

Pràctica Genètica OBC 2014

1. INTRODUCCIÓ

Una de les metodologies més comunes emprades als laboratoris de Genètica Molecular és la digestió de fragments de DNA amb enzims de restricció (ER).

Els ERs són produïts de manera natural a les bactèries i la seua funció és reconèixer específicament petites regions de l'ADN –entre 4 i 8 nucleòtids- i catalitzar talls en la doble cadena. Un exemple seria l'enzim *EcoRI*, un ER aïllat del bacteri *Escherichia coli* i que reconeix una seqüència específica de 6 nucleòtids (GAATTC).

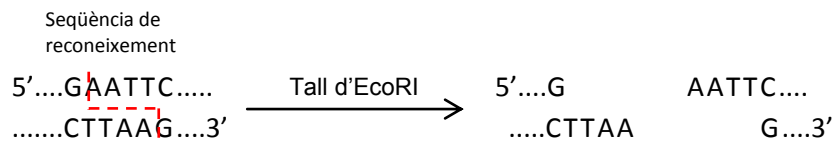


Figura 1. *EcoRI* catalitza el tall d'un lloc de reconeixement palindròmic. El tall genera dos fragments amb extrems 5' cohesius.

També és una pràctica habitual analitzar fragments de DNA per digestió (tall) amb els ERs; la localització de les seqüències diana dels diferents ER en un fragment d'ADN es coneix com a mapa de restricció. Una de les aproximacions per dur a terme un mapa de restricció és introduir el fragment d'ADN a analitzar dins d'un plasmidi de seqüència coneguda, fer les digestions amb diferents ERs i, finalment, separar els fragments mitjançant una electroforesi (separació de molècules en un camp elèctric a través d'una matriu) per esbrinar la mida de cadascun dels fragments obtinguts. A partir de les mides dels diferents fragments de les digestions resolts en el gel es pot deduir quina és la posició de cadascun dels llocs de reconeixement dels diferents ERs utilitzats en el fragment de ADN a analitzar.

Hem comentat que una de les opcions és introduir el fragment d'ADN en un plasmidi. Un plasmidi és una molècula circular d'ADN de doble cadena que existeix de manera natural als bacteris. Ara bé, els investigadors han utilitzat aquest plasmidis naturals com a base per "dissenyar" plasmidis per enginyeria genètica amb certes característiques que els optimitzen per a treballar amb ells. Una d'aquestes característiques és que contenen un lloc de clonatge múltiple (**Multiple Cloning Site** o *polylinker*). Aquesta és una petita regió del plasmidi que conté els llocs de reconeixement de diferents enzims de restricció. A més, aquests llocs són únics al plasmidi. Per a la introducció de l'ADN d'interès dins del plasmidi, es digereixen insert i plasmidi amb el mateix enzim de restricció i després s'uneixen per l'acció d'un altre enzim anomenat

l·ligasa. Aquest procés seguit de la producció en grans quantitats del plasmidi recombinant dins dels bacteris s'anomena clonació.

