



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFICACIA DE CORTE DE ENZIMAS DE
RESTRICCIÓN EN PRESENCIA DE NANOTUBOS DE
CARBONO DE PARED SENCILLA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

NETZI RIVERA SÁNCHEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
2010**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

<p>1. Datos del alumno. Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s): Teléfono: Universidad: Facultad o escuela: Carrera: No. de Cuenta:</p>	<p>1. Datos del alumno. Rivera Sánchez Netzi 56 65 55 73 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 302510481</p>
<p>2. Datos del asesor. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):</p>	<p>2. Datos del asesor. Dr. Camacho Carranza Rafael</p>
<p>3. Datos del sinodal 1. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):</p>	<p>3. Datos del sinodal 1. Dra. Montero Montoya Regina Dorinda</p>
<p>4. Datos del sinodal 2. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):</p>	<p>4. Datos del sinodal 2. Dra. Ramos Morales Patricia</p>
<p>5. Datos del sinodal 3. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):</p>	<p>5. Datos del sinodal 3. M. en C. Vilchis Peluyera Alfonso José</p>
<p>6. Datos del sinodal 4. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):</p>	<p>6. Datos del sinodal 4. Biol. Barajas Lemus Claudia</p>
<p>7. Datos de la tesis. Título: Subtítulo: No. de páginas: Año:</p>	<p>7. Datos de la tesis. Eficacia de Corte de Enzimas de Restricción en presencia de Nanotubos de Carbono de Pared Sencilla. 2010</p>

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que siempre me ha apoyado y brindado todo lo que estuvo a su alcance para darme la mejor educación posible.

Agradezco al Dr. Rafael Camacho por ser un gran mentor y compartir conmigo su conocimiento y al Dr. Javier Espinosa por acogerme en su laboratorio y brindarme su apoyo y consejos.

A la Biol. Sandra Luz Hernandez por la realización de los ensayos de suspensión de los SWCNT's en DNA, los cuales sirvieron como base para la realización del presente trabajo, por su enseñanza de diferentes técnicas de biología molecular y de las medidas pertinentes para el manejo de los SWCNT's.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por su ayuda en la realización de la microscopía electrónica de transmisión.

A la Biol. Claudia Barajas y a la M. en C. Blanca Hernandez por su enseñanza y ayuda durante la elaboración de ésta tesis. A la M. en C. Concepción Moreno y a la QFB. Ma. Dolores Ronquillo por sus observaciones consejos y amistad.

Este trabajo fue apoyado por el proyecto "Efecto de Xenobióticos y Nanotubos en la estabilidad del Genoma Bacteriano" PAPIIT IN204207 del Dr. Rafael Camacho Carranza en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

A la Dra. Patricia Ramos por ser una guía durante mí formación académica y a los doctores Dr. Armando Muñoz y Dra. Adriana Muñoz por sus enseñanzas.

Quiero agradecer nuevamente a mis padres por todo el esfuerzo que realizaron para llevar a cabo mi formación, principalmente con el ejemplo de perseverancia, esfuerzo y rectitud.

I. RESUMEN	5
II. INTRODUCCIÓN	7
1. NANOTECNOLOGÍA.....	7
2. NANOPARTÍCULAS DE CARBONO	11
2.1 FULLERENOS Y NANOTUBOS DE CARBONO	12
2.2 ESTRUCTURA, PROPIEDADES Y CLASIFICACIÓN DE LOS CNT'S	14
2.3 SÍNTESIS DE CNT	18
2.4 REACTIVIDAD DE LOS CNT.	20
3. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	22
3.1 ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN	22
3.2 TIPOS DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN	25
3.2.1 Endonucleasas de Restricción de Tipo II.....	27
3.3 PREFERENCIA DE SITIOS DE RECONOCIMIENTO	31
III. HIPÓTESIS	36
IV. OBJETIVOS	36
OBJETIVO GENERAL.	36
OBJETIVOS PARTICULARES.	36
V. MATERIALES Y MÉTODOS	37
ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y SUSTRATOS DE DNA.....	37
NANOTUBOS DE CARBONO	41
SOLUCIONES	41
SOLUCIÓN DE DNA - CNT'S.....	42
SOLUCIONES DE BUFFERS Y ENZIMAS	43
SOLUCIONES DE ELECTROFORÉISIS	45
PROTOCOLO DE DIGESTIÓN DE DNA.	45
PROTOCOLO MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	48
VI. RESULTADOS	49
1. ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES PARA RESTRICCIONES	49
1.1 <i>EcoRI</i>	49
1.2 <i>HindIII</i>	51
1.3 <i>SacII</i>	52
1.4 <i>NarI</i>	52
1.5 <i>NaeI</i>	53
2. RESTRICCIONES EN PRESENCIA DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED SENCILLA (SWCNT's)	55

2.1 <i>EcoRI</i>	55
2.2 <i>HindIII</i>	56
2.3 <i>SacII</i>	58
2.4 <i>NarI</i>	59
2.5 <i>NaeI</i>	60
3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	62
VII. DISCUSIÓN.....	64
VIII. CONCLUSIONES.....	67
IX. REFERENCIAS.....	68
X. ANEXOS.....	70

I. RESUMEN.

En años recientes la investigación se ha dirigido al estudio, desarrollo y aplicación de diferentes materiales, los cuales dentro de rangos nanométricos (de tamaños de 1 a 100nm) presentan propiedades físicas, químicas y biológicas particulares. Este proceso ha dado lugar a una amplia variedad de dispositivos y productos elaborados con nano-partículas. Sin embargo son poco satisfactorios los estudios que describen las posibles implicaciones genotóxicas ante dichas partículas debido a que su comportamiento dentro pruebas y modelos convencionales es totalmente diferente al de partículas del mismo material pero de mayor tamaño (Kisin *et al.*, 2007).

Los Nanotubos de Carbono (CNT) son nanopartículas conformadas por estructuras hexagonales de carbono, que al plegarse forman estructuras tubulares que poseen propiedades electrónicas, mecánicas y térmicas de interés industrial (Terrones y Terrones 2003). Se ha reportado que los CNT pueden interactuar con diferentes biomoléculas como enzimas, antígenos-anticuerpos y moléculas de DNA, entre otras. Estudios *in vitro* sobre las propiedades eléctricas de los CNT de pared sencilla (SWCNT's) han mostrado que pueden oxidar preferentemente guaninas al estar en contacto con el DNA (Napier *et al.*, 2005).

Por otra parte, se ha observado que muchas endonucleasas de restricción presentan preferencias en el corte de algunos de sus sitios de reconocimiento en una misma molécula de DNA, expresado en diferencias en sus tasas de corte. Usualmente son modestas diferencias de órdenes de 10 veces en la eficacia, pero hay un grupo particular de enzimas de restricción que muestra una preferencia dramática dentro de sus sitios de reconocimiento (New England Biolabs, 2009). Debido a las propiedades de interacción de los CNT con el DNA, nos preguntamos si esta interacción puede afectar la eficacia de corte de dichas enzimas de restricción.

En el presente proyecto se estudió la interacción del DNA con los SWCNT, mediante un eficacia de corte de una serie de endonucleasas de restricción de tipo

II (*EcoRI*, *HindIII*, *SacII*, *NarI* y *NaeI*), las cuales presentan diferencias en las tasas de corte de órdenes desde 10 hasta 50 veces, en sustratos de DNA del fago λ y DNA del plásmido pBR322 respectivamente, en presencia de nanotubos de carbono de pared sencilla (10,10).

II. INTRODUCCIÓN

1. Nanotecnología

Es dentro del mundo de las moléculas, átomos y estructuras nanométricas, en el que se desarrolla la nanotecnología, una nueva disciplina que implica la habilidad de observar, medir, manipular y explotar las propiedades de materiales a escalas de nanómetros, cuyos rangos van de 1nm hasta 100nm (Fig.1). Esta disciplina ha adquirido un potencial extraordinario a nivel mundial, fomentado el descubrimiento de numerosos materiales que pueden cambiar nuestras vidas mediante el mejoramiento de productos existentes y la creación de nuevos (Magrez *et al.* 2006; Ochoa, 2008).

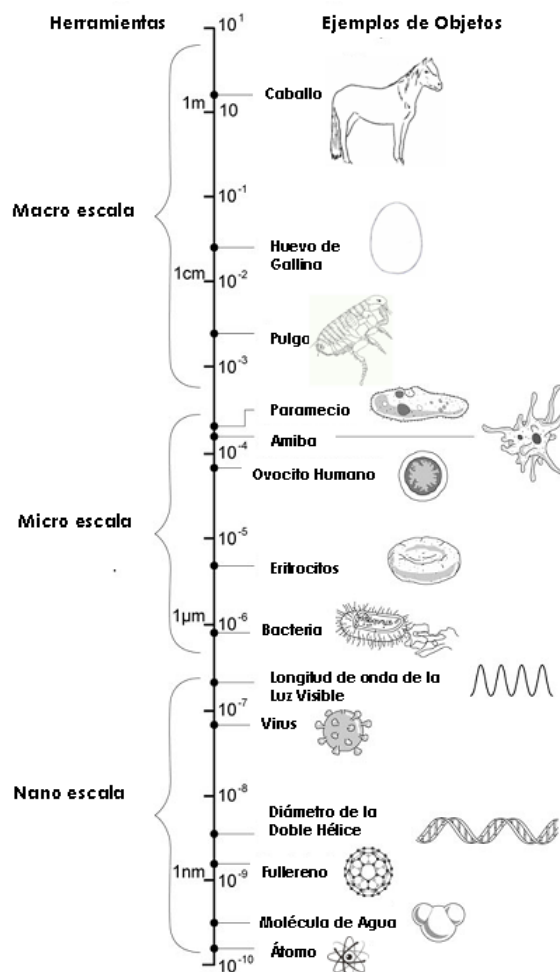


Figura 1. Diagrama de objetos a diferentes escalas (Modificado de Mongillo, 2007).

Tabla 1. Superficie de área por unidad de volumen.

Longitud del lado del cubo	Volumen del Cubo (V)	Superficie del Área del Cubo (A)	Proporción A / V
3mm	27mm ³	54mm ²	2mm
2mm	8mm ³	24mm ²	3mm
1mm	1mm ³	6mm ²	6mm

Todo este desarrollo se debe a que las propiedades de la materia; físicas, químicas y biológicas, generalmente son diferentes a escalas nanométricas, comparadas con cantidades mayores del mismo material. Esto se debe en parte a la diferencia en la superficie de área por unidad de volumen a escalas nanométricas, conforme la escala disminuye hasta valores nanométricos, la relación existente entre área/volumen incrementa (Tabla 1.1; Mongillo, 2007). Este factor es importante ya que al incrementar el número de nanopartículas de cierta sustancia también se incrementa la proporción de átomos que se encuentran en la superficie en comparación con el número de átomos internos. Los átomos de la superficie tienden a comportarse de forma diferente a los del interior debido a que presentan un estado energético mayor, implicando que sean más propensos a reaccionar con partículas de sustancias cercanas. Como resultado, se pueden llevar a cabo reacciones químicas entre átomos y moléculas de las superficies, actuando como reactores químicos en miniatura (Mongillo, 2007).

Otra característica es que mientras menor es la escala, los átomos se comportan diferentes, tendiendo a obedecer las leyes de la mecánica cuántica. (Sugunan y Dutta, 2004). Estas propiedades dependientes del tamaño son de gran interés para diversas aplicaciones en la industria e investigación, haciendo de la nanotecnología un área de gran inversión.

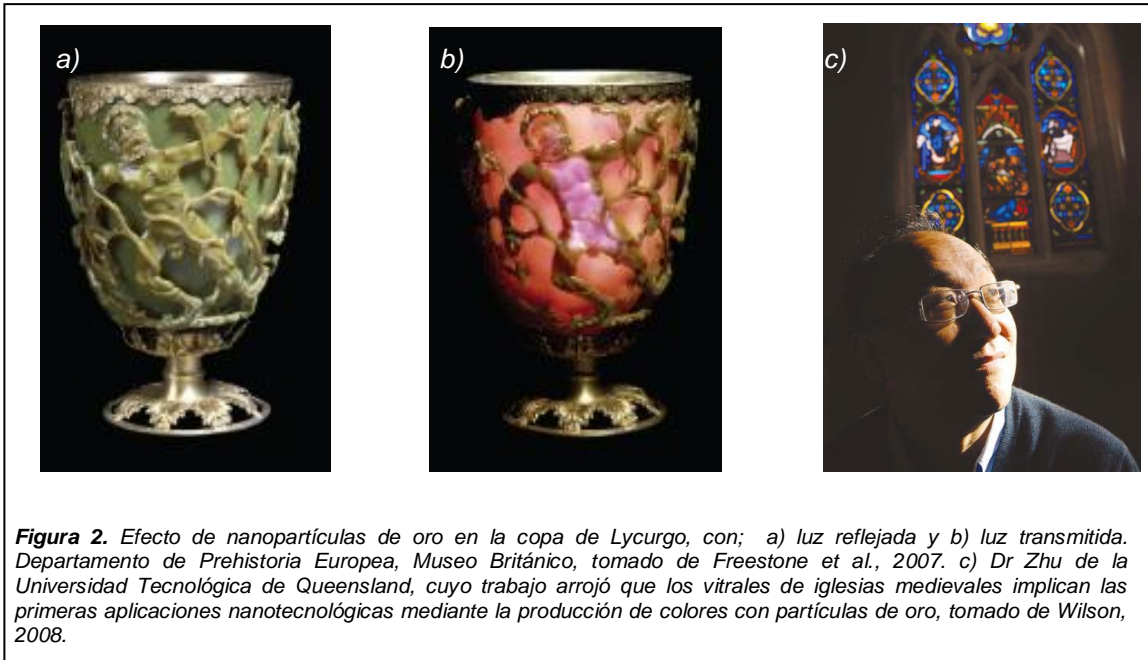
En el 2005 se vendieron globalmente casi \$30 mil millones de dólares en productos conteniendo algún tipo de nanomaterial. En la actualidad más de 200 compañías comercializan los casi 700 productos con aplicaciones nanotecnológicas disponibles en el mercado (Mongillo, 2007).

Dentro de estos productos podemos encontrar pinturas y ceras para autos, las cuales dan una mayor resistencia contra rayones y una mejor cobertura de las superficies. Dentro de los artículos deportivos ya se comercializan raquetas de tenis y bats de baseball endurecidos con nanotubos de carbono, dándoles una rigidez 100 veces mayor a aquellas de acero y 6 veces más ligereza. En el caso

de la industria de la limpieza se producen limpiadores y antibacteriales con tecnologías de nano-emulsión para matar patógenos sin tener que ser inflamables ó corrosivos. La industria textil también se ha beneficiado con la producción de nuevas fibras elaboradas con mezclas de los textiles comunes y nano-fibras, dando nuevas cualidades a los productos como impermeabilidad, antiestática y manteniendo la frescura o calor de los materiales (Monteiro-Riviere y Lang Tran, 2007).

A pesar del reciente surgimiento de esta nueva rama de la tecnología, el hombre junto con otros seres vivos, se han expuesto desde hace mucho tiempo a una gran variedad de partículas nanométricas, tanto de origen natural (por ejemplo aquellas producidas por emisiones volcánicas e incendios forestales), como aquellas que se produjeron indirectamente por máquinas de combustión resultantes de la revolución industrial (Monteiro-Riviere y Lang Tran, 2007).

Las primeras nanopartículas utilizadas por el hombre, sin conciencia de ello, datan del Siglo IV D.C. y son principalmente suspensiones de nanopartículas de metales, características por sus colores brillantes. Aunque el propósito de esta aplicación era meramente estético, artefactos con nanopartículas de oro y plata empezaron a fabricarse durante el imperio Romano, como ejemplo representativo se encuentra la copa de Lycurgo. Este artefacto contiene un extraordinario tallado representando la leyenda del rey Lycurgo muerto por Dionisio y es el único ejemplar completo de un tipo especial de vidrio conocido como dicroico, o sea que cambia de color dependiendo de la posición de la luz. Cuando la luz es reflejada en la copa, el color de la copa es verde opaco pero cuando la luz pasa a través de ésta cambia a un color rojo traslúcido que brilla intensamente, fenómeno que se debe a que el vidrio contiene pequeñas nanopartículas de oro y plata en estado coloidal (Freestone *et al.*, 2007)



Del mismo modo se ha observado que diversos vitrales de iglesias medievales Europeas fueron decorados con vidrio tratado con nanopartículas de oro y plata. Además de los atributos estéticos de estas aplicaciones, ahora se sabe que también sirven como purificadores de aire debido a que las partículas de oro al ser energizadas por el sol, adquieren la capacidad de destruir contaminantes tales como químicos volátiles orgánicos (Wilson, 2008).

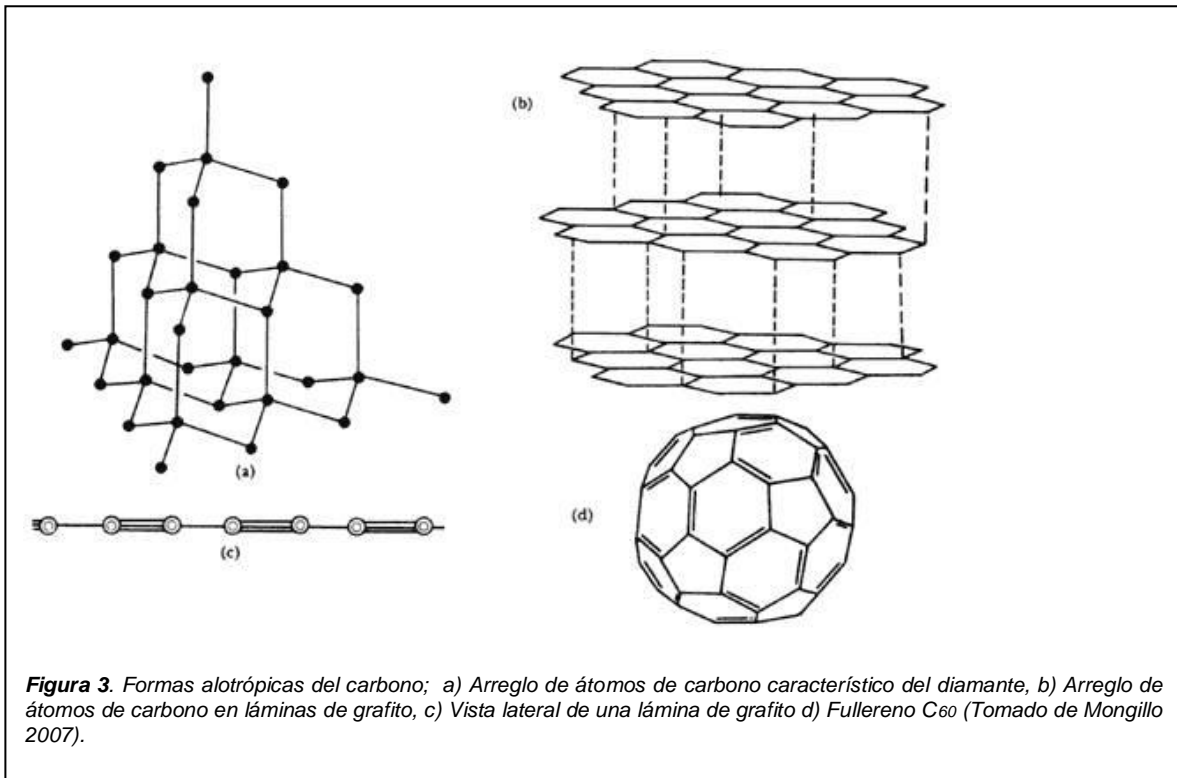
2. Nanopartículas de Carbono

En la actualidad existe una amplia variedad de materiales cuyas propiedades a nivel nanométrico han causado gran interés y por consecuencia diversas aplicaciones, entre ellos se encuentran los silicatos y cerámicas, nanopartículas de metales (oro y plata), nanofibras, puntos cuánticos (quantum dots) y nanopartículas de carbono. Estas últimas, nanoestructuras basadas en átomos de carbono, son de los nanomateriales más utilizados y entre los cuales se encuentran las hojas de grafito, esferas de fullereno y los nanotubos de carbono (Sugunan y Dutta, 2004; Terrones y Terrones, 2003).

Existen diversas formas alotrópicas del carbono, cada una presentando una estructura molecular diferente, estas son: grafito, diamante y nanoestructuras de carbono (fullerenos y nanotubos de carbono). También existe el carbono amorfo, el cual no tiene forma específica, particularmente carece de forma cristalina, un ejemplo de éste es el hollín. Por otro lado el grafito, el diamante y el grupo de las nanoestructuras de carbono sí presentan formas cristalinas.

El diamante es el mineral natural más duro, conteniendo átomos de carbono en un arreglo tridimensional. Aunque el diamante no es un buen conductor de electricidad es un excelente conductor de calor (Fig. 3 (a)).

El grafito es un mineral suave que puede encontrarse de forma natural y sintética. Está formado por átomos de carbono unidos fuertemente por enlaces covalentes en un arreglo bidimensional, formando láminas (Fig. 3 (b)). Las láminas se encuentran unidas entre sí por fuerzas de Van der Waals, propiedad que permite el fácil deslizamiento de las capas, dándole al grafito la propiedad de ser un buen lubricante sólido, sumado a la característica de ser un buen conductor eléctrico.



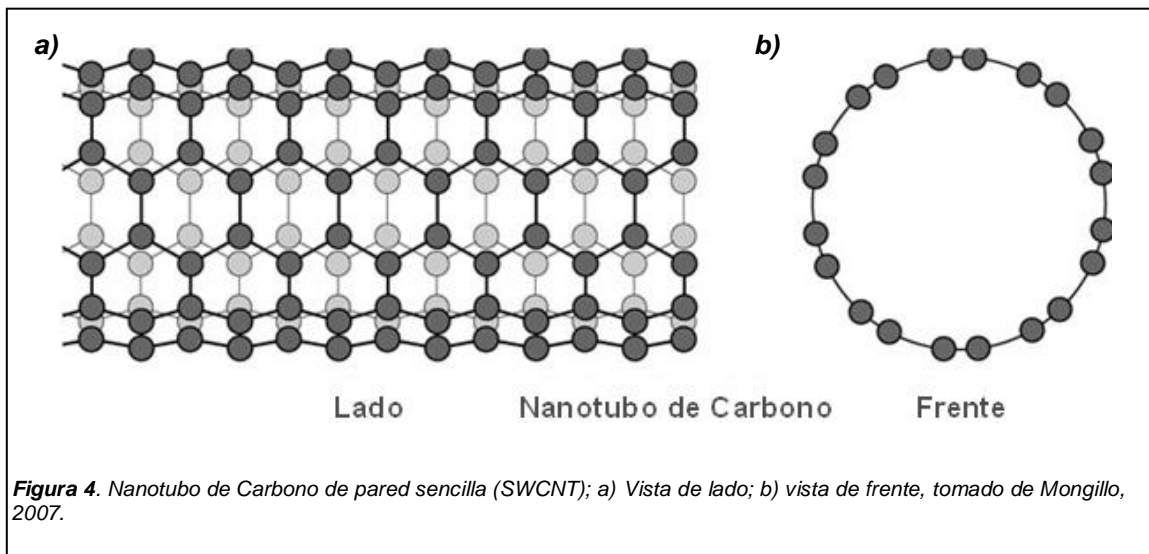
Las nanoestructuras de carbono representan la tercera forma alotrópica del carbono, estas estructuras conforman al conjunto de materiales más utilizados dentro de la nanotecnología, debido a su potencial aplicación en diversas áreas. Dentro de este grupo se encuentran a los fullerenos y a los nanotubos de carbono.

