

# PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA PLASMÍDICO

## OBJETIVOS DOCENTES

### Objetivos específicos (conocimientos)

- Ensayo de un procedimiento de purificación, separación de biomoléculas.
- Efecto de los diferentes reactivos sobre el DNA, el RNA, las proteínas, etc. (propiedades fisicoquímicas y su relación con la estructura): desnaturalización, hidrólisis, renaturalización, insolubilización.
- Propiedades singulares de los plásmidos: renaturalización diferencial.
- Cuantificación y análisis de pureza del DNA mediante espectrofotometría ultravioleta. Propiedades espectrales de ácidos nucleicos y de proteínas.
- Plásmidos como vectores de clonación. Conceptos de vector e inserto, DNA recombinado, enzimas de restricción. Requisitos de las enzimas de restricción (cofactores, tamponamiento...).
- Superenrollamiento en el DNA circular: concepto y topoisómeros posibles.
- Análisis de DNA mediante electroforesis: parámetros de la separación. Comportamiento diferencial de moléculas circulares y lineales.

### Objetivos para la adquisición de habilidades y competencias

- Manejo de volúmenes reducidos (intervalo de 2 a 300  $\mu$ L): tubos, micropipetas, centrifuga, precauciones experimentales.
- Precauciones asociadas al material biológico: trabajo con material estéril de un solo uso, reactivos libres de nucleasas, eliminación de residuos biológicos potencialmente infecciosos.
- Estímulo de las dotes de observación y anotación durante el trabajo experimental. Elaboración del cuaderno de laboratorio personal.
- Procedimientos de cálculo habituales en el laboratorio.
- Preparación de geles y montaje de electroforesis. Aplicación de muestras al gel.
- Precauciones asociadas al uso de la corriente eléctrica, de reactivos intercalantes de carácter mutágeno y de la radiación ultravioleta.

## 1.ª parte: PURIFICACIÓN (“mini-prep”) DEL DNA DE UN PLÁSMIDO RECOMBINADO

### 1. INTRODUCCIÓN

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico, circular y de pequeño tamaño que se encuentran en muchas especies bacterianas y que se caracterizan por que se pueden replicar de manera independiente del DNA cromosómico. A diferencia de éste, los plásmidos no son necesarios para la viabilidad general de la célula, pero pueden contener genes que contribuyen a la supervivencia en condiciones especiales, como los que confieren resistencia a antibióticos. Algunas clases de plásmidos poseen además la propiedad conocida como “replicación relajada”, esto es, están presentes en forma de muchas copias por célula, lo que facilita enormemente su aislamiento y purificación.

Los plásmidos poseen un interés singular en Ingeniería Genética por ser uno de los sistemas vectores más sencillos de usar (un vector es el sistema que permite introducir en una célula el fragmento de DNA que se pretende clonar; en esta célula anfitriona el vector se replica y expresa, en su caso). La molécula resultante de la unión del vector con el DNA de interés (denominado entonces “inserto”) se denomina molécula de DNA recombinado.

Para ser utilizado como vector de clonación, un plásmido ideal debe poseer la capacidad de replicación autónoma, ser lo más pequeño posible para permitir un fácil aislamiento y manejo, y contener sitios únicos de restricción y marcadores genéticos selectivos. La mayoría de los plásmidos naturales no cumplen todas estas condiciones, por lo que una primera tarea de la Ingeniería Genética ha consistido en la construcción de plásmidos artificiales o *recombinados*, combinando en una misma molécula diversos rasgos útiles procedentes de los plásmidos naturales.

En esta práctica se emplea una cepa de *E. coli* que ha sido transformada (es decir, se le ha introducido de forma estable) con un plásmido artificial. El inserto se ha introducido en ese plásmido empleando secuencias de corte específicas para la enzima de restricción **EcoRI**.

La presencia en el plásmido del gen de resistencia a ampicilina permite seleccionar las bacterias que portan estos plásmidos, gracias a su capacidad para crecer en presencia de dicho antibiótico (el gen de resistencia codifica una enzima que degrada la ampicilina).

