

43. Purificación y análisis de DNA cromosómico bacteriano

Gabriel Dorado Pérez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba

RESUMEN

La purificación de ácidos nucleicos es un requisito imprescindible para realizar diversas técnicas de biología molecular. El método clásico de purificación de ácidos nucleicos se basa en el uso de disolventes orgánicos tóxicos, siendo la extracción mediante fenol/cloroformo la más conocida. No obstante, recientemente se han desarrollado métodos alternativos que emplean una alta concentración salina en vez de disolventes orgánicos. Con ello se consigue el mismo objetivo de desproteinizar la muestra, sin los inconvenientes de toxicidad antes mencionados. Este sistema es conocido también con el nombre de “purificación salina” (del inglés, “salting out”). El primer paso consiste en la lisis de las células cuyo DNA se desea purificar. Este paso se realiza mediante un detergente aniónico que solubiliza los componentes celulares. Dicha rotura celular se lleva a cabo en presencia de “conservantes”, que garantizan la integridad del DNA; esto es, que impiden o limitan la acción de las DNAsas presentes en las células o contaminantes del medio. El RNA presente se elimina mediante tratamiento con RNasa. A continuación se eliminan las proteínas y otros contaminantes celulares, mediante precipitación salina (que sustituye al tratamiento clásico con disolventes orgánicos tóxicos). Finalmente, el DNA genómico se aísla mediante precipitación en presencia de alcohol y se disuelve en agua o en una solución tamponada que puede contener “conservantes” del DNA.

Palabras clave (seis como máximo por orden alfabético, no incluidas en título ni resumen, que siempre se indexan): agarosa, bromuro de etidio, electroforesis, gel, kit comercial, luz ultravioleta.

Abreviaturas empleadas (por orden alfabético de abreviatura). DNA: ácido desoxirribonucleico; DNasa: desoxirribonucleasa; BrEt: bromuro de etidio; LB: medio rico Luria-Bertani; Na₂-EDTA: sal disódica del ácido etilén diamino tetraacético; OD: densidad óptica; PM: peso molecular; RNA: ácido ribonucleico; RNasa: ribonucleasa; TE: solución amortiguadora Tris-EDTA; Tris-HCl, Tris clorhídrico, Trizma-HCl o Trizma-clorhídrico: Tris (hidroximetil) aminometano - clorhídrico.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La purificación de ácidos nucleicos es un requisito imprescindible para realizar diversas técnicas de biología molecular. El método clásico de

purificación de ácidos nucleicos se basa en el uso de disolventes orgánicos tóxicos, siendo la extracción mediante fenol/cloroformo la más conocida.

No obstante, recientemente se han desarrollado métodos alternativos que emplean una alta concentración salina en vez de disolventes orgánicos. Con ello se consigue el mismo objetivo de desproteínizar la muestra, sin los inconvenientes de toxicidad antes mencionados. Este sistema es conocido también con el nombre de “purificación salina” (del inglés, “*salting out*”).

Por otra parte, es cada vez más común el uso de kits comerciales en biología molecular, dada la garantía de calidad que ofrecen. Además de la significativa reducción de precio que han experimentado en los últimos años, debido a la competencia entre diferentes casas comerciales. Todo ello los convierte en una alternativa a tener en cuenta en el laboratorio de biología molecular.

En esta práctica de aislamiento de DNA emplearemos un kit recientemente desarrollado para el aislamiento de DNA. Se trata de «Puregene DNA Isolation kit» (Número de Catálogo: D-5500A) de Gentra Systems (Minneapolis, MN, USA; <<http://www.gentra.com>>). Distribuido en Europa por Flowgen Instruments (Ashby de la Zouch, UK; <<http://www.flowgen.co.uk>>) y en España por Comercial Rafer (Zaragoza, España; <<http://www.rafer.es>>).