2.1 Fullerenos y Nanotubos de Carbono

Los fullerenos son moléculas de carbono que se encuentran arregladas en formas esféricas, elípticas o cilíndricas. Son de aproximadamente 1 nm de diámetro. El descubrimiento de dichas partículas en 1985 por Robert F. Curl, Jr., Richard E. Smalley y Harold W. Kroto mereció el premio Nobel de 1996. El nombre fullereno proviene de Richard Buckminster Fuller, arquitecto reconocido

por sus diseños de domos geodésicos, los cuales en apariencia semejan a tales nanopartículas. El fullereno más común y conocido es el C_{60} (buckminsterfullerene, buckyball; Fig. 3 (d)) el cual asemeja a un balón de fútbol soccer que incluye 20 hexágonos y 12 pentágonos en su estructura, aunque también se han descubierto otros fullerenos como el C_{70} , C_{76} , y C_{84} .

Los nanotubos de carbono (CNT's por sus siglas en inglés) son resultado del mismo proceso de síntesis que el de los fullerenos. Un nanotubo de carbono tiene una fuerza tensil de 20 veces más que el acero y una densidad de la mitad que la del aluminio, por lo que es más fuerte que el acero y más ligero que el aluminio (Yu *et al.*, 2000). Estos son principalmente láminas de grafito o grafenos enrolladas, formando cilindros muy delgados y largos (Fig. 4 a y b).



En 1976, el grupo de Morinobu Endo de la Universidad de Shinshu publicó las primeras imágenes de pequeños filamentos de carbono con un diámetro menor a 10nm (los primeros nanotubos), estas pasaron desapercibidas al no ser el objetivo principal de dicha investigación (Endo, 2008). Ijima (1991), tras observar bajo el microscopio electrónico muestras del hollín resultante del proceso de síntesis de fullerenos C_{60} , encontró unas estructuras tubulares y huecas que asemejan a agujas. Estas estructuras estaban formadas por capas concéntricas

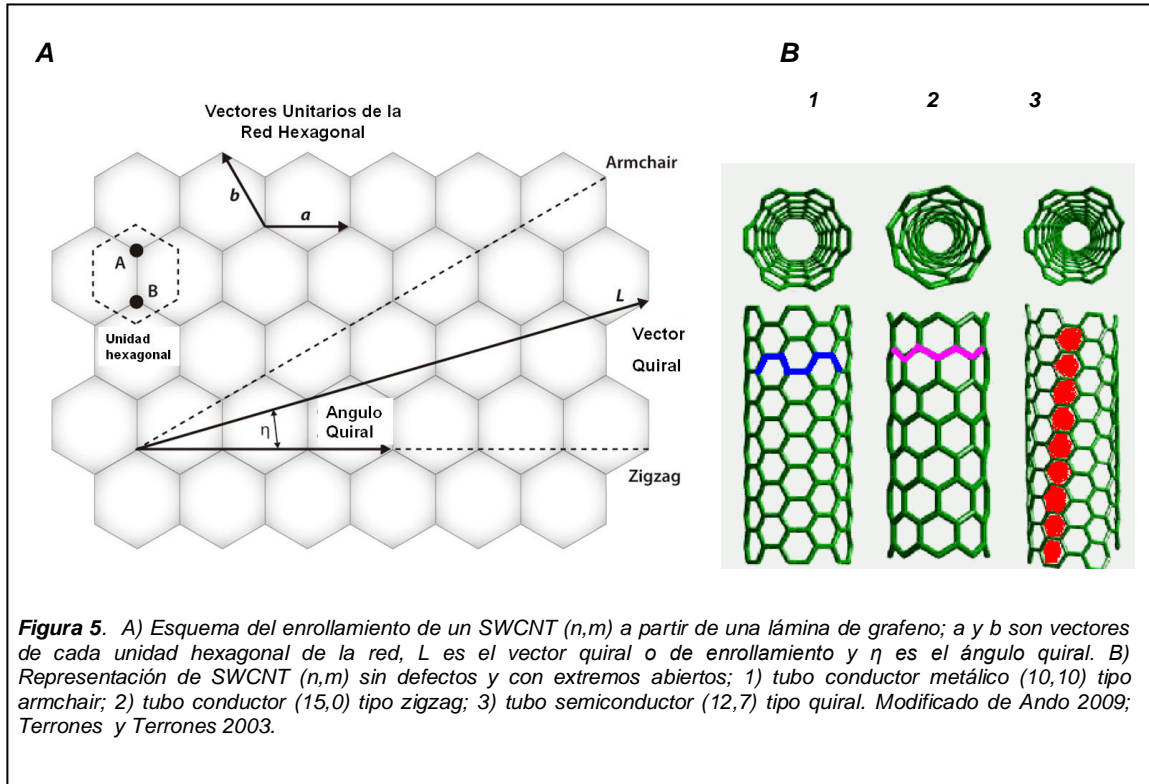
de láminas de grafito enrolladas, se trataban de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT's por sus siglas en inglés) y presentaban en sus extremos moléculas semiesféricas de fullerenos. Iijima y colaboradores (1993) observaron los primeros nanotubos de carbono de pared sencilla (SWCNT's por sus siglas en inglés).

2.2 Estructura, Propiedades y Clasificación de los CNT's

Un CNT se forma cuando una lámina de grafito se envuelve en si misma y el borde resultante se une. La forma en la que la lámina es enrollada depende de los índices de Hamada (vectores representados por un par de numeros enteros n,m), que a su vez dan lugar a un vector quiral (o de enrollamiento) y por los vectores unitarios de la red hexagonal a y b (Fig. 5A). El vector de enrollamiento se puede definir con la siguiente ecuación:

$$\mathbf{r} = n\mathbf{a} + m\mathbf{b}$$

Las circunferencias de los CNT's se definen de acuerdo con su vector de enrollamiento, existiendo aquellos que son quirales (donde $m \neq n$ (m,n)) y los no quirales (con configuraciones armchair cuando $m=n$ (m,m) y zig-zag cuando $n=0$ ($m,0$)).



En 1992, dos grupos de investigación descubrieron que los CNT's presentan propiedades electrónicas, dependiendo de su diámetro y quiralidad (Dresselhaus y Avouris, 2001). Los CNT's de tipo armchair fueron catalogados como conductores metálicos (Fig. 5 B1), los de tipo zigzag como semiconductores (con excepción de casos en los que $m-n$ es un múltiplo de 3, Fig. 5 B2). Estos resultados sorprendieron a la comunidad científica ya que el grafito solamente se comporta como un semi conductor (Terrones y Terrones, 2003).

Además de las características electrónicas, los CNT's presentan propiedades superiores a otros materiales comerciales de interés industrial. A continuación se presentan algunas de estas propiedades:

Tabla 2. Comparación de las propiedades que exhiben los CNT con respecto a otros materiales.

<i>Propiedad</i>	<i>Nanotubos</i>	<i>Por comparación</i>
<i>Resistencia a la tracción</i>	<i>45 mil millones de Pascales (1000X más resistente que el acero)</i> <i>(Endo et al., 2004)</i>	<i>Las aleaciones de acero de alta resistencia se rompen alrededor de 2 mil millones de pascales.</i>
<i>Elasticidad</i>	<i>Pueden doblarse a grandes ángulos y vuelven a su estado original sin daño.</i> <i>(Terrones y Terrones, 2003)</i>	<i>Los metales y las fibras de carbono se fracturan ante esfuerzos similares.</i>
<i>Conducción de corriente eléctrica</i>	<i>Estimada en mil millones de amperes por centímetro cuadrado.</i> <i>(Miravittles et al., 2001)</i>	<i>Los alambres de cobre se funden aproximadamente a un millón de amperes por centímetro cuadrado .</i>
<i>Emisión de campo</i>	<i>Poseen una alta capacidad de emisión de electrones. Son capaces de emitir electrones a 0.11 eV de energía</i> <i>(Terrones y Terrones, 2003)</i>	<i>Los mejores emisores de electrones utilizados en la actualidad emiten en un rango entre 0.6 y 0.3 eV.</i>
<i>Transmisión de Calor</i>	<i>Se predice que es tan alta como 6,000 vatios por metro por kelvin, a temperatura ambiente.</i> <i>(Miravittles et al., 2001)</i>	<i>El diamante altamente puro transmite 3,320 W/mK</i>
<i>Estabilidad térmica</i>	<i>Estable aún a 2,800 grados Celsius en el vacío, y 750 °C en aire.</i> <i>(Terrones y Terrones, 2003)</i>	<i>Los alambres metálicos en microchips se funden a temperaturas de entre 600 y 1000°C.</i>

Basándose en lo anterior, los nanotubos de carbono se pueden clasificar de acuerdo a distintos parámetros como el número de capas de grafito que tienen, el tipo de simetría e índice de quiralidad que presentan y a propiedades físicas como conductividad eléctrica.

- **Clasificación de acuerdo al número de capas:**

- Nanotubos de carbono de pared sencilla (SWCNT)**

Son aquellas estructuras conformadas por una capa bidimensional de grafito enrollada, formando un cilindro con un diámetro de nanómetros y una longitud que puede llegar a micras. Pueden o no poseer semiestructuras de fullerenos en sus extremos. Algunas de sus características es que pueden ser 10 veces mas fuertes que el acero y pueden tener 1.2 veces mas dureza que el diamante (Walters *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2000).

- Nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT)**

Están formados por capas concéntricas de forma cilíndrica, separados de aproximadamente una distancia similar a la distancia interplanar del grafito (Terrones *et al.*, 1997).

- **Clasificación de acuerdo a la conductividad eléctrica:**

Dependiendo de sus valores m y n los nanotubos de carbono pueden ser metálicos o semiconductores, de acuerdo a su diámetro y su disposición helicoidal.

Conductores metálicos

Un CNT puede ser metálico cuando $n-m = 3p$ (siendo p un entero). En la figura 5 B, se muestran nanotubos de carbono abiertos en los extremos, conformando estructuras metálicas conductoras (Fig. 5 B 1 y 2).

Semiconductores

Se considera como semiconductor cuando n y m presentan todos los demás valores (Fig. 5B 3; Katz y Willner, 2004).

De acuerdo a una clasificación genérica:

Nanotubos Quirales

No presentan simetría de reflexión y no son isomórficos.

Nanotubos No- Quirales

(Zigzag y armchair) presentan simetría de reflexión y son isomórficos (Ochoa, 2008).

○ **De acuerdo a los índices de Hamada (n,m):**

Los CNT's también se pueden clasificar con base en su índice de quiralidad, dividiéndolos en tres tipos: armchair, quiral y zigzag.

Nanotubos Armchair

Implican que sus índices de hamada sean iguales entre si ($n=m$) y presentan un ángulo quiral $\theta = 30^\circ$.

Nanotubos Zigzag

Los nanotubos de tipo zigzag presentan un índice de hamada $m=0$ y una $\theta = 0^\circ$.

Nanotubos Quirales

Son aquellos que presentan un índice de hamada $n>m>0$ y tienen un ángulo $= 0^\circ < \theta < 30^\circ$ (Katz y Willner, 2004).

2.3 Síntesis de CNT

En el 2004 la producción anual global de SWCNT fue de 9 toneladas.

Existen tres métodos comúnmente utilizados para sintetizar CNT's:

- Descarga de Arco
- Deposición de Vapor Químico (CVD)
- Ablación Láser

El rasgo común de estas metodologías es la adición de energía a una fuente de carbono para producir fragmentos (grupos o átomos de carbono solos) que

pueden recombinarse para generar CNT's. La fuente de energía puede ser electricidad de una descarga de arco, calor de un horno (~ 900° C) para el CVD o luz de alta intensidad de un láser (ablación láser).

Posterior a la síntesis, los CNT's son generalmente purificados para remover residuos de carbón amorfo (hollín), residuos libres del catalizador (generalmente son residuos de metales en donde los nanotubos fallaron en crecer) y cualquier otro material de soporte.

Esto se logra mediante lavados o ultrasonificación con ácido diluido. Los CNT's altamente purificados llevan un tipo de oxidación adicional. Debido a que los procesos de purificación pueden llegar a destruir a los CNT's, la remoción de impurezas debe ser balanceada en contra de la introducción de defectos en los tubos (Donaldson *et al.*, 2006).

Los CNT varían en su tamaño y diámetro dependiendo del procedimiento para su síntesis. Las longitudes dependen generalmente del tiempo de síntesis pero son típicamente de decenas de micras aunque se han sintetizado significativamente más cortos y largos. Los diámetros de los SWCNT son controlados por los tamaños de la nanopartícula del metal del cual son crecidos, los cuales varían de entre 0.7nm a 3nm. Los MWCNT generalmente varían de entre 10nm a 200nm de diámetro.

2.4 Reactividad de los CNT.

Los CNT's no son significativamente reactivos, por ejemplo deben calentarse hasta 500° C antes de quemarse en el aire, aunque hay puntos en la estructura de los CNT's que los hacen más reactivos que otros, éstos generalmente yacen en ciertos defectos, como átomos de carbono faltantes y en aquellos con tapas curvas mas tensas. Los CNT's que son purificados tienen más probabilidad de presentar defectos adicionales en forma de residuos de ácido carboxílico (-COOH). Una muestra de CNT's contendrá, invariablemente, una variedad de impurezas residuales derivadas de la síntesis, que pueden ser metales (Co, Fe, Ni y Mo son de los metales mas utilizados durante la síntesis de CNT's) usualmente encapsulados e incorporados en los extremos de los nanotubos; partículas orgánicas formadas a partir de las láminas de grafito (Ej. hollín amorfo) y finalmente residuos del material de soporte para el catalizador (Ej. silicatos y óxido de magnesio; Donaldson y Borm, 2004).

Debido a la reciente expansión en métodos para modificar y funcionalizar a los CNT's se ha hecho posible su solubilidad y dispersión en agua, abriendo una vía para una fácil manipulación y procesamiento en ambientes fisiológicos para su aplicación en la biología y biomedicina (Wenrong Yang *et al.*, 2007). A pesar de que los CNT's se han logrado solubilizar en solventes orgánicos y en agua mediante modificaciones químicas, adsorción de detergentes y compuestos aromáticos, se ha comprobado que las moléculas de DNA, en soluciones acuosas, permiten la dispersión de los SWCNT's (Naotoshi *et al.*, 2003). De igual manera se han propuesto modelos en los que la presencia del DNA de una sola hebra propicia la formación de híbridos DNA/CNT (Lustig *et al.*, 2005), y que dicho híbrido no inactiva al DNA, por el contrario, puede provocar la oxidación de guaninas (Napier *et al.*, 2005). Estudios con modelos computacionales proponen sistemas en los que matrices de CNT's interactúan acoplándose en el surco mayor del DNA (Lu *et al.*, 2005). Otros trabajos han mostrado que los CNT's pueden ser

conjugados con carbohidratos y proteínas, por ejemplo nucleasas (Wei *et al.*, 2007).

Por otra parte, existe un grupo de enzimas de restricción que presentan preferencias en el corte de algunos de sus sitios de reconocimiento dentro de un mismo sustrato, expresado en notables diferencias en sus tasas de corte (New England Biolabs, 2009).

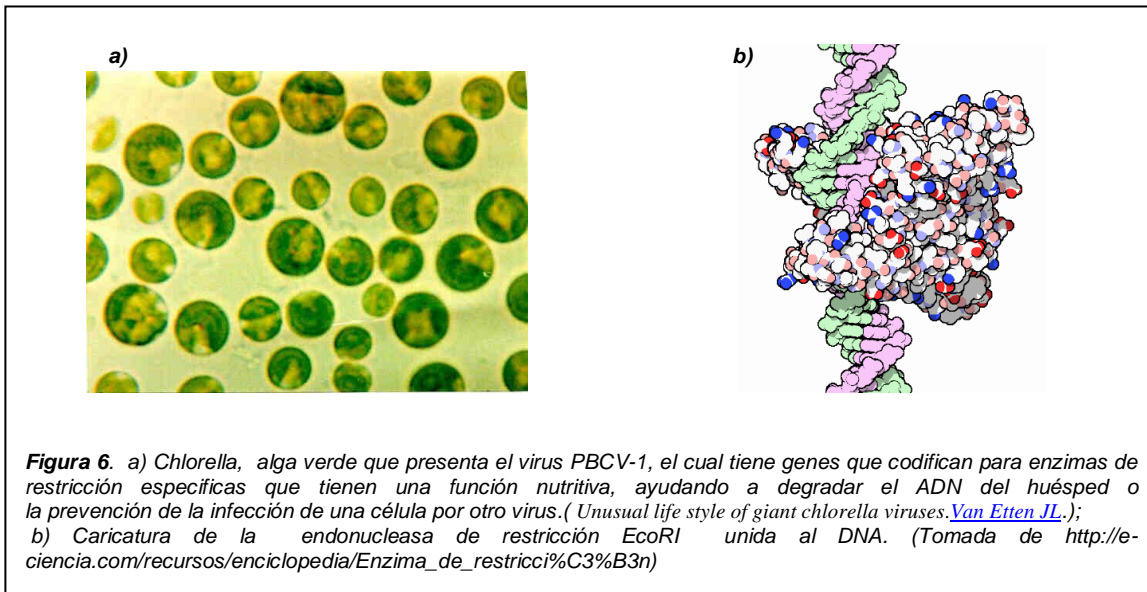
Debido a las propiedades de interacción de los CNT con el DNA por modificación de la estructura del DNA y a las propiedades para formar interacciones de van der Waals en moléculas lineales, se puede proponer que esta interacción puede afectar la eficacia de corte de dichas enzimas de restricción.

3. Enzimas de Restricción

Las nucleasas o enzimas de restricción son proteínas con actividades enzimáticas que permiten a la célula romper uniones covalentes fosfodiéster en las cadenas del DNA y RNA. Existen desoxirribonucleasas las cuales son nucleasas que cortan uniones fosfodiéster en el DNA y ribonucleasas, que cortan RNA; las hay que degradan cadenas dobles o sencillas. Otras propiedades de estas enzimas son las de ser exo o endonucleasas. Las exonucleasas requieren sustratos de ácidos nucleicos con extremos libres —5' ó 3'—, e inician su rompimiento en esos extremos (Bolívar, 2007).

Por otro lado las endonucleasas de restricción o enzimas de restricción no requieren extremos presentes en sus sustratos y por lo tanto hidrolizan el enlace fosfodiéster de un ácido nucleico dentro o cerca de una secuencia de reconocimiento específica de DNA ó RNA, generando una serie de fragmentos más pequeños (Nelson y Cox, 2005).

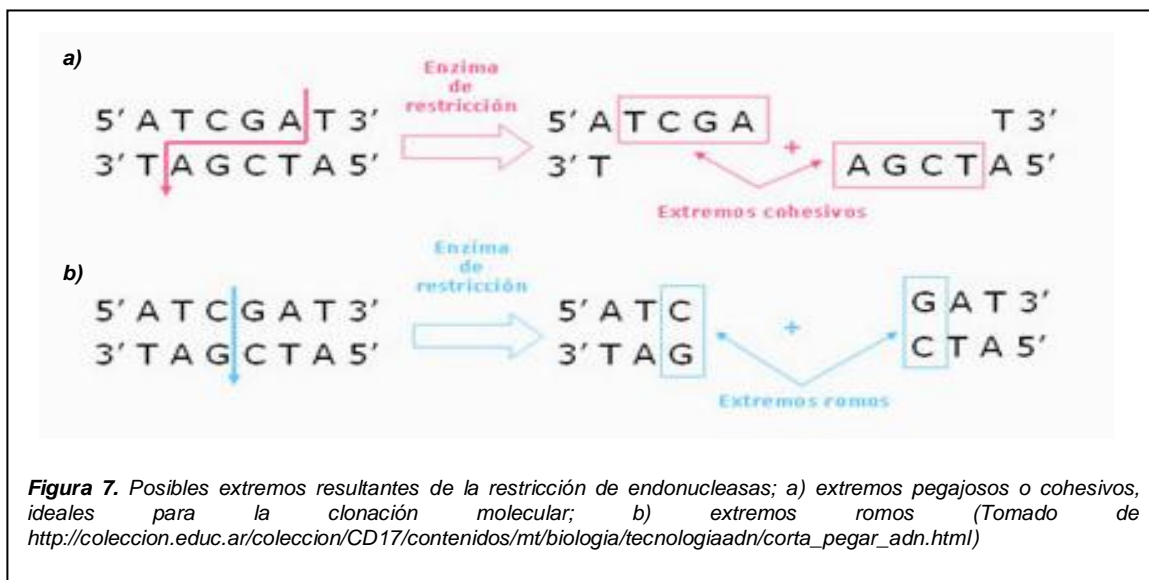
3.1 Endonucleasas de Restricción



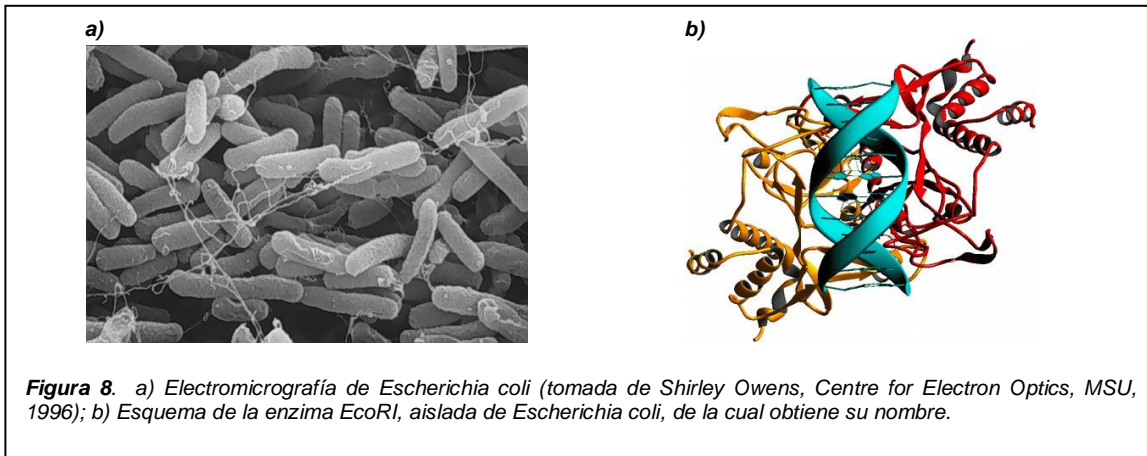
Las endonucleasas de restricción son componentes de sistemas de Modificación-Restricción (MR), encontradas en un amplio rango de especies bacterianas,

arqueas y virus de ciertas algas unicelulares (Fig. 6 a; Pingoud *et al.*, 2005). La función biológica principal de estas enzimas fue descubierta a principio de la década de 1960 por Werner Arber, implicando el reconocimiento y corte del DNA ajeno al del organismo, por lo tanto se dice que restringe al DNA externo (Nelson y Cox, 2005). Para resguardar al DNA propio en los organismos mencionados, se llevan a cabo procesos de restricción-modificación por un complejo compuesto por la endonucleasa de restricción (la cual restringe el DNA externo) y en ciertos casos una DNA metilasa específica (la cual metila a la secuencia interna para evitar su corte). Otras funciones propuestas, pero que aún se encuentran bajo discusión, es su participación en recombinación y transposición (Pingoud *et al.*, 2005).

