

42. Aislamiento y visualización de ácidos nucleicos

Gabriel Dorado Pérez

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

RESUMEN

La información necesaria para la construcción de los seres vivos se encuentra almacenada en los ácidos nucleicos. Existen dos variedades químicas de ácidos nucleicos: el DNA (ácido desoxirribonucleico) y el RNA (ácido ribonucleico). El cromosoma de las bacterias es de doble cadena (dsDNA), circular y superenrollado. Su tamaño es de ~4.500 kilo pares de bases (kpb). Estas células pueden contener también moléculas de dsDNA relativamente pequeñas (~3 kpb), circulares y superenrolladas: plásmidos. El RNA generalmente se encuentra en forma de cadena sencilla, aunque suele formar estructuras secundarias de doble hélice, por autoapareamiento de regiones complementarias. Existen diversos tipos de RNA ribosómico (rRNA), nombrados de acuerdo con su coeficiente de sedimentación “Svedberg”, que es una medida de su tamaño (peso), conformación y agregación. Así, los rRNA de procariontes tienen tamaños de 23S (~2'5 kilobases; kb) y 16S (~1'5 kb). Una cantidad menor de RNA —aunque muy importante para la célula—, es el RNA mensajero (mRNA), que existe en una amplia variedad de tamaños: de cientos a miles de bases (b). El mRNA representa la expresión de algunos de los genes contenidos en el DNA cromosómico. El mRNA es leído en los ribosomas con la ayuda del RNA transferente (tRNA; ~80 b), traducándose a proteínas, que son las biomoléculas que sirven para construir los seres vivos. El objetivo de esta práctica es obtener una preparación de todo el material genético de bacterias, que pueda ser sometida a electroforesis.

Palabras clave: agarosa, bromuro de etidio, congelación, electroforesis, gel, luz ultravioleta.

Abreviaturas empleadas (por orden alfabético de abreviatura). ADN: ácido desoxirribonucleico; BrEt: bromuro de etidio; LB: medio rico Luria-Bertani; Na₂-EDTA: sal disódica del ácido etilén diamino tetra-acético; PM: peso molecular; RNA: ácido ribonucleico; SDS: dodecil sulfato de sodio; TAE: solución amortiguadora Tris-Acético-EDTA; TBE: solución amortiguadora Tris-Bórico-EDTA; Tris base o Trizma base: Tris (hidroximetil) aminometano.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La práctica se realizará en grupos de 24 alumnos, repartidos en ocho subgrupos de tres. Tendrá una duración aproximada de cuatro horas.

La información necesaria para la construcción de los seres vivos se encuentra almacenada en los **ácidos nucleicos**. Su nombre deriva de su carácter ácido y del hecho de que fueron descubiertos en el núcleo de las células eucariontes.

Existen dos variedades químicas de ácidos nucleicos: el **DNA** (ácido desoxirribonucleico) y el **RNA** (ácido ribonucleico). Generalmente, la información genética se almacena en forma de cromosomas de DNA y se expresa en forma de mRNA (RNA mensajero). Las bacterias son procariontes (sin núcleo celular); por tanto, todos sus ácidos nucleicos se encuentran en el citoplasma.

El **cromosoma** de las bacterias es de doble cadena (dsDNA), circular y superenrollado. Su tamaño es de **~4.500 kilo pares de bases (kpb)**. Estas células pueden contener también moléculas de dsDNA relativamente pequeñas (**~3 kpb**), circulares y superenrolladas: **plásmidos**. Éstos confieren diferentes características a las células hospedadoras, como resistencia a antibióticos o prototrofia para determinados nutrientes. Los plásmidos son además unas herramientas muy valiosas en ingeniería genética y biología molecular.

El RNA generalmente se encuentra en forma de cadena sencilla, aunque suele formar estructuras secundarias de doble hélice, por autoapareamiento de regiones complementarias. La mayor parte del RNA forma parte (estructural y funcional) de los ribosomas. Existen diversos tipos de RNA ribosómico (**rRNA**), nombrados de acuerdo con su coeficiente de sedimentación "Svedberg", que es una medida de su tamaño (peso), conformación y agregación. Así, los rRNA de procariontes tienen tamaños de 23S (**~2'5 kilobases; kb**) y 16S (**~1'5 kb**). Una cantidad menor de RNA —aunque muy importante para la célula—, es el RNA mensajero (**mRNA**), que existe en una amplia variedad de tamaños: **de cientos a miles de bases (b)**. El mRNA representa la expresión de algunos de los genes contenidos en el DNA cromosómico. El mRNA es leído en los ribosomas con la ayuda del RNA transferente (**tRNA; ~80 b**), traducándose a proteínas, que son las biomoléculas que sirven para construir los diferentes seres vivos.

