

# GAPDH

## ENZIMA RECOMBINANTE

Juan Barbosa - 201325901

27 de mayo de 2019

### Índice

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

---

## 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 [3, 5].

## 1.1. Método de extracción

Considerando una muestra de 300  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L en el falcon
- 6 Agitar el falcon para resuspender el residuo sólido
- 7 Agregar 300  $\mu$ L de la solución de lisis celular, y agitar
- 8 Agregar 1.5  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $A_\lambda$  corresponde con las absorbancias en  $\lambda$  nm [4].

**$A_{260}/A_{280}$ :** Un valor cercano a 1.8 sería indicativo de un DNA puro [2, 6].

- 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 [2].

## 2. Amplificación del gen

El gen que codifica para la enzima **GAPDH** se encuentra en el cromosoma 12 de los seres humanos. La secuencia de nucleótidos se muestra a continuación y corresponde con 3859 bp [1].

```
GCTCTCTGCTCCTCCTGTTTCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTTTTCGTCGCCAGGTGAAGACGGGCGGAGA
GAAACCCGGGAGGCTAGGGACGGCCTGAAGGCGGCAGGGGCGGCGCAGGCCGGATGTGTTTCGCGCCGCT
GCGGGGTGGGCCCCGGGCGGCCTCCGCATTGCAGGGGCGGGCGGAGGACGTGATGCGGCGCGGGCTGGGCA
TGGAGGCCTGTTGGGGGAGGGGAGGGGAGGCGTGTGTGTCGGCCGGGGCCACTAGGCGCTCACTGTTCTC
TCCCTCCGCGCAGCCGAGCCACATCGCTCAGACACCATGGGGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAACGGGTGAG
TTCGCGGGTGGCTGGGGGGCCCTGGGCTGCGACCGCCCCGAACCGCGTCTACGAGCCTTGCGGGCTCCG
GGTCTTTGCAGTCGTATGGGGGCAGGGTAGCTGTTCCCCGCAAGGAGAGCTCAAGGTCAGCGCTCGGACC
TGGCGGAGCCCCGCACCCAGGCTGTGGCGCCCTGTGCAGCTCCGCCCTTGCGGCGCCATCTGCCCCGAGC
CTCCTTCCCCTAGTCCCCAGAAACAGGAGGTCCCTACTCCCGCCGAGATCCCGACCCGGACCCCTAGGT
GGGGGACGCTTTCTTTCTTTTCGCGCTCTGCGGGGTACGTGTGCGAGAGGAGCCCTCCCCACGGCCT
CCGGCACCGCAGGCCCCGGGATGCTAGTGCGCAGCGGGTGCATCCCTGTCCGGATGCTGCGCCTGCGGTA
GAGCGGCCGCCATGTTGCAACCGGGAAGGAAATGAATGGGCAGCCGTTAGGAAAGCCTGCCGGTGAATAA
CCCTGCGCTCCTGCCTCGATGGGTGGAGTCGCGTGTGGCGGGGAAGTCAGGTGGAGCGAGGCTAGCTGGC
CCGATTTCTCCTCCGGGTGATGCTTTTCTAGATTATTCTCTGGTAAATCAAAGAAGTGGGTTTATGGAG
GTCTCTTGTGTCCCCTCCCCGAGAGGTGTGGTGGCTGTGGCATGGTGCCAAGCCGGGAGAAGCTGAGT
CATGGGTAGTTGGAAAAGGACATTTCCACCGCAAAATGGCCCCCTCTGGTGGTGGCCCCCTTCTCTGCAGCGC
CGGCTCACCTCACGGCCCCGCCCTTCCCCTGCCAGCCTAGCGTTGACCCGACCCCAAAGGCCAGGCTGTA
```