Estas enzimas se han convertido en herramientas fundamentales para la disección *in vitro* del DNA, ya que las secuencias que reconocen y posteriormente cortan, son generalmente pequeñas secuencias específicas de entre cuatro y ocho pares de nucleótidos en cualquier molécula de DNA. De esta manera con ciertas enzimas es posible cortar o digerir un DNA particular, siempre de la misma manera, en forma reproducible, utilizando la misma enzima de restricción (figura 7).



Con respecto al tipo de corte que realizan, pueden ser en ambas hebras del DNA, dejando de dos a cuatro nucleótidos sin aparear en cada extremo del corte de cada hebra. Los extremos de estas hebras son conocidos como extremos pegajosos debido a que pueden aparearse entre ellos o con otros extremos complementarios de DNA foráneo. Otro tipo de extremos producidos son los romos, los cuales no generan extremos sin aparear debido a que el corte de los enlaces fosfodiester se realiza a la misma altura en ambos lados de la doble hélice.



La nomenclatura de las endonucleasas de restricción generalmente es derivada de la abreviatura del nombre del organismo del cual fue aislada dicha enzima. El nombre es formado por la primera letra del género y las dos primeras letras de la especie. Cuando la enzima se encuentra presente en una cepa específica de un microorganismo, el nombre básico de tres letras puede ser seguido por la designación particular de la cepa (ejemplo *EcoRI* deriva su nombre de *Escherichia coli* organismo de donde se aisló y del factor de resistencia R, figura 8 a y b). Finalmente, un número romano indica el orden de descubrimiento de las enzimas dentro de una cepa microbiana (Bolívar, 2007).

A pesar de la gran variedad de endonucleasas que reconocen secuencias específicas de nucleótidos, hay ciertas enzimas que pueden no ser específicas al unirse al DNA. Esta inespecificidad usualmente no implica a la interacción de la proteína con las bases nitrogenadas, sino con la estructura del DNA. En contraste,

la especificidad de la unión se caracteriza por una íntima relación entre la interacción directa de la enzima con las bases y la interacción indirecta con la estructura del DNA. Generalmente entre 15-20 uniones de hidrógeno son formados entre una enzima de restricción dimérica y las bases nitrogenadas de la secuencia de reconocimiento, además de las numerosas uniones de van der Waals y de los puentes de hidrógeno con el DNA, el cual puede ser mediado por el agua.

El proceso de reconocimiento desencadena grandes cambios conformacionales de la enzima y el DNA, los cuales dan lugar a la activación de los centros catalíticos. En muchas enzimas de restricción los centros catalíticos, uno en cada subunidad, son representados por el motivo PD...D/EXK, en el cual los dos carboxilatos son responsables de la unión al Mg^{2+} , cofactor esencial de la mayoría de estas enzimas. El mecanismo específico de corte aún no se ha establecido para alguna de estas enzimas, el principal cuestionamiento yace en el número de iones de Mg^{2+} involucrados directamente en el corte. El corte en las dos hebras usualmente ocurre de forma concertada y da lugar a la inversión de la configuración del fósforo. Los productos de la reacción son fragmentos de DNA con 3'-OH y fosfatos-5'.

Con respecto a su estructura, las endonucleasas de restricción difieren entre si en la composición de sus subunidades y en ciertos requerimientos de cofactores. Sin embargo todas presentan un núcleo estructural en común, configurado por 4 láminas β y una α hélice.

3.2 Tipos de Endonucleasas de Restricción

Las endonucleasas de restricción se han clasificado en tres tipos; I, II y III. Para el año 2009 la base de datos de enzimas de restricción REBASE (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>), reportó: 4,755 enzimas de tipo I, 5,947 tipo II, 1,017 tipo III y 840 de tipo IV.

Las enzimas de tipo I cortan el DNA azarosamente en sitios que pueden estar a más de 1000 pares de bases de la secuencia de reconocimiento (Nelson y Cox 2005). Éstas consisten en tres diferentes subunidades; HsdM, HsdR y HsdS, las cuales son responsables de la modificación, restricción y reconocimiento de la secuencia, respectivamente. La estructura cuaternaria de estas enzimas es HsdM₂HsdR₂HsdS. Otra característica de estas enzimas de tipo I es que requieren de ATP, Mg²⁺ y metilación para su actividad. De forma general, estas enzimas interactúan con dos sitios de reconocimiento asimétricos, traslocando el DNA mediante la hidrólisis del ATP y cortando el DNA en zonas dístales al sitio de reconocimiento, aproximadamente a la mitad entre los dos sitios. Ejemplos de estas enzimas son *EcoKI*, *EcoAI*, *EcoR1241* y *StySBLI*, las cuales representan a los subtipos IA, IB, IC y ID respectivamente (Pingoud *et al.*, 2005).

Las endonucleasas de restricción de tipo III consisten en solamente dos subunidades: Mos, responsable del reconocimiento y modificación del DNA y Res, encargada del corte o restricción del DNA. Las nucleasas activas presentan una estequiometría Mod₂Res₂, requieren de ATP y Mg²⁺ para su actividad y también son estimuladas por metilación. Interactúan con dos sitios de reconocimiento asimétricos, translocan el DNA de manera dependiente a la hidrólisis de ATP y cortan el DNA de 5 a 25 pares de nucleótidos de distancia del sitio de reconocimiento. Ejemplos de estas son las enzimas *EcoP1I* y *EcoP15I*.

Las endonucleasas de restricción de tipo IV reconocen y cortan DNA metilado. Como tal, no son consideradas parte de un sistema MR. La enzima más estudiada y representativa de este grupo es McrBC, la cual consiste en dos subunidades; McrB y McrC, responsables del reconocimiento y del corte del DNA, respectivamente. McrBC reconoce el DNA en al menos dos secuencias de reconocimiento a una distancia variable, conteniendo citocinas metiladas o hidroximetiladas en una o ambas hebras. Para el corte del DNA, se requiere de GTP y Mg²⁺ y sucede cerca de uno de los dos sitios de reconocimiento (Pingoud *et al.*, 2005).

Finalmente, las enzimas de restricción de tipo II son de las más utilizadas en técnicas de biología molecular. Fueron aisladas por primera vez en 1970 por

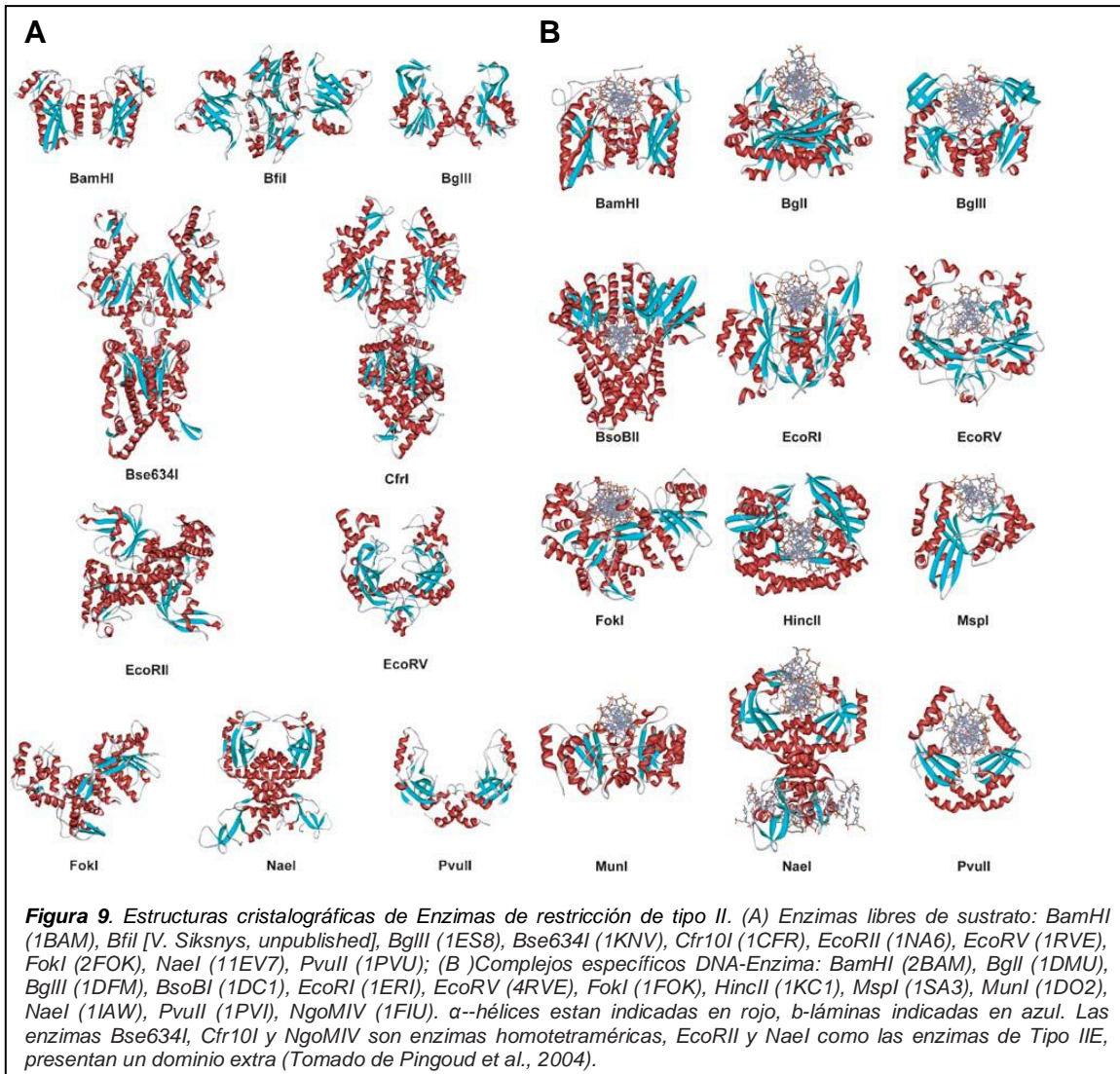
Hamilton Smith y se caracterizan por presentar una organización de subunidades más simple, generalmente son homodiméricas y homotetraméricas. Estas enzimas no requieren de ATP o GTP y cortan el DNA dentro o muy cerca de la secuencia de reconocimiento, generalmente son secuencias palindrómicas de 4 a 8 pb. Con algunas excepciones, requieren de Mg^{2+} como cofactor.

3.2.1 Endonucleasas de Restricción de Tipo II

Las enzimas de tipo II ortodoxas son homodímeros que reconocen sitios palindrómicos (secuencias que se leen igual de 5'-3' y de 3' a 5') de 4 a 8 pb de longitud y cortan el DNA dentro de esta secuencia en ambas hebras, produciendo extremos hidroxilos -3' y fosfatos -5'. Algunas reconocen palíndromos discontinuos, interrumpidos por una secuencia de una longitud específica pero de secuencia inespecífica. Los fragmentos de DNA producidos presentan extremos romos o cohesivos, con terminaciones 5' o 3' de 5 nucleótidos.

Dependiendo de las características específicas se clasifican en subtipos. La nomenclatura actual trata de agrupar a las enzimas de restricción de tipo II de acuerdo a propiedades que son del subtipo respectivo, sin embargo existen características compartidas entre enzimas de grupos diferentes, resultado de la gran diversidad dentro de este grupo (Pingoud *et al.*, 2005).

La mayoría de las enzimas de restricción usadas para trabajos de recombinación de DNA pertenecen al Subtipo IIP (P de palindrómico), de acuerdo a la nomenclatura aceptada. Muchas endonucleasas de restricción Tipo II tienen propiedades diferentes de aquellas de Subtipo IIP, de las cuales *EcoRI* y *EcoRV* son las representantes más conocidas y estudiadas.



Las enzimas IIA reconocen secuencias asimétricas. Un miembro de este subtipo es la enzima *Bpu10I*, un heterodímero cuyas unidades son responsables del corte de cada cadena, respectivamente. Estas enzimas son precursores ideales para la generación de extremos pegajosos.

El tipo IIB abarca enzimas que cortan el DNA en ambos lados de la secuencia de reconocimiento, un ejemplo es *BpII*, la cual corta la hebra de polaridad 5'- 3' 8 nucleótidos antes y 13 después de la secuencia de

reconocimiento, mientras que la hebra que va de 3'- 5' es cortada 13 nucleótidos antes y 8 después de la secuencia.

Las enzimas del tipo IIC se caracterizan por tener dominios de modificación y de corte dentro de un polipéptido. Una de las primeras enzimas descubiertas de este grupo es *BcgI*, la cual tiene una organización funcional muy inusual. Presenta una estructura cuaternaria A₂B con dominios de endonucleasa y metiltransferasa en la subunidad A y el dominio de reconocimiento localizado en la subunidad B. *BcgI* ilustra el problema de nomenclatura de las enzimas de restricción de Tipo II ya que también es considerada de tipo IIB (Pingoud *et al.*, 2005).

El tipo IIE agrupa a enzimas que necesitan interactuar con dos copias de la secuencia de reconocimiento para lograr un corte eficiente, una copia siendo el blanco para el corte y la otra sirviendo como efector alostérico. Los ejemplos mejor estudiados con respecto a la estructura y función de este grupo son *EcoRII* y *NaeI* (Fig. 9). Es interesante notar que al remover el dominio efector de la enzima *EcoRII*, se convierte en una enzima muy activa de subtipo IIP. Otro caso es el de la enzima *Sau3AI*, la cual en ausencia de DNA se presenta como un monómero con dos dominios similares y en presencia de DNA se dimeriza funcionando como una enzima de tipo IIE, con un sitio catalítico y un sitio de efector alostérico (Pingoud *et al.*, 2005).

Las enzimas del tipo IIF son típicamente homotetraméricas, que interactúan con dos copias de su sitio de reconocimiento, pero cortan ambos sitios de forma más o menos concertada. Ejemplos muy bien estudiados incluyen a *CfrIol*, *NgoMIV* y *Sfil*, que aunque en soluciones son dímeros, se ensamblan en tetrámeros funcionales tras la unión con el DNA.

El tipo IIG comprende a un conjunto de enzimas que son similares e inclusive consideradas como un subgrupo del subtipo IIC. Presentan dominios de modificación y corte dentro de un polipéptido. A excepción de ser generalmente

estimuladas por Ado metilación, se comportan como las demás enzimas de tipo II, aunque la mayoría son consideradas también del subtipo IIS. Un ejemplo muy estudiado es Eco571. Las enzimas de este grupo son muy prometedoras para la ingeniería de endonucleasas de restricción con nuevas especificidades.

Las enzimas del tipo IIH se comportan como cualquier otra del tipo II, pero su organización genética se asemeja a los sistemas MR de Tipo I. Por ejemplo *AhdI* que reconoce la secuencia GACNNN/NNGTC, presenta una metiltransferasa que consiste en 2 subunidades de modificación y dos de especificidad.

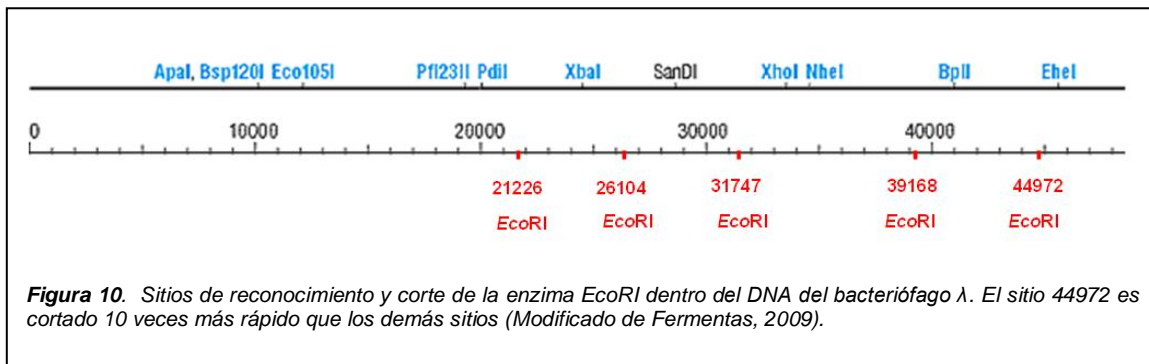
El tipo IIM incluye enzimas que reconocen una secuencia metilada específica del DNA en un sitio fijo. El representante mejor conocido es la enzima *DpnI* (GATC), la cual corta Gm6ATC, Gm6ATm4C and Gm6ATm5C, sin embargo no corta secuencias como GATC, GATm4C, GATm5C ó ciertos sitios hemimetilados

La diferencia entre las enzimas de subtipo IIM y las de Tipo IV (como la ya mencionada *McrBC*) es que las últimas no cortan su sustrato en un sitio fijo. Muchas enzimas de restricción son más o menos tolerantes a la metilación, pero para las enzimas de este grupo el grupo metilo es un elemento esencial de reconocimiento (Pingoud *et al.*, 2005).

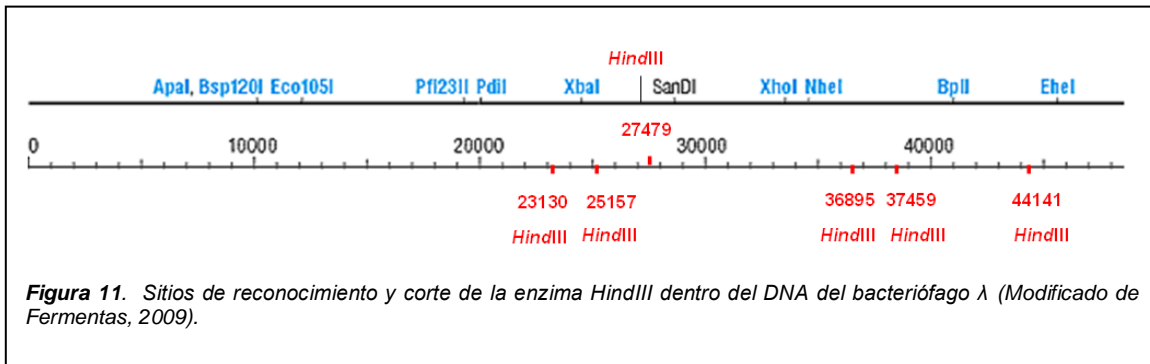
Las enzimas de tipo IIS cortan al menos una hebra del sustrato de DNA fuera de la secuencia de reconocimiento. Una de las enzimas más conocidas de este grupo es *FokI* (GGATG) la cual, como muchas otras del Tipo IIS, interactúa con dos sitios de reconocimiento antes de cortar el DNA. Estas enzimas son activas en forma de homodimeros y usualmente se componen por dos dominios; uno responsable por el reconocimiento del blanco y el otro por la catálisis (sirviendo también como dominio de dimerización). Estas enzimas se han usado para la creación de nucleasas quiméricas que cortan una sola hebra del duplex.

El tipo IIT engloba a enzimas heterodiméricas. Un representante de dicho grupo es *BsII* (CCNNNNN/NNGG), la cual está compuesta por dos subunidades diferentes. La enzima funcional es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$. Varias de estas enzimas se utilizan para generar complejos que cortan únicamente una sola hebra del duplex del DNA (Pingoud *et al.*, 2005).

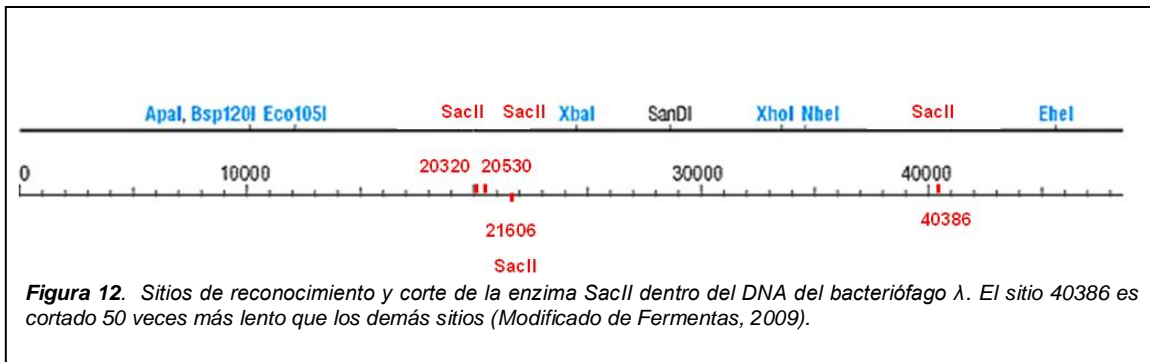
3.3 Preferencia de Sitios de Reconocimiento



Ciertas endonucleasas de restricción presentan una preferencia en el corte de algunos sitios de reconocimiento dentro de un mismo sustrato. Varios ejemplos de estas enzimas, han sido reportados, una de las primeras y de las más utilizadas es *EcoRI*. En 1975 Thomas y Davis reportaron que la preferencia de corte de *EcoRI* en los cinco sitios de reconocimiento dentro del DNA del bacteriófago λ , no es de manera azarosa, el sitio de reconocimiento más cercano al término es cortado 10 veces más rápido que los sitios que se encuentran en zonas de la parte media del DNA (Fig. 10). También se reportó que la misma enzima, pero esta vez en un sustrato de DNA de adenovirus-2, presenta diferentes tasas de corte entre los diferentes sitios de restricción (Forsblom *et al.*, 1976).



