondo. El plásmido se encuentra en el sedimento junto con parte del RNA bacteriano.
  11. Añadir 0,5 ml de etanol al 70% frío. Invertir el tubo para lavar los restos de sal, centrifugar 2 min a 13000 rpm y eliminar el sobrenadante.
  12. Secar los tubos con el plásmido en una estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  durante al menos 15 min. (\*)
- (\*) *Mientras tanto se prepararán los geles de agarosa que servirán para realizar la electroforesis de DNA en la Práctica 5. En ella se explica cómo se preparan.*
13. Después de secar la preparación que contiene DNA plasmídico y RNA, se añaden 20  $\mu$ l de tampón TE conteniendo 0,1 mg/ml de RNasa y se agita vigorosamente en el vórtex durante varios minutos para la resuspensión homogénea del DNA. Una vez resuspendido, tomar 10  $\mu$ l y pasarlos a un tubo nuevo para el corte con la enzima de restricción correspondiente.

### **Digestión del plásmido con enzimas de restricción.**

Se inicia la digestión del DNA con enzimas de restricción tal y como se indica en la Práctica 5, y se deja incubar en una estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta el día siguiente.



## Práctica 5.

# Digestión de DNA plasmídico con endonucleasas de restricción y visualización de los fragmentos mediante electroforesis en agarosa.

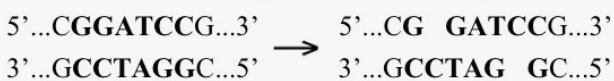
### Introducción.

Una enzima o endonucleasa de restricción es aquella que reconoce una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de DNA, llamada *sitio o diana de restricción*, y corta ambas hebras dentro de él (de ahí que sean endonucleasas). Los sitios de restricción suelen tener 4-8 pares de bases (o más), aunque lo más frecuente es que sean seis.

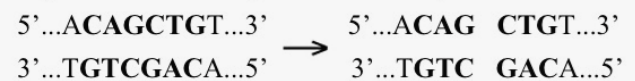
Las enzimas de restricción se encuentran de forma natural en bacterias y arqueas, donde proporcionan un mecanismo de defensa contra DNAs exógenos invasores, normalmente virus. Para ello cortan de forma selectiva el DNA extraño en el proceso llamado *restricción*, mientras que el DNA del huésped está protegido gracias a la acción de un enzima metiltransferasa de *modificación*, que metila bases específicas del DNA propio y bloquea la restricción. Juntos, estos dos procesos forman el *sistema de restricción-modificación*.

El mecanismo del corte de ADN se realiza a través de la ruptura de dos enlaces fosfodiéster en la doble hebra, lo que da lugar a dos extremos de DNA. Éstos pueden ser *cohesivos* (cuando sobresale un trozo de cadena sencilla) o *romos* (cuando los enlaces rotos coinciden).

Digestión con BamHI (extremos cohesivos):



Digestión con PvuII (extremos romos):



Se han identificado y estudiado más de 3.000 enzimas de restricción y sus secuencias diana, y unas 800 de ellas se han clonado y están disponibles comercialmente. Se denominan con las iniciales del nombre de la especie y cepa de la que provienen y un número de orden. P.e. *EcoRI* es el primer (I) enzima aislado de la cepa RY13 de la bacteria *Escherichia coli*. Estas enzimas se utilizan habitualmente para el corte de fragmentos de DNA en los laboratorios, y son una herramienta básica en la clonación molecular y otros procesos de Biología Molecular.

Dos fragmentos de restricción de DNAs de distinta procedencia pueden ser unidos a voluntad cuando se ponen en una mezcla de reacción gracias a la acción de un enzima llamado *ligasa*, que forma enlaces fosfodiéster entre hebras de DNA. Para ello tienen que haber sido cortados con el mismo enzima de restricción y tener extremos cohesivos complementarios, o bien tener extremos romos (en este caso la ligación es más difícil). En la práctica esto se traduce en la posibilidad de obtener moléculas de DNA recombinantes o híbridas, lo que constituye la base de la *tecnología del DNA recombinante* y la *clonación génica*, al poder insertar fragmentos de DNA con genes de interés en vectores de clonación.