(Tema 9 del programa de teoría. Véase el libro, págs. 204-205, 207, 209, 213-214.)

## 2. OBJETIVO DE LA PRÁCTICA

Consiste en la purificación del DNA del plásmido recombinado contenido en una cepa de la bacteria *E. coli*.

El método empleado para la obtención del plásmido se denomina de “lisis alcalina”: se basa en la lisis celular y desnaturalización del DNA mediante NaOH (medio básico) y SDS (detergente), y la posterior renaturalización en condiciones en las que sólo el DNA plasmídico recupera su estructura nativa, gracias a su pequeño tamaño y su naturaleza circular y superenrollada.

Al neutralizar el medio y añadir una alta concentración de sal (acetato potásico), se produce la precipitación de gran parte de las proteínas debido al tratamiento previo con SDS y a la alta concentración de sales. También precipita el DNA cromosómico, probablemente porque se producen reasociaciones al azar entre las diferentes regiones de este DNA y así se forman agregados insolubles. Por el contrario, el DNA plasmídico se renaturaliza correctamente y queda soluble, en el sobrenadante. La purificación del plásmido se completa después por precipitación con etanol.

La concentración de DNA obtenido se determina mediante la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, sabiendo que una disolución con 50 µg/mL de DNA de doble hebra posee una  $A_{260} = 1$  (véase el libro, págs. 17 y 36). Además, la relación  $A_{260}/A_{280}$  indica el grado de pureza del DNA aislado (respecto a la presencia de proteínas), considerándose libre de proteínas la muestra cuyo cociente alcanza 1.8.

## 3. MATERIALES

Tubos Eppendorf, micropipetas, puntas estériles, agua estéril, pipetas Pasteur, microcentrífuga, espectrofotómetro UV y cubetas de cuarzo, un tubo de 5 mL con tapón.

- Células *E. coli* transformadas: suspensión en medio LB/Amp  
(ver apartado 4a)
- Medio LB/Ampicilina (medio de cultivo “Lennox L Broth”)
  - Caseína digerida enzimáticamente            10 g/L
  - Extracto de levadura                                5 g/L
  - NaCl    5 g/L
  - Ampicilina    0.1 mg/mL
  - pH 7.4
- RNasa en tampón TE
  - Tris base    10 mM
  - EDTA    1 mM
  - pH 8.0 (ajustar con HCl)
  - RNasa A (de páncreas bovino)            0.1 mg/mL
- Disolución de desnaturalización o de lisis alcalina
  - NaOH    0.2 M
  - SDS     1%
- Acetato Potásico  
CH<sub>3</sub>COOK 3 M, ajustado a pH 5.5 con ácido acético glacial
- Etanol absoluto, frío (-20°C)
- Etanol 80%, frío (-20°C)


#### 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

##### 4.a. Cultivo de bacterias (realizado previamente)

1. De la reserva de bacterias (conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  con 15% de glicerol) se toma una pequeña porción con una punta de pipeta estéril y se siembra en una placa de medio sólido agar/LB/ampicilina. Se incuba una noche a  $37^{\circ}\text{C}$ .
2. Se preparan frascos de cultivo o tubos con medio LB estéril, al que se añade en el momento de cultivar ampicilina para una concentración final de 0.1 mg/mL (ya que estamos trabajando con plásmidos que poseen el gen de resistencia a este antibiótico).
3. Se toman colonias individuales de la placa de agar, pasándolas al medio líquido, y se incuba una noche a  $37^{\circ}\text{C}$ , con agitación y sin cerrar herméticamente para que entre el aire.

##### 4.b. Extracción del DNA plasmídico

Antes de empezar el procedimiento experimental, léelo por completo, prepara los tubos y material necesario, rotula los tubos. Es muy recomendable hacer el esquema de la purificación antes de empezar, que te ayudará a realizar el proceso correctamente.

**A**  En un único folio, haz un esquema del proceso de purificación en forma gráfica. A lo largo del proceso, refleja por escrito cualquier incidencia que observes (en el propio esquema o en paralelo con él).