2. PRINCIPIO

El primer paso consiste en la lisis de las células cuyo DNA se desea purificar. Este paso se realiza mediante un detergente aniónico que solubiliza los componentes celulares. Dicha rotura celular se lleva a cabo en presencia de “conservantes”, que garantizan la integridad del DNA; esto es, que impiden o limitan la acción de las DNAsas presentes en las células o contaminantes del medio. El RNA presente se elimina mediante tratamiento con RNAsa. A continuación se eliminan las proteínas y otros contaminantes celulares, mediante precipitación salina (que sustituye al tratamiento clásico con disolventes orgánicos tóxicos). Finalmente, el DNA genómico se aísla mediante precipitación en presencia de alcohol y se disuelve en agua o en una solución tamponada que puede contener “conservantes” del DNA.

3. AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO BACTERIANO

Nota: Como es habitual, la manipulación del material biológico se debe realizar bajo las oportunas condiciones de esterilidad, a fin de evitar contaminaciones o degradación de las muestras.

ATENCIÓN: Este protocolo está diseñado para obtener DNA genómico de bacterias gram-negativas (como lo son *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli*). Para bacterias gram-positivas, es necesario un paso previo que asegure la completa lisis celular (y que no trataremos en esta práctica).

3.1. Preparación de las muestras

a).-Las muestras pueden ser frescas o congeladas. En esta experiencia partiremos de un cultivo bacteriano fresco iniciado el día anterior.

b).-Guardar los 10 ml del cultivo de *Salmonella typhimurium* (crecido en medio rico Luria–Bertani) en hielo hasta su uso.

Nota: el cultivo se obtiene inoculando una colonia previamente aislada en medio rico Luria–Bertani (LB) sólido, en 10 ml de medio rico LB líquido. A continuación, se deja crecer unas 16 horas. Generalmente ello se realiza durante toda la noche (“*overnight*”) a 37 °C y 200 rpm en un incubador orbital. La agitación es importante para incrementar la aireación del cultivo y así poder obtener las $0,5$ a $1,5 \times 10^9$ células/ml típicas de los cultivos estacionarios bacterianos.

3.2. Lisis celular

a).-Añadir 0,5 ml de suspensión bacteriana (esto es, cultivo en fase estacionaria crecido durante la noche) a un tubo Eppendorf de 1,5 ml pinchado —si es posible— en hielo picado.

b).-Centrifugar a 13.000–16.000 *g* durante 5 segundos para precipitar las células. Eliminar el máximo posible de sobrenadante: primero por decantación; luego dejando escurrir el tubo sobre papel absorbente limpio, o retirando restos con micropipeta.

c).-Añadir 300 µl de la solución de lisis y pipetear suavemente hacia arriba y hacia abajo hasta que las células queden resuspendidas de nuevo.

d).-Incubar la muestra a 80 °C durante 5 minutos para lisar las células.

e).-Enfriar la muestra hasta temperatura ambiente.

Nota: Las muestras son estables en la solución de lisis durante al menos 18 meses (a temperatura ambiente).

3.3. Digestión del RNA

ATENCIÓN: Las RNAsas pueden causar problemas en los experimentos donde se manipula el RNA. Tener un cuidado especial en no contaminar con RNAsa el material de laboratorio. Una vez usadas, arrojar las puntas de pipeta que hayan estado en contacto con RNAsa a una solución con hipoclorito sódico (lejía) al 10% (v/v) en agua; o bien agua oxigenada (peróxido de hidrógeno) al 3%. En general, se recomienda emplear esta medida de forma rutinaria para eliminar contaminaciones procedentes de las puntas de pipeta.

a).-Añadir 1’5 µl de la solución de RNAsa A al lisado celular.

b).-Mezclar bien la muestra, invirtiendo el tubo 25 veces.

c).-Incubar a 37 °C durante 15–60 minutos.

3.4. Precipitación de proteínas

a).-Enfriar la muestra hasta temperatura ambiente. Si la misma fuera superior a 21 °C, enfriar en hielo.

b).-Añadir 100 µl de la solución de precipitación de proteínas al lisado celular previamente tratado con RNAsa.

c).-Agitar vigorosamente (p. ej., con agitador tipo vórtex) a alta velocidad durante 20 segundos, para mezclar uniformemente la solución de precipitación de proteínas con el lisado celular.

d).-Centrifugar a 13.000–16.000 g durante 3 minutos.