Otro de los campos en los que las enzimas de restricción son esenciales es el diagnóstico de enfermedades genéticas relacionadas con cambios en la secuencia del DNA, ya sean mutaciones puntuales, inserciones o deleciones. Estas pueden afectar a uno o más sitios de restricción, aumentando o disminuyendo el tamaño de los fragmentos que generan, o incluso eliminando o agregando sitios de corte. El procedimiento para el diagnóstico consiste en amplificar por PCR (*reacción en cadena de la polimerasa*) una región concreta del DNA del cromosoma donde se conozca o sospeche un cambio genético, e incubar con una o más enzimas de restricción para que corten en sus sitios diana. Al analizar electroforéticamente los resultados obtenidos de una persona normal y una afectada se observan distintos patrones de fragmentos para cada caso.

Este tipo de análisis también se usa para el análisis de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), pequeñas diferencias individuales que se dan de forma natural en las secuencias de bases de un gen o un fragmento cromosómico, y que permiten realizar distintas pruebas genéticas, p.e. de paternidad.

En nuestro caso realizaremos un *mapa de restricción* del plásmido, en el que se muestra éste linearizado, sobre el que se indican los sitios de restricción de las enzimas de interés.



**El objetivo de esta práctica consiste en la digestión con endonucleasas de restricción del plásmido pcDNA3-TRHR obtenido el día anterior y el análisis de los fragmentos generados mediante electroforesis en geles de agarosa, indicando su posición en un mapa de restricción.**

El DNA y el RNA son cadenas polinucleotídicas con una carga negativa en cada nucleótido debido a la presencia de los grupos fosfato ( $pK_a = 2,12$ ). El método de separación de moléculas o fragmentos de DNA se basa en que, a pH neutro o alcalino, estos grupos fosfato confieren a la molécula una fuerte carga negativa, que además está uniformemente distribuída y proporciona la misma relación carga/masa (o densidad de carga) a todas las moléculas, por lo que tienen una carga proporcional a su longitud o Pmol.

La electroforesis de DNA se suele llevar a cabo en geles de agarosa, un soporte restrictivo para la movilidad de los ácidos nucleicos. La agarosa es un polisacárido lineal formado por repeticiones de agarobiosa, que a su vez consiste en unidades alternas de galactosa y anhidrogalactosa. Los geles se forman calentando la agarosa en un tampón acuoso y dejando enfriar la solución resultante. La formación y propiedades del gel se deben al establecimiento de puentes de H entre las grandes cadenas de agarosa.

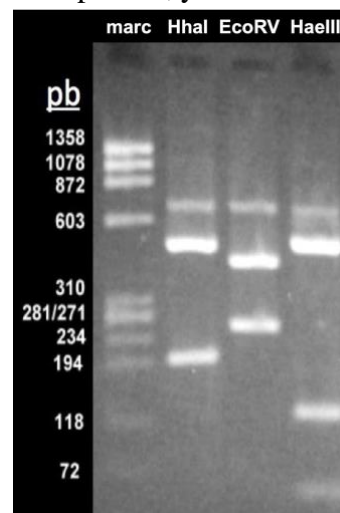
Estos geles permiten la separación de fragmentos de DNA desde aproximadamente 500 hasta 50.000 pares de bases (0,5-50 kpb o kb), lo que cubre el rango de tamaños más habitualmente usados en Biología Molecular. En todo caso, dependiendo del rango de tamaños que se desea separar se usan distintas concentraciones de agarosa, que proporcionan distinto grado de reticulación o tamaño de poro. Para separar fragmentos más pequeños (entre 10 y 500 pb) se suelen usar geles de *poliacrilamida*.

| agarosa [%] | tamaños (Kb) |
|-------------|--------------|
| 0,3         | 5 - 60       |
| 0,6         | 1 - 20       |
| 0,7         | 0,8 - 10,0   |
| 0,9         | 0,5 - 7,0    |
| 1,2         | 0,4 - 6,0    |
| 1,5         | 0,2 - 3,0    |
| 2,0         | 0,1 - 2,0    |

Puesto que la densidad de carga es igual en todas las moléculas de DNA, al separar una mezcla de ellas en una electroforesis en agarosa, el efecto de tamizado molecular determina la movilidad de cada molécula de forma proporcional a su longitud. Las diferencias de movilidad entre ellas serán debidas exclusivamente a su tamaño y las moléculas mayores tendrán más dificultad para atravesar los poros del gel que las más pequeñas, lo que permite separarlas. Dentro de cierto rango de tamaños, la movilidad electroforética de un fragmento de DNA en un gel de agarosa es inversamente proporcional al logaritmo de su longitud o Pmol. Gracias a esto, utilizando una mezcla de marcadores de DNA de tamaños conocidos, se puede obtener una recta patrón y se podrán calcular las longitudes de fragmentos de DNA problema, p.e. los obtenidos al digerir un plásmido con enzimas de restricción.

