

Tratamiento con Endonucleasas de Restricción

Las endonucleasas de restricción son enzimas de origen bacteriano cuya actividad comprende el reconocimiento de regiones de secuencia específica y el posterior corte del DNA doble cadena.

Se conocen decenas de enzimas de restricción diferentes, y la gran mayoría son comercializadas por las empresas de Biotecnología (Gibco, Promega, New England, etc). Algunas son proteínas recombinantes, mientras que otras son purificadas de la fuente de origen.

La formulación de las mismas comprende, en general, un tubo conteniendo la solución con la enzima en buffer de almacenamiento apropiado, y otro tubo conteniendo el buffer de reacción (generalmente como stock 10X).

La digestión de un DNA doble cadena dado consiste en generar una mezcla conteniendo al mismo, más la cantidad de enzima adecuada (unidades de actividad enzimática recomendadas para la concentración de molde utilizada, para un tiempo de incubación dado y para el fin buscado) y el buffer de reacción en concentración 1X.. Se lleva al volumen deseado con agua estéril libre de nucleasas.

Ejemplo de protocolo de digestión:

DNA (cuantificado)	x μ l
Buffer de Reacción (10X)	(Vf/10) μ l
Enzima de Restricción (X U/μl)	n μ l
H₂O	10 μ l - (x+Vf/10+n) μ l
Vf	Vf

La mezcla se incuba a la temperatura de reacción recomendada, que en general es 37°C.

La unidad enzimática para las endonucleasas de restricción suele definirse como la cantidad de enzima necesaria para digerir 1 μ gr de DNA de fago λ en un período de incubación de 1 hora. Es posible alargar el tiempo de incubación de manera de introducir menor cantidad de unidades enzimáticas. Así, es común realizar digestiones incubando *overnight* a la temperatura recomendada. Para DNAs genómicos o de gran tamaño, se recomiendan otras condiciones de reacción.

El grado de digestión del DNA molde depende no sólo de la presencia de las regiones de secuencia de reconocimiento para la enzima en cuestión, sino también del grado de limpieza o pureza de la muestra. La presencia de sales o proteínas pueden disminuir la eficiencia de la digestión enzimática por las endonucleasas de restricción.

De acuerdo a cuales son los pasos o experimentos diseñados a partir del DNA digerido (ligaciones, nuevas digestiones, tratamientos con otras enzimas) será necesaria la inactivación de la endonucleasa de restricción utilizada y/o la eliminación del buffer de reacción. Para ello, algunas son inactivables por calentamiento a 60-75 °C durante 10-15 minutos. Otras es necesario extraerlas con fenol y luego precipitar el DNA. Siempre que sea necesario eliminar el buffer, porque después es necesario utilizar otro no compatible, habrá que realizar una precipitación del DNA para luego poder resuspenderlo en la solución deseada. Muchas enzimas presentan actividad (total o parcial) en varios buffers de composiciones ligeramente diferentes. Así es posible realizar varias digestiones con endonucleasas de restricción diferentes al mismo tiempo y con un único buffer de reacción. Por ello es útil analizar en los catálogos la composición de las soluciones donde tienen lugar la reacciones, puesto que una buena elección de esos buffers permite hacer un buen diseño experimental que puede permitir ahorrar pasos y por ende evitar manipulaciones y pérdidas del DNA molde.

Referencias.

- 1)Catálogo Gibco (1999).
- 2)Catálogo New England (1999).
- 3)Catálogo Promega (1999).
- 4)“Setting Up Digestions with Restriction Enzymes”. Molecular cloning. Sambrook, Fritsch y Maniatis.