El objetivo de esta práctica es obtener una preparación de todo el material genético de bacterias, que pueda ser sometida a electroforesis.

2. UTILIDAD DE LA PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

El aislamiento y purificación de ácidos nucleicos puede ser **analítico** o **preparativo** y tiene diferentes objetivos. En el primer caso, sólo nos interesa visualizar dicho material genético; generalmente, para determinar su tamaño y seleccionar el apropiado. Así puede comprobarse, por ejemplo, si hemos clonado un inserto o DNA pasajero en un vector o plásmido. La purificación preparativa se realiza generalmente como paso siguiente, cuando necesitamos dicho material genético para realizar futuras manipulaciones con el mismo; por ejemplo, secuenciarlo o usarlo para transformar bacterias.

El resultado de la purificación analítica o preparativa se suele someter a electroforesis en gel de agarosa y se tiñe con bromuro de etidio. Estos análisis

son complementarios: puede realizarse uno, varios o todos; según las necesidades y tiempo disponible.

3. PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS: PRINCIPIOS

Existen diversos métodos de purificación de ácidos nucleicos. Éstos varían según se desee aislar DNA o RNA, así como del grado de pureza requerido. Otro aspecto importante a considerar es el uso de sustancias tóxicas o inocuas. Aunque hace unos años era normal usar fenol y cloroformo para la purificación de ácidos nucleicos, actualmente existen metodologías tan eficientes o más, que no emplean compuestos químicos tóxicos.

En esta práctica se realiza primero un aislamiento rápido por lisis celular. Después se procede a la separación electroforética en gel de agarosa y visualización de dichos ácidos nucleicos. También se llevará a cabo un **cálculo aproximado de pesos moleculares (tamaños) del material genético obtenido**.

Como se observa, se trata de un método analítico; es decir, cuyo objetivo no es utilizar dichos ácidos nucleicos en futuras manipulaciones, sino, simplemente, visualizar las diferentes formas moleculares de los mismos, así como determinar su tamaño aproximado y posteriormente desecharlos. Existen varios protocolos de purificación rápida de DNA (genómico, plásmidos, etc) y RNA (total, mRNA, etc). Por ejemplo, algunos protocolos de purificación de plásmidos utilizan detergentes (como el SDS) para romper las células, álcali (como NaOH) para desnaturalizar el cromosoma bacteriano y las proteínas y sal (como KCl) para favorecer la precipitación de las proteínas y cromosomas desnaturalizados. Ello arrastra también los restos de membrana y pared celular a los cuales se encuentra unido físicamente el cromosoma, otros restos celulares y el propio SDS. De esta forma, los plásmidos quedan en solución (detallado en Sambrook y Russell, 2001: "Protocol 6. Preparation of plasmid DNA: toothpick minipreparations", pp. 1-51–1.54).

En esta práctica se describe un protocolo algo menos eficiente para visualizar plásmidos. No obstante, es mucho más eficiente para visualizar todo el material genético de las bacterias (diferentes tipos de DNA y RNA), y claramente mucho más rápido y cómodo.

4. VISUALIZACIÓN RÁPIDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE BACTERIAS

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

ATENCIÓN: el material biológico de desecho deberá ser destruido. Por ejemplo, mediante inmersión en un agente oxidante fuerte como lejía (hipoclorito sódico) al 10%, agua oxigenada (peróxido de hidrógeno) al 3%, esterilización "húmeda" en autoclave a 120 °C y 1 bar (1 kg/cm²) durante 20 min, o esterilización "seca" en horno a 180°C durante 4 h. Los dos primeros

métodos suelen emplearse para destruir ácidos nucleicos; los dos últimos para matar células.