Todo el material que entre en contacto con el cultivo de bacterias deberá desecharse en un recipiente con lejía.


1. Se toma 1.5 mL del cultivo de bacterias y se centrifuga en un tubo eppendorf durante 2 min (13 000 o 14 000 rpm, la velocidad máxima que permita la centrifuga). Se retira cuidadosamente el sobrenadante por aspiración (con pipeta Pasteur o micropipeta), dejando el sedimento lo más seco posible. Desechar el sobrenadante y la pipeta Pasteur o punta de pipeta en la lejía.


**B**  Junto al esquema, anota el aspecto del sobrenadante y del sedimento. ¿Qué contiene el sedimento?


2. Se resuspende el sedimento de bacterias en 300  $\mu\text{L}$  de tampón TE con RNasa, empleando la pipeta (aspirar y expulsar el líquido, sin aire, varias veces sobre el sedimento hasta que desaparezca). Se incuba 2 min a temperatura ambiente.

**C**  ¿Ha cambiado el aspecto del contenido del tubo?


3. Se añaden al mismo tubo 300  $\mu\text{L}$  de la disolución de desnaturalización o de lisis alcalina (NaOH/SDS). Se agita el tubo por inversión suave (o aspirando 2 veces con la pipeta). Posteriormente se incuba durante 5 min a temperatura ambiente.

**D**  Anota en el esquema el aspecto de la disolución.


**E**  Explica cuál es el papel de los reactivos NaOH y SDS

**F**  ¿Crees que se podría prescindir de la RNasa?

4. Se añaden a continuación 300  $\mu\text{L}$  de acetato potásico 3 M. Se mezcla el contenido del tubo por inversión rápida y enérgica. Aparecerá una turbidez blanca, al precipitar el DNA cromosómico. Se incuba 10 min en hielo.

**G**  Anota en el esquema el aspecto antes y después de ponerlo en el hielo. ¿A qué se deben los cambios? Explica cuál es el papel del reactivo de acetato potásico.

5. Se centrifuga 8 min (13 000 o 14 000 rpm).
6. Se transfiere el sobrenadante cuidadosamente con pipeta Pasteur a otro tubo eppendorf evitando tocar el sedimento. Se recoge el sobrenadante y se reparte a partes iguales en dos tubos eppendorf. En este sobrenadante se encontrará el DNA plasmídico.
7. Se añade a cada tubo eppendorf 1 mL de etanol absoluto frío. Mezclar bien por inversión y guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 20 min (congelador).

**H**  Si los nucleótidos del RNA de la bacteria estuvieran marcados con un isótopo radiactivo, razona, a lo largo de todo el proceso de purificación, en qué fracción (sobrenadante o precipitado) iría apareciendo la radiactividad.

8. Pasado este tiempo, se centrifuga durante 10 min a 13 000 o 14 000 rpm. Se elimina todo el sobrenadante volcando el tubo con cuidado.

**I** ¿Se observa ahora algún precipitado?

9. El precipitado se lava añadiendo 0,5 mL de etanol 80% frío, mezclando bien y centrifugando de nuevo. Se elimina todo el sobrenadante volcando el tubo con cuidado y manteniéndolo boca abajo para evitar que el etanol vuelva a entrar en contacto con el precipitado de DNA.

**K** Comenta el aspecto y cantidad del precipitado obtenido.

El precipitado de DNA, casi invisible, se debe secar completamente, para evitar que quede etanol que impediría redisolverlo luego en agua. Para ello:

10. Uno de los tubos (“tubo nº2”) se deja abierto a temperatura ambiente hasta el día siguiente. El otro (“tubo nº1”) se deja secar unos 10 min y luego se le añaden **300** µL de agua, asegurándose de que se disuelva bien el precipitado.
11. En un tubo de 5 mL se ponen 2.5 mL de agua y 200 µL del tubo nº1, para cuantificar el DNA por medida de la absorbancia (apartado 4.c.1).