Nota: las proteínas precipitadas deben formar una pella compacta. Si el precipitado no fuera visible o compacto, las causas probables, así como la forma de evitarlas serían:

∂-**Causa probable:** La muestra no se ha enfriado suficientemente (<21 °C) antes de añadir la solución de precipitación de proteínas, o bien ésta no se ha mezclado bien con el lisado celular.

◆-**Solución:** Enfriar la muestra hasta temperatura ambiente (o menor). Se recomienda volver a agitar otros 20 segundos para mezclar bien la muestra e incubar posteriormente en hielo durante 5 minutos para enfriar la muestra. La muestra puede ser centrifugada después a la aceleración (g) especificada anteriormente para aislar las proteínas precipitadas.

↑-**Solución:** Agitar o mezcla vigorosamente el tiempo especificado.

●-**Causa probable:** La velocidad de la microfuga es incorrecta.

◆-**Solución:** Ajustar la velocidad de la centrífuga a la aceleración (g) especificada. Para preparaciones con microfuga, ajustar la velocidad al máximo. Para centrífugas de mesa u otro tipo, la velocidad se ajusta normalmente a 2.000 g. Si dicha aceleración no se puede alcanzar, aumentar el tiempo de centrifugado.

ATENCIÓN: Como es sabido, 2.000 g y 2.000 rpm NO suelen ser equivalentes en las centrífugas empleadas en los laboratorios. Consultar el manual de la centrífuga para obtener la equivalencia en cada caso.

3.5. Precipitación del DNA

a).-Decantar el sobrenadante (que contiene el DNA) a un tubo Eppendorf de 1'5 ml que contenga 300 µl de isopropanol (también llamado 2-propanol) puro (100%). El precipitado (que contiene las proteínas) puede tirarse.

b).-Mezclar la muestra invirtiendo suavemente 50 veces.

c).-Centrifugar a 13.000–16.000 g durante 1 minuto. El DNA debe ser visible como un pequeño precipitado blanco.

d).-Eliminar el sobrenadante por decantación y escurrir el tubo en papel absorbente limpio.

e).-Añadir 300 µl de etanol al 70%. Invertir el tubo varias veces para limpiar el precipitado de DNA.

f).-Centrifugar a 13.000–16.000 g durante 1 minuto.

g).-Con cuidado, eliminar el etanol por decantación.

ATENCIÓN: El precipitado puede estar suelto. Decantar con cuidado y vigilar el precipitado para evitar perderlo.

h).-Ecurrir el tubo en papel absorbente limpio y secar la muestra al aire durante 15 minutos (p. ej., sobre la mesa o —mejor— en estufa a 37 °C).

3.6. Hidratación del DNA

a).-Añadir 50 µl de la solución de hidratación del DNA.

Nota: si el rendimiento ha sido de 25 µg, al disolverlos en 50 µl se obtendrá una concentración de 0,5 µg/µl = 500 ng/µl.

b).-Rehidratar el DNA a temperatura ambiente durante toda la noche. Alternativamente, la rehidratación puede hacerse calentando a 65 °C durante 1 hora. Mover el tubo periódicamente para ayudar a dispersar el DNA (p. ej., coger la parte superior del tubo con una mano y con el dedo índice de la otra dar golpecitos en la parte inferior del tubo).

c).-Guardar el DNA a 2–8 °C (~4 °C) hasta su uso. Si se desea un almacenamiento más prolongado, congelar la muestra a –20 °C o —mejor— –80 °C o inferior. Para un almacenamiento todavía más duradero, desecar el DNA en un rotaevaporador o —mejor— liofilizarlo.

3.7. Rendimiento

El rendimiento esperado a partir de 1 ml de cultivo bacteriano (gram-negativo) crecido toda la noche es de unos 25–75 µg de DNA (generalmente, unos 50 µg).

Nota: el rendimiento de DNA obtenido a partir de bacterias gram negativas es muy dependiente del número de células de la muestra. Dicho número varía con la estirpe bacteriana considerada, así como con las condiciones de crecimiento.

ATENCIÓN: Si las muestras no se recolectan en hielo o no se almacenan correctamente, pueden obtenerse rendimientos reducidos.