Nath y Azzolina reportaron una diferencia entre las tasas de corte de 10 y 14 veces de *EcoRI* y *HindIII* en sitios de restricción específicos para el ADN del fago lambda (Figs. 10 y 11).



En cuanto a la enzima *SacII*, ésta tiene cuatro sitios de reconocimiento en el DNA de lambda, de los cuales tres se encuentran agrupados en la parte media de ese sustrato (Fig. 12). El corte de estos sitios es 50 veces más rápido que el sitio restante cercano al término (nucleótido 40,386). *SacII* necesita interactuar con 2 copias de la secuencia de reconocimiento para cortar. Como resultado los sustratos con un solo sitio de reconocimiento para *SacII* son cortados a un ritmo más lento (New England Biolabs, 2009).

Las diferencias observadas en las tasas de corte realizadas por muchas endonucleasas de restricción son usualmente modestas diferencias que son de órdenes de 10 veces en la eficiencia, pero hay un grupo particular de enzimas de restricción que muestra una preferencia dramática de sitios de reconocimiento. Estas enzimas son *NarI*, *NaeI* y *SacII*.

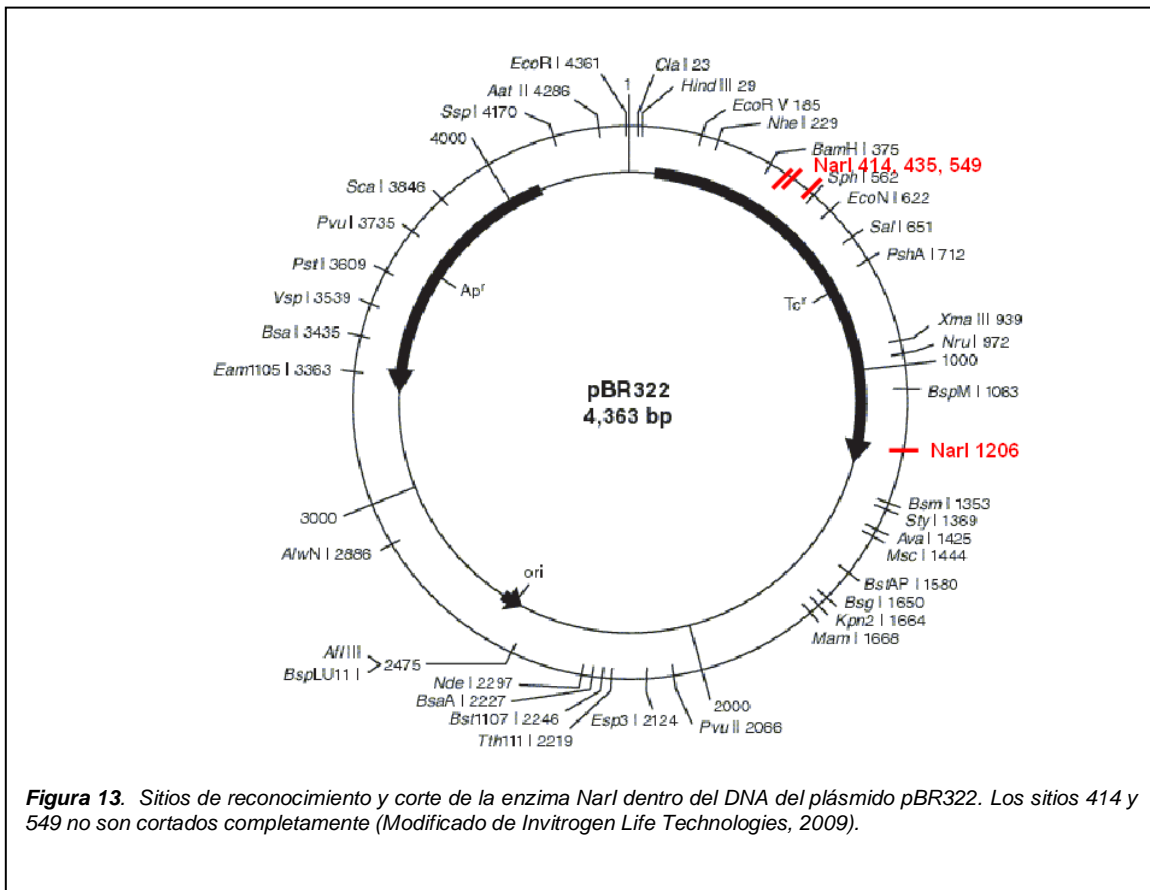


Figura 13. Sitios de reconocimiento y corte de la enzima *NarI* dentro del DNA del plásmido pBR322. Los sitios 414 y 549 no son cortados completamente (Modificado de Invitrogen Life Technologies, 2009).

El DNA de pBR322 contiene cuatro sitios de reconocimiento por parte de la enzima *NarI*. Una unidad de *NarI* (como la definida en adenovirus -2 DNA) puede cortar completamente dos de esos sitios en una hora bajo condiciones estándar (Fig. 13). El agregar 50 unidades adicionales de la enzima no cortan los 2 sitios restantes completamente, aún después de 16 horas (Broek *et al.*, 2006).

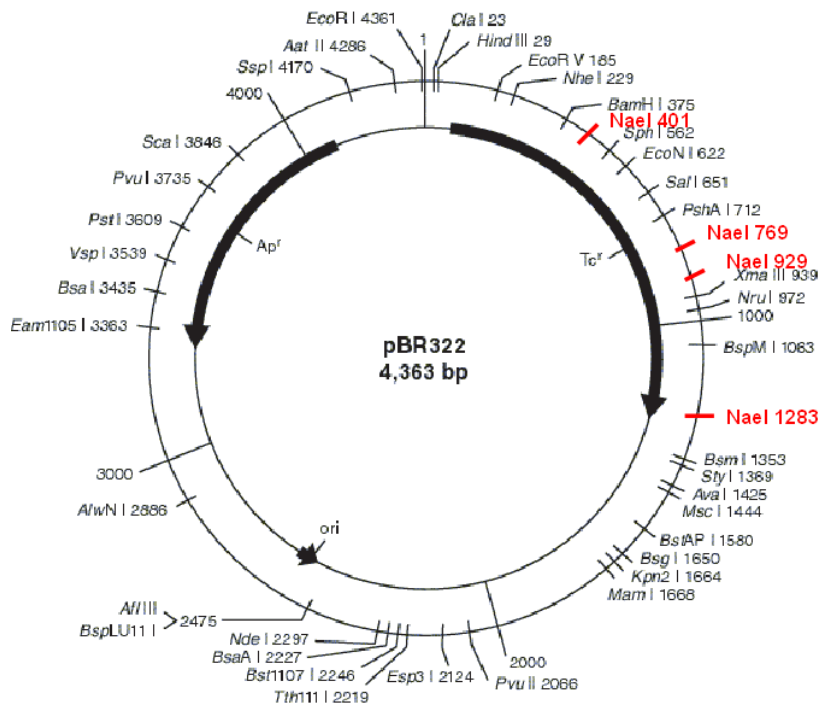


Figura 14. Sitios de reconocimiento y corte de la enzima *NaeI* dentro del DNA del plásmido pBR322. El sitio encontrado en el nucleótido 401 es cortado moderadamente lento y el sitio 1283 es cortado 50 veces más lento que los sitios 769 y 929 (Modificado de Invitrogen Life Technologies 2009).

Por otro lado la enzima *NaeI* presenta 4 sitios de reconocimiento en el mismo sustrato, localizados en los nucleótidos 401, 769, 929 y 1283. Todos los sitios son cortados con eficiencias diferentes sin embargo el sitio 401 es cortado moderadamente lento y 1283 es cortado 50 veces más lento (Fig. 14). Estos dos últimos sitios de reconocimiento son más resistente al corte en ausencia de los demás, debido a que tanto *NarI* como *NaeI* son enzimas de tipo IIE y por lo tanto necesitan interactuar con dos copias de la secuencia de reconocimiento para lograr un corte eficiente (Amersham Biosciences, 2009).

Se ha reportado que en el caso de ciertas enzimas de tipo IIE como las mencionadas anteriormente, cuyos sitios son resistentes al corte, son trans-

activados por la adición de DNA superenrollado de plásmidos o pequeños fragmentos de DNA, conteniendo secuencias propensas a corte. De forma similar están sujetas a cis-activación mediante la formación de asas del sustrato de DNA cuando los sitios resistentes al corte y los propensos al corte se encuentran dentro de la misma molécula. Por lo tanto la formación de las asas del DNA sirven para traer en contacto 2 ó más sitios de reconocimiento con una enzima en común dentro de una misma molécula de DNA (Yang y Topal, 1992).

La inducción de las asas dependen aparentemente de interacciones específicas entre la molécula de DNA con múltiples secuencias de reconocimiento y los múltiples sitios de unión de la enzima. La activación de la enzima sugiere una regulación alostérica del corte, por la acción de sitios cis y trans en el DNA que contiene tanto sitios resistentes como propensos al corte. La formación de las asas de DNA es un medio por el cual la molécula actúa como un efector alostérico de la enzima, dependiendo de las propiedades regulatorias de dicha proteína. Una vez que uno de los sitios es cortado y el asa es deshecha, la enzima se mantiene unida fuertemente a uno de los sitios de reconocimiento. Las posteriores formaciones de asas ocurren como un proceso en el que la asociación del complejo proteína-DNA con el segundo sitio de reconocimiento es el paso limitante en la tasa de corte (Broek *et al.*, 2006).

III. HIPÓTESIS

- ◇ Debido a que estudios anteriores han propuesto posibles modelos sobre la interacción entre los SWCNT y el DNA y por otro lado existe una serie de endonucleasas de restricción que presentan diferencias en la preferencia del corte de algunos de sus sitios de reconocimiento dentro de un mismo sustrato, entre ellas *EcoRI*, *HindIII*, *SacII*, *NaeI* y *NarI*, se propone una posible modificación en la preferencia de ciertos sitios de reconocimiento de alguna de las enzimas de restricción al interactuar con los SWCNT's, reflejado en una diferencia en la eficacia de corte de dichas endonucleasas de restricción.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General.

- ◇ Este proyecto tiene como objeto evaluar la eficacia en la actividad enzimática en el corte de DNA en presencia de Nanotubos de Carbono de Pared Sencilla dentro de un modelo con enzimas de restricción.

Objetivos Particulares.

- ◇ Estudiar la posible interacción de los SWCNT con el DNA, reflejado en el cambio de la eficacia de corte de las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII*, *SacII*, *NaeI* y *NarI*.
- ◇ Determinar si la supuesta unión de los CNT's a regiones ricas en guaninas interfiere con la actividad de dichas enzimas de restricción.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Enzimas de Restricción y sustratos de DNA.

Se eligió el siguiente grupo de enzimas debido a que presentan preferencia en el corte de ciertos sitios de reconocimiento dentro de un mismo sustrato; ésto se refleja en la diferencia en la eficacia de corte de tales sitios de reconocimiento.

Tabla 3. Características enzimas de restricción con preferencias en sus sitios de reconocimiento (New England Biolabs, 2009).

Enzima	Sustrato	Secuencia de reconocimiento	Características
<i>Eco RI</i>	DNA del fago λ	5'...G/AATTC...3' 3'...CTTAA/G...5'	De <i>Escherichia coli</i> . 6 sitios de reconocimiento en el DNA de λ .
<i>Hind III</i>	DNA del fago λ	5'...A/AGCTT...3' 3'...TTCGA/A...5'	De <i>Haemophilus influenzae</i> . 7 sitios de reconocimiento en el DNA de λ .
<i>Sac II</i>	DNA del fago λ	3'...CCGC/GG...5' 5'...GG/CGCC...3'	De <i>Streptomyces achromogenes</i> . 5 sitios de reconocimiento en el DNA de λ .
<i>Nae I</i>	DNA de pBR322	5'...GCC/GGC...3' 3'...CGG/CCG...5'	De <i>Nocardia aerocolonigenes</i> . 4 sitios de reconocimiento en el DNA de pBR322.
<i>Nar I</i>	DNA de pBR322	5'...GG/CGCC...3' 3'...CCGC/GG...5'	De <i>Nocardia argentinensis</i> . 4 sitios de reconocimiento en el DNA de pBR322.

Para cuantificar a las enzimas se utilizan unidades ya establecidas, resultado de la estandarización del corte en ciertas moléculas de DNA (New England Biolabs, 2009). Debido a lo anterior la unidad de cada enzima es descrita de la siguiente forma:

- *Eco RI*: unidad definida como la cantidad de enzima requerida para digerir 1µg de DNA del fago λ en 1hr a 37°C en un volumen total de 50µl.
- *Hind III*: unidad definida como la cantidad de enzima requerida para digerir 1µg de DNA del fago λ en 1hr a 37°C en un volumen total de 50µl.
- *Sac II*: unidad definida como la cantidad de enzima requerida para digerir 1µg de DNA de Adenovirus 2 en 1hr a 37°C en un volumen total de 50µl.
- *Nae I*: unidad definida como la cantidad de enzima requerida para digerir 1µg de DNA de pBR322 en 1hr a 37°C en un volumen total de 50µl.
- *Nar I*: unidad definida como la cantidad de enzima requerida para digerir 1µg de DNA de ΦX174 RFI en 1hr a 37°C en un volumen total de 50µl.

- **DNA del fago λ**

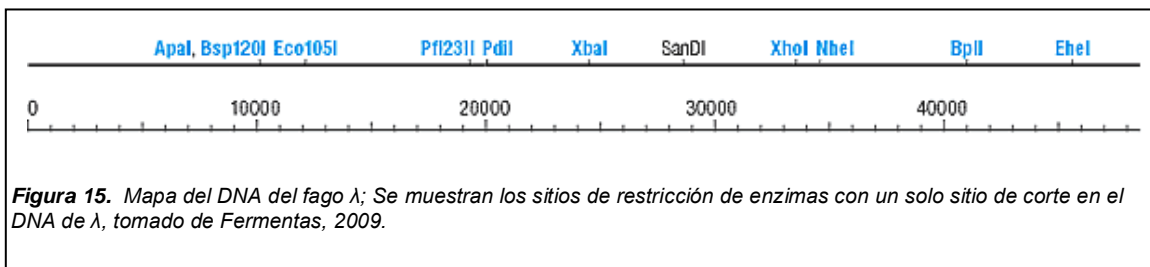
Lambda es un bacteriófago de *Escherichia coli* que está constituido por proteínas y DNA. Su material genético consiste en un cromosoma lineal de doble cadena que consta de 48,502 pares de bases y se caracteriza por contener aproximadamente 50 genes que codifican para 5 proteínas relacionadas con la regulación, 7 con la recombinación, 21 con la morfogénesis de la cápside y tallo, 2 con la replicación y 2 con la lisis bacteriana.

El genoma del fago λ está organizado de tal forma que presenta grupos de genes en unidades funcionales. A la derecha del sitio de integración del fago, o sea el sitio *attP*, se localizan los genes relacionados con la recombinación, posteriormente los genes relacionados a la regulación, le siguen los de replicación, los de lisis y finalmente los genes relacionados para la formación de la cápside y del tallo.

Después de que el fago inyecta su cromosoma en la célula, el cromosoma se circulariza uniendo los extremos complementarios de cadena sencilla que

presenta. Durante la vía lítica los genes que codifican para la replicación, lisis y demás proteínas del viron son expresados. Cuando el cromosoma se replica, las réplicas son empaquetadas en partículas de la progenie del fago. En la vía lisogénica, la expresión génica del fago es reprimida y el cromosoma circular se inserta en el cromosoma bacteriano por recombinación.

El DNA del fago λ es utilizado comúnmente como sustrato para la restricción enzimática y para generar fragmentos de DNA utilizados marcadores de peso molecular (Fig. 5; Kameyama *et al.*, 2004)



- **DNA del plásmido pBR322**

pBR322 es el primer plásmido secuenciado, diseñado artificialmente para la clonación, caracterización y expresión del material genético, es de los vectores de clonación mas utilizados en *E. coli*. pBR322 fue nombrado así por sus creadores, los doctores F. Bolívar y R.L. Rodríguez. Este plásmido permitió la clonación de cerca de los 2,000 primeros genes aislados de diferentes organismos, y gracias a sus múltiples derivados ha sido posible clonar, caracterizar y expresar DNA de distintos orígenes en diferentes organismos.

Consta de 4,361 pares de bases y contiene el replicón *rep* responsable de la replicación del plásmido; el gen *rop* el cual codifica para la proteína *Rop*, la cual promueve la conversión del complejo inestable RNA I- RNA II a un complejo estable y sirve para disminuir el número de copias; el gen *bla* que codifica para la beta-lactamasa, la cual confiere resistencia a ampicilina (proveniente del transposon Tn3); el gen *tet* el cual codifica para una proteína que da resistencia a tetraciclina. La secuencia circular está enumerada de tal modo que la posición 1 se refiere a la primera timina del único sitio de restricción de EcoRI (secuencia

GAATTC) y la numeración incrementa a través del gen tet y finalmente a través de la región Tn3 (Figura 16; Bolívar, 2007).

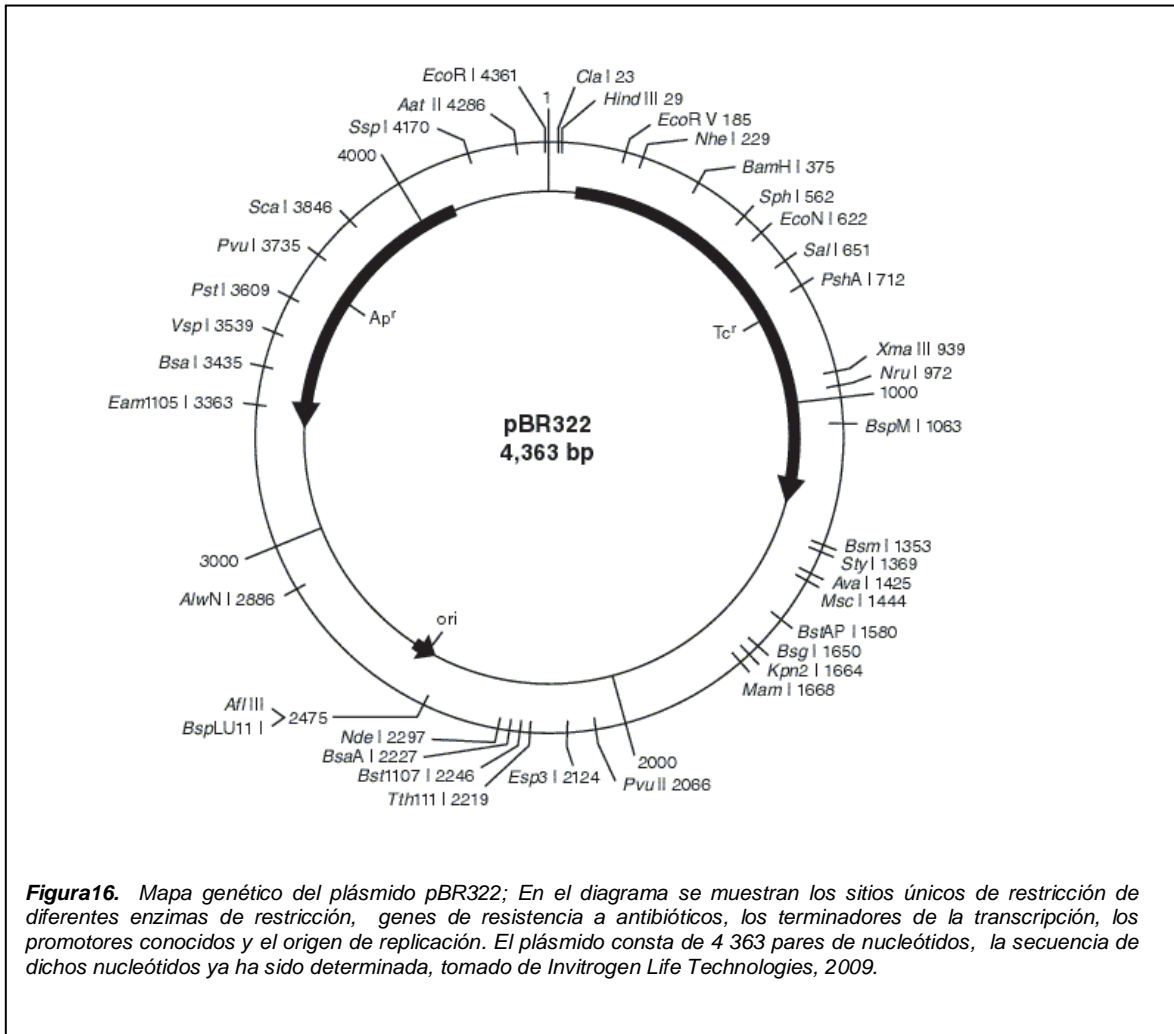


Figura16. Mapa genético del plásmido pBR322; En el diagrama se muestran los sitios únicos de restricción de diferentes enzimas de restricción, genes de resistencia a antibióticos, los terminadores de la transcripción, los promotores conocidos y el origen de replicación. El plásmido consta de 4 363 pares de nucleótidos, la secuencia de dichos nucleótidos ya ha sido determinada, tomado de Invitrogen Life Technologies, 2009.

Nanotubos de Carbono

Se utilizaron nanotubos de carbono de pared sencilla obtenidos de Nanostructure and Amorphous Material Inc. con 90% pureza de CNT's y 80% de pureza de SWNT's. Presentan un diámetro de 1-2 nm y longitud de 5-15 μm . Su proceso de fabricación fue mediante la descarga de un arco voltaico en láminas grafito, agrupados en cuerdas de 50 unidades. Otras características son:

- Punto de fusión 3652°
- Densidad 20° C de 1.7-1.9 g/cm³
- Área >400 mt²/g
- Clase de Irritante: XI (ACGIH)

Soluciones

3.1 Purificación y manejo del DNA

- a) El DNA del fago lambda se obtuvo de Invitrogen a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- b) El DNA de pBR322 se obtuvo de Fermentas con una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- c) El DNA genómico de *Salmonella* RC1 se obtuvo mediante el siguiente protocolo:
 1. Se inoculó 1L de RC1 en medio NB y se creció a 37°C toda la noche.
 2. Centrifugar a 10 kRPM a 4°C y agregar al botón 10ml de TEN pH 8.1 + 1mg/ml de lisozima + 80 μl de RNAsa 10mg/ml.
 3. Incubar en hielo-agua por 8' y agregar 200 μl de SDS al 10%.

