	<b>Guía Unificada de Laboratorios</b>	<b>Código</b>	GLA-01 V. 00
		<b>Página</b>	1 de 1

**AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA**

## 1. Titulo

**Ligación de DNA con la enzima T4 DNA ligasa**

## 2. Objetivo

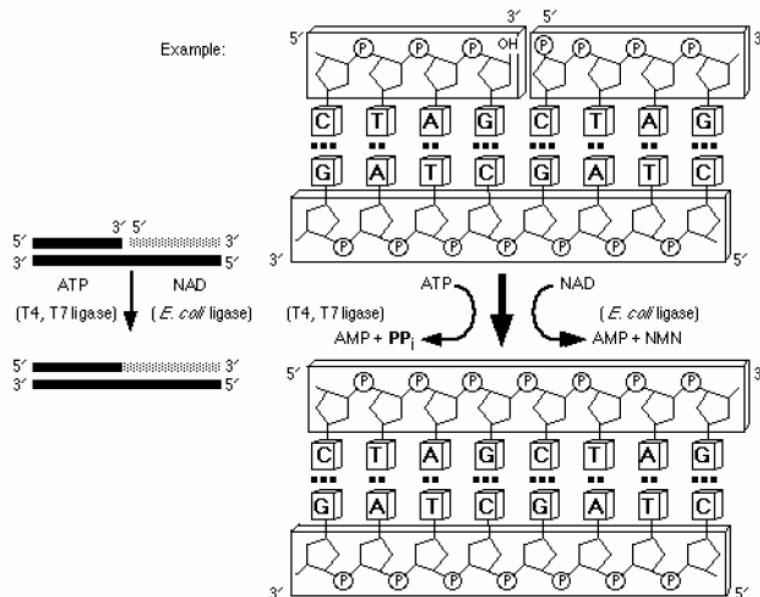
**Conocer los principios básicos para producir DNA recombinante y aplicarlos para la ligación de fragmentos de DNA de un vector, previamente generados con enzimas de restricción.**

## 3. Marco teórico

Las enzimas DNA ligasas catalizan la síntesis de enlaces fosfodiéster entre un extremo fosfato 5' y un extremo hidroxilo 3' que estén cercanos y que hagan parte de un DNA de doble cadena. Durante los procesos de replicación, recombinación y reparación, corrige rupturas de enlaces fosfodiéster en DNA de doble cadena (ver gráfico 1).

Algunas enzimas pueden unir tanto extremos romos como extremos cohesivos compatibles (ver gráficos 2 y 3), los cuales, son producidos la mayoría de las veces como resultado de la digestión de DNA con enzimas de restricción.

Se pueden utilizar dos ligasas una de *E. coli* y otra del bacteriófago T4. La enzima de *E. coli* utiliza NAD como fuente de energía para la reacción y no une extremos romos. La enzima utilizada en la presente práctica corresponde a la T4 DNA ligasa., la cual, utiliza ATP como fuente de energía para la reacción y a diferencia de las otras ligasas puede unir extremos romos. La enzima es codificada por el gen 30 del bacteriófago T4.



**Gráfico 1: Reparación de rupturas de enlaces fosfodiéster en DNA de doble cadena**



AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA

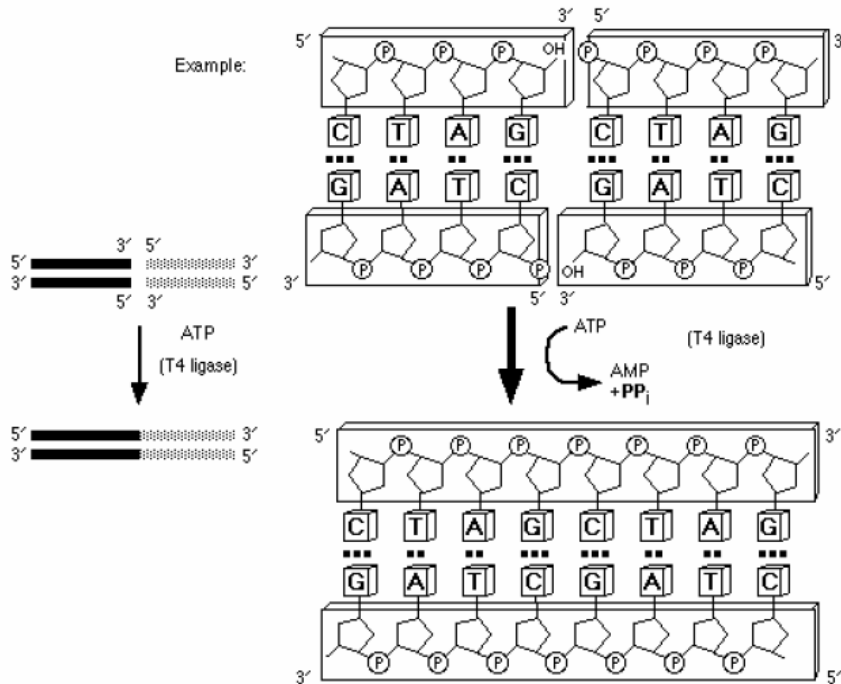


Gráfico 2: Unión de extremos romos.