4. VISUALIZACIÓN DEL DNA EN GEL DE AGAROSA

Como se ha indicado arriba, si asumimos un rendimiento de 50 µg/ml de cultivo, al disolverlos en 100 µl se obtendrá una concentración de 500 ng/µl. Por consiguiente, 2 µl de muestra deben contener 1 µg de DNA; cantidad más que suficiente para ser visualizada por tinción con BrEt en gel de agarosa.

Nota: para cargar la muestra de DNA en el gel de agarosa, es necesario incrementar la densidad de la solución que lo contiene. En caso contrario, no descendería por el pocillo del gel donde se añade.

Nota: la cantidad de muestra que puede aplicarse por pocillo depende del volumen de los mismos, que viene determinado por la anchura del peine empleado en su formación y por la altura del gel. En nuestro caso (peine de 1,5 mm) pueden cargarse hasta unos 20 µl de muestra; idealmente, 10 µl.

a).-Preparar 10 µl para aplicar por pocillo. Para ello añadir 2 µl de la muestra del DNA purificado a 5 µl de la solución 2XFicoll de carga. Completar hasta 10 µl con 3 µl de solución amortiguadora ("buffer") TE (pH 7,6).

b).-Aplicar en los correspondientes pocillos los 10 µl de muestra (DNA con solución de carga). En otro pocillo, cargar 500 ng del patrón de pesos moleculares (p. ej., λ x Pst I).

ATENCIÓN: el gel de agarosa, el electrolito de cubeta y, en general, la zona donde se realiza la electroforesis, están o pueden estar contaminados con bromuro de etidio (BrEt), que es un potente mutágeno y posible carcinógeno. Para protegerse es imprescindible cumplir escrupulosamente las siguiente normativa:

∂-Entrar a la habitación de electroforesis provistos de guantes.

●-Dejar los objetos que se desee volver a sacar (llaves, gradillas, etc) en un lugar libre de posibles contaminaciones (p. ej., a la entrada).

÷-No tocar dichos objetos una vez manipulados con los guantes las cubetas, etc de la habitación. Si fuera necesario hacerlo, cambiar de guantes.

≠-Al acabar, dejar todo como estaba, limpiar y tirar los guantes cogiéndolos por la zona de la muñeca y tirando hacia fuera de forma que se vuelvan del revés.

≡-Salir sin tocar posibles zonas contaminadas.

c).-Desarrollar la electroforesis a voltaje constante. Comprobar el amperaje generado. Entre una y dos horas suele ser suficiente para visualizar el DNA separado en el gel.

ATENCIÓN: Los geles de agarosa no deben "correrse" a más de 5 V/cm de longitud (distancia entre electrodos). En general, a menor voltaje, mayor resolución. En cualquier caso, controlar que la intensidad de corriente no supere los 50 mA. En caso contrario, podrían dañarse las cubetas por el excesivo calor. En casos excepcionales, puede montarse un sistema de recircularización del electrolito, así como sumergir la cubeta en agua con hielo. En general, ello no es necesario.

d).-Visualizar el gel con lámpara de luz ultravioleta (UV) portátil.