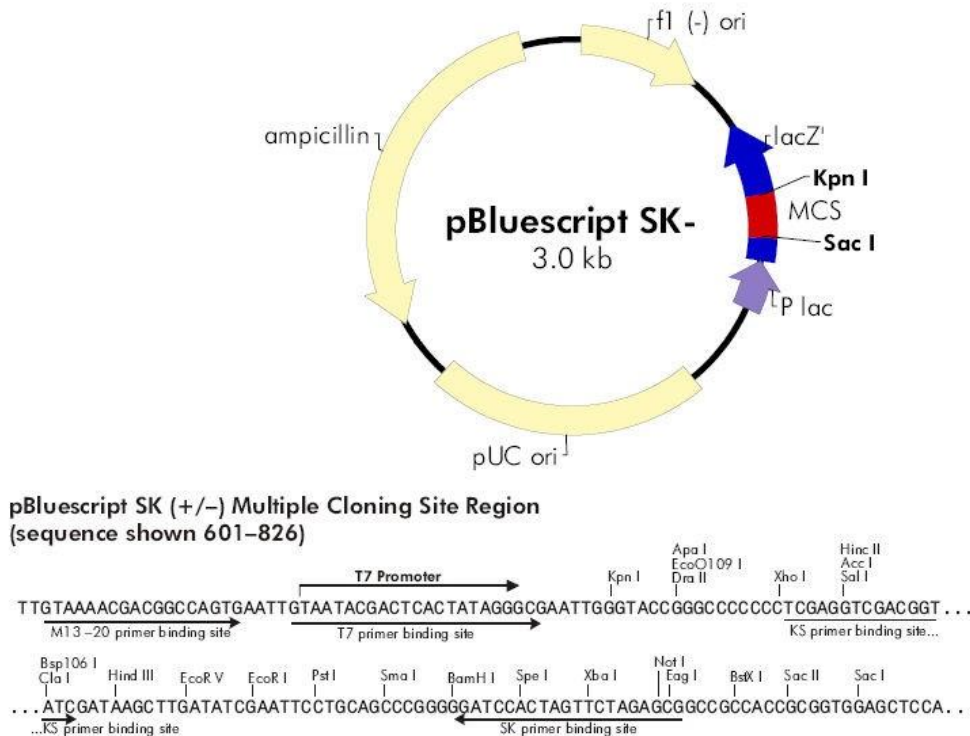
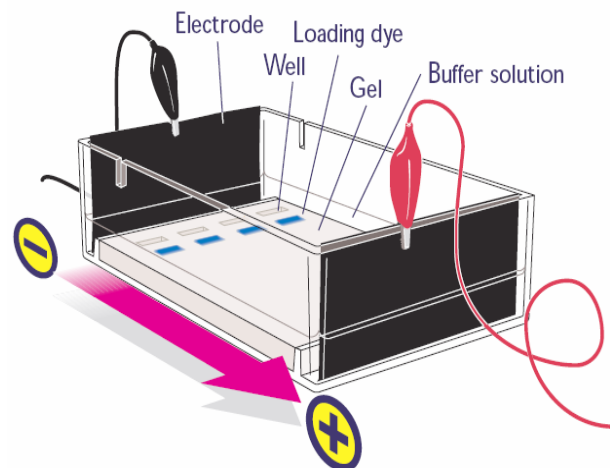


Figura 2. Representació del plasmidi pBLUESCRIPT, junt amb la seqüència del MCS.

També hem esmentat l'electroforesi com una tècnica per esbrinar les mides dels diferents fragments d'ADN. En concret, l'electroforesi en gels d'agarosa -un polímer aïllat de les algues- és el mètode usat habitualment per a la separació, identificació i purificació de fragments de DNA. El DNA en solució està carregat negativament i en aplicar un camp elèctric migra cap a l'elèctrode positiu. Si fem migrar els àcids nucleics dins una matriu d'agarosa, se separen segons el seu pes molecular, de forma que els fragments més petits migraran més ràpidament.

Normalment, els gels d'agarosa es preparen en una cubeta horitzontal, que se submergeix en un tampó ric en sals (com ara el TBE), que manté eficaçment de forma perllongada el camp elèctric.



A les mostres, se'ls afegeix un tampó de càrrega amb un agent espessidor per facilitar-ne la càrrega en uns clots o "pous" del gel a més d'un colorant per visualitzar el front de l'electroforesi.

Un cop han migrat per acció del camp elèctric, els àcids nucleics es poden visualitzar en el gel per tinció amb diversos agents que s'intercalen dins la molècula.

Figura 3. Muntatge d'una electroforesi

2. PROBLEMA

Al laboratori hem clonat un fragment d'ADN de la mosca *Drosophila melanogaster* de 7,5 Kb en el plasmidi pBLUESCRIPT (figura 2) al lloc *BamHI* del MCS. Ens interessa poder localitzar les dianes de 3 enzims de restricció: *EcoRI*, *Sall* i *PstI*. Per aconseguir-ho, haureu de fer una digestió amb els diferents enzims en el plasmidi recombinant que conté l'insert i comparar-ne la mida amb la que s'obté d'un plasmidi sense insert (control). La separació dels fragments per mida es realitza mitjançant una electroforesi. Per últim, es visualitzarà la posició dels fragments de DNA mitjançant un agent intercalant després de la il·luminació amb llum UV.