4. Incubar en hielo-agua por 10' y posteriormente a 60°C por 20' en baño María.
5. Agregar 1 volumen de fenol y agitar por inversión.
6. Centrifugar 13 kRPM por 15' 4°C, recuperar fase acuosa.
7. Repetir 2 veces más los pasos 5, 6 y 7.
8. Añadir 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), agitar por inversión y Centrifugar a 13 Krpm por 15' a 4°C.
9. Recuperar fase acuosa y agregar Acetato de Potasio 3M para una concentración final de 0.3M.
10. Añadir 2.5 volúmenes de Etanol absoluto (a -20°C) y guardar a -20°C por 1h.
11. Centrifugar 15' a 13Krpm 4°C y decantar.
12. Realizar 2 enjuagues con etanol al 70% y centrifugar 15' a 13,000 RPM a 4°C y decantar.
13. Hacer un tercer enjuague con etanol sin decantar y guardar a 4°C toda la noche.
14. Centrifugar a 13 Krpm 4°C 15' y decantar.
15. Evaporar el etanol y resuspender el pellet en 200µl de H2O Milli Q para PCR (filtrada y estéril).
16. Dejar toda la noche a 4°C para su hidratación.
17. Se cuantificó en el espectrofotómetro NANODROP, resultando en una concentración de 5,590 µg/ml.

Solución de DNA - CNT's

La solución inicial de DNA-CNT's se realizó basándose en ensayos de suspensión de CNT's realizados previamente en el laboratorio, siendo las soluciones iniciales las siguientes:

- 1mg de CNT en una solución de DNA de RC1 a 120 µg en 1 ml de agua desionizada estéril. Se sonicó por 10 min y se agitó en el vortex.

- 1mg de CNT en una solución de DNA de λ a 120 μg en 1 ml de agua desionizada estéril. Se sonicó por 10 min y se agitó en el vortex.

Posteriormente se realizaron diluciones de 1:10 y 1:100 con DNA del fago lambda y DNA de pBR322 a partir de las respectivas soluciones iniciales.

Soluciones de buffers y enzimas

- ***EcoRI***

Obtenido de New England Biolabs. 20,000 u/ml.

Como amortiguador se utilizó el NEBuffer EcoRI 10x el cual contiene:

- 100 mM Tris-HCl
- 50 mM NaCl
- 10 mM MgCl_2
- 0.025 % Triton X-100
- pH 7.5 a 25°C

Su desactivación se lleva a cabo a 65°C por 20 minutos.

- ***HindIII***

Obtenido de New England Biolabs. 20,000 u/ml.

Como amortiguador se utilizó el NEBuffer 2 10x el cual contiene:

- 10 mM Tris-HCl
- 50 mM NaCl
- 10 mM MgCl_2
- 1 mM Dithiothreitol
- pH 7.9 a 25°C

Su desactivación se lleva a cabo a 65°C por 20 minutos.

- ***SacII***

Obtenido de ChimerX Laboratories, Inc. Con u/ μl .

Como amortiguador se utilizó el Buffer #2 10x el cual contiene:

- 10 mM Tris-HCl
- (pH 7.5 at 22°C)
- 10 mM MgCl₂
- 1 mM dithiothreitol
- 100 µg/ml albúmina bovina
- pH 7.5 a 22°C

Su desactivación se lleva a cabo a 65°C por 20 minutos.

○ ***Nael***

Obtenido de Invitrogen 20 u/µl.

Como amortiguador se utilizó el Buffer L 10x el cual contiene:

- 20 mM Tris-acetate
- 50 mM potassium acetate
- 10 mM Magnesium Acetate
- 1 mM Dithiothreitol
- pH 7.9 a 25°C

Su desactivación se lleva a cabo a 60°C por 20 minutos.

○ ***Narl***

Obtenido de ChimerX Laboratories, Inc. Con 20 u/µl.

Como amortiguador se utilizó el Buffer #1 10x el cual contiene:

- 10 mM Tris-HCl
- 10 mM MgCl₂
- 1 mM dithiothreitol
- 100 µg/ml albumina bovina
- pH 7.5 a 22°C

Su desactivación se lleva a cabo a 65°C por 20 minutos.

Soluciones de electroforésis

- EDTA 0.5 M (pH 8.0).
 - TAE
- Ácido acético glacial / Tris base / EDTA, 1X.
- TBE
- Tris Base / Ácido Bórico / EDTA 0.5X (pH 8.3).
- Agarosa de Sigma
 - Bromuro de Etidio [0.5mg/ml]

Protocolo de Digestión de DNA.

- Restricción de DNA del fago λ por *EcoRI*

Se preparó la mezcla de reacción formada por: agua desionizada estéril 2.5 μ l / muestra de DNA de λ [0.5 μ g / μ l], 5 μ l / amortiguador de reacción 1 μ l / Solución DNA-CNT 1 μ l / enzima de restricción 0.5 μ l (1u), para tener un volumen final de 10 μ l. Se colocó la mezcla en un tubo Eppendorf, homogenizando cada vez con una punta nueva y estéril. Las muestras se incubaron a 37°C durante 1', 15', 30', 45', 60' y 12h (over night). Las reacciones se inactivaron a 65°C por 20' y posteriormente se almacenaron a -20°C. Para retirar el buffer y demás impurezas, se procedió a precipitar las muestras con $\frac{1}{2}$ volumen de acetato de amonio al 2.5M más 2 veces el volumen de la muestra de etanol al 100%, dejándose a -70°C por 12 horas. Las muestras se centrifugaron por 10' a 4°C, se removió el sobrenadante y se dejó secar la pastilla en la microcentrífuga (al vacío), por 1h a velocidad media. Para observar la digestión de la muestra de DNA, se corrió un gel de agarosa 0.9% y se tiñó con bromuro de etidio para observarse y fotografiarse bajo la luz ultravioleta.

- Restricción de DNA del fago λ por *HindIII*

La solución se preparó mezclando: agua desionizada estéril 1 μ l / muestra de DNA de λ [0.5 μ g / μ l], 6 μ l / amortiguador de reacción 1 μ l / Solución DNA-CNT 1 μ l / enzima de restricción 1 μ l (2u), para tener un volumen final de 10 μ l. La mezcla se colocó en un tubo Eppendorf, homogenizando cada vez con una punta nueva y estéril. Las muestras se incubaron a 37°C durante 1', 15', 30', 45' 60' y 12h (over night). Las reacciones se inactivaron a 65°C por 20' y se almacenaron a -20°C. Posteriormente se procedió a precipitar las muestras con ½ volumen de acetato de amonio al 2.5M + 2 veces el volumen de etanol puro a -70°C por 12 horas. Se centrifugaron las muestras por 10' a 4°C, se removió el sobrenadante y se dejó secar la pastilla en la microcentrífuga por 1h a velocidad media. Para observar la digestión de la muestra de DNA, se corrió un gel de agarosa 0.9% y se tiñó con bromuro de etidio para observarse y fotografiarse bajo la luz ultravioleta.

- Restricción de DNA del fago λ por *SacII*

La mezcla consistió en agua desionizada estéril 2.5 μ l / muestra de DNA de λ [0.5 μ g / μ l], 5 μ l / amortiguador de reacción 1 μ l / Solución DNA-CNT 1 μ l / enzima de restricción 0.5 μ l (6 u), obteniendo un volumen final de 10 μ l. Se colocó la mezcla en un tubo Eppendorf, se homogenizó cada vez con una punta nueva y estéril. Las muestras se incubaron a 37°C durante 1', 15', 30', 45' 60' y 12h (over night). Las reacciones se inactivaron a 65°C por 20' y se almacenaron a -20°C. Se precipitaron las muestras con ½ volumen de acetato de amonio al 2.5M + 2 veces su volumen de etanol puro a -70°C por 12 horas. Se centrifugaron las muestras por 10' a 4°C, se removió el sobrenadante y se dejó secar la pastilla en la microcentrífuga por 1h a velocidad media. Para observar la digestión de la muestra de DNA, se corrió un gel de agarosa 0.9% y se tiñó con bromuro de etidio para observarse y fotografiarse bajo la luz ultravioleta.

- Restricción de DNA de pBR322 por *NarI*

Se mezclaron: agua desionizada estéril 2.5 μ l / muestra de DNA de pBR322 [0.25 μ g / μ l], 5 μ l / amortiguador de reacción 1 μ l / Solución DNA-CNT 1 μ l / enzima de restricción 0.5 μ l (10 u), para tener un volumen final de 10 μ l. Se colocó la mezcla en un tubo Eppendorf, homogenizando cada vez con una punta nueva y estéril. Las muestras se incubaron a 37°C durante 1', 15', 30', 45' 60' y 12h (over night). Las reacciones se inactivaron a 65°C por 20' y se almacenaron a -20°C. Posteriormente se procedió a precipitar las muestras con $\frac{1}{2}$ volumen de acetato de amonio al 2.5M + 2 veces su volumen de etanol puro a -70°C por 12 horas. Se centrifugaron las muestras por 10' a 4°C, se removió el sobrenadante y se dejó secar la pastilla en la microcentrífuga por 1h a velocidad media. Para observar la digestión de la muestra de DNA, se corrió un gel de agarosa 1.3% y se tiñó con bromuro de etidio para observarse y fotografiarse bajo la luz ultravioleta.

- Restricción de DNA de pBR322 por *NaeI*

Se preparó la mezcla de reacción formada por: agua desionizada estéril 2.5 μ l / muestra de DNA de pBR322 [0.5 μ g / μ l], 5 μ l / amortiguador de reacción 1 μ l / Solución DNA-CNT 1 μ l / enzima de restricción 0.5 μ l (10 u), para tener un volumen final de 10 μ l. Se colocó la mezcla en un tubo Eppendorf, homogenizando cada vez con una punta nueva y estéril. Las muestras se incubaron a 37°C durante 1', 15', 30', 45' 60' y 12h (over night). Las reacciones se inactivaron a 65°C por 20' y se almacenaron a -20°C. Se precipitaron las muestras con $\frac{1}{2}$ volumen de acetato de amonio al 2.5M + 2 veces su volumen de etanol puro a -70°C por 12 horas. Se centrifugaron las muestras por 10' a 4°C, se removió el sobrenadante y se dejó secar la pastilla en la microcentrífuga por 1h a velocidad media. Para observar la digestión de la muestra de DNA, se corrió un gel de agarosa 1.3% y se tiñó con bromuro de etidio para observarse y fotografiarse bajo la luz ultravioleta.

Protocolo Microscopía Electrónica.

Se utilizó una rejilla de cobre sobre la que se colocaron las siguientes soluciones:

- Solución de 1mg de CNT en 1 ml de agua desionizada estéril. Se sonicó por 10 min y se agitó en el vortex.
- Solución de 1mg de CNT en una solución de DNA de RC1 a 120 μg en 1 ml de agua desionizada estéril. Se sonicó por 10 min y se agitó en el vortex.
- 1mg de CNT en una solución de DNA de λ a 120 μg en 1 ml de agua desionizada estéril. Se sonicó por 10 min y se agitó en el vortex.

En cada rejilla se colocó 1 μl de cada solución y se esperó aproximadamente un minuto para que se secase. Posteriormente se observó en el microscopio electrónico de transmisión (TEM).

VI. RESULTADOS

1. Estandarización de Condiciones para Restricciones

Se estandarizaron y establecieron las condiciones específicas de restricción para observar la diferencia en la preferencia de sitios de reconocimiento y eficacia de corte de cada una de las siguientes enzimas: *EcoRI*, *HindIII*, *SacII*, *NaeI* y *NarI*.

1.1 Restricción del DNA del fago λ por *EcoRI*

Las condiciones para la restricción del DNA del fago lambda con la enzima *EcoRI* se establecieron con una concentración de 0.25 μ g/ μ l de DNA y 0.2u/ μ l de la enzima en un volumen total de 10 μ l, durante lapsos de 2' a 12h. Se realizaron electroforesis en geles de agarosa para observar el patrón de restricción resultante (Fig. 17. muestra las restricciones durante 2' carril "c" y 120' carril "d"). En el carril "a" se observa el marcador de peso molecular y en el carril "b" se observa el DNA del fago λ [2.5 μ g/ μ l] sin digerir.

La banda 1 de los carriles "c" y "d" corresponde al fragmento de menor peso molecular (3,503 pb), derivado del corte en el nucleótido 44,972 del extremo derecho del genoma del fago λ . Este sitio es reportado por Thomas y Davis como el que presenta una frecuencia de corte de hasta 10 veces mayor que la del nucleótido (nt) 31,747 y nt. 26,104 encontrados en el centro de la molécula. Las bandas 2, 3 y 4 que corresponden a un peso de 4,876pb, 5,804pb y 7,421pb, respectivamente son típicas de la restricción del DNA de λ por *EcoRI*.

Las bandas 5, 6 y 7 del carril "c" son bandas resultantes de la restricción parcial de la enzima. La banda 5 resulta de la ausencia del corte en el sitio correspondiente al nt. 44,972 implicando que se observe un fragmento de 9,304pb en vez de dos fragmentos: de 3,500pb y 5,804pb. La banda 6 de 10,521pb se

deriva de la ausencia de corte en el nucleótido 26,104, el cual en condiciones de restricción total da fragmentos de 4,878pb y 5,643pb. Cuando el nucleótido 31,747 es cortado por la enzima *EcoRI* (en condiciones para una restricción total), se obtienen fragmentos de 5,643pb y 7,421pb, pero en casos de restricción parcial en los que no se da el corte en dicho sitio se obtienen fragmentos de 13,064pb (banda 7, Fig.17). La banda 8 de los carriles “c” y “d” representan al DNA que no fue digerido por la enzima.

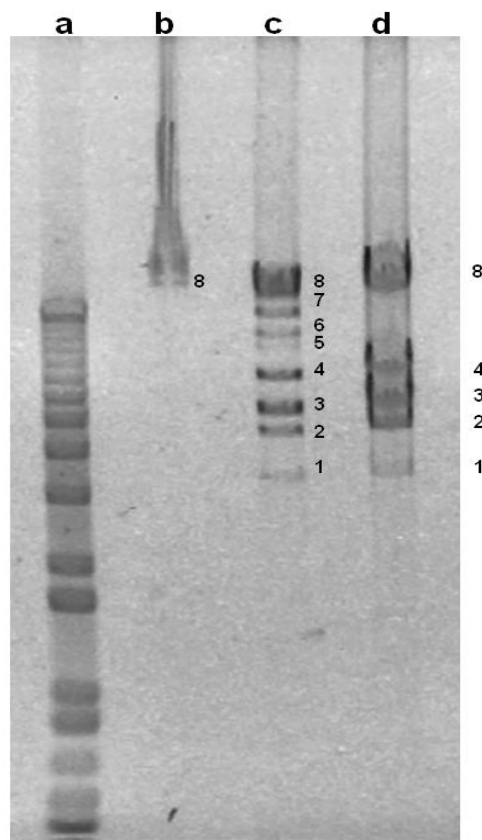


Figura17 . Gel de Agarosa al 0.9%, de la digestión del DNA del fago λ por la enzima *EcoRI*; carril a) marcador de peso molecular de una kb; carril b) DNA del fago λ ; carril c) DNA del fago λ digerido durante 2' por la enzima *EcoRI*; carril d) DNA del fago λ digerido durante 2h por la enzima *EcoRI*.

1.2 Restricción del DNA del fago λ por *HindIII*

Con respecto a la enzima *HindIII*, se establecieron las condiciones de restricción en el DNA del fago λ [0.2 μg / μl] con una concentración de 2u/ μl de la enzima con una incubación a 37°C durante 2' a 120' (Fig. 18 carriles "c" y "d").

En la figura se observa la electroforésis en un gel de agarosa de la restricción con *HindIII*; las bandas 1 (564pb), 3 (2,027pb), 4 (2,322pb), 5 (4,361pb), 6 (6,557pb) y 7 (9,416pb) son característicos de la restricción de la enzima, mientras que la banda 2 (679pb) es resultado de la ausencia del corte en el nucleótido 37,459 y la banda 8 (10,650pb) de la ausencia de corte en los sitios correspondientes a los nt. 36,895 y 37,459.

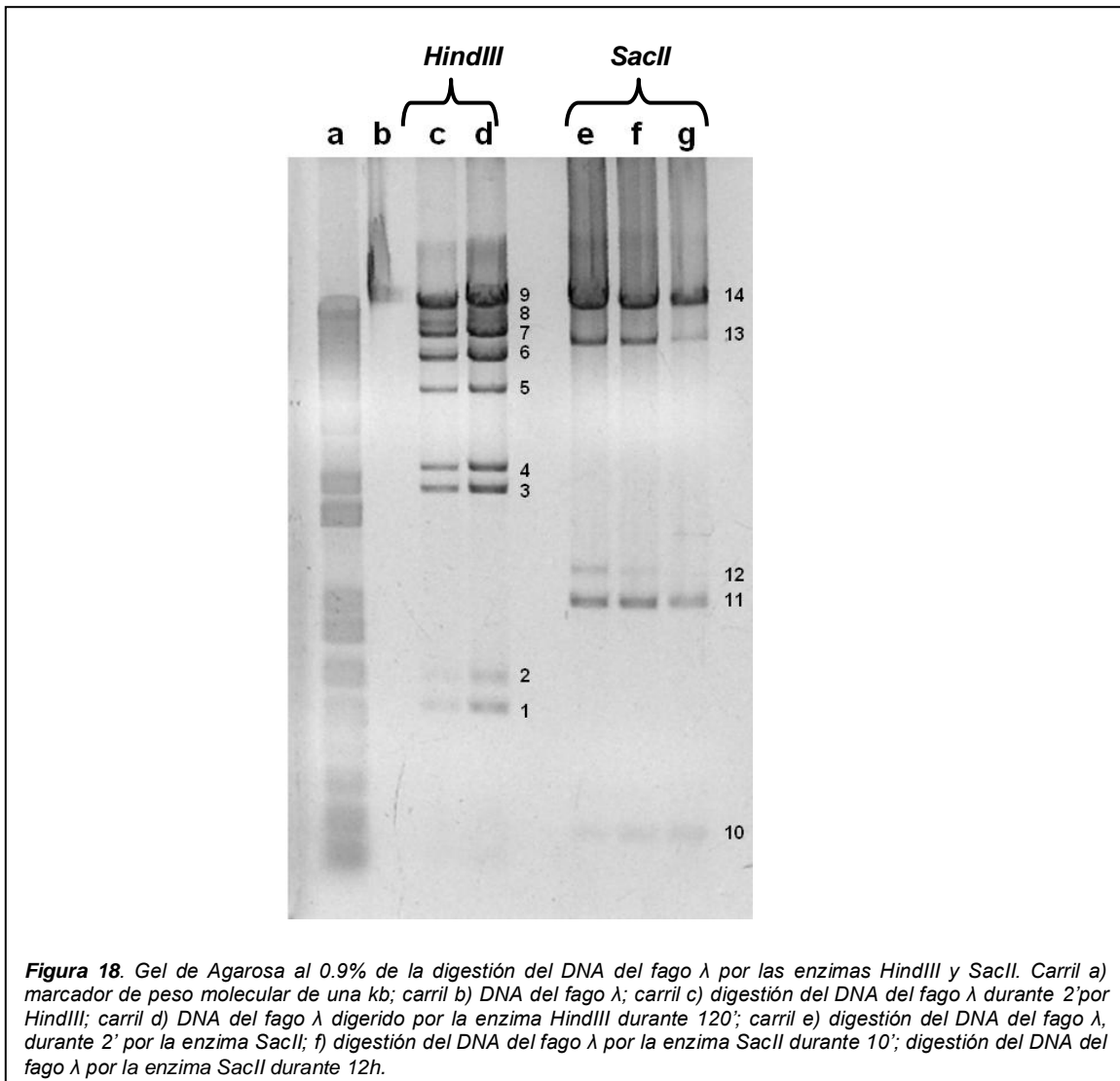


Figura 18. Gel de Agarosa al 0.9% de la digestión del DNA del fago λ por las enzimas *HindIII* y *SacII*. Carril a) marcador de peso molecular de una kb; carril b) DNA del fago λ ; carril c) digestión del DNA del fago λ durante 2' por *HindIII*; carril d) DNA del fago λ digerido por la enzima *HindIII* durante 120'; carril e) digestión del DNA del fago λ , durante 2' por la enzima *SacII*; f) digestión del DNA del fago λ por la enzima *SacII* durante 10'; digestión del DNA del fago λ por la enzima *SacII* durante 12h.

1.3 Restricción del DNA del fago λ por *SacII*

Se estableció una concentración de 0.1u/ μ l de la enzima *SacII* para el corte del DNA del fago λ [1.25 μ g/ μ l], en un volumen total de 12 μ l con una incubación a 37°C durante 2', 10' y 12h (Fig. 18 carriles "e" a "g"). Los fragmentos correspondientes a las bandas 10 (210pb), 11 (1,076pb) y 13 (8,116) son comúnmente encontrados tras la restricción de la enzima *SacII*. La banda 12 representa un fragmento de 1,286pb, el cual resulta de la ausencia de corte del sitio 20,530.

1.4 Restricción del DNA de pBR322 por *NarI*

En el caso de las enzimas *NarI* y *NaeI* se utilizó como sustrato DNA del plásmido pBR322. Se estableció para el corte con la enzima *NarI* una concentración 0.25 μ g/ μ l de DNA y 1u/ μ l de enzima en un volumen total de 10 μ l con una incubación a 37°C durante 1' y 120'.

En la figura 19 se observa la electroforesis en gel de agarosa de la restricción; marcador de peso molecular (carril a); DNA del plásmido pBR322, se observa formando multímeros debido al superenrollamiento de la molécula (carril b); restricción del DNA de pBR322 por *NarI* durante 1' (carril c) y 120' (carril d).

La banda 1 de los carriles "c" y "d" corresponde a un peso de 798 pb y es resultado de la ausencia de corte en los nucleótidos 435 y 549, por lo tanto no se observan bandas de 21, 114 y 657pb correspondientes al corte en los nucleótidos 435, 549 y 1206. Las bandas 2 y 3 son de 3,325pb y 4,000pb respectivamente.

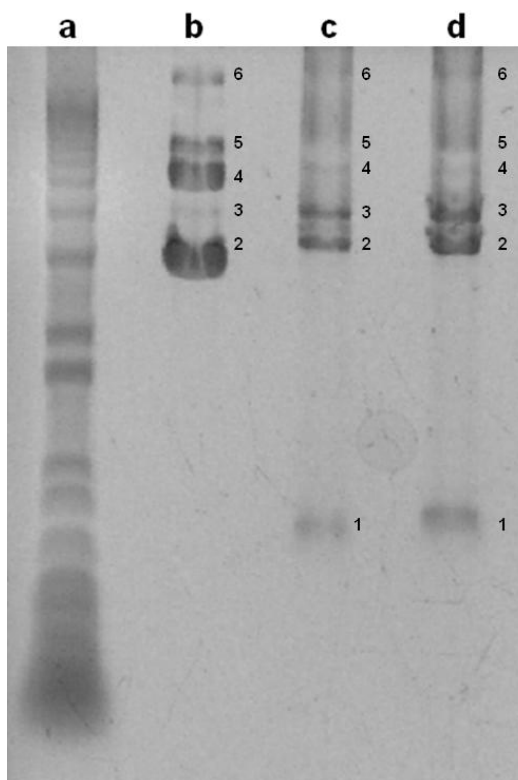


Figura 19. Gel de Agarosa al 1.5%. Digestión del DNA de pBR322 por la enzima *NaeI*; carril a) marcador de peso molecular de una kb; carril b) DNA del plásmido pBR322; carril c) DNA del plásmido pBR322 digerido por *NaeI* durante 1h; carril d) DNA del plásmido pBR322 digerido por *NaeI* durante 12h.