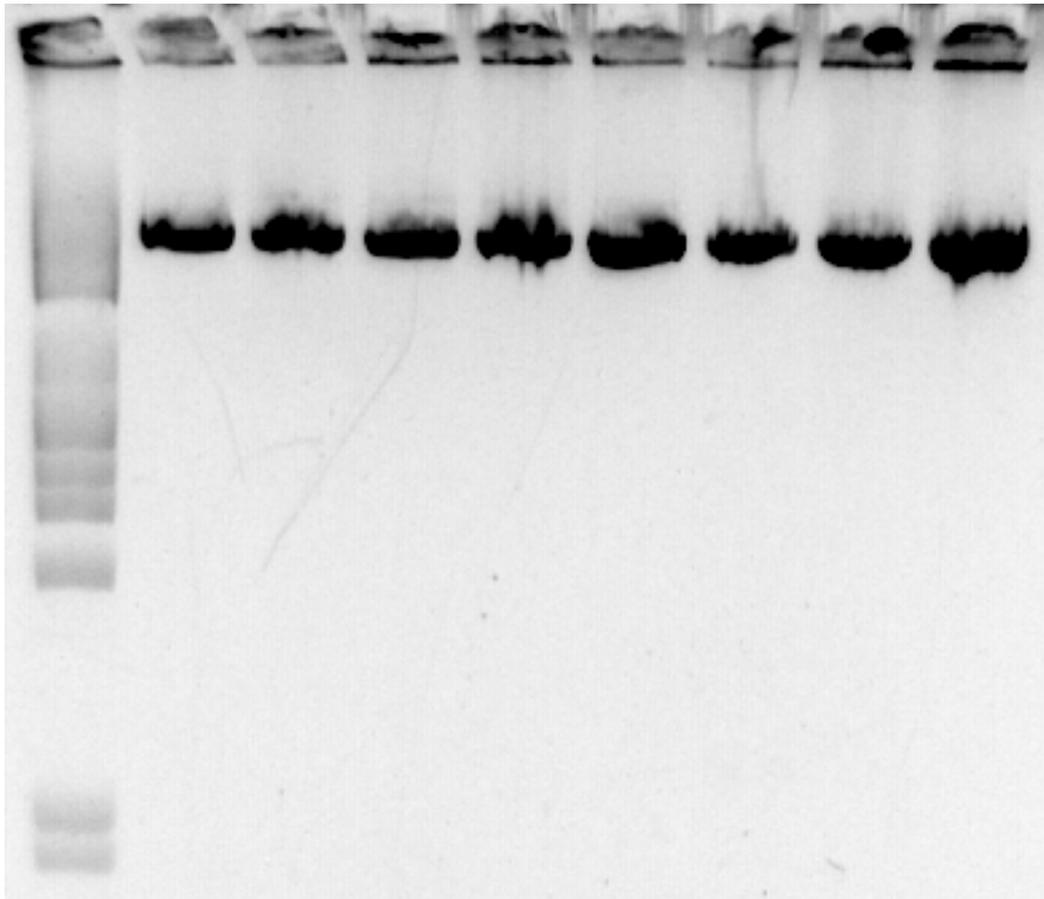


Figura 1. Patrón electroforético del DNA genómico de *Salmonella typhimurium*. Se aprecia el DNA genómico (banda superior) limpio de DNA plasmídico y RNA. El primer carril contiene el marcador de peso molecular λ x *Pst* I.

ATENCIÓN: la luz UV es cancerígena. Es muy importante proteger la piel con ropa (bata, guantes, etc) y —sobre todo— los ojos (gafas y —mejor— máscara facial).

e).-Una vez comprobada la separación de las muestras, colocar la bandeja en el transiluminador de luz UV y poner en marcha el sistema de documentación de geles (cámara de vídeo, impresora térmica, monitor y digitalizador). Realizar los ajustes oportunos (enfoco, apertura del diafragma, brillo, contraste, etc) y capturar la imagen. El resultado esperado y obtenido puede apreciarse en la Fig. 1.

f).-Apagar la luz ultravioleta del transiluminador. La imagen del gel debe permanecer en la pantalla del sistema de documentación de geles porque ha sido digitalizada electrónicamente. Ello evita una exposición excesiva de las muestras a la luz UV (lo que podría dañarlas), incrementando además la vida de la lámpara.

g).-Obtener copias de la imagen en papel térmico de alta resolución (256 niveles de gris).

Nota: los mejores resultados se obtienen invirtiendo la imagen (lo blanco es negro, y viceversa) e incrementando el contraste para que las bandas aparezcan con mayor intensidad.

Nota: la imagen puede ser también grabada en disco flexible (“*floppy*”). Ello permite obtener copias adicionales en papel térmico en el futuro, así como analizar la imagen mediante las aplicaciones GelBase/BlotPro, IntelligentQuantifier o Advanced Quantifier instaladas en el Macintosh. Dichas aplicaciones permiten, por ejemplo, cuantificar las bandas obtenidas. Asimismo, la imagen grabada puede llevarse a aplicaciones de tratamiento de imagen (como Canvas o Photoshop) para su edición y finalmente a programas de tratamiento de texto o autoedición (como AppleWorks, MacWrite Pro, InDesign o WordPerfect) para su incorporación definitiva a tesis, publicaciones científicas, pósteres de congresos, etc.

