

# MARIA DEL PILAR CASTRO PÉREZ

## BIOLOGIA MOLECULAR

### MEDICINA HUMANA



#### Preguntas de repaso

1. ¿Cuáles son las condiciones de almacén y conservación de las enzimas de restricción?

Las enzimas de restricción, al igual que muchas otras proteínas, pueden disminuir su vida media y en consecuencia su actividad, al ser conservadas y manejadas de forma inadecuada fuera de su rango ideal de temperatura; deben conservarse a  $-20^{\circ}\text{C}$ , así que para evitar su congelamiento y su consecuente pérdida de actividad son diluidas en un volumen determinado de glicerol. Para usarlas se requiere un contenedor que asegure la menor variación de temperatura posible

2. ¿Cómo se determina la enzima de restricción ideal para realizar un corte en una secuencia específica de ADN?

Todos los organismos cuentan con un mapa de restricción que indica la posición donde se encuentran los sitios de corte para muchas de las enzimas conocidas. Cuando se pretende realizar el corte en un plásmido conocido o comercial, por ejemplo, se revisa el mapa de restricción, el cual ofrece un listado en orden alfabético de las enzimas que son capaces de cortar dicho ADN, el sitio de corte, el tipo de corte, así como el número y tamaño de cada fragmento generado. En el caso del ADN genómico es necesario conocer la secuencia completa con la que se va a trabajar para conocer los sitios de corte y predecir el número y tamaño de los fragmentos. Se realiza ingresando dicha secuencia a una base de datos especializada para estudios de restricción y, de esta manera, se obtiene un listado de las posibles enzimas que reconocen la secuencia diana. Se elige la enzima tomando en cuenta las características experimentales ajustándose al objetivo perseguido.

3. ¿Cómo se logra la mayor eficiencia en la actividad de las enzimas de restricción?

Las hojas de instrucciones o insertos que facilita el proveedor incluyen las características y descripción de las condiciones óptimas de actividad de las enzimas de restricción disponibles comercialmente. Dichas condiciones están ajustadas para el volumen de reacción requerido, de acuerdo a la tecnología que se requiere aplicar. Se debe tener en cuenta la temperatura óptima de acción, presentación comercial de la enzima (unidades de enzima por microlitro), tiempo de incubación, así como los posibles requerimientos de aditivos, como albúmina, ATP, etcétera.

4. ¿Cómo se determina la cantidad de enzima de restricción para un ensayo?

La cantidad de enzima utilizada en una reacción dependerá de la concentración de ADN en la muestra a digerir. La concentración de la enzima está descrita en la hoja de instrucciones del proveedor, como unidades por microlitro ( $\text{u}/\mu\text{l}$ ). Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima requerida para producir la digestión completa de un microgramo de ADN sustrato en 60 minutos a la temperatura óptima de acción de la enzima. El tiempo de incubación de la reacción puede ser incrementado si la enzima utilizada está cerca de su fecha de caducidad y su actividad está mermando.

5. ¿Aumenta la eficiencia de la actividad de restricción si se rebasa el tiempo recomendado de incubación?

El tiempo no debe incrementarse demasiado, pues, aunque el ADN es una molécula resistente, se corre el riesgo de su degradación.