AATGTCACCGGGAGGATTGGGTGTCTGGGCGCCTCGGGGAACCTGCCCTTCTCCCCATTCCGTCTTCCGG  
 AAACCAGATCTCCCACCGCACCCCTGGTCTGAGGTTAAATATAGCTGCTGACCTTTCTGTAGCTGGGGGCC  
 TGGGCTGGGGCTCTCTCCCATCCCTTCTCCCCACACACATGCACTTACCTGTGCTCCCACTCCTGATTTCT  
 TGGAAAAGAGCTAGGAAGGACAGGCAACTTGGCAAATCAAAGCCCTGGGACTAGGGGGTTAAAATACAGC  
 TTCCCCTCTTCCCACCCGCCCCAGTCTCTGTCCCTTTTGTAGGAGGGACTTAGAGAAGGGGTGGGCTTGC  
 CCTGTCCAGTTAATTTCTGACCTTTACTCCTGCCCTTTGAGTTTGATGATGCTGAGTGTACAAGCGTTTT  
 CTCCCTAAAGGGTGCAGCTGAGCTAGGCAGCAGCAAGCATTCTGCGGTGGCATAGTGGGGTGGTGAATA  
 CCATGTACAAAGCTTGTGCCCAGACTGTGGGTGGCAGTGCCCCACATGGCCGCTTCTCCTGGAAGGGCTT  
 CGTATGACTGGGGGTGTTGGGCAGCCCTGGAGCCTTCAGTTGCAGCCATGCCTTAAGCCAGGCCAGCCTG  
 GCAGGGAAGCTCAAGGGAGATAAAATTCAACCTCTTGGGCCCTCCTGGGGGTAAAGGAGATGCTGCATTCTG  
 CCCTCTTAATGGGGAGGTGGCCTAGGGCTGCTCACATATTCTGGAGGAGCCTCCCCCTCCTCATGCCTTCT  
 TGCCTCTTGTCTCTTAGATTTGGTCGTATTGGGCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTTTTAACTCTGGTAAAG  
 TGGATATTGTTGCCATCAATGACCCCTTCATTGACCTCAACTACATGGTGAGTGCTACATGGTGAGCCCC  
 AAAGCTGGTGTGGGAGGAGCCACCTGGCTGATGGGCAGCCCCCTTCATACCCTCACGTATTCCCCCAGGTT  
 TACATGTTCCAATATGATTCCACCCATGGCAAATTCCATGGCACCGTCAAGGCTGAGAACGGGAAGCTTG  
 TCATCAATGGAAATCCCATCACCATCTTCCAGGAGTGAGTGGAAGACAGAATGGAAGAAATGTGCTTTGG  
 GGAGGCAACTAGGATGGTGTGGCTCCCTTGGGTATATGGTAACCTTGTGTCCCTCAATATGGTCCTGTCC  
 CCATCTCCCCCCCCACCCCATAGGCGAGATCCCTCCAAAATCAAGTGGGGCGATGCTGGCGCTGAGTACG  
 TCGTGGAGTCCACTGGCGTCTTACCACCATGGAGAAGGCTGGGGTGAGTGCAGGAGGGCCCGGGGAGG  
 GGAAGCTGACTCAGCCCTGCAAAGGCAGGACCCGGGTTCACTAAGTGTCTGCTTCTCTGCTGTAGGCTCAT  
 TTGCAGGGGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCTCTGCCCCCTCTGCTGATGCCCCCATGTTCTGTCATGGGTG  
 TGAACCATGAGAAGTATGACAACAGCCTCAAGATCATCAGGTGAGGAAGGCAGGGCCCGTGGAGAAGCGG  
 CCAGCCTGGCACCCCTATGGACACGCTCCCCTGACTTGCGCCCCGCTCCCTCTTTCTTTGAGCAATGCCT  
 CCTGCACCACCACTGCTTAGCACCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACTTTGGTATCGTGGAAGGACT  
 CATGGTATGAGAGCTGGGGAATGGGACTGAGGCTCCACCTTTCTCATCCAAGACTGGCTCCTCCCTGCC  
 GGGGCTGCGTGCAACCCTGGGGTTGGGGTTCTGGGGACTGGCTTTCCCATAAATTTCTTTCAAGGTGGG  
 GAGGGAGGTAGAGGGGTGATGTGGGGAGTACGCTGCAGGGCCTCACTCCTTTTGAGACCACAGTCCATG  
 CCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGGCCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCT  
 CCAGAACATCATCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGG  
 AAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAG  
 AAAAACTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCAT  
 CCTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGTCTCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGAC  
 GCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACCACTTTGTCAAGCTCATTTCTGGTATGTGGCTGGGGCCAGAG  
 ACTGGCTCTTAAAAAGTGCAGGGTCTGGCGCCCTCTGGTGGCTGGCTCAGAAAAGGGGCCCTGACAACCT  
 TTTTCATCTTCTAGGTATGACAACGAATTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCACATGG  
 CCTCCAAGGAGTAAGACCCCTGGACCACCAGCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGACCCTCACT  
 GCTGGGGAGTCCCTGCCACACTCAGTCCCCACCACACTGAATCTCCCTCCTCACAGTTGCCATGTAG  
 CCCCTTGAAGAGGGGAGGGGCCTAGGGAGCCGCACCTTGTGATGTACCATCAATAAAGTACCCTGTGCTC

AACCAGTTA

## 2.1. PCR

### 2.1.1. Elección de primers

Un resumen completo de los posibles primers a usar se muestra a continuación:

Cuadro 1: Posibles primers a usar

Primers		Longitud	% GC
Forward:	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	22	54.5
Reverse:	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA	22	54.5 <sup>1</sup>
Forward:	GCAACTAGGATGGTGTGGCT	20	55
Reverse:	TCCCATTCCCCAGCTCTCATA	21	52.4
Forward:	CTGAGGCTCCCACCTTTCTC	20	60.0
Reverse:	AAGAGTTGTCAGGGCCCTTTT	21	47.6
Forward:	AAGGGCCCTGACAACCTCTTT	20	50.0
Reverse:	CTCCCCTCTTCAAGGGGTCT	20	60.0

## 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

## 9. Extracción y purificación

## 10. Análisis estructural de la proteína

### 10.1. Estructura secundaria

### 10.2. Modificaciones postraduccionales

### 10.3. Estructura cuaternaria

## Referencias

- [1] Gapdh glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [ homo sapiens (human) ]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2597>. Accessed: 2019-05-26.
- [2] Michael R. Green and Joseph Sambrook. *Molecular cloning, A Laboratory Manual*. 4th edition, 2012.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] QIAGEN. *Gentra Puregene Handbook*. QIAGEN, 2014.
- [6] 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.