Cada subgrupo procesará una muestra, que será finalmente cargada en el gel de electroforesis, junto con dos patrones de peso molecular. La fotografía del gel servirá para realizar los correspondientes cálculos de peso molecular (tamaño).

a).-Crecer la bacteria *Escherichia coli* DH5 α F' hospedadora del plásmido recombinante *pGEM-5Zf(+)* o *pBluescript(SK+)* en 1 a 5 ml de medio rico Luria-Bertani (LB), en presencia del antibiótico selectivo apropiado (ampicilina), hasta cultivo estacionario (p.ej., unas 12 a 16 h durante la noche) a 37°C y en condiciones de agitación vigorosa (p.ej., 200 rpm) para asegurar una buena aireación y crecimiento. El cultivo puede repartirse en tubos de microfuga y guardarse a 4°C durante varios días (una a dos semanas). También puede guardarse durante meses a -20°C o menos (aunque ello provocará la rotura de algunas células).

b).-Centrifugar 0,5 ml del cultivo estacionario en un tubo de microfuga de 1,5 ml) a 12.000 g durante 30 segundos o a 16.000 g durante 15 segundos para precipitar las células. Eliminar el sobrenadante por decantación. Dejar escurrir boca abajo sobre papel absorbente (higiénico o de filtro) uno o varios minutos.

Nota: en una microfuga estándar tipo Eppendorf 5415C o similar, 12.000 g son aproximadamente 12.000 rpm; 16.000 g son aproximadamente 14.000 rpm (máxima velocidad de dicha microfuga).

c).-Añadir 50 μ l de agua destilada estéril en la tapa del tubo (para no ensuciar la punta y así poder usar la misma punta con todos los tubos). Agitar vigorosamente con un agitador tipo vórtex para resuspender bien las células. Si se dispone de muchos tubos, puede emplearse un soporte multitubo para acelerar el proceso. Estas muestras pueden guardarse durante meses a -20°C o menos hasta su posterior uso. En caso de no realizarse el paso siguiente ("c" opcional), pasar al "e" indicado más adelante.

d).-Opcional (para incrementar rendimiento unas 100 veces): congelar a -80°C y descongelar a 100°C una o dos veces las células para provocar la lisis celular. También puede congelarse a -20°C y descongelar a 100°C, en cuyo caso se recomienda hacerlo dos veces. El proceso consiste en congelar, descongelar hirviendo un minuto, agitar vigorosamente en vórtex y —en su caso— repetir el proceso.

ATENCIÓN: para que los tubos no se abran durante el hervido, deben usarse tubos especiales, como se indica a continuación.

e).-Opcional: fijar la apertura del tubo Eppendorf con un "pico de pato" para que el tubo no se abra (otra alternativa es usar tubos Eppendorf con cierre de seguridad), e incubar en un baño de agua a 95-100°C durante 1 min. Agitar vigorosamente mediante vórtex.

f).-Centrifugar a 12.000 g durante 5 min o a velocidad máxima (16.000 g) durante 2 minutos. Recoger el sobrenadante, que contendrá parte de los ácidos nucleicos.

g).-Someter a electroforesis 9 μ l del sobrenadante + 1 μ l de solución "Ficoll" de carga 10X, en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Se recomienda echar primero 1 μ l del solución de carga en el fondo de cada tubo nuevo, usando la misma punta. El resultado esperado y obtenido puede apreciarse en la Fig. 1.

Nota: como la solución Ficoll de carga 10X es muy densa, se recomienda ajustar una pipeta tipo Gilson P20 a unos 3 μ l para coger 1 μ l. Si se ajusta a 1 μ l no se coge nada. En cualquier caso, estos volúmenes son aproximados; y da igual coger 1 μ l que el doble o triple. Eso no va a alterar para nada el resultado de la electroforesis que se realice a continuación.

