

GAPDH

ENZIMA RECOMBINANTE

Juan Barbosa - 201325901

25 de mayo de 2019

Índice

	4.2. New England Biolabs (Gen)	3
1. Cómo extraer el DNA	1	5. Ligar gen + plásmido
1.1. Método de extracción	2	6. Transformarlo
1.2. Caracterización	3	7. Extraer el plásmido recombinante
2. Amplificación del gen	3	8. Expresión de la proteína X
2.1. PCR	3	9. Extracción y purificación de la pro-
2.1.1. Elección de primers	3	teína X
2.2. Purificación	3	10. Análisis estructural de la proteína
2.3. Secuenciación	3	10.1. Estructura secundaria
3. Selección del vector (clonación y/o	3	10.2. Modificaciones postraduccionales
expresión)		10.3. Estructura cuaternaria
4. Seleccionar enzimas de restricción	3	
4.1. New England Biolabs (Plásmido)	3	

1. Cómo extraer el DNA

Dado que la **GAPDH** tiene un origen humano, la muestra de DNA sería obtenida a partir de sangre humana. Con el objetivo de preservar la muestra, hasta el momento de la extracción del material genético, a la sangre se le agregaría EDTA como anticoagulante, y será conservada a 4 °C [2, 4].

1.1. Método de extracción

Considerando una muestra de 300 μ L de sangre, y usando el kit *Gentra Puregene Blood Kit* para extraer el DNA, los pasos necesarios son los siguientes:

- 1 Agregar 0.9 mL de la solución de lisis RBC (*Red Blood Cells*) a un falcon
- 2 Agregar 300 μ L de la muestra de sangre al mismo falcon y mezclar 10 veces por inversión
- 3 Incubar la mezcla a 25 °C por 1 minutos
- 4 Centrifugar a 13000 x por 20 segundos para precipitar las células blancas
- 5 Retirar el sobrenadante dejando 10 μ L en el falcon
- 6 Agitar el falcon para resuspender el residuo sólido
- 7 Agregar 300 μ L de la solución de lisis celular, y agitar
- 8 Agregar 1.5 μ L de *RNaseA Solution*, mezclar y encubar a 37 °C por 15 minutos
- 9 Agregar 0.1 mL de la solución para la precipitación de proteínas y agitar
- 10 Centrifugar por 1 minuto a 13000 x
- 11 Pipetear 300 μ L de alcohol isopropílico a un tubo de 1.5 mL, y agregar el sobrenadante del paso anterior, y mezclar hasta observar el DNA
- 12 Centrifugar por 1 minuto a 13000 x
- 13 Descartar el sobrenadante
- 14 Agregar 300 μ L de etanol al 70 % al contenedor del DNA previamente extraído
- 15 Centrifugar por 1 minuto a 13000 x
- 16 Descartar el sobrenadante y secar el DNA con una corriente de aire por 5 minutos
- 17 Agregar 100 μ L de la solución *DNA Hydratation Solution* y agitar
- 18 Incubar por 5 minutos a 65 °C para disolver el DNA

Procedimiento reportado por [QIAGEN](#)

1.2. Caracterización

La determinación de la pureza del DNA extraído se puede cuantificar usando espectroscopía UV-Vis. Depositando una pequeña cantidad del DNA extraído en una celda de cuarzo, cuya concentración sea cercana a 20 $\mu\text{g/mL}$ y midiendo el coeficiente A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , donde A_λ corresponde con las absorbancias en λ nm [3].

A_{260}/A_{280} : Un valor cercano a 1.8 sería indicativo de un DNA puro [5, 1].

- Desviaciones positivas a este valor estarían asociadas a contaminación con RNA
- Desviaciones negativas estarían asociadas con la presencia de proteínas

A_{260}/A_{230} : Los valores esperados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2 [1].

2. Amplificación del gen

2.1. PCR

2.1.1. Elección de primers

2.2. Purificación

2.3. Secuenciación

3. Selección del vector (clonación y/o expresión)

4. Seleccionar enzimas de restricción

4.1. New England Biolabs (Plásmido)

4.2. New England Biolabs (Gen)

5. Ligar gen + plásmido

6. Transformarlo

Generar muchas réplicas del plásmido (procariota o eucariota)

7. Extraer el plásmido recombinante
8. Expresión de la proteína X
9. Extracción y purificación de la proteína X
10. Análisis estructural de la proteína
 - 10.1. Estructura secundaria
 - 10.2. Modificaciones postraduccionales
 - 10.3. Estructura cuaternaria

Referencias

- [1] Michael R. Green and Joseph Sambrook. *Molecular cloning, A Laboratory Manual*. 4th edition, 2012.
- [2] Francesco M Carpi, Fabio Di Pietro, Silvia Vincenzetti, Fiorenzo Mignini, and Valerio Napolioni. Human dna extraction methods: patents and applications. *Recent patents on DNA & gene sequences*, 5(1):1–7, 2011.
- [3] Nathan D Olson and Jayne B Morrow. Dna extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC research notes*, 5(1):668, 2012.
- [4] QIAGEN. *Gentra Puregene Handbook*. QIAGEN, 2014.
- [5] William W Wilfinger, Karol Mackey, and Piotr Chomczynski. Effect of ph and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Bio-techniques*, 22(3):474–481, 1997.