1.1 Restricción del DNA de pBR322 por *NaeI*

Para la enzima *NaeI* se estableció una concentración de 0.5µg/µl de DNA del plásmido pBR322 y 1u/µl de enzima en un volumen total de 10u/µl, con una incubación a 37°C. En el gel de electroforesis de las restricciones (Fig. 20) se observa el marcador de peso molecular (carril b) y el DNA del plásmido pBR322 en los carriles “a” y “c”. En los carriles “d” y “e” se observan los fragmentos resultantes de la restricción de la enzima durante 10’ y 12h, respectivamente.

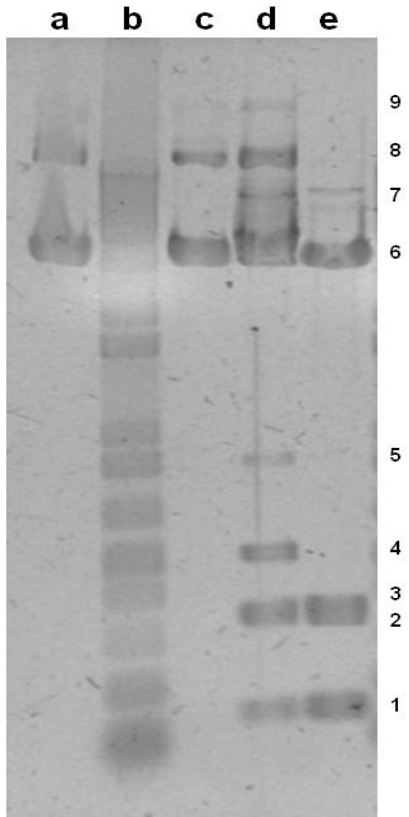


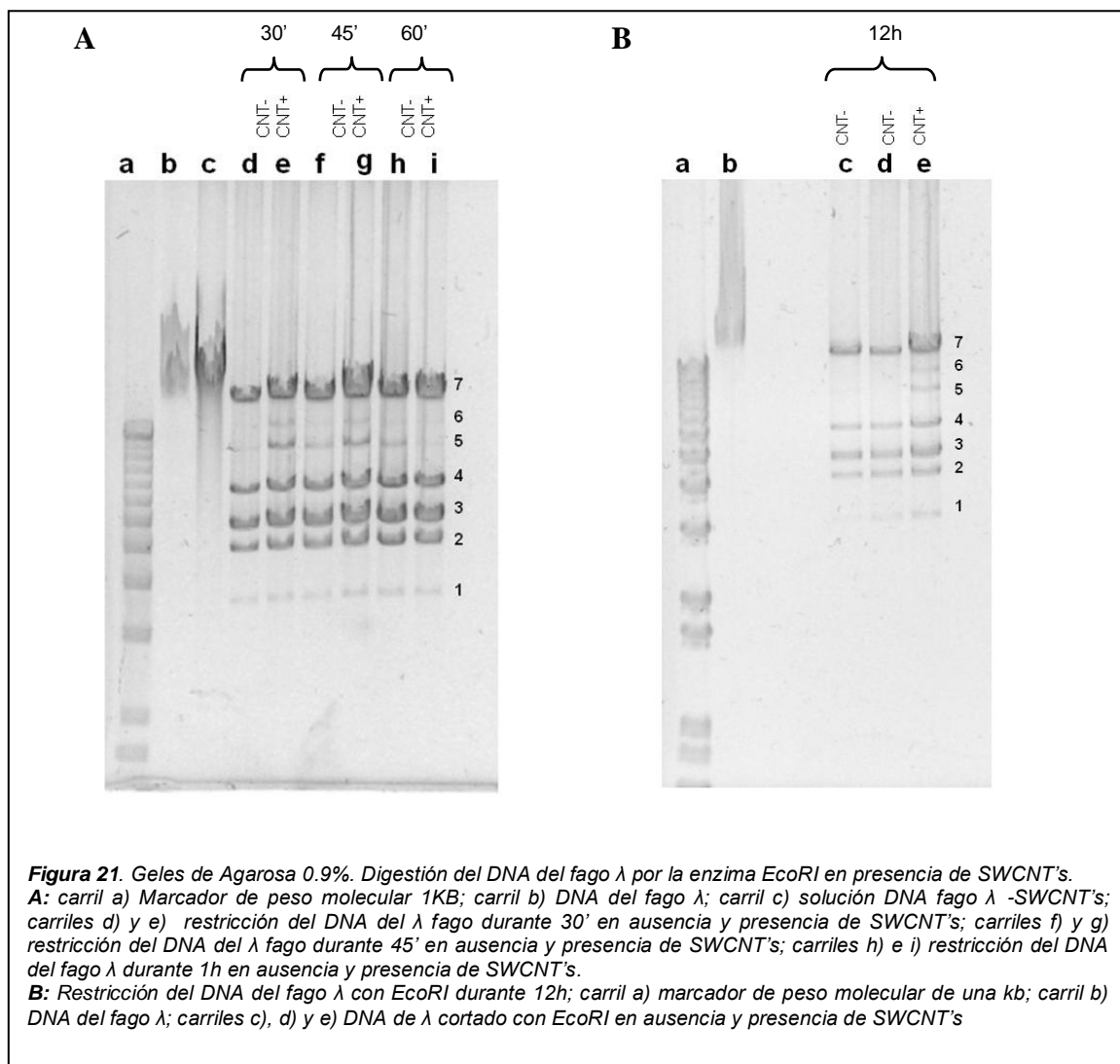
Figura 20. Gel de Agarosa 1.5%. Digestión del DNA de pBR322 por la enzima NaeI; carril a) DNA del plásmido pBR322; b) marcador de peso molecular de una kb; carril c) DNA de pBR322; d) DNA del plásmido pBR322 digerido durante 10' por la enzima NaeI; carril e) DNA del plásmido pBR322 digerido durante 12h por la enzima NaeI; carril f) marcador de peso molecular de una kb.

De los 4 sitios de reconocimiento que tiene esta enzima en pBR322, 2 son bien cortados (sitio 401 y 929), dando como resultado un fragmento de 528pb (banda 4). El sitio del nucleótido 769 que es cortado moderadamente, da lugar a los fragmentos 1 (160pb) y 3 (368pb). La banda 5 es El sitio correspondiente al nucleótido 1,283 es cortado 50 veces más lento que los demás y cuando es cortado da lugar a fragmentos de 354pb (banda 2) y de 3,479pb (no definido). La banda 5 de 882pb se obtiene cuando los nucleótidos 401 y 1,283 son cortados pero no se da el corte en los nucleótidos 769 y 929.

2. Restricciones en Presencia de Nanotubos de Carbono de Pared Sencilla (SWCNT's)

Con base en las condiciones establecidas anteriormente, se realizaron los ensayos de restricción en presencia de los SWCNT's.

2.1 Restricción del DNA del fago λ por *EcoRI* en presencia de SWCNT's

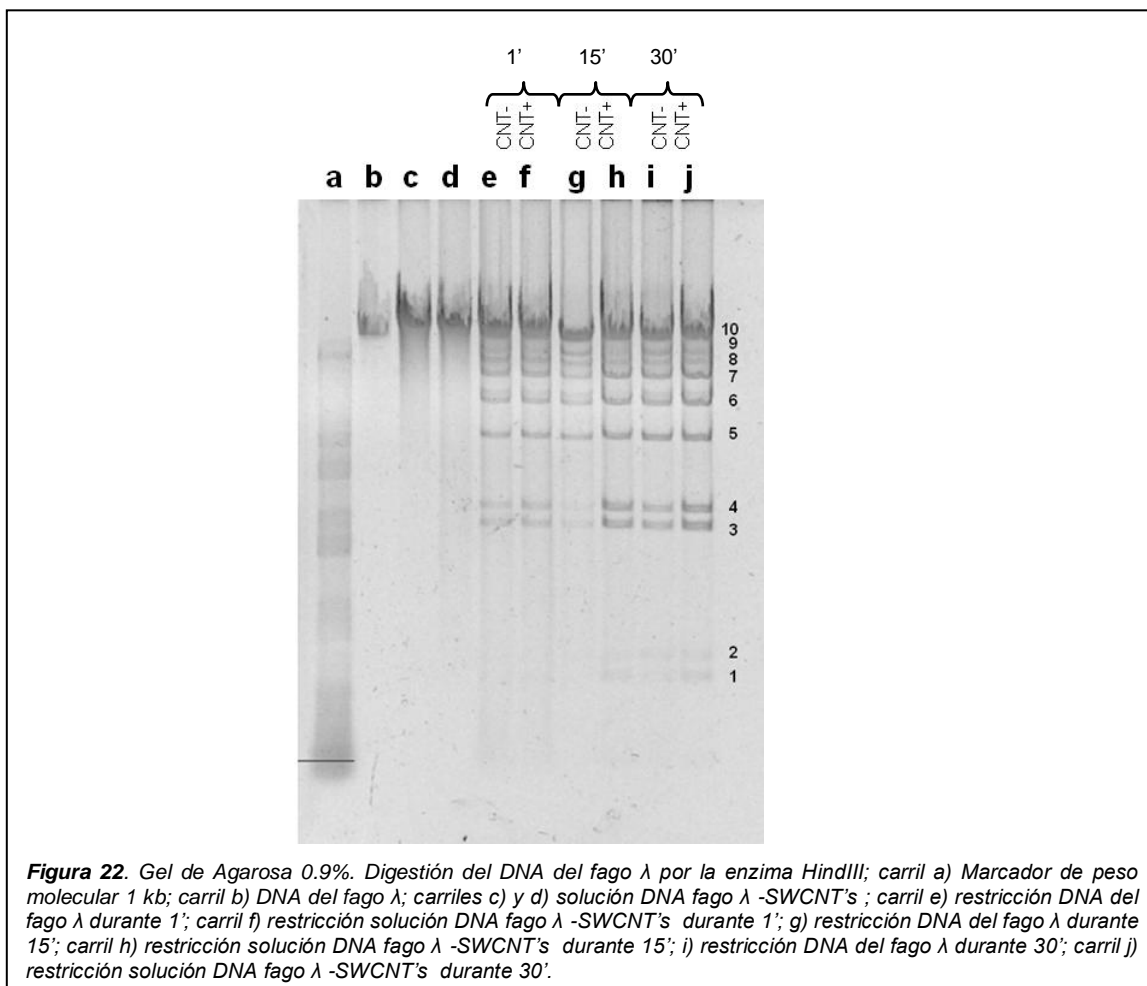


En la figura 21 A se muestra la electroforesis de los fragmentos resultantes de las restricciones del DNA del fago λ por la enzima *EcoRI* llevadas a cabo en

presencia y ausencia de SWCNT's. Los fragmentos correspondientes a la banda 7 en todos los carriles, representan DNA del fago λ que no fue digerido. En esta figura se puede observar una diferencia en el patrón de corte en ausencia (carriles "d", "f" y "h") y presencia de SWCNT's (carriles "e", "g" e "i"). En los carriles "e" y "g" las bandas 5 (9,304pb) y 6 (10,521pb) presentan mayor intensidad que los carriles "d" y "f". Con respecto a los carriles "h" e "i" se observa un patrón inverso al de los carriles anteriores.

La figura 21 B muestra fragmentos de una incubación de 12h en ausencia (carriles "c" y "d") y presencia de SWCNT's (carril "e"). En el carril "e" se observan bandas de 9,304pb (banda 5) y 10,521pb (banda 6), las cuales no son observados en los carriles "c" y "d".

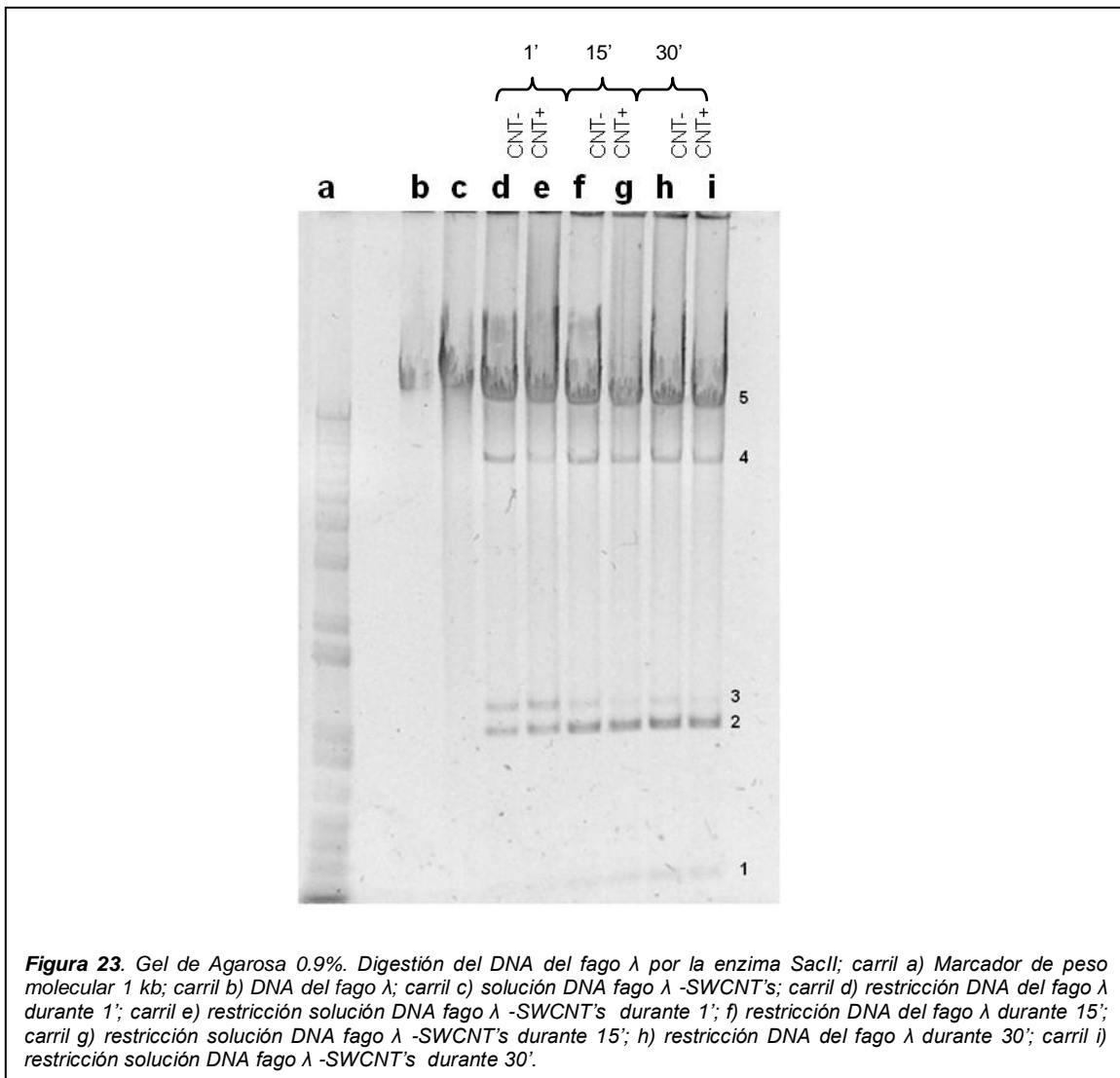
2.2 Restricción del DNA del fago λ por *HindIII* en presencia de SWCNT's



Se realizaron las restricciones con la enzima *HindIII* en presencia de SWCNT's. En la figura 22 se observa la electroforesis en agarosa de los fragmentos resultantes de las restricciones en ausencia y presencia de SWCNT's con lapsos de incubación de 1' (carriles, "e" y "f") 15' (carriles "g" y "h") y 30' (carriles "i" y "j"). En los carriles "e", "f" y "g" se observan las bandas 3 (2,027pb), 4 (2,322pb), 5 (4,361pb), 6 (6,557pb), 7 (9,416pb), 8 (10,650pb) y 9 (11,043pb). En los carriles "h", "i" y "j" se observan las bandas anteriores más las bandas las bandas 1 y 2 que corresponden a fragmentos de 564pb y 679. Este ensayo no mostró

diferencias con respecto al corte de la enzima en presencia y ausencia de SWCNT's.

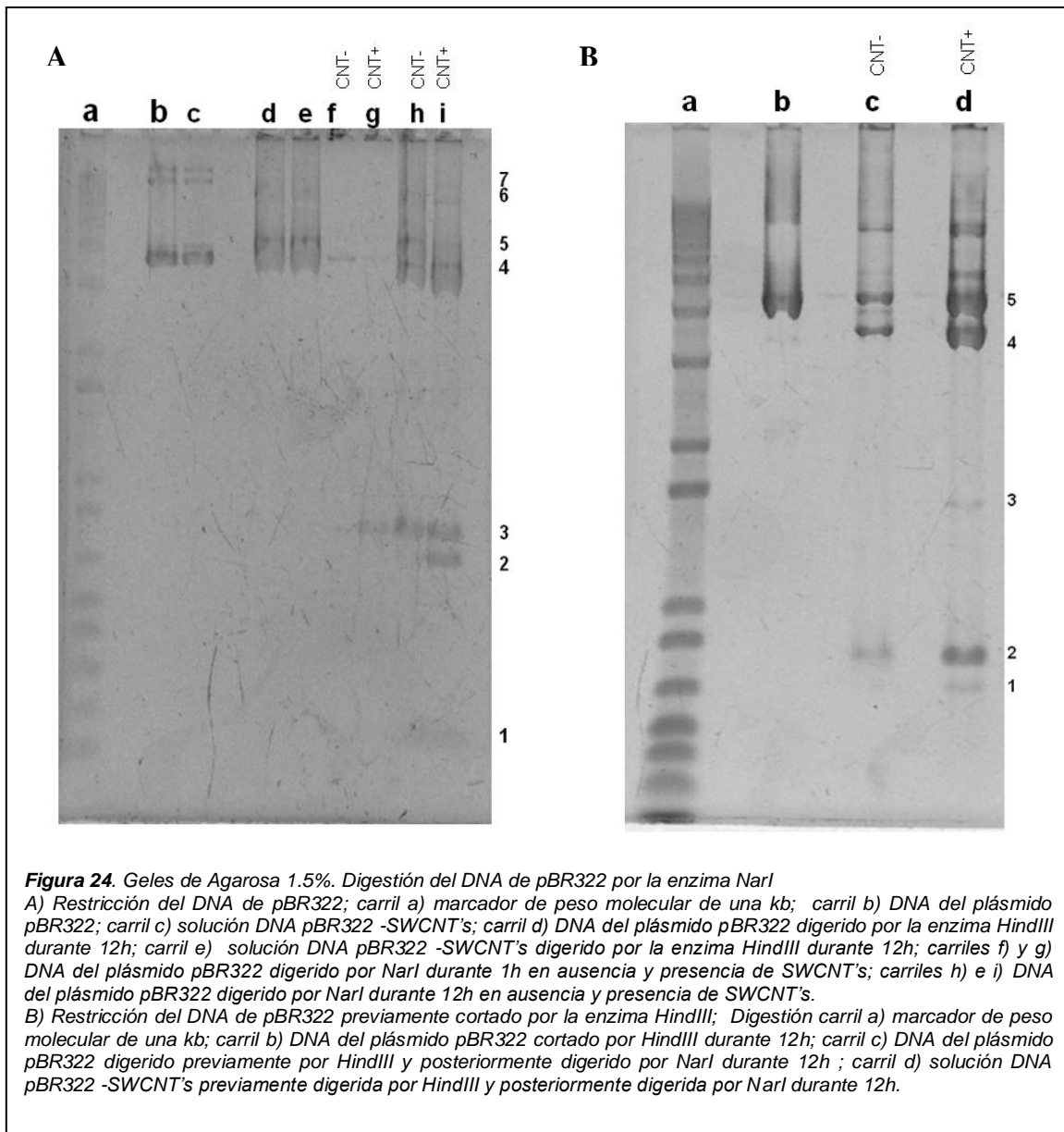
2.3 Restricción del DNA del fago λ por *SacII* en presencia de SWCNT's



El ensayo de restricción con la enzima *SacII* en presencia y ausencia de SWCNT's (Fig. 23), fue realizado con tiempos de incubación de 1' (carriles "d" y "e"), 15' (carriles "f" y "g") y 30' (carriles "h" e "i").

No se observaron diferencias con respecto a los patrones de corte en presencia y ausencia de SWCNT's.

2.4 Restricción del DNA de pBR322 *NarI* en presencia de SWCNT's



Se realizaron ensayos de restricción tanto en DNA circular como en DNA lineal (mediante una restricción previa) de pBR322, con la enzima *NarI*. Estos ensayos mostraron que la presencia de SWCNT's ayudan a propiciar el corte en el sitio del nucleótido 549. Este sitio es reportado como difícil de cortar, aún mediante varias digestiones solo se puede lograr una digestión parcial.

En la figura 24 A se observa la electroforesis de la restricción con *NarI* durante un tiempo de incubación de 1h y 12h. En los carriles "b" y "c" se observa el DNA de pBR322 (carril "b" banda 5) y la solución de *pBR322* -SWCNT's (carril "c" banda 5). Debido a la formación de multímeros del DNA de pBR322, se realizaron digestiones con la enzima *ScaI*, la cual tiene un solo sitio de restricción para dicho sustrato; carriles "d" (restricción del DNA de pBR322) y "e" (restricción de la solución *pBR322* -SWCNT's).

El carril "h" muestra los fragmentos resultantes de la restricción del DNA circular de pBR322 con la enzima *NarI* durante 12h. El carril "i" corresponde a los fragmentos de la restricción de la enzima *NarI* en presencia de SWCNT's, a diferencia de la restricción sin SWCNT's, se pueden observar los fragmentos de 114pb y 657pb, resultantes del corte del nucleótido 549 (bandas 1 y 2, respectivamente).

En la figura 24 B se observa la electroforesis de una doble restricción del DNA de pBR322 con las enzimas *ScaI* y *NarI*, la primera para linearizar el DNA y la segunda durante un tiempo de incubación de 15'. En el carril "d" se observa la restricción en presencia de SWCNT's; la banda 1 que corresponde a un peso de 657pb, la banda 2 de 771pb, la banda 3 de 1064pb (resultante del corte de ambas enzimas) y la banda 4 de 3,569.