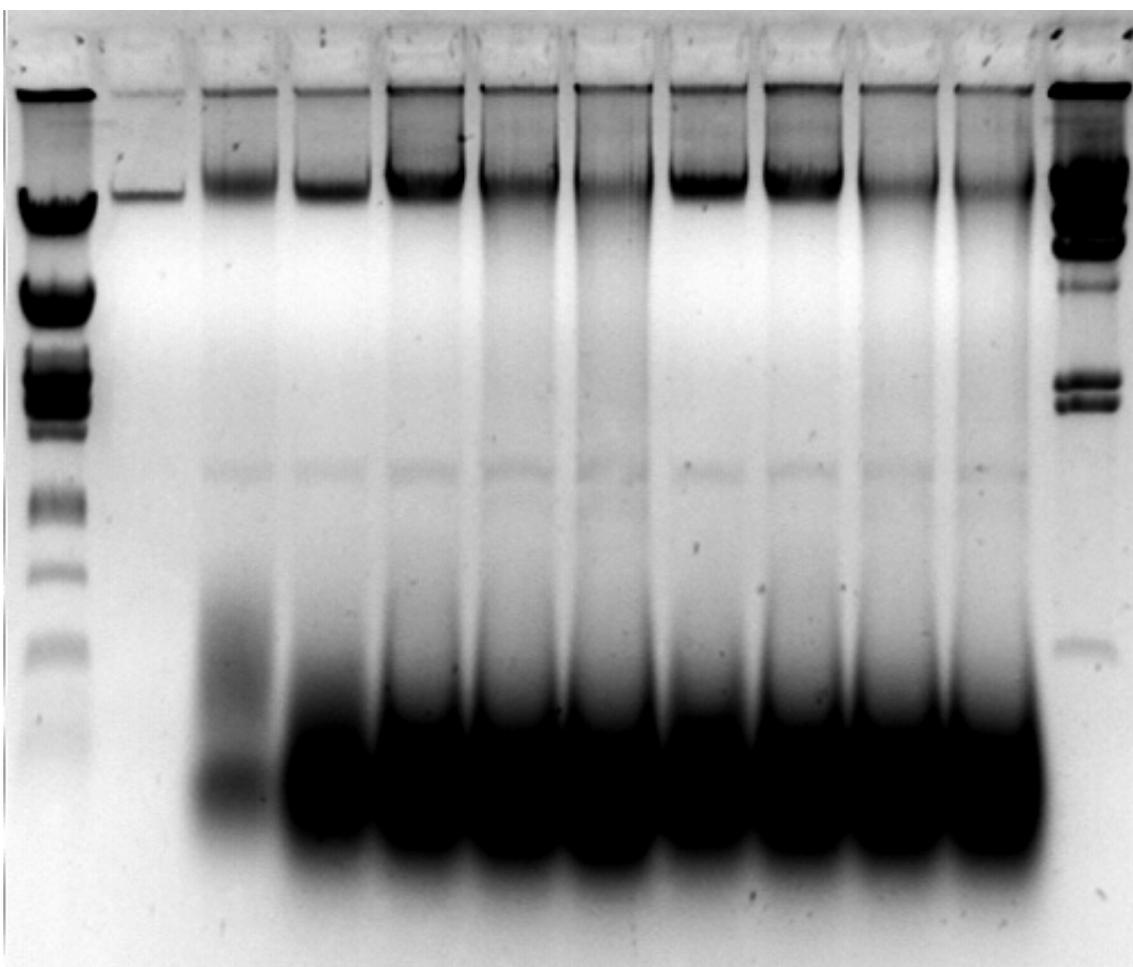


Figura 1. Patrón electroforético de ácidos nucleicos de *Escherichia coli* DH5 α F'. Se aprecia el DNA genómico (banda superior), el DNA plasmídico (banda tenue intermedia) y diversas formas de RNA como el ribosómico (mancha inferior). El tRNA se encontraría en la parte inferior (aunque no es apreciable), mientras que el mRNA se encontraría a lo largo del carril (fondo). Los carriles de los extremos contienen el marcador de peso molecular λ x *Pst* I (izquierda) y λ x *Hind* III (derecha).

h) Como marcadores de peso molecular pueden emplearse 0,5 μ g/10 μ l del vector *pGEM-5Zf(+)* o *pBluescript(SK+)* superenrollado. También pueden usarse otros patrones de peso molecular, como 0,5 μ g/10 μ l de λ x*Hind* III

(fragmento menor visible de ~2 kpb) y λ xPst I (fragmento menor visible de ~300 pb).