La electroforesis en agarosa se realiza en geles horizontales sumergidos totalmente en tampón, en el que se han preparado con un *peine* una serie de calles donde introducir las muestras a analizar (ver figura en la página siguiente). A las muestras con DNA se les añade un tampón que contiene un agente densificante como el glicerol, que permite a la muestra caer al fondo del pocillo, y un colorante como el azul de bromofenol, que permite ver la muestra durante la aplicación. Además, el azul de bromofenol actúa como marcador del frente de avance de la electroforesis, ya que tiene carga negativa y alta movilidad, migrando como si fuera un DNA de pocos nucleótidos. Siempre se incluye en una de las calles del gel una mezcla de marcadores de tamaño conocido para tener referencias de tamaño y si es preciso dibujar una recta patrón.

El método habitual para visualizar los ácidos nucleicos es la detección con el compuesto fluorescente *GelGreen*, que se añade al gel de agarosa durante su preparación. Este compuesto se une al DNA y permite detectar a simple vista bandas de DNA de hasta 0,1 ng. Como las bandas de DNA sólo son visibles mientras están expuestas a un sistema de iluminación, es necesario fotografiar la imagen para tenerla de forma permanente. Por otra parte, los geles pueden ser usados con



fines preparativos, puesto que la porción de gel que contiene el fragmento o banda de interés puede ser recortada y el DNA extraído de la agarosa.

## Procedimiento.

### Digestión con endonucleasas de restricción.

La reacción se lleva a cabo en tubos eppendorf. Añadir a un tubo:

- 10  $\mu$ l de la disolución de DNA plasmídico pcDNA3-TRHR de la Práctica 4.
- 10  $\mu$ l de una mezcla que contiene agua destilada, el tampón adecuado y un enzima de restricción (*HindIII*, *XhoI*, *EcoRV* o *SacI*) en proporción 7:2:1, respectivamente.

Mezclar suavemente golpeando el tubo con el dedo e incubar en un baño a 37°C durante al menos dos horas (puede hacerse dejarse incubando durante la noche).

Una vez digeridas las muestras de DNA, y antes de cargarlas en el gel, añadir a cada una 5  $\mu$ l de *tampón de la muestra*. Esta disolución contiene glicerol y azul de bromofenol.

### Preparación del gel y electroforesis.

El gel que se utiliza es de agarosa al 1 % en tampón TBE (Tris 50 mM, ácido bórico 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Para cada gel, pesar 0,75 g de agarosa, y ponerla en un erlenmeyer. Añadir 75 ml de tampón TBE, tapar con un erlenmeyer pequeño invertido y fundir en un horno microondas, sacándolo y agitándolo cada poco para que no hierva.

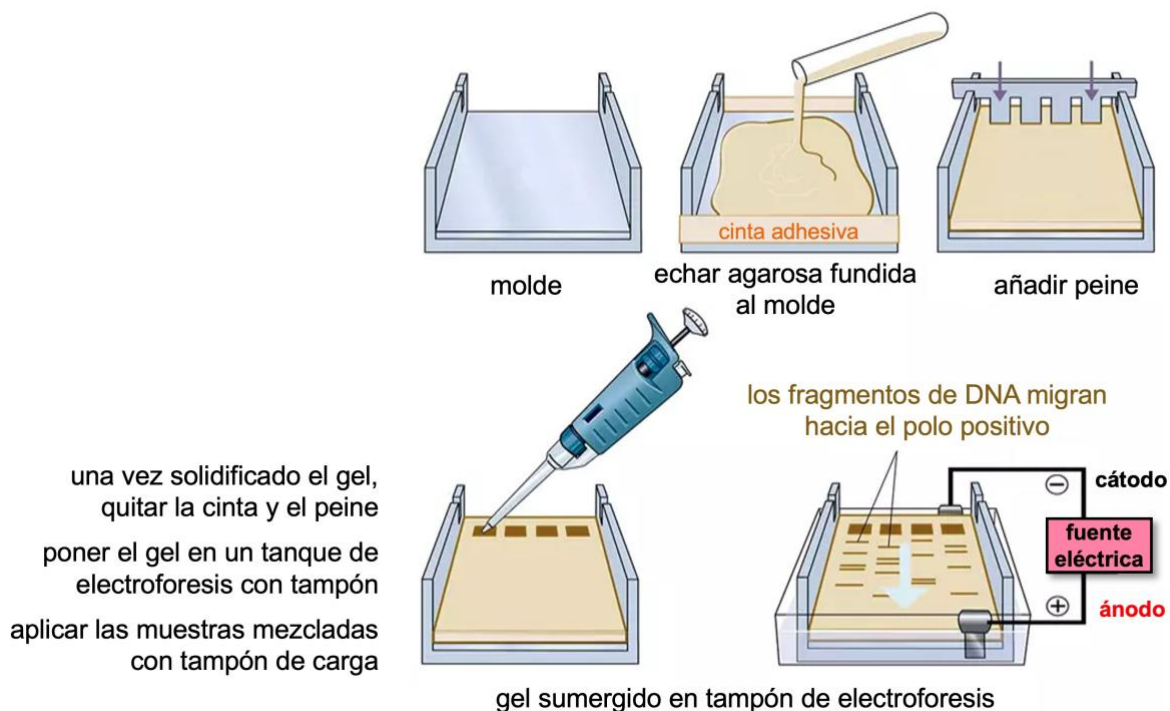
Cuando enfríe un poco, añadir 7,5  $\mu$ l de la solución *GelGreen* (dilución 1/10000).