#### 4.c. Medida de la concentración de DNA recombinado.

1. Pasar el contenido del tubo de 5 mL (DNA plasmídico purificado en el tubo nº1, disuelto y diluido con agua) a una cubeta (de espectrofotómetro) de cuarzo.
2. Medir la absorbancia a 260 y a 280 nm utilizando como blanco agua destilada (calibrar el cero a ambas longitudes de onda).

**L** Calcula la relación  $A_{260}/A_{280}$  y razona según su valor si la muestra purificada está contaminada con proteínas.

**M** Calcula la cantidad total de DNA que se había obtenido en el tubo nº1. (*Dato necesario para poder comenzar rápidamente la práctica al día siguiente*)

## 2.ª parte: DIGESTIÓN DE DNA CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN. VISUALIZACIÓN DEL PLÁSMIDO INTACTO Y DE SUS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN MEDIANTE ELECTROFORESIS

### 1. INTRODUCCIÓN

Las endonucleasas de restricción son enzimas que reconocen secuencias específicas en el DNA de doble hebra (de 4 a 8 nucleótidos) y cortan ambas hebras de la molécula. Las bacterias utilizan estas enzimas como sistema de defensa frente a los bacteriófagos: el DNA propio de la bacteria no se corta, debido a que las secuencias que reconocerían las endonucleasas de restricción están metiladas y, por tanto, protegidas del corte. (*Tema 9 del programa de teoría. Véase el libro, págs. 199-202.*)

Existen tres tipos de endonucleasas de restricción; de ellas, las más utilizadas en el laboratorio son las endonucleasas de tipo II, que reconocen una secuencia palindrómica en el DNA y lo cortan en una posición específica dentro de la propia secuencia de reconocimiento.

Algunas endonucleasas de restricción cortan las dos hebras del DNA en el mismo punto, de tal modo que no dejan bases desapareadas en ningún extremo (extremos romos), mientras que otras hacen cortes en puntos separados de cada hebra, dejando de dos a cuatro nucleótidos desapareados (extremos escalonados o cohesivos). Este último tipo de corte es muy útil porque permite unir fácilmente dos fragmentos de DNA de orígenes distintos, siempre que hayan sido cortados con la misma enzima de restricción. En la práctica, esto se traduce en la posibilidad de crear moléculas de DNA híbridas (“DNA recombinado”), lo que constituye una de las bases de la Ingeniería Genética.

**Ejemplo de corte con distintas enzimas de restricción:**

Pvu II (extremos romos):	5'...CAG      CTG...3' 3'...GTC      GAT...5'
Bam HI (extremos cohesivos con saliente 5'):	5'...G      GATCC...3' 3'...CCTAG      G...5'
Eco RI (extremos cohesivos con saliente 5'):	5'...G      AATTC...3' 3'...CTTAA      G...5'
Hin dIII (extremos cohesivos con saliente 5'):	5'...A      AGCTT...3' 3'...TTCGA      A...5'
Pst I (extremos cohesivos con saliente 3'):	5'...CTGCA      G...3' 3'...G      ACGTC...5'

(consulta el libro, pág.201-202)

El análisis de los fragmentos de DNA generados por la digestión con enzimas de restricción se realiza generalmente mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. (Tema 6 del programa de teoría. Véase el libro, págs. 137-138). El método se basa en que a pH neutro o alcalino, los grupos fosfato del DNA confieren a las moléculas una carga neta negativa y uniformemente distribuida. Así, para moléculas de DNA de la misma conformación sometidas a unas mismas condiciones electroforéticas, la velocidad de migración sólo va a depender de su tamaño, puesto que las moléculas más grandes tendrán más dificultad para atravesar los poros del gel que las más pequeñas.

Un plásmido no tratado con enzimas de restricción es una molécula circular de DNA y, debido a esta característica, puede presentarse en dos conformaciones, principalmente: una forma superenrollada y una forma relajada. Aunque las dos tienen la misma masa molecular, migran de forma diferente debido a su forma o disposición espacial. La movilidad relativa de las dos formas depende principalmente del porcentaje de agarosa en el gel, aunque también influyen la corriente aplicada, la fuerza iónica del tampón y el grado de enrollamiento de la forma superenrollada. Bajo las mismas condiciones la forma superenrollada, más compacta, migra más deprisa que la forma relajada.