Nota: los plásmidos son generalmente dsDNA superenrollado (I). No obstante, parte de los mismos puede encontrarse en forma relajada (II; cuando una de las hebras está cortada) o incluso lineal (III; ambas hebras rotas en el mismo sitio). Las proporciones relativas suelen ser: I >>> II > III. Por otra parte, el bromuro de etidio se intercala entre las bases del DNA, reduciendo la densidad de éste. La movilidad de las moléculas en una electroforesis en gel de agarosa depende no sólo de su carga, tamaño y densidad, sino también de su forma. Así, en ausencia de bromuro de etidio, los plásmidos generan tres bandas que se distribuyen cátodo → ánodo de la siguiente forma: tipo II → III → I. En presencia de bromuro de etidio, la movilidad pasa a ser: tipo III → I → II.

i).-Visualizar el resultado de la electroforesis, capturar la imagen en disco e imprimirla.

j).-Realizar el cálculo aproximado del tamaño del material genético visualizado: DNA genómico, DNA plasmídico superenrollado y RNA. Este cálculo puede realizarse de forma aproximada por comparación de visu con el estándar conocido. Un cálculo más preciso implica construir una recta patrón, representando la distancia en mm desde el pocillo a la banda (ordenadas) frente al lg del tamaño (kpb) de las bandas del patrón de pesos moleculares (abscisas).

ATENCIÓN: a la hora de comparar tamaños, es importante no olvidar que sólo el dsDNA lineal tiene movilidades equiparables a un estándar de pesos de dsDNA (que es lineal). Los plásmidos superenrollados sólo podrán compararse con otros superenrollados. La razón estriba en que el dsDNA superenrollado de los plásmidos avanza más rápidamente que ese mismo DNA lineal. Por tanto, no puede calcularse de forma precisa el tamaño de un plásmido superenrollado, usando estándares de peso molecular de dsDNA lineal. Aunque siempre podrá inferirse un tamaño “mayor que” el correspondiente a dicha banda (si fuera dsDNA lineal). Así, por ejemplo, un plásmido de 3 kb migrará como un DNA lineal de 1 kb. Por tanto, podremos decir que dicho plásmido es “mayor que” 1 kb. Otra opción sería emplear estándares de peso molecular compuestos por dsDNA superenrollados, pero ello no suele realizarse por la dificultad técnica que supone la obtención de dicho material. Lo que sí suele hacerse es incluir un plásmido de tamaño conocido como referencia

Corolario: el protocolo descrito previamente está diseñado para visualizar todos los ácidos nucleicos de las bacterias. Así, aparecerán **dos manchas muy llamativas de RNA (tRNA y —sobre todo— rRNA 23S y 16S, respectivamente) de bajo peso molecular (de 100 a 500 kpb), que pueden aparecer fusionadas cuando existe gran cantidad de rRNA.** La mayor intensidad de estas bandas es normal, ya que el RNA se encuentra fundamentalmente en forma de cadena sencilla (ssRNA), por lo que tiene expuestas sus bases nitrogenadas al exterior, provocando una mayor fluorescencia. Por otra parte, la agarosa no tiene suficiente poder resolutivo para diferenciar bien tamaños tan pequeños. Asimismo, debe apreciarse un

fondo débil de mRNA a todo lo largo de cada carril. El DNA plasmídico (en caso de que la bacteria porte dicho material genético), suele aparecer de forma tenue en la **zona de 1 a 2 kpb (para plásmidos superenrollados de 3 a 4 kpb).** Finalmente, **el DNA genómico (cromosoma bacteriano), aunque tiene 4.500 kpb, aparece como una banda intensa y definida en la región de 10 kpb.** Ello es así porque la agarosa no tiene suficiente poder resolutivo como para diferenciar tamaños tan grandes.

5. 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.
- + 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 práctica 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 en botes) y esterilizar en autoclave ("autoclavar") a 120°C y 1 bar (= 1 kg/cm²) de presión durante 20 minutos. Una vez esterilizados, los medios con agar pueden conservarse líquidos en una estufa a 63 °C hasta su uso.

Normas para el manejo del autoclave: Comprobar que el autoclave tiene suficiente agua. 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. Una vez haya terminado el autoclave hay que esperar que baje la presión y la temperatura para abrirlo sin peligro.

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.

Medio rico Luria–Bertani

A continuación se indica la composición del medio rico de cultivo de *Escherichia coli*.

