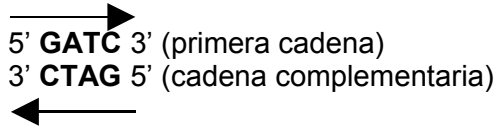
	Guía Unificada de Laboratorios	Código	GLA-01 V. 00
		Página	2 de 1

AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA

Un ejemplo de una secuencia palindrómica es el siguiente:



Como puede observarse, la primera cadena en dirección 5' a 3' se lee **GATC** y la cadena complementaria en dirección 5' a 3' también se lee **GATC**, haciendo referencia al material genético esto corresponde a una secuencia palindrómica. Cada enzima de restricción reconoce su propia secuencia palindrómica. Entre más corta sea la secuencia palindrómica mayor número de sitios de corte habrá para esa enzima de restricción y viceversa.

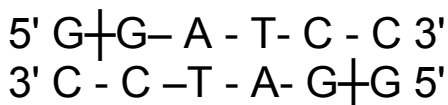
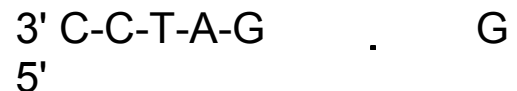
Para un determinado segmento de material genético se puede establecer la localización y número de secuencias palindrómicas reconocidas por una o varias enzimas de restricción. Esta información produce los denominados "mapas de restricción". Mapa del plásmido pUC19, ver gráfico de la página anterior.

El nombre de una enzima de restricción se deriva de la bacteria en la cual fue encontrada, por ejemplo, EcoRI, corresponde a una enzima encontrada en *Escherichia coli*, HindIII, corresponde a una enzima aislada de *Haemophilus influenzae* y Sau3A1 corresponde a una enzima de *Staphylococcus aureus*. Actualmente se conocen cientos enzimas de restricción.

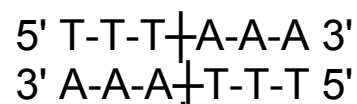
El sistema se denomina restricción y metilación porque en el DNA de la bacteria también se encuentran las secuencias palindrómicas, pero no pueden ser reconocidas ni cortadas por la enzima de restricción debido a que alguna de las bases de la secuencia está metilada. A través de la metilación el DNA bacteriano es protegido de la degradación y solo son destruidas las secuencias no metiladas.


Al cortar el DNA una enzima de puede producir extremos romos o extremos pegajosos (cohesivos) en los fragmentos de DNA que se producen. Ejemplos:

BamHI produce extremos cohesivos.



DraI produce extremos romos:



	Guía Unificada de Laboratorios	Código	GLA-01 V. 00
		Página	3 de 1

AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA

5' T-T-T . A-A-A 3'
3' A-A-A . T-T-T 5'

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	GLA-01 V. 00
		Página	4 de 1

La re-asociación de DNA con extremos cohesivos es más probable y por lo tanto más fácil, pero exige que los dos DNA que se quieren unir sean cortados con la misma enzima o que al cortar dejen los mismos extremos; la re-asociación con extremos romos es menos probable y por tanto más difícil, aunque permite unir DNA cortado con diversas enzimas que dejen extremos romos.

Una vez descubierto, caracterizado y aislado este sistema natural de restricción-metilación se convirtió en el eje para el desarrollo del DNA recombinante y muchas otras aplicaciones. Recombinante porque permitió la mezcla de DNA de diferentes fuentes, permite unir DNA de diversos orígenes. Principalmente uniéndolos a través de los extremos cohesivos.

En esta práctica podremos ver efecto de la enzima de restricción Hind III, BamHI o EcoRI sobre el DNA del fago lambda o plásmido pUC18.

4. Materiales equipos e insumos

Sistema de electroforesis horizontal (cámara y fuente de poder)
 Micropipetas P200 y P20
 Puntas para micropipetas amarillas y blancas
 Lámpara de luz ultravioleta
 Lentes de protección ultravioleta
 Baño serológico con agitación

5. Reactivos

DNA del fago Lambda o plásmido pUC18
 Enzima de restricción HindIII, EcoRI o BamHI (10 U/ μ L)
 Amortiguador TBE 1X
 Agarosa
 Bromuro de etidio
 Azul de bromofenol
 Xilene cianol
 Glicerol
 DNA Lambda Hind

6. Procedimiento

La práctica se realizará en dos sesiones; en la primera, se hace la digestión del DNA con la enzima de restricción; en la segunda, se hace electroforesis en gel de agarosa para ver el DNA digerido.

	Guía Unificada de Laboratorios	Código	GLA-01 V. 00
		Página	5 de 1

1. Hacer la digestión de DNA del fago Lambda o del plásmido pUC18. Se utilizarán 500 ng de DNA, diez unidades de enzima HindIII, EcoRI o Bam HI y el volumen final de la reacción será de 20 μ L.
2. Fijarse detalladamente en las concentraciones del DNA, enzima y buffer de la enzima.
3. La mezcla para la reacción se hará de la siguiente forma en un tubo eppendorf de 200 μ L:

H ₂ O	16 μ L
DNA (500 ng/ μ L)	1 μ L
Buffer 10 X	2 μ L
Enzima 10 U/ μ L	1 μ L
 Total	 20 μ L

Cada pipeteado se hace con una punta diferente y nueva.

4. Mezclar bien y centrifugar a 10.000 rpm por 30 segundos.
5. Incubar por 1 hora a 37 °C en un baño serológico en el termociclador.
6. Centrifugar a 10.000 rpm por 30 segundos.
7. Agregar 5 μ L de buffer de carga.
El buffer de carga tiene una composición de 0.25 % de azul de bromofenol, 0.25 % de xylene cyanol y 80 % de glicerol.
8. Guardar la muestra en un congelador y hacer electroforesis en gel de agarosa en la siguiente sesión.

7. Bibliografía

- J. Sambrook; E.F. Fritsch, T. Maniatis, **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** CSHL press 2001
- Fred M. Ausubel; Roger Brent; Robert E. Kingston; David D. Moore; J.G. Seidman; John A. Smith; Kevin Struhl **Current Protocols in Molecular Biology**, John Wiley and Sons, Inc, 1998
- Contreras J, Pinilla G, Beltrán R, Wasserman M, Rojas M O **Manual de Técnicas Básicas. Primer Curso Institucional sobre Biología Molecular** ISBN 958-13-0083-X .1 ed. Bogotá : Instituto Nacional de Salud, 1991, v.1. p.30.
- Concepción Puerta y Claudia Urueña. **Prácticas de Biología Molecular**. Editorial Pontificia Universidad Javeriana, 2005