En los geles de agarosa se pueden utilizar concentraciones de ésta desde un 0.1%, válida para separar fragmentos grandes (800 000 pb), hasta un 3%, para separar fragmentos más pequeños (70 pb). Cuanto mayor es la concentración de agarosa menor es el tamaño de poro, por lo que la capacidad resolutive del gel permitirá separar fragmentos de masa molecular más pequeña.

**Intervalo de separación en geles de agarosa:**

% de agarosa	intervalo de separación óptimo (kb)
0.3	60 - 5.0
0.6	20 - 1.0
0.7	10 - 0.8
0.9	7 - 0.5
1.2	6 - 0.4
1.5	4 - 0.2
2.0	3 - 0.1

(consulta el libro, pág.137)

Se puede observar que, dentro de ciertos límites, la movilidad electroforética de un fragmento lineal de DNA es inversamente proporcional al logaritmo de su tamaño; gracias a esto, utilizando patrones de longitud conocida se puede calcular el tamaño de los fragmentos de DNA estudiados mediante una curva de calibrado.

## 2. OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA

Esta práctica consiste en la digestión del plásmido, purificado en la práctica anterior, con la enzima de restricción *EcoRI* y el análisis electroforético de los fragmentos generados tras su digestión, así como, por otro lado, el análisis de las dos conformaciones del plásmido intacto, relajada y superenrollada.

## 3. MATERIALES

### MATERIAL

Agua estéril, hielo, cubetas de electroforesis horizontal con formador de gel, micropipetas, tubos Eppendorf, matraz Erlenmeyer, vaso, transiluminador UV, cámara de fotos

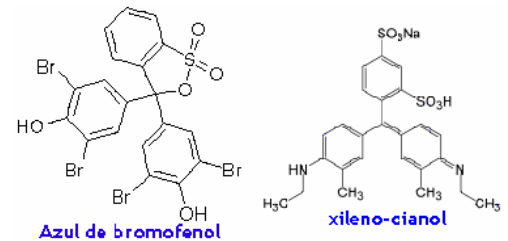
### REACTIVOS

- Agarosa
- *EcoRI* (variedad FastDigest)  
1 unidad/ $\mu$ L  
en un medio de conservación que contiene 50 mM Tris-HCl (pH=7,4), 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 7 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,2 mg/mL BSA, 0,15% Triton-X100, 50% glicerol.  
(1 U de esta enzima es la actividad capaz de digerir, en 5 min a 37°C, 1  $\mu$ g de DNA plasmídico; es posible usar 0,5 U durante 10-15 min con el mismo resultado)
- Tampón de restricción para *EcoRI* (Tampón “10x FastDigest”)

-Tris-HCl, pH=7,5	500 mM
-MgCl <sub>2</sub>	100 mM
-NaCl	1 M
- Seroalbúmina bovina (BSA)	1 mg/mL
- Tampón TAE (para la electroforesis)


-Tris base	40 mM
-Ácido acético	19 mM
-EDTA	1 mM
pH 7.5	
- Tampón de muestras (5x ó 6x)  
Se prepara en TAE

-Glicerol	50%
-Azul de bromofenol	0.25%
-Xileno-cianol	0.25%
- Disolución de tinción  
GelRed™ 10 000x en agua
- Patrones de masa molecular  
Mezcla de fragmentos de restricción del DNA del fago lambda con *Hin* dIII (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb)



## 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Antes de empezar, léelo completo, prepara los tubos y el material necesario, rotula los tubos.

 Haz un esquema donde se vean claramente las partes del experimento, junto al cual podrás ir anotando las incidencias.