Nota: el DNA obtenido debe tener un tamaño >50 kpb; típicamente entre 100–200 kpb. Si se obtuviera un tamaño menor, indicaría que el material no ha sido almacenado o procesado adecuadamente. Para mayor información, consultar el manual original del “Puregene DNA Isolation Kit”.

5. CUANTIFICACIÓN DEL DNA

Existen diversos métodos para determinar la concentración de DNA de una muestra. Entre ellos se encuentran:

◆–Sistemas semicuantitativos: a) visualización en gel de agarosa; b) comparación de “gotas” conteniendo diferentes cantidades de muestra con un patrón de DNA conocido, en presencia de EtBr; c) kits comerciales, como DipStick de Invitrogen (San Diego, CA, USA; <<http://www.invitrogen.com>>) y NucleicDotMetric de GenoTechnology (St. Louis, MO, USA; <<http://www.genotech.com>>), etc.

↑–Sistemas cuantitativos: métodos fluorimétricos y espectrofotométricos. Los primeros tienen la ventaja de su sensibilidad y la desventaja de su puesta a punto. Además, requieren sustancias tóxicas. Los métodos espectrofotométricos son los más populares porque son fáciles de ejecutar y proporcionan resultados fiables. En esta práctica emplearemos un espectrofotómetro dedicado a cuantificar ácidos nucleicos y proteínas: el GeneQuant II de AmershamBiosciences (Uppsala, Suecia; <<http://www.amershambiosciences.com>>).

Como se ha indicado arriba, si asumimos un rendimiento de 25 µg/0,5 ml de cultivo), al disolverlos en 50 µl se obtendrá una concentración de 500 ng/µl). Dado que 1 unidad de densidad óptica a 260 nm ($1OD_{260}$) = 50 µg/ml en cubeta (= 50 ng/µl) para DNA de doble cadena (dsDNA), y que las medidas fiables de densidad óptica oscilan entre 0,5 y 1,5 OD_{260} , proceder como sigue:

a).-Diluir 5 µl de la solución de DNA a cuantificar en 65 µl de agua (volumen total de 70 µl). Si la solución de DNA fuera de 500 ng/µl, tras dicha dilución se tendrían en cubeta 35,7 ng/µl = 35,7 µg/ml = 0,71 OD_{260} .

b).-Comprobar la densidad óptica a 260 nm. Si fuera preciso, diluir la muestra hasta que la medida de densidad óptica se encuentre dentro del rango apropiado.

c).-Comprobar la densidad óptica a 280 nm. Ello es un índice de la posible contaminación proteica.

d).- Si fuera posible, determinar el espectro entre 250 y 290 nm. Debe obtenerse un pico romo claro.

Nota: Las soluciones de DNA puro presentan una relación $OD_{260} / OD_{280} = 1,6-2,0$. Valores menores de 1,6 son típicamente causados por contaminación proteica. Valores mayores de 2,0 generalmente se deben a contaminación con RNA. El kit empleado genera DNA de alta calidad, con una relación $OD_{260} / OD_{280} > 1,7$. Para mayor información sobre problemas con la calidad del DNA, rendimiento, etc, consultar el manual original del "Puregene DNA Isolation Kit".

6. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA

+ Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds) (2005): "Current Protocols in Molecular Biology". Vols 1 a 4. New York: Greene & John Wiley (New York). Manual de protocolos. "La nueva «Biblia» del Biólogo Molecular" actualizada trimestralmente. Clasificación: PROTOCOLOS.

Brown TA (ed) (1998): "Molecular Biology LabFax". Vol I (Recombinant DNA) & II (Gene Analysis). 2nd ed. San Diego: Academic Press. Clasificación: DATOS.

Chen, W, Kuo T (1993): A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. Nucleic Acids Res 21: 2260. Clasificación: TEORÍA ESPECÍFICO.