2.5 Restricción del DNA de pBR322 *NaeI* en presencia de SWCNT's

En la figura 25 se muestra la electroforesis de la restricción del DNA de pBR322 con la enzima *NaeI* en presencia y ausencia de SWCNT's. Previamente se realizó una restricción del DNA de pBR322 con la enzima *HindIII* para linearizar

el DNA. Los carriles “d” y “e” (en ausencia y presencia de SWCNT’s, respectivamente) son los fragmentos resultantes de la incubación con la enzima durante 10’, mientras que en los carriles “f” y “g” (en ausencia y presencia de SWCNT’s, respectivamente) se observan los fragmentos correspondientes a restricciones con una incubación de 12h. En los carriles “d” y “e” no se observan diferencias en los patrones de corte, encontrándose presente las bandas 2 (354pb), 3 (514pb), 4 (882pb) y 5 (900pb). En el carril “f” en ausencia de SWCNT’s se observan las bandas 2 (354pb) y 5 (900pb) a diferencia del patron encontrado en presencia de SWCNT’s (carril “g”) en el que se observan las bandas 2 (354) y 6 (3,107).

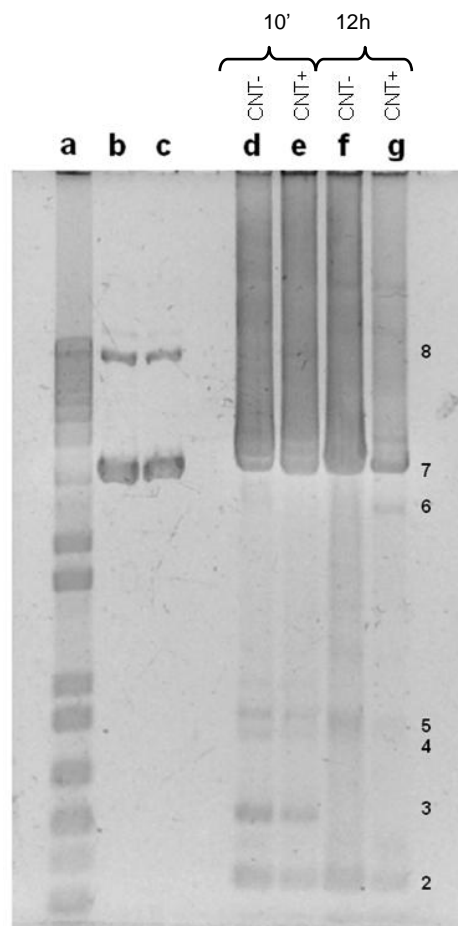
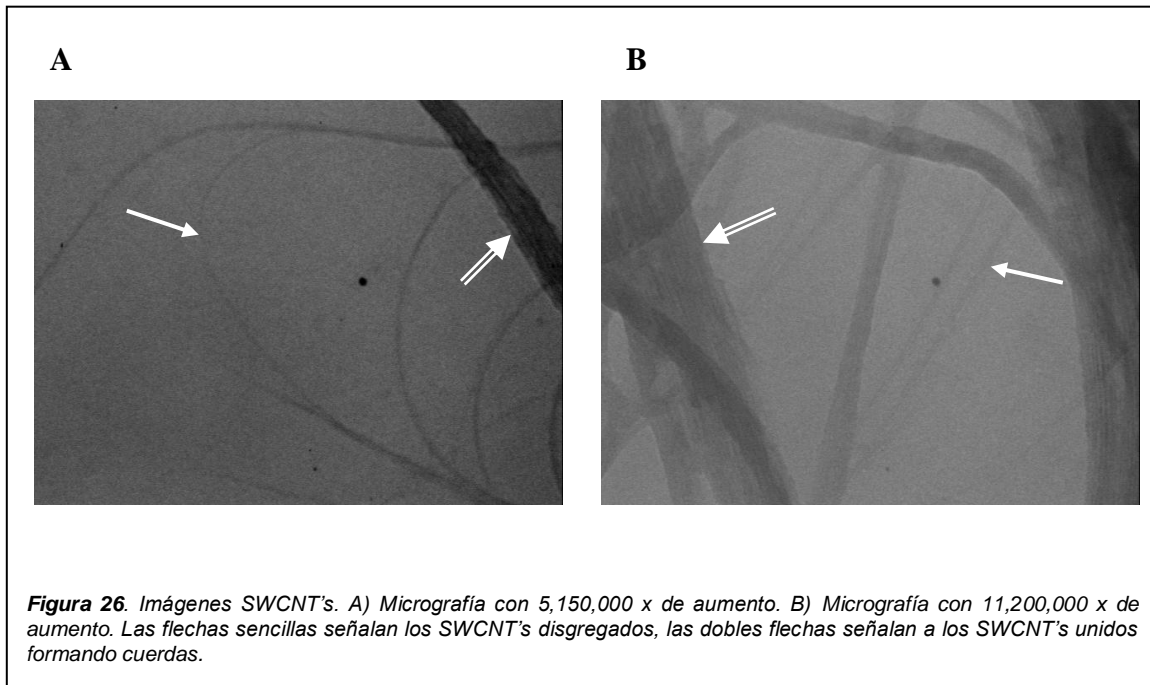


Figura 25. Gel de Agarosa 1.5%. Doble digestión del DNA de pBR322 por la enzima HindIII y NaeI en presencia de SWCNT’s; carril a) marcador de peso molecular de una kb; carril b) DNA del plásmido pBR322; carril c) solución DNA de pBR322; carriles d) y e) DNA del plásmido pBR322 digerido durante 10’ por la enzima NaeI en ausencia y presencia de SWCNT’s; carriles f) y g) DNA del plásmido pBR322 digerido durante 12h por la enzima NaeI en ausencia y presencia de SWCNT’s.

3. Microscopía Electrónica

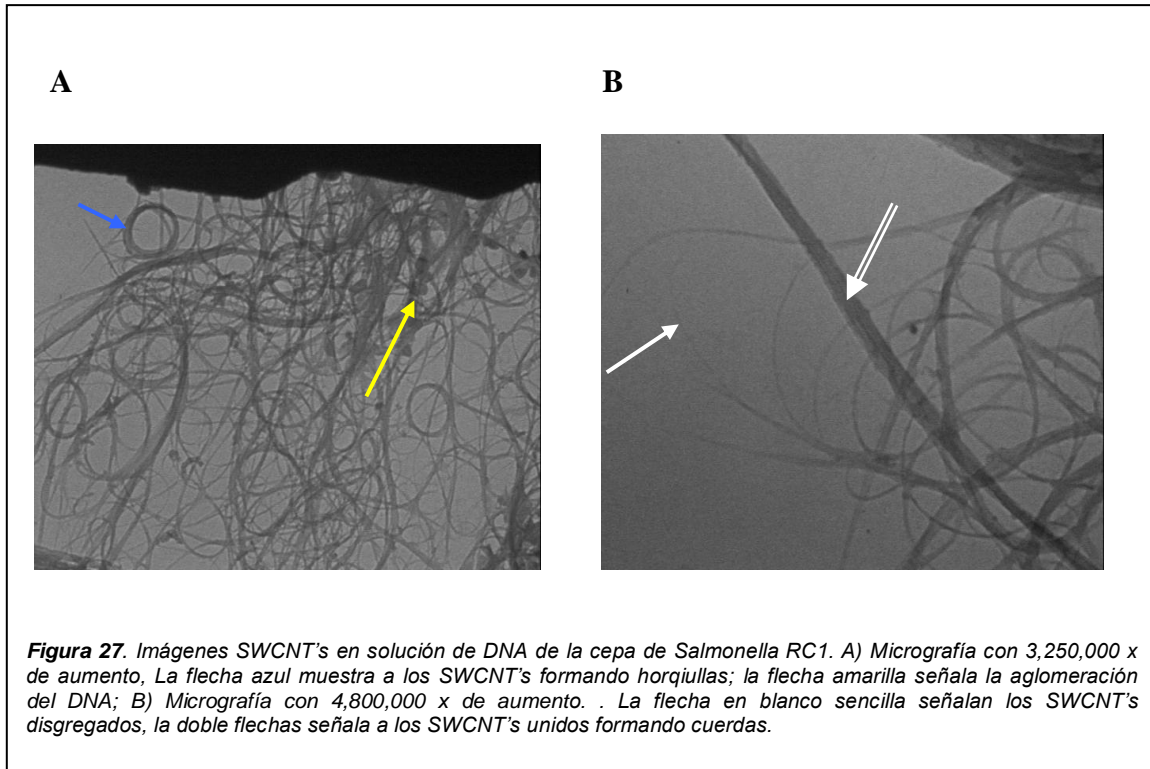
Se realizaron observaciones de soluciones de SWCNT's en el microscopio electrónico de transmisión (TEM).

En las micrografías de la figura 26 se observan SWCNT's que fueron en un principio colocaron en agua desionizada y después deshidratados para su fijación. En las figuras A y B se observan SWCNT's disgregados y SWCNT's agrupados, formando cuerdas.



Se observaron muestras de SWCNT's suspendidos en solución de 120µg/ml de DNA de la cepa de *Salmonella* RC1, la cual fue deshidratada previamente para su observación (Fig. 27). En la figura A) se puede observar que los CNT's tienen la capacidad de doblarse a grandes ángulos y en este caso formar horquillas, como lo reportado con anterioridad por Miravittles y colaboradores en el 2001. También se puede observar el DNA de la cepa de

Salmonella RC1 en forma de aglomeraciones (pequeños grumos) unidas a los SWCNT's. En la figura B) se observan cuerdas formadas por la unión de varios SWCNT's, tendencia de los SWCNT's que ha sido ampliamente reportada por diversos grupos de investigación (Donaldson, 2006) y también SWCNT's disgregados.



VII. DISCUSIÓN

Tras la realización de los ensayos de restricción con 3 repeticiones, en presencia y ausencia de SWCNT's, no se observaron diferencias en los patrones de corte de las enzimas *SacII*, *HindIII*.

En el caso de la restricción del DNA del fago λ por la enzima *EcoRI* en presencia de SWCNT's, se observó la prevalencia de los fragmentos de 4,361pb y 6,557pb a diferentes tiempos de incubación, con excepción de la restricción durante 1h de incubación en la que no se observaron los fragmentos parciales en presencia de SWCNT's. Dichos fragmentos son observados en las restricciones parciales del sustrato, dadas principalmente por tiempos cortos de incubación o por poca cantidad de la enzima (tal como se estableció inicialmente en las condiciones de restricción). Debido a que estudios anteriores proponen el acople de estos SWCNT's al zurco mayor del DNA, se puede esperar que bajo las condiciones establecidas en este trabajo, los SWCNT's estén impidiendo el corte en los sitios correspondientes a los nucleótidos 26,104 y 31,747.

Por otro lado en la restricción con la enzima *NarI* en presencia de SWCNT's se observó una banda de 657pb, la cual es reportada como difícil de cortar inclusive con mayor tiempo de incubación o añadido más unidades de la enzima (New England Biolabs). Es importante recordar que esta enzima es del tipo IIE, o sea que necesita interactuar con dos copias de la secuencia de reconocimiento para lograr un corte eficiente, con una copia siendo el blanco para el corte y la otra sirviendo como efector alostérico. Se ha propuesto que una vez que el dominio efector se une a una secuencia de reconocimiento la enzima se "ancla" al DNA y comienza a escanear la cadena en busca de secuencias de reconocimiento disponibles para su corte, provocando un supuesto cambio en la topología del DNA mediante la formación de horquillas. Es posible que con la formación de estas horquillas se esté impidiendo el acceso a ciertos sitios de reconocimiento del DNA y que en este caso los SWCNT's podrían estar modificando la topología del DNA y así permitiendo a la enzima el acceso al sitio del nucleótido 549 (Milsom *et*

al., 2001). Cabe señalar que aunque se logra observar una banda correspondiente a 657pb (sugiriendo el corte en el sitio 549) no se está logrando una restricción total del sitio, ya que aún se observa una banda correspondiente a 771pb, sugiriendo que pueden haber moléculas en las que no se está propiciando el corte del sitio.

Con respecto a la enzima *NaeI* se observaron diferencias en los patrones de corte en ausencia y presencia de SWCNT's durante una incubación de 12h. En ausencia de SWCNT's se observó una banda de 354pb, característica de la restricción por la enzima y una banda de 900pb la cual es resultado de una restricción parcial (al no cortar los sitios 929, 769 y 401). El patrón encontrado en presencia de SWCNT's muestra la misma banda característica de la restricción por *NaeI* (354pb) y se observa otra banda correspondiente a un peso de 3,107pb la cual implica que la enzima logró además del corte en el nucleótido 1,283 también el del nucleótido 401.

La microscopía electrónica de transmisión nos brindó una visión diferente de los SWCNT's ya que aún al suspenderlos en soluciones de DNA, éstos se mantenían unidos en cuerdas y al ser flexibles formaban horquillas. El DNA se observó unido de forma irregular a los nanotubos de carbono y en comparación con las micrografías de los SWCNT's solos, en aquellas con DNA se observó una mayor disgregación de los SWCNT's y mayor formación de horquillas lo cual puede proponerse como resultado de la interacción DNA-SWCNT's. Aunque los sistemas de restricción de *EcoRI*, *NarI* y *NaeI* cumplieron con las condiciones para observar cambios propuestos por los SWCNT's, es de gran importancia recalcar que debido a las características observadas durante la microscopía electrónica (formación de horquillas y agrupación en cuerdas de los tubos), es un gran reto predecir el comportamiento que pueden tener al interactuar con sistemas biológicos más complejos.

Este proyecto ha contribuído con una nueva visión a cerca de la interacción de los SWCNT's con los componentes de un sistema de modificación restricción.

Entre las diversas aplicaciones que pueden tener estos sistemas se encuentran en el campo de la biotecnología ya que los SWCNT's pueden servir para propiciar el corte de ciertos sitios para la formación de fragmentos más pequeños como el caso de *NarI* o para impedir el corte de ciertos sitios y generar fragmentos más grandes como el caso de *EcoRI*.

Se proponen más experimentos para estudiar los efectos derivados de la interacción entre los SWCNT's y el DNA, como lo es la secuenciación de las bandas observadas tras la presencia de los SWCNT's para corroborar los pesos y proveniencia de los fragmentos. Ensayos de las enzimas con diferentes sustratos de DNA que contengan diferentes porcentajes de bases nitrogenadas para comparar la actividad de la enzima en sustratos con mayor y menor contenido de Guaninas. También se sugiere la observación de muestras de los complejos DNA-SWCNT's-Enzima, en el microscopio electrónico con diversas tinciones para la identificación de cada uno de sus componentes y estudiar su interacción, ya que no se puede descartar una posible interacción SWCNT's-enzima.

VIII. CONCLUSIONES

- No se observaron diferencias en los patrones de corte de las enzimas *SacII* y *HindIII* durante los ensayos de restricción en presencia y ausencia de SWCNT's.
- En los ensayos de restricción con la enzima *EcoRI* en presencia y ausencia de SWCNT's se observaron diferencias con respecto al patrón de corte, sugiriendo que los SWCNT's podrían estar impidiendo el corte de los sitios correspondientes a los nucleótidos 26,104 y 31,747 de la secuencia del DNA del fago λ .
- En los ensayos de restricción con la enzima *NarI* en presencia y ausencia de SWCNT's, se observaron diferencias con respecto al patrón de corte de la enzima, sugiriendo que los SWCNT's podrían estar propiciando el corte del sitio correspondiente al nucleótido 549.
- En los ensayos de restricción con la enzima *NaeI* en presencia y ausencia de SWCNT's se observaron diferencias con respecto al patrón de corte de la enzima en restricciones de 12 horas de incubación, sugiriendo que los SWCNT's pudieron haber influido en el corte del sitio correspondiente al nucleótido 401.
- Mediante la microscopía electrónica se estudiaron a los SWCNT's solos y en solución de DNA, observándose la formación de horquillas debido a la flexibilidad de los nanotubos y la agrupación de éstos formando cuerdas formadas por varios SWCNT's.

IX. REFERENCIAS

- Adhilash Sugunan , y Joydeep Dutta. 2004. Nanoparticles for Nanotechnology. *Journal of Physics Science and Idea* 4, no. 1: 50-57.
- Amersham Biosciences. 2009. Amersham Biosciences. http://www.amershammedia.com/cy_dye/html/am_bi.htm.
- Bolivar, Francisco. 2007. *Fundamentos y Casos Exitosos de la Biotecnología*. Segunda Edición. El Colegio Nacional. http://www.porra.com/tienda_detalleLibro.asp?CB=9789706403520.
- Broek, Bram van den, Francesco Vanzi, Davide Normanno, Francesco S. Pavone, y Gijis J.L. Wuite. 2006. Real-time observation of DNA looping dynamics of Type IIE restriction enzymes NaeI and NarI. *Nucl. Acids Res.* 34, no. 1 (Enero 10): 167-174. doi:10.1093/nar/gkj432.
- Donaldson, Ken, Robert Aitken, Lang Tran, Vicki Stone, Rodger Duffin, Gavin Forrest, y Andrew Alexander. 2006. Carbon Nanotubes: A Review of Their Properties in Relation to Pulmonary Toxicology and Workplace Safety. *Toxicol. Sci.* 92, no. 1 (Julio 1): 5-22. doi:10.1093/toxsci/kfj130.
- Donaldson, Ken, y Paul Borm. 2004. Particle and Fibre Toxicology, a new journal to meet a real need. *Particle and Fibre Toxicology* 1, no. 1 (Diciembre 3): 1. doi:10.1186/1743-8977-1-1.
- Dresselhaus, G., y Phaedon Avouris. 2001. *Carbon nanotubes*. Springer.
- Endo, Morinobu. 2008. Catalytically-Grown Carbon Nanotubes and Their Current Applications. En *Nanoscale Phenomena*, 9-13. http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-73048-6_2.
- Endo, Morinobu, Kazuhiro Osato, Kunio Nishimura, Kojiro Takahashi, Takayuki Tukada, Fuminori Munekane, y Syuji Tsuruoka. 2004. *FINE CARBON FIBER WITH VARIOUS STRUCTURES*. World Intellectual Property Organization. <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2004070095&IA=JP2004001400&DISPLAY=STATUS>.
- Forsblom, S, R Rigler, M Ehrenberg, y L Philipson. 1976. Kinetic studies on the cleavage of adenovirus DNA by restriction endonuclease Eco RI. *Nucleic Acids Research* 3, no. 12 (Diciembre): 3255-3269.
- Ian Freestone, Nigel Meeks, Margaret Sax, y Catherine Higgitt. 2007. The Lycurgus Cup-A Roman Nanotechnology. *Gold Bulletin*: 270-276.
- Kameyama, Luis, Norma Oviedo, y Gabriel Guarneros. 2009. Bacteriófago Lambda. http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_22/Capitulo22.pdf.
- Katz, Eugenii, y Itamar Willner. 2004. Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: applications in nanobioelectronics. *Chemphyschem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry* 5, no. 8 (Agosto 20): 1084-1104. doi:10.1002/cphc.200400193.
- Kisin, Elena R, Ashley R Murray, Michael J Keane, Xiao-Chun Shi, Diane Schwegler-Berry, Olga Gorelik, Sivaram Arepalli, et al. 2007. Single-walled

- carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 70, no. 24 (Diciembre): 2071-2079. doi:10.1080/15287390701601251.
- Lu, Gang, Paul Maragakis, y Efthimios Kaxiras. 2005. Carbon nanotube interaction with DNA. *Nano Letters* 5, no. 5 (Mayo): 897-900. doi:10.1021/nl050354u.
- Lustig, Steven Raymond, Anand Jagota, Constantine Khripin, y Ming Zheng. 2005. Theory of structure-based carbon nanotube separations by ion-exchange chromatography of DNA/CNT hybrids. *The Journal of Physical Chemistry. B* 109, no. 7 (Febrero 24): 2559-2566. doi:10.1021/jp0452913.
- Mongillo, John. 2007. *Nanotechnology 101*. Greenwood Publishing Group.
- Monteiro-Riviere, Nancy A., y C. Lang Tran. 2007. *Nanotoxicology*. CRC Press.
- Naotoshi, Nakashima, Okuzono Shingo, Murakami Hiroto, Nakai Tonau, y Yoshikawa Kenichi . 2003. DNA Dissolves Single-walled Carbon Nanotubes in Water 32, no. 5: 456-457.
- Napier, Mary E., Dominic O. Hull, y H. Holden Thorp. 2005. Electrocatalytic Oxidation of DNA-Wrapped Carbon Nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* 127, no. 34: 11952-11953. doi:10.1021/ja054162c.
- Nelson , David, y Michael Cox. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fourth Edition.
<http://bcs.whfreeman.com/lehninger/default.asp?s=&n=&i=&v=&o=&ns=0&t=&uid=0&rau=0>
- New England Biolabs. 2009. Site Preferences.
http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/site_preferences.asp.
- Ochoa Olmos, Omar Eligio, y Nacional Autónoma de México Universidad. 2008. *Nanoestructuras Híbridas: Nanotubos De Carbono/Nylon-6 Y Su Actividad Biológica En Estudios De Biocompatibilidad*. México.
- Pingoud, Vera, Anna Sudina, Hildegard Geyer, Janusz M Bujnicki, Rudi Lurz, Gerhild Lüder, Richard Morgan, Elena Kubareva, y Alfred Pingoud. 2005. Specificity changes in the evolution of type II restriction endonucleases: a biochemical and bioinformatic analysis of restriction enzymes that recognize unrelated sequences. *The Journal of Biological Chemistry* 280, no. 6 (Febrero 11): 4289-4298. doi:10.1074/jbc.M409020200.
- Rachel Wilson . 2008. Church Windows purify air. *Queensland University of Technology Newspaper*.
- Terrones, M., N. Grobert, J. Olivares, J. P. Zhang, H. Terrones, K. Kordatos, W. K. Hsu, et al. 1997. Controlled production of aligned-nanotube bundles. *Nature* 388, no. 6637 (Julio 3): 52-55.
- Terrones, Mauricio, y Humberto Terrones. 2003. The Carbon Nanocosmos: Novel Materials for the Twenty-First Century. *Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 361, no. 1813 (Diciembre 15): 2789-2806.
- Topal, M D, R J Thresher, M Conrad, y J Griffith. 1991. Nael endonuclease binding to pBR322 DNA induces looping. *Biochemistry* 30, no. 7 (Febrero 19): 2006-2010.