	Medio líquido (g)	Medio sólido (g)
Bacto triptona	10	10
Extracto de levadura	5	5
CINa	10	10
Agar	—	15
Agua destilada	Hasta 1 litro	Hasta 1 litro

El medio rico líquido puede prepararse en botes Pyrex o en matraces erlenmeyer para cultivos (10 ml de medio rico en matraz de 100 ml). El medio sólido también se prepara en matraz de 100 ml, se deja enfriar un poco después de la esterilización (~63 °C) y se reparte a razón de 25 ml por caja de petri de 9 cm Ø. Por lo tanto, cada alumno preparará 10 ml de medio líquido y 25 ml de medio sólido.

Las cajas de medio rico, una vez haya solidificado el medio, se dejan boca abajo en la estufa a 37°C hasta el día siguiente (para secar el vapor condensado). El secado puede realizarse rápidamente colocando las cajas abiertas en una cabina estéril de flujo laminar durante una hora.

El medio rico líquido se almacena a temperatura ambiente. Las cajas de medio rico se guardan en bolsas cerradas a 4°C hasta su uso. El medio rico permanece estable durante meses.

Nota: No conviene añadir los agentes selectivos (en su caso) a las cajas con medio sólido que vayan a ser conservadas en frigorífico. Es mejor prepararlas sin dichos agentes (p.ej., antibióticos), y añadirlos en la superficie con un asa de siembra triangular justo antes de usarse. Así se asegura que el antibiótico no ha sido degradado.

Solución amortiguadora TBE

A continuación se indica la composición de la solución amortiguadora TBE para electroforesis.

Tabla 2. Solución amortiguadora 5X TBE		
	3,8 litros (g)	1 litro (g)
Tris base	212	55,8
Ácido bórico	160	42,1
Na ₂ -EDTA	18,6	4,9
Agua destilada	Hasta 3,8 litros	Hasta 1 litro

ATENCIÓN: La solución amortiguadora 10X TBE puede prepararse también, pero con el tiempo y las bajas temperaturas acaba por precipitar, siendo luego imposible volver a disolverlo. Por ello se recomienda preparar la máxima concentración como 5X TBE.

Solución amortiguadora TAE

A continuación se indica la composición de la solución amortiguadora TAE para electroforesis.

Tabla 3. Solución amortiguadora TAE		
	50X	1X
Tris base	242 g	4'84 g
Ácido acético glacial	57,1 ml	1,14 ml
Na ₂ -EDTA (0'5 M, pH 8'0)	100 ml	2 ml
Agua destilada	Hasta 1 litro	Hasta 1 litro

Solución 20X Bromuro de etidio

A continuación se indica la composición de la solución de bromuro de etidio.

Tabla 4. Solución 20X Bromuro de etidio (10 mg/ml)		
	10 ml	1 ml
Bromuro de etidio	100 mg	10 mg
Agua destilada	Hasta 10 ml	Hasta 1 ml

ATENCIÓN: El BrEt es un mutágeno potente. NO es necesario esterilizarlo. NO se debe "autoclavar" por precaución. Deben seguirse escrupulosamente medidas estrictas de seguridad (guantes, mascarilla, campana extractora) en su preparación a fin de evitar la inhalación del polvo o su contacto con la piel. Una vez en solución es más fácil de manipular.

ATENCIÓN: El BrEt es sensible a la luz. Proteger la solución en bote envuelto por papel aluminio o —mejor— en bote con cristal ámbar.

Soluciones "Ficoll" de carga

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

Tabla 5. Soluciones 10X "Ficoll" (I y II)		
	Tipo I	Tipo II

	(g)	(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.

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 de Sigma e inyectar en el bote original los reactivos necesarios para digerir dicho DNA.

	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. 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 “star”; es decir, no corta en sitios inespecíficos).

Estándar de peso molecular (λ x *Hind* III)

Realizar las mezclas e incubaciones que se indican para λ x *Pst* I (Tabla 6), pero empleando la restrictasa *Hind* III en vez de *Pst* I.

Material biológico (*Escherichia coli*)

Bacteria *Escherichia coli* DH5 α F' hospedadora del plásmido recombinante pGEM-5Zf(+) o pBluescript(SK+).