2.1. Digestió

A partir dels dos plasmidis que se us han facilitat, procedireu a fer diferents digestions amb enzims de restricció. Això ens permetrà identificar les dianes per als enzims de restricció emprats i les mides dels fragments produïts per l'insert desconegut clonat en el plasmidi pBLUESCRIPT.

Cadascú durà a terme les següents reaccions:

pBLUESCRIPT recombinant (amb insert)

pBLUESCRIPT salvatge (buit)

- 1- *BamHI*
- 2- *Sall*
- 3- *PstI*
- 4- *EcoRI*
- 5- *EcoRI* + *BamHI*
- 6- *EcoRI* + *PstI*
- 7- *Sall* + *PstI*

- 8- *BamHI*

Protocol de digestió amb enzims de restricció

Tot el material haurà estat autoclavat prèviament per eliminar-ne les nucleases i evitar la degradació dels àcids nucleics.

- 1- Se us facilitaran 8 tubs eppendorf retolats de l'1 al 8 i en cadascun estaran fetes les mescles dels enzims amb els tampons adients per a dur a terme les digestions (volum de 16 µl).
- 2- Afegiu-hi:
 - tubs de l'1 al 7: 4 µl del plasmidi pBLUESCRIPT recombinant (amb insert)
 - tub 8: 4 µl del plasmidi pBLUESCRIPT buit (sense insert)
- 3- Incubeu 1h a 37°C

2.2. Electroforesi



Mentre les digestions estan en marxa, es moment d'anar preparant l'electroforesi

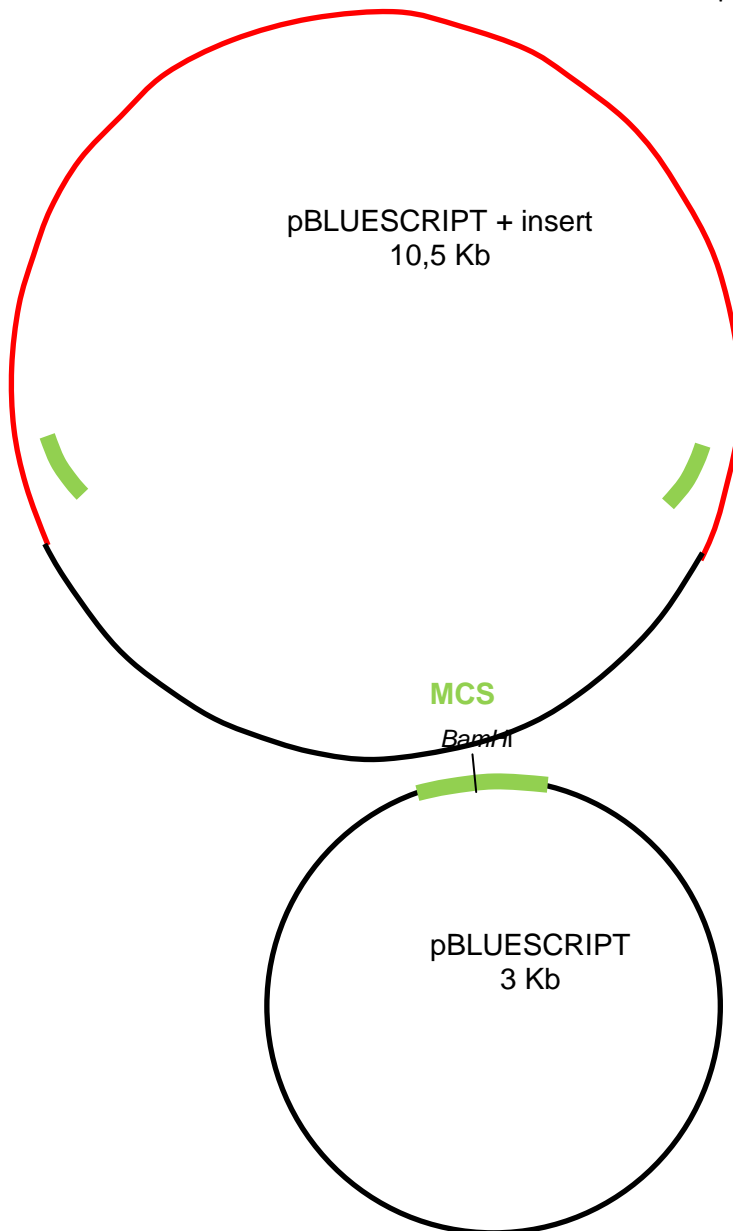
Protocol d'electroforesi en gel d'agarosa:

1. Prepareu 800 ml de tampó TBE 0,5x a partir d'una solució 5x concentrada
2. Peseu a la balança l'agarosa que cal per preparar un gel de 100 ml al 1% (pes/volum). Barregeu l'agarosa pesada amb 100 ml de tampó TBE 0,5x preparat dins d'un erlenmeyer.
3. Escalfeu-ho al microones fins a fondre l'agarosa (1 minut a màxima potència). *ATENCIÓ: Feu servir l'agafador de silicona per a no cremar-vos i aneu amb compte de no esquitjar-vos amb l'agarosa bullint. Per saber si està completament fosa sempre es mira a través de l'erlenmeyer i no per la boca del matràs.*
Barregeu circularment la solució i feu-la bullir uns segons més, fins que sigui transparent i no contingui grumolls.
4. Deixeu refredar la solució d'agarosa a sobre de la bancada uns 5 minuts.
5. Agafeu un suport de metacrilat i una pinta i segelleu el suport amb cinta de pintor per a preparar la cubeta on solidificareu el gel.
6. Un cop passat els 5 minuts, afegiu-hi 2 µl de l'agent intercalant *Sybrsafe* i remeneu-ho. *ATENCIÓ: Manipuleu amb guants l'agent intercalant Sybrsafe, encara que presenta molt baixa toxicitat.*
7. Aboqueu l'agarosa al suport, col·loqueu-hi la pinta en un extrem per a crear els pouets i deixeu-ho refredar fins que gelifiqui (uns 5-10 minuts).
8. Ompliu una de les cubetes d'electroforesi amb la resta de TBE 0,5x preparat.
9. Traieu amb cura la cinta i la pinta dels gels i submergiu-lo en la cubeta d'electroforesi.
10. Un cop transcorregut el temps de les digestions, heu de preparar les mostres per la seua càrrega en el gel d'electroforesi. Per preparar-les, afegiu-hi 4 µl de tampó de càrrega 6X (aquest és de color blau).
11. Carregueu en els gels les 8 digestions i carregueu també 10 µl de marcador de pes molecular.
12. Connecteu la cubeta al corrent elèctric i deixeu migrar les mostres uns 45 minuts a 110 V o fins que el colorant blau més ràpid arribi a 2/3 parts del gel.

13. Traieu els gels de la cubeta amb guants. Observeu-los en el trans-il·luminador de llum ultraviolada i feu-ne una fotografia.

3. Mapa de restricció

Un cop obtinguda la foto hem de fer el mapa de restricció. El primer pas es mesurar els diferents fragments d'ADN digerits en la foto. Un cop esbrinades les mides, hem de col·locar la posició dels llocs de reconeixement dels diferents enzims de restricció sobre el mapa del plasmidi.



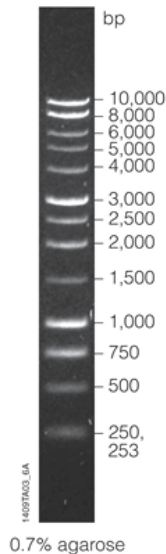
4. Glossari

- ER: enzim de restricció
- Plasmidi: DNA circular de doble cadena
- MCS: regió petita d'un plasmidi que conté les seqüències de reconeixement de diferents enzims de restricció
- Clonar: introducció d'un ADN d'interès en un plasmidi