Mientras, limpiar con etanol un molde y cerrarlo por los lados con cinta adhesiva. Verter la mezcla en el molde y colocar el peine cerca (~ 1 cm) de uno de sus bordes, de forma que quede paralelo al mismo. Dejar que la agarosa solidifique sin mover el molde.

Una vez solidificado el gel, retirar el peine con cuidado y verificar que los pocillos formados no tengan el fondo roto. Retirar las cintas adhesivas. Si no se va a utilizar el gel hasta el día siguiente, envolverlo en un plástico y dejarlo en la nevera. Usar guantes.

Colocar cuidadosamente cada muestra en un pocillo del gel usando una micropipeta. Reservar un pocillo para colocar la muestra de patrones con los fragmentos de DNA de tamaños conocidos.

Finalmente, conectar los electrodos del aparato a la fuente de alimentación, aplicando un voltaje constante de ~ 80 V durante 2-3 horas.



Tras el corrido, se coloca cada gel sobre un transiluminador que emita radiación ultravioleta o visible intensa. Protegidos con una pantalla se pueden visualizar los geles durante unos segundos. Posteriormente se obtiene la imagen con un sistema fotográfico.

**Resultados.**

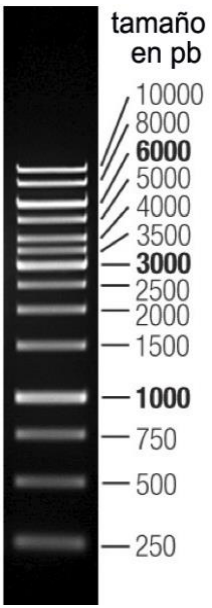
**Determinación del tamaño de los fragmentos de DNA.**

Mientras corre el gel, usar una fotografía de un gel anterior ya teñido para medir la distancia recorrida por las bandas de DNA, desde el centro del pocillo hasta la banda, tanto de las muestras cortadas con los distintos enzimas de restricción, como de cada uno de los patrones de tamaño.

Representar gráficamente las distancias migradas por las bandas de DNA patrón frente al logaritmo de su tamaño en pares de bases. Trazada la recta patrón, interpolar las distancias migradas por las bandas de DNA problema para estimar su tamaño.

**DNA patrón:  
GeneRuler™ 1 kb Ladder**

| tamaño (pb) | distancia (mm) |
|-------------|----------------|
|             |                |
|             |                |
|             |                |
|             |                |
|             |                |
|             |                |
|             |                |
|             |                |
|             |                |
|             |                |
|             |                |
|             |                |
|             |                |
|             |                |
|             |                |
|             |                |
|             |                |



**Fragmentos de pcDNA3-TRHR**

|                | distancia (mm) | tamaño calculado | tamaño teórico |
|----------------|----------------|------------------|----------------|
| <b>HindIII</b> |                |                  |                |
| <b>XhoI</b>    |                |                  |                |
| <b>EcoRV</b>   |                |                  |                |
| <b>SacI</b>    |                |                  |                |
|                |                |                  |                |
|                |                |                  |                |

**Partiendo del mapa circular y los sitios de restricción del plásmido pcDNA3-TRHR (pag. 21), calcular el tamaño de los fragmentos que se obtendrían cortando con XhoI, EcoRV o SacI, y HindIII en cada caso. Dibujar el mapa de restricción del plásmido linearizado con Hind III, indicando el tamaño de los fragmentos.**

**Cálculo de los tamaños de los fragmentos de pcDNA3-TRHR usando como patrones los marcadores de GeneRuler**