+ Puregene (2005): Genomic DNA Isolation Kit. Catalog number D-5500A (Manual: version 6/99; reference: PL-0010). Genra Systems, Minneapolis, MN, USA; <<http://www.gentra.com>>. Distribuido en Europa por Flowgen Instruments, Ashby de la Zouch, UK; <<http://www.flowgen.co.uk>>. Manual de instrucciones del kit "Puregene". Clasificación: PROTOCOLOS.

+ Sambrook J, Russell D (2001): "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 3rd edition, Vols 1-3. New York: CSH Laboratory Press. Manual de protocolos. "La «Biblia» clásica del Biólogo Molecular". Clasificación: PROTOCOLOS.

Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (1992): "Recombinant DNA" New York: Freeman and Company. Divulgativo y a la vez con nivel y rigor científico. Clásico sobre Ingeniería Genética y sus aplicaciones. Claro, didáctico y con numerosos esquemas e ilustraciones explicativas. Muy recomendable. Clasificación: TEORÍA DIVULGATIVO.

Nota: las referencias fundamentales para la preparación de la sesión se indican con el símbolo "+".

AGRADECIMIENTOS

Proyecto PAFPU 'FORMAPROFE' ('UCO-N-031') de Formación del Profesorado Universitario, Junta de Andalucía.

ANEXO 1: MEDIOS, SOLUCIONES Y MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

Pesar o añadir las cantidades o volúmenes que se indican en las tablas correspondientes, disolver en agua (en el caso de que se desee repartir entre botes) y esterilizar en autoclave (“autoclavar”) a 120 °C y 1 bar (= 1 Kg/cm²) de presión durante 20 minutos.

ATENCIÓN: Comprobar que el autoclave tiene agua en el fondo. En caso contrario, añadir agua destilada hasta la rejilla del fondo de la máquina. Asimismo, comprobar que las salidas de agua y de aire se encuentran cerradas. Si no se toman estas precauciones podría quemarse el autoclave.

ATENCIÓN: Como norma general, no se deben “autoclavar” soluciones concentradas de ácidos (clorhídrico, sulfúrico) o álcalis (NaOH). Como es obvio, estas soluciones son “estériles” per se. Además, pueden dañar la estructura de acero del autoclave. Tampoco se autoclavan soluciones concentradas de disolventes orgánicos (acetona, tolueno, éter, metanol, etanol, etc).

Generalmente las soluciones se preparan en botes de vidrio tipo “Pyrex”.

ATENCIÓN: Los álcalis como la sosa (NaOH) o la potasa (KOH) atacan al vidrio. En estos casos deberán usarse botes de plástico para su almacenamiento.

Solución 1M Tris-HCl (pH 7,6)

A continuación se indica la composición de la solución amortiguadora Tris-HCl.

Tabla 1. Solución Tris-HCl (1M, pH 7,6)		
	Para 1 litro (g)	Para 100 ml (g)
Tris-HCl	121,1	12,1
Agua destilada “milli-Q”	800 ml	80 ml
Ajustar el pH a 7,6		
Agua destilada “milli-Q”	Hasta 1 litro	Hasta 100 ml
Esterilizar en autoclave		
Guardar a temperatura ambiente		

Nota: Ajustar el pH con HCl concentrado ANTES de ajustar el volumen final con agua. Es decir, disolver en algo menos de 1 litro o 100 ml, respectivamente (p. ej., en 800 y 80 ml, respectivamente), ajustar pH y finalmente completar hasta el volumen final.

Solución Na₂-EDTA (0,5 M, pH 8,0)

A continuación se indica la composición de la solución de EDTA disódico.

Tabla 2. Solución Na₂-EDTA (0,5 M, pH 8,0)
--

	Para 800 ml (g)	Para 100 ml (g)
Na ₂ -EDTA	186,1	23,26
Disolver con "mosca"		
Ajustar el pH a 8,0		
Agua destilada "milli-Q"	Hasta 800 ml	Hasta 100 ml
Esterilizar en autoclave		
Guardar a temperatura ambiente		

Nota: Ajustar el pH con NaOH concentrado ANTES de ajustar el volumen final con agua. Es decir, disolver en algo menos de 800 o 100 ml, respectivamente, ajustar pH y finalmente completar con agua hasta el volumen final.