### 4.a. Preparación del gel para la electroforesis

Preparar la cubeta de electroforesis y el molde donde se va a formar el gel. Ajustar el “peine”, que formará los pocillos de muestra, de modo que no toque el costado ni el fondo y quede a 1-2 mm de éste.

Utilizaremos geles de agarosa al 1% en tampón TAE.

1. Se preparan 45 mL de la disolución de agarosa (en un matraz Erlenmeyer), pesando la cantidad necesaria de agarosa y disolviéndola en tampón TAE mediante calentamiento casi hasta ebullición (en el horno microondas).
2. Se añaden a la disolución de agarosa 4,5 µL del reactivo de tinción GelRed™.
3. Una vez que se ha enfriado un poco (hasta 50-55°C, temperatura que se resiste sin problema con la mano), se vierte en el molde (debe alcanzar una altura de unos 5 mm, que será el grosor del gel). Se introduce el "peine" en la disolución, cerca de uno de los extremos del gel y paralelo a él.
4. Una vez se haya terminado la reacción de digestión (apartado b), con la agarosa ya solidificada, se quita el "peine" cuidadosamente para evitar deformar o romper los pocillos, y el soporte con el gel se coloca en la cubeta de electroforesis, situando los pocillos en el lado del cátodo (-, negro).
5. Se llenan los dos compartimentos de la cubeta con tampón TAE hasta cubrir totalmente el gel (esta modalidad se denomina electroforesis "submarina").

**B** Razona: ¿qué cambiaría en el resultado si el TAE tuviera un pH inferior (por ejemplo, 6,5)?

#### 4.b. Digestión con endonucleasas de restricción

Se debe disolver el precipitado seco del tubo nº2 del día anterior en 30 µL de agua estéril. Para conseguirlo, se hacen pasar varias veces con la pipeta los 30 µL de agua por la pared del tubo en donde estaba el precipitado. Puesto que durante la purificación el material se repartió en dos partes iguales, supondremos que en este tubo nº2 hay la misma cantidad total de DNA que en el tubo nº1 (calculada en la práctica anterior).

Se deben preparar 2 tubos eppendorf con 10 µg de DNA cada uno.

**C** Calcula el volumen de la disolución anterior que debes tomar para ello:  
volumen a tomar de la disolución de DNA del tubo nº2 =

Se va a realizar la digestión de ese DNA plasmídico con la enzima de restricción **Eco RI**.

**D** Busca en el apartado de reactivos la concentración de esta enzima tal como la compramos y calcula el volumen que debes tomar para emplear en la reacción 0,5 unidades por cada µg de DNA:  
volumen de Eco RI =

Queremos una mezcla completa de reacción de 20 µL. Para que la actividad de la enzima sea óptima debemos además aportar un medio con condiciones adecuadas de fuerza iónica, pH, cofactores, etc.. Para Eco RI, este medio se llama **Tampón 10x FastDigest**, lo abreviaremos a **10x FD** (10x significa que viene a concentración 10 veces superior a la requerida, por lo que el volumen a tomar será 1/10 del total).

**E** Calcula el volumen necesario: volumen de Tampón 10x FD =

**F** Observa la composición del tampón 10x FD y explica cuál es el papel de cada componente

Para completar el volumen de reacción se emplea agua estéril:

**G** Volumen de agua =

Nota: para evitar pérdidas de enzima por las paredes del tubo es recomendable añadir primero los volúmenes mayores. Así, añadir primero el agua y el DNA, luego el tampón y al final la enzima.

En uno de los tubos realizaremos la digestión del DNA, mientras que el otro, al que no añadimos enzima, servirá como control de plásmido intacto.

**H** Prepara una tabla con las cantidades a pipetear en cada tubo (calculadas previamente) en el orden en el que se deben añadir:

	tubo Digestión	tubo Control	observaciones
agua estéril			la cantidad necesaria en cada uno
DNA plasmídico			debe haber 10 µg en ambos
Tampón 10x FD			lo mismo en ambos
Eco RI		0	sólo en el primero, 0,5 U / µg DNA
volumen total:			deben sumar 20 µL en ambos tubos

Para asegurarse de que los pequeños volúmenes empleados se mezclen, se centrifuga durante unos segundos (aguantar el pulsador "SHORT" o ►►► de la microcentrífuga); después se procede a la incubación en un bloque térmico a 37°C durante 15 min, durante la cual tendrá lugar la digestión del plásmido (total o parcial).