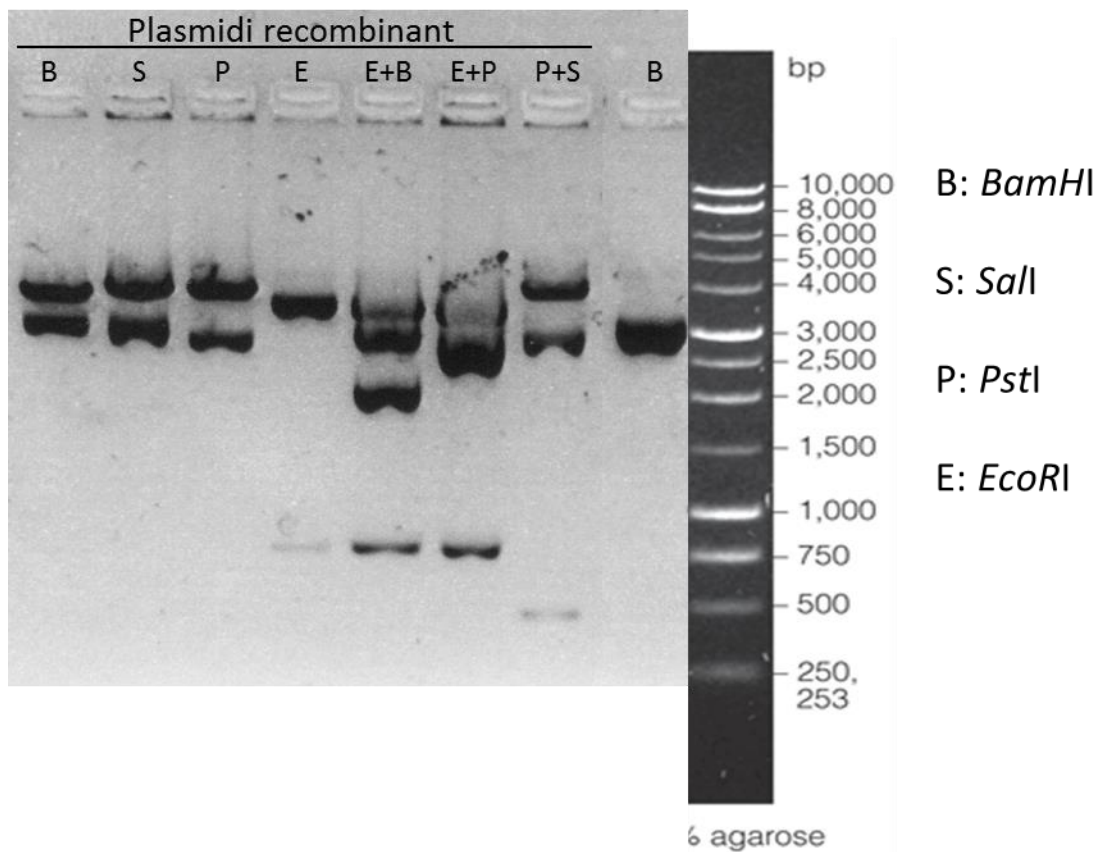
5. Annex

A) Marcador de mida d'ADN

Com a marcador de mida del DNA s'utilitza el marcador de 1 kilobase que es mostra a continuació:



B) Imatge d'un resultat obtingut amb un plasmidi similar:



Test (recapitulació):

1. Els enzims de restricció tallen en:
 - a. Qualsevol regió de l'ADN
 - b. En regions específiques únicament de l'ADN bacterià
 - c. Generalment en regions palindròmiques de l'ADN
 - d. En una única cadena de l'ADN
2. L'agent (reactiu) que utilitzem per visualitzar l'ADN en una electroforesi és:
 - a. un agent intercalant
 - b. l'agarosa
 - c. el TBE
 - d. un agent gelificant
3. En una electroforesi els àcids nucleics:
 - a. Es separen segons la mida i la càrrega quan apliquem un camp elèctric
 - b. Es separen segons la mida quan apliquem un camp elèctric
 - c. Es separen inversament proporcionals a la seva càrrega
 - d. Es separen per l'acció de l'agarosa

4. Vols fer un gel d'agarosa en TBEx1 de 50 ml a l'1%. Necessitaràs:
- 5 gr d'agarosa, 5 ml de TBEx10 i 50 ml d'aigua
 - 0,45 gr d'agarosa, 5 ml de TBEx10 i 50 ml d'aigua
 - 0,5 gr d'agarosa, 5 ml de TBEx10 i 50 ml d'aigua
 - 0,5 gr d'agarosa, 5 ml de TBEx10 i 45 ml d'aigua