ATENCIÓN: Con frecuencia se puede observar en los protocolos impresos en libros y artículos científicos, que se confunde sistemáticamente el EDTA con el EDTA-Na₂. Prácticamente en todos los casos en que se dice emplear EDTA, realmente se debe emplear EDTA-Na₂.

Solución amortiguadora TE (pH 7,6)

Esta solución amortiguadora se emplea para disolver DNA en general y como sustituto del agua, ya que contiene EDTA que, al quelar metales, evita la acción de algunas nucleasas.

Tabla 3. Solución amortiguadora TE (pH 7,6)		
	Para 500 ml (ml)	Para 100 ml (ml)
Tris-HCl (1M, pH 7,6) estéril	5 ([Final]: 10 mM)	1 ([Final]: 10 mM)
Na ₂ -EDTA (0,5 M, pH 8,0) estéril	1 ([Final]: 1 mM)	0,2 (= 200 µl) ([Final]: 1 mM)
Agua destilada "milli-Q" estéril	Hasta 500 ml	Hasta 100 ml
Si no lo estuviera, esterilizar en autoclave		
Guardar a temperatura ambiente		

Soluciones "Ficoll" de carga

A continuación se indica la composición de la solución "Ficoll" de carga.

Tabla 4. Soluciones 10X "Ficoll" (I y II)

	Tipo I (g)	Tipo II (g)
“Ficoll” (PM ~400)	17,5 ([Final]: 17'5%)	17,5 ([Final]: 17'5%)
Azul de bromofenol	0,06 ([Final]: 0,06 %)	—
“Xileno Cianol FF”	—	0,12 (final: 0,12 %)
Na ₂ -EDTA (0,5 M, pH 8,0)	10 ml ([Final]: 50 mM)	10 ml ([Final]: 50 mM)
Agua destilada “milli-Q”	Hasta 100 ml	Hasta 100 ml
Esterilizar en autoclave		
Guardar a temperatura ambiente		

Estándar de peso molecular (λ x *Pst* I)

Realizar las mezclas e incubaciones que se indican a continuación (Tabla 5).

ATENCIÓN: El DNA del fago lambda generalmente se recibe liofilizado. Debe tenerse un cuidado especial en su manipulación, ya que este fago es capaz de infectar a *E. coli* y otras bacterias generalmente usadas en biología molecular. Lo ideal es comprar el preparado “no metilado” de un suministrador como Sigma (St. Louis, MO, USA; <<http://www.sigma-aldrich.com>>), e inyectar en el bote original los reactivos necesarios para digerir dicho DNA.

Tabla 5. Estándar de peso molecular (λ x <i>Pst</i> I) a [500 ng DNA/10 μ l]				
	Con solución Ficoll de carga (I)		Con solución Ficoll de carga (II)	
	Para 10 ml	Para 1 ml	Para 10 ml	Para 1 ml
DNA del fago lambda sin metilar	500 μ g	50 μ g	500 μ g	50 μ g
Restrictasa <i>Pst</i> I	500 U	50 U	500 U	50 U
10X Amortiguador de <i>Pst</i> I	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Agua destilada “milli-Q”	Hasta 20 μ l	Hasta 20 μ l	Hasta 20 μ l	Hasta 20 μ l
Mezclar bien				
Incubar a 37 °C 1 hora (o más)				
10X Solución Ficoll (I)	1 ml	100 μ l	—	—
10X Solución Ficoll (II)	—	—	1 ml	100 μ l
Agua destilada “milli-Q”	Hasta 10 ml	Hasta 1 ml	Hasta 10 ml	Hasta 1 ml
Guardar stock a 4 °C y tubo en uso a temperatura ambiente				

Nota: Pueden emplearse cantidades menores de *Pst* I en la digestión arriba indicada (tabla 5). En tal caso, debe incrementarse el tiempo de incubación varias horas (incluso un fin de semana completo no produce efectos negativo, ya que *Pst* I no tiene actividad “asterisco o estrella” -del inglés, “*star*”-; es decir, no corta en sitios inespecíficos).

Material biológico (*Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli*)

Bacterias gram-negativas (como lo son *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli*).