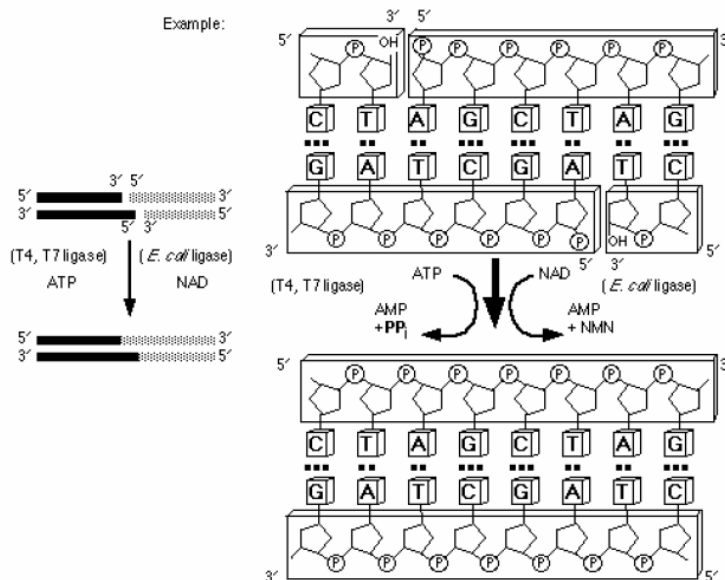



Gráfico 3: Unión de extremos cohesivos

	<b>Guía Unificada de Laboratorios</b>	<b>Código</b>	GLA-01 V. 00
		<b>Página</b>	3 de 1

**AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA**

La combinación de las enzimas de restricción y las ligasas se constituyen en las principales herramientas para el acelerado desarrollo de las tecnologías de DNA recombinante. Dos de los principales desarrollos de esta combinación de tecnologías son: por una parte, la construcción de librerías para la clonación de genes, y por otra parte, el desarrollo de los sistemas de producción de proteínas, incluidos los utilizados en terapia génica y en la producción de plantas y animales transgénicos.

La T4 DNA ligasa es inestable en hielo por largos períodos. Por lo tanto, se recomienda no sacarla de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento en que vaya a ser utilizada y devolverla inmediatamente después de su uso.

Una unidad de enzima es la cantidad necesaria para hidrolizar ATP produciendo 1 mmol de pirofosfato (PPi) durante 20 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**4. Materiales equipos e insumos**

Micropipetas P20  
 Microcentrífuga refrigerada  
 Vortex

Puntas blancas o amarillas  
 Tubos eppendorf de 200  $\mu\text{L}$   
 Marcador indeleble

**5. Reactivos**

T4 DNA ligasa 1 U/ $\mu\text{L}$   
 Buffer T4 DNA ligasa 5 X :

Composición del buffer :

250 mM Tris-HCl pH 7.6  
 50 mM  $\text{MgCl}_2$   
 5 mM de ATP  
 5 mM de DTT (Ditiotreitol)  
 25 % P/V polietilen glicol 8000 (PEG-8000)

DNA  $\lambda$  Hind III  
 Agua desionizada

**6. Procedimiento**

1. Descongelar el buffer de T4 DNA ligasa a temperatura ambiente y resuspender con vórtex cualquier material que se encuentre precipitado.

	<b>Guía Unificada de Laboratorios</b>	<b>Código</b>	GLA-01 V. 00
		<b>Página</b>	4 de 1

**AUTOR: JORGE CONTRERAS PINEDA**

- En un tubo eppendorf de 200  $\mu$ L organizar de mezcla de reacción de la siguiente manera:

Buffer ligasa 5 X	4 $\mu$ L
DNA $\lambda$ HindIII	200 ng
T4 DNA ligasa	1 U
Agua desionizada	Hasta completar 20 $\mu$ L de reacción total

- Incubar 60 minutos a temperatura ambiente.
- Parar la reacción agregando 2  $\mu$ L de EDTA 0.2 M
- Hacer electroforesis en gel de agarosa y comparar con una muestra de DNA  $\lambda$  Hind III sin ligar.

**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