#### 4.c. Preparación de las muestras

Calcular y añadir el volumen necesario de tampón “de muestras” o “de carga” (que está preparado 5x o 6x) a cada uno de los 2 tubos eppendorf procedentes de la incubación (plásmido sin digerir y plásmido sometido a la reacción de digestión con *EcoRI*).

Este “tampón de muestras” contiene un componente denso, glicerol, para que las muestras sedimenten en el fondo de los pocillos, y un colorante de pequeño peso molecular, azul de bromofenol, para observar la migración del frente durante la electroforesis.

(Los patrones de tamaño han sido ya previamente mezclados con tampón de muestra.)

#### 4.d. Electroforesis

1. Para cada gel de agarosa, se depositan con micropipeta (puntas pequeñas, de color blanco) en un pocillo 10  $\mu\text{L}$  de los marcadores de peso molecular o patrones, y en el resto de pocillos 10  $\mu\text{L}$  de las muestras (plásmido digerido y sin digerir). Debe tenerse mucho cuidado de no desgarrar el fondo de los pocillos con la punta de pipeta. Si sobran pocillos, es conveniente repetir las muestras (o repetir muestras de los compañeros de laboratorio).

**I** Anota claramente (mediante un dibujo) en qué orden se han aplicado las muestras.

2. Se conectan los electrodos a la fuente de alimentación y se aplica una corriente constante de 150 mA por cada gel. Se mantiene la corriente hasta que el frente (bandas de azul de bromofenol) se acerque al final del gel.

**J** Anota durante cuánto tiempo se desarrolló la electroforesis en tu caso.

El reactivo GelRed™ tiene la propiedad de unirse al DNA, mediante una combinación de acción intercalante entre los pares de bases e interacción electrostática y aumentar en esas condiciones su fluorescencia, de modo que emite luz visible (de color rojo) cuando es excitado por radiación ultravioleta. De este modo permite la visualización del DNA.

#### 4.f. Visualización del plásmido y de los productos de su digestión

**IMPORTANTE:** No exponerse a la luz ultravioleta sin emplear una pantalla de protección, se puede sufrir quemaduras graves.

El gel se coloca sobre un transiluminador que emite radiación ultravioleta de 300 nm de longitud de onda, observando las bandas de DNA formadas, y se fotografía.

**K** Pega en el cuaderno la fotografía del gel (o, en su defecto, el negativo).

**L** Representa, además, el resultado obtenido dibujando un esquema en el que se indique la posición de las bandas y a qué corresponde cada una.

**M** A la vista de los resultados obtenidos (**no** de los datos previos que te dieron sobre la identidad del plásmido), ¿cuántos sitios de reconocimiento para *EcoRI* hay en este plásmido?. Razona la respuesta.

**N** Mide en la foto la distancia migrada por cada banda (desde el pocillo de carga hasta el centro de la banda). [NOTA: habitualmente, el patrón de 125 pb no se ve en el gel de 1% de agarosa, pues avanza demasiado. El de 564 pb y el de 4361 pb se tiñen débilmente, pero sí se aprecian].

**O** Haz una curva de calibrado, representando las distancias migradas por los patrones frente al logaritmo de su tamaño (en pares de bases). Traza la **curva**, interpola en ella las distancias migradas por los DNAs procedentes del plásmido fragmentado y estima así su tamaño. **Discute el resultado:** ¿confirma la interpretación que has hecho antes sobre la identidad de las bandas? ¿es coherente con la información conocida sobre el plásmido empleado?. (Véase el libro, pág. 138).

**P** ¿Tienen las formas superenrollada y relajada del plásmido el mismo peso molecular? ¿Y la misma longitud en pares de bases?. Razona la respuesta.