- Walters, D. A., L. M. Ericson, M. J. Casavant, J. Liu, D. T. Colbert, y K. A. Smith. 1999. Elastic Strain of Freely Suspended Single-Wall Carbon Nanotube Ropes 74: 3803-3805.
- Wei, W, A Sethuraman, C Jin, N A Monteiro-Riviere, y R J Narayan. 2007. Biological properties of carbon nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7, no. 4-5 (Mayo): 1284-1297.
- Yang, C C, y M D Topal. 1992. Nonidentical DNA-binding sites of endonuclease NaeI recognize different families of sequences flanking the recognition site. *Biochemistry* 31, no. 40 (Octubre 13): 9657-9664.
- Yang, Wenrong, Pall Thordarson, J. Justin Gooding, Simon P. Ringer, y Filip Braet. 2007. Carbon nanotubes for biological and biomedical applications. *Nanotechnology* 18, no. 41: 412001.
- Yu, Min-Feng , Bradley S. Files, Sivaram Arepalli, y Rodney S. Ruoff. 2000. Tensile Loading of Ropes of Single Wall Carbon Nanotubes and their Mechanical Properties. *Physical Review Letters* 84, no. 24 (Junio 12): 5552. doi:10.1103/PhysRevLett.84.5552.

X. ANEXOS

Genoma del plásmido pBR322 con los sitios de reconocimiento de las enzimas, *HindIII*, *ScaI*, *NaeI* y *NarI*. El conteo de bases indica que este DNA presenta 983 adeninas, 1,209 citosinas, 1,134 guaninas y 1,035 timinas.

```
1      ttctcatggt  tgacagctta  tcatcgataa  gctttaatgc  ggtagtttat  cacagttaaa
61     ttgctaaccg  agtcaggcac  cgtgtatgaa  atctaacaat  gcgctcatcg  tcatcctcgg
121    caccgtcacc  ctggatgctg  taggcatagg  cttggttatg  ccggtactgc  cgggcctctt
181    gcgggataatc  gtccattccg  acagcatcgc  cagtcaactat  ggcgtgctgc  tagcgctata
241    tgcgttgatg  caatctctat  ggcaccccg  tctcggagca  ctgtccgacc  gctttggccg
301    ccgcccagtc  ctgctcgcct  cgctacttgg  agccactatc  gactacgcga  tcatggcgac
361    cacacccgtc  ctgtggatcc  tctacgccgg  acgcatcgtg  gcgggatca  ccggggccac
421    aggtgcggtt  gctggggcct  atatcgccga  catcaccgat  ggggaagatc  gggctcgcca
481    cttcgggctc  atgagcgctt  gtttcggcgt  gggtatggtg  gcaggccccg  tggccggggg
541    actggtggc  gccatctcct  tgcatgcacc  attccttgcg  gcggcggtgc  tcaacggcct
601    caacctacta  ctgggctgct  tcctaattgca  ggagtcgcat  aagggagagc  gtcgaccgat
661    gcccttgaga  gccttcaacc  cagtcagctc  cttccggtgg  gcgccccgca  tgactatcgt
721    cgccgcactt  atgactgtct  tctttatcat  gcaactcgt  ggacaggtgc  cggcagcgct
781    ctgggtcatt  ttccggcgag  accgctttcg  ctggagcgcg  acgatgatcg  gcctgtcgtc
841    ctccggtatt  ggaatcttgc  acgccctcgc  tcaagccttc  gtcactggtc  ccgccacca
901    acgtttcggc  gagaagcagg  ccattatcgc  cggcatggcg  gccgacgcgc  tgggctacgt
961    cttgctggcg  ttccgcgacg  gaggtctgg  ggccttcccc  attatgattc  ttctcgcttc
1021   cggcggcatc  gggatgcccg  cgttgcaggc  catgctgtcc  aggcaggtag  atgacgacca
1081   tcagggacag  cttcaaggat  cgctcgcggc  tcttaccagc  ctaacttcga  tcattggacc
1141   gctgatcgct  acggcgatct  atgccgcctc  ggcgagcaca  tggaacgggt  tggcatggat
1201   tgtagggcgc  gccctatacc  ttgtctgctc  ccccgcgctg  cgtcgcggtg  catggagccg
1261   gggcacctgc  acctgaatgg  aagcggcgcg  cacctcgcga  acggattcac  cactccaaga
1321   attggagcca  atcaattctt  gcggagaact  gtgaatgcgc  aaaccaacc  ttggcagaac
1381   atatccatcg  cgtccgccat  ctccagcagc  cgcacgcggc  gcatctcggg  cagcgttggg
1441   tcctggccac  ggggtgcgat  gatcgtgctc  ctgtcgttga  ggaccggct  aggctggcgg
1501   ggttgcctta  ctggttagca  gaatgaatca  ccgatacgcg  agcgaacgtg  aagcgaactg
1561   tgctgcaaaa  cgtctgcgac  ctgagcaaca  acatgaatgg  tcttcggttt  ccgtgtttcg
1621   taaagtctgg  aaacgcggaa  gtcagcgccc  tgcaccatta  tgttcgggat  ctgcatcgca
1681   ggatgctgct  ggcctaccctg  tggaacacct  acatctgtat  taacgaagcg  ctggcattga
1741   ccctgagtg  tttttctctg  gtcccgcgcg  atccataccg  ccagttgttt  accctcacia
1801   cgttccagta  accgggcatg  ttcattcatc  gtaaccctga  tcgtgagcat  cctctctcgt
1861   ttcattcgg  tcattacccc  catgaacaga  aatccccctt  acacggaggc  atcagtgacc
1921   aaacaggaaa  aaaccgccct  taacatggcc  cgctttatca  gaagccagac  attaacgctt
1981   ctggagaaa  tcaacgagct  ggacgcggat  gaacaggcag  acatctgtga  atcgcttacc
2041   gaccacgctg  atgagcttta  ccgcagctgc  ctccgcgctt  tcgggtgatg  cgggtgaaa
2101   ctctgacaca  tgcagctccc  ggagacggtc  acagcttgtc  tgaagcggg  tgccgggagc
2161   agacaagccc  gtcagggcgc  gtcagcgggt  gttggcgggt  gtcggggcgc  agccatgacc
2221   cagtcacgta  gcgatagcgg  agtgtatact  ggcttaacta  tgccggcatc  gagcagattg
2281   tactgagagt  gcaccatag  cggtgtgaaa  taccgcacag  atgcgtaagg  agaaaatacc
2341   gcatcaggcg  ctcttccgct  tcctcgcctc  ctgactcgtc  gcgctcggtc  gttcggctgc
2401   ggcgagcgg  atcagctcac  tcaaaggcgg  taatacgggt  atccacagaa  tcaggggata
2461   acgcaggaaa  gaacatgtga  gcaaaaggcc  agcaaaaggc  caggaaccgt  aaaaaggccg
2521   cgttgcctgg  gtttttccat  aggetccgcc  cccctgacga  gcatcacia  aatcgacgct
2581   caagtccag  gtggcgaaac  ccgacaggac  tataaagata  ccaggcgctt  cccctggaa
2641   gctccctcgt  gcgctctcct  gttccgacc  tgcgcttac  ccgatacctg  tccgctttc
2701   tcccttcgg  aagcgtggcg  ctttctcata  gctcacgctg  taggtatctc  agttcgggtg
2761   aggtcgttcg  ctccaagetg  ggctgtgtgc  acgaacccc  cgttcagccc  gaccgctgcg
2821   ccttatccg  taactatcgt  cttgagtcga  accggtaag  acacgactta  tcgccactgg
2881   cagcagccc  tggtaacagg  attagcagag  cgaggatgt  aggcgggtgt  acaggttct
2941   tgaagtgggt  gcctaactac  ggctacacta  gaaggacagt  atttggatc  tgcgctctgc
3001   tgaagccagt  taccttcgga  aaaagagttg  gtagctcttg  atccggcaaa  caaacaccg
3061   ctggtagcgg  tggtttttt  gtttgcaagc  agcagattac  gcgcagaaaa  aaaggatctc
3121   aagaagatcc  tttgatcttt  tctacggggt  ctgacgctca  gtggaacgaa  aactcacgtt
3181   aagggatctt  ggtcatgaga  ttatcaaaaa  ggtcttccac  ctagatcctt  ttaaatataa
3241   aatgaagttt  taaatcaatc  taaagtatat  atgagtaaac  ttggtctgac  agttaccaat
3301   gcttaatcag  tgaggcacct  atctcagcga  tctgtctatt  tcgctcatcc  atagttgcct
3361   gactccccgt  cgtgtagata  actacgatac  gggagggtct  accatctggc  cccagtgctg
```

3421 caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag
3481 ccggaagggc cgagcgcaga agtggctcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta
3541 attggtgccc ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccc aacggtgttg
3601 ccattgctcg aggcactggt ggtgcacgct cgctggttgg tatggcttca ttcagctccg
3661 gttcccacgc atcaaggcga gttacatgat ccccatggtt gtgcaaaaaa gcggttagct
3721 ccttcgggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggtatca ctcatggtta
3781 tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg
3841 gtg**agtactc** aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc
3901 cggcgtcaac acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg
3961 gaaaacggtc ttcggggcca aaactctcaa ggatcttacc gctggtgaga tccagttcga
4021 tgtaacccac tcgtgcacc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg
4081 ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaat
4141 gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc
4201 tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca
4261 catttccccg aaaagtgcc cctgacgtct aagaaacat tattatcatg acattaacct
4321 ataaaaatag gcgtatcacg aggcctttc gtcttcaaga a

Genoma del fago lambda (NCBI, secuencia de referencia: NC_001416.1) con los sitios de reconocimiento de las enzimas, **EcoRI**, **HindIII** y **SacII**.

1 gggcggcgac ctgcggggtt ttctctatct atgaaaattt tccggtttaa ggcgtttccg
61 ttcttctctg tcataactta atgtttttat ttaaaatacc ctctgaaaag aaaggaaacg
121 acaggtgctg aaagcgaggc tttttggcct ctgtcgtttc ctttctctgt tttgtccgt
4021 tttatggggc ggcgaaaatt cgctcgcacg ctgcaggcga gccagatggt tctgtgctgg
4081 ctggaaagag ccactcgttcg ccgctggttg acgttacctt caaaagcggc cttcagtttt
4141 caggaagccc gcagtgcctg ggggaactgc gactggatag gctccggctg tatggccatc
4201 gatggtctga aagaagtcca ggaagcggtg atgctgatag aagccggact gactacctac
4261 gagaaagagt gcgcaaacg cggtagcagc taccagaaa tttttgcca gcaggtccgt
4321 gaaacgatgg agcgcctgac agccggtctt aaaccgcccg cctgggcccg tcagcattt
20221 agtcctcaaa aaacgcggcg gccaccagtg ccggtgcggc gaaaacgta gaaacgaaatg
20281 ctgcagcgtc acaacaatca gccgccacgt ctgcctccac **cgcg**ccacg aaagcgtcag
20341 aggccggcac ttcagcacga gatgcggtgg cctcaaaaga ggcagcaaaa tcatcagaaa
20401 cgaaagcacc atcaagtgcc ggtcgtgcag cttcctcggc aacggcggca gaaaattctg
20461 ccagggcggc aaaaacgtcc gagacgaatg ccaggtcacc tgaacagca gcggaacgga
20521 gcgctctctg **cgcg**cagac gcaaaaacag cggcggcggg gactgcgtca accgcatcca
20581 cgaagcggc agaggtcgcg ggaagtgcgg taccagcacc gcagagcaaa agtgcggcag
20641 aagcggcggc aatacgtgca aaaaattcgg caaacgtgc agaagatata gcttcagctg
21121 tgcgaaaaat gatgcgcca gcctgactga actgactcag gttggcaggg atattctggc
21181 aaaaaattcc gttgcagatg ttcttgaata ccttggggcc ggtgga**gaatt** cggcctttcc
21241 ggcaggtgcg ccgatcccgt ggccatcaga taccgttccg tctggctacg tctgatgca
21301 gggcagggcg tttgacaaat cagcctacc aaaacttgct gtcgcgtacc catcgggtgt
21361 gcttctctgat atgcgaggtt ggacaatcaa ggggaaacc gccagcggtc gtgctgtatt
21421 gtctcaggaa caggatggaa ttaagtgcga caccacaggt gccagtgcat ccggtacgga
21481 tttggggacc aaaaccacat cgtcgtttga ttacgggacg aaaacaacag gcagtttoga
21541 ttacggcacc aaatcgacga ataacacggg ggctcatgct cacagtctga cgggttcaac
21601 agggg**cgcg** ggtgctcatg cccacacaag tggtttaagg atgaacagtt ctggctggag
21661 tcagtatgga acagcaacca ttacaggaag tttatccaca gttaaaggaa ccagcacaca
21721 gggatttgct tatttatcga aaacggacag tcagggcagc cacagtcact cattgtccgg
23041 gtattgatta aatcaattgg atggaattgt ttatcataaa aaattaatgt ttgaatgtga
23101 taaccgtcct ttaaaaaagt cgtttctgca **agctt**ggctg tatagtcaac taactcttct
23161 gtcgaagtga tatttttagg cttatctacc agttttagac gctctttaat atcttcagga
25021 caataggaag aaaatgatct atattttttg tctgtcctat atcaccaca aatggacatt
25081 tttcacctga tgaacaagc atgtcatcgt aatatgttct agcgggtttg ttttatctc
25141 ggagattatt ttcata**aagc** **ttt**tctaatt taacctttgt caggttacca actactaagg
25201 ttgtaggctc aagaggtgt gtctgtogt aggtaaataa ctgacctgtc gagcttaata
26041 gatagcttca agccagagtt gtctttttct atctactctc atacaacca taaatgctga
26101 aat**gaattc** aagcggagat cgcctagtga ttttaacta ttgctggcag cattcttgag
26161 tccaatataa aagtattgtg taccttttgc tgggtcaggt tggtctttag gaggagtaaa
26221 aggatcaaat gcaactaacg aaactgaaac aagcgtatga aaatatccct ttggattct
27421 cgtttgacat cactgctatc ttcttactgg ttatgcaggt cgtagtgggt ggcacaca **aa**
27481 **gctt**gacact ggattgcgag gctttgtgct tctctggagt gcgacaggtt tgatgacaaa

31741 ggaagt**gaat** **t**caaacaggg ttctggcgtc gttctcgtae tgttttcccc aggcagatgc
36721 cgcgctctcc actgcttaat gacattcctt tcccgattaa aaaaatctgtc agatcggatg
36781 tggtcggccc gaaaacagtt ctggcaaaac caatggtgtc gccttcaaca acaaaaaaag
36841 atgggaatcc caatgattcg tcatctgcga tctatgttctt aatatcttca actg**aagctt**
36901 tagagcgatt tatcttctga accagctctc tgtcatttgt tttggtaaag agaaaagttt
36961 ttccatcgat tttatgaata tacaataat tggagccaac ctgcaggtga tgattatcag
37021 ccagcagaga attaaggaaa acagacaggt ttattgagcg cttatctttc cttttatttt
37081 tgctcgggta agtcgcataa aaaccattct tcataattca atccatttac tatgttatgt
37141 tctgagggga gtgaaaatc ccctaattcg atgaagattc ttgctcaatt gttatcagct
37201 atgcgccagc cagaacacct tgccgatcag ccaaacgtct cttcaggcca ctgactagcg
37261 ataactttcc ccacaacgga acaactctca ttgcatggga tcatgggta aatggggtt
37321 agtggttgta aaaacacctg accgctatcc ctgatcagtt tcttgaaggt aaactcatca
37381 cccccaagtc tggctatgca gaaatcacct ggctcaacag cctgctcagg gtcaacgaga
37441 attaacattc cgtcaggaa**a** **gctt**ggcctg gagcctgttg gtgcggtcat ggaattacct
37501 tcaacctcaa gccagaatgc agaactactg gcttttttgg ttgtgcttac ccatctctcc
39061 aaaacgaggg ataaaaatc cctcaaattg ggggattgct atccctcaa acagggggac
39121 acaaaagaca ctattacaaa agaaaaaaga aaagattatt cgtcagaa **t**tc**t**ggcgaa
39181 tcctctgacc agccagaaaa gcacctttct gtggtgaaac cggatgctgc aattcagagc
40321 taatagcttc tgtgcgccgg acgttgccgc gctaacaggc gcaacagtaa ccagcataaa
40381 tcag**ccgg** **g**ctaaaatgg cacgggcagg tcttctggtt atcgaaggta aggtctggcg
40441 aacggtgat taccggtttg ctaccagggga agaaccggga gaaagatga gcacgaacct
40501 ggtttttaag gagtgcgcc agagtgcgcc gatgaaacgg gtattggcgg tatatggagt
40561 taaaagatga ccatctacat tactgagcta ataacagggc tgctggtaat cgcagccctt
40621 tttatttggg ggagagggaa gtactgaaaa aactaacctt tgaattcoga tctccagcac
43381 gtggtgcaga gaacgttgaa tgcttggaa taatcacatt cccctggttc agagctgtac
43441 gtggaacca tgagcaaatg atgattgatg gcttatcaga gcgtggaaac gttaatcact
43501 ggctgcttaa tggcggtgcc tggttcttta atctcgatta cgacaagaa atctcgcta
43561 aagctcttgc ccataaagca gatgaacttc cgttaatcat cgaactgggtg agcaagata
43621 aaaaatatgt tatctgccac gccgattatc cttttgacga atacgagttt ggaaagccag
43681 ttgatcatca gcagtaatc tggaaaccgg aacgaatcag caactcaca acgggatcgc
43741 tgaagaaat caaaggcgcg gacacgttca tctttggtca tacgccagca tgaaaccac
43801 tcaagtttgc caaccaaatg tatactgata ccggcgcagt gttctgcgga aacctaatc
43861 tgattcaggt acagggagaa ggcgcatgag actcgaagc gtagctaaat ttcattcgcc
43921 aaaaagccc atgatgagcg actcaccacg ggccacggct tctgactctc tttccggtac
43981 tgatgtgatg gctgctatgg ggatggcgca atcacaagcc ggattcggta tggctgcatt
44041 ctgcggtaag cacgaactca gccagaacga caaacaag gctatcaact atctgatgca
44101 atttgcacac aaggtatcgg ggaataccg tgggtgcca **aagctt**gaag gaaatactaa
44161 ggcaaggta ctgcaagtgc tgcgaactc cgcttatgcy gattattgcc gtatgcccgc
44221 gacgccgggg gcaagatgca gagattgcca tggtagcaggc cgtgcggttg atattgcaa
44281 aacagagctg tgggggagag ttgtcgagaa agagtgcgga agatgcaaag gcgtcgcta
44341 ttcaaggatg ccagcaagcg cagcatatcg cgctgtgacg atgtaatcc caaaccttac
44401 ccaaccacc tggctacgca ctgttaagcc gctgtatgac gctctgggtg tgcaatgcca
44461 caaagaagag tcaatcgag acaacatatt gaatgcggct acacgttagc agcatgattg
44521 ccacggatgg caacatatta atggcatgat attgacttat tgaataaaat tggtaaaat
44581 tgactcaacg atgggttaat tgcctcgttg tggtagtgag atgaaaagag gcggcgctta
44641 ctaccgatc cgcctagtgg gtcacttoga cgtatcgtct ggaactcaa ccatcgagg
44701 cagagaggtc tgcaaaatgc aatccgaaa cagtctcgag gtaatagta gagcctgcat
44761 aacggtttcg ggatttttta tatctgcaca acaggtaaaga gcattgagtc gataatcgtg
44821 aagagtcggc gagcctggtt agccagtgtc ctttccgttg tgetgaatta agcgaatacc
44881 ggaagcagaa ccggatcacc aaatgcgtac aggcgtcact gccgccagc aacagcaca
44941 cccaaactga gccgtagcca ctgtctgccc **t**gaat**t**oatt agtaatagtt acgctgcggc
45001 cttttacaca tgacctcgt gaaagcgggt ggcaggaggt cgcgctaaca acctcctgcc
45061 gttttgcccg tgcatatcgg tcacgaaca atctgattac taacacagat agcctggatt
45121 tgttctatca gtaatcgacc ttattcctaa ttaaataagag caaatccct tattgggggt
45181 aagacatgaa gatgccagaa aaacatgacc tgttggccgc cattctcggc gcaaaggaac
45241 aaggcatcgg ggcaatcctt gcgtttgcaa tggcgtaact tcgcgcgaga tataatggcg
45301 gtgcgtttac aaaaacagta atcgacgcaa cgatgtgcgc cattatcggc tggtcattc
45361 tggactctct cgactcggc ggactaagta gcaatctcgc ttatataacg agcgtgttta
45421 tcggctacat cggtagctgac tcgattggtt cgcttatcaa acgctcggc gtaaaaaag
45481 ccggagtaga agatggtaga aatcaataat caacgtaagg cgttctcoga tatgctggcg
45541 tggtcggagg gaactgataa cggacgtoag aaaaccagaa atcatgggta tgacgtcatt
45601 gtaggcggag agctatttac tgattactcc gatcaccctc gcaactttg cacgctaaac
45661 ccaaaactca aatcaacagg cgcggagcgc taccagctc tttccggtg gtgggatgcc
45721 taccgcaagc agcttggcct gaaagacttc tctccgaaaa gtcaggacgc tgtggcattg
45781 cagcagatta aggagcgtgg cgtttacct atgattgatc gtggtgatat ccgtcaggca
45841 atcgaccggt gcagcaatat ctgggcttca ctgcccggcg ctggttatgg tcagttcgag
45901 cataaggctg acagcctgat tgcaaaatc aaagaagcgg gcggaacggc cagagagatt
45961 gatgtatgag cagagtcacc gcgattatct ccgctcgggt tatctgcate atcgtctgcc

46021 tgtcatgggc tgtaaatcat tacctgata acgccattac ctacaaagcc cagcgcgaca
46081 aaaatgccag agaactgaag ctggcgaacg cggcaattac tgacatgcag atgctgcagc
46141 gtgatgttgc tgcgctcgat gcaaaaatac cgaaggagtt agctgatgct aaagctgaaa
46201 atgatgctct gcgtgatgat gttgcccgtg gtcgtcgtcg gttgcacatc aaagcagctc
46261 gtcagtcagt gcgtgaagcc accaccgect ccggcgtgga taatgcagcc tcccccgac
46321 tggcagacac cgctgaacgg gattatttca cectcagaga gaggctgac actatgcaaa
46381 aacaactgga aggaaccag aagtatatta atgagcagtg cagatagagt tgccatatac
46441 gatgggcaac tcatgcaatt attgtgagca atacacacgc gcttccagcg gagtataaat
46501 gcctaaagta ataaaaccga gcaatccatt tacgaatggt tgctggggtt ctgttttaac
46561 aacattttct gcgcccac aaattttggc tgcacgcaga gttttcttct gcccaattcc
46621 agaaacgaag aaatgatggg tgatggtttc ctttgggtgct actgctgccg gtttgtttg
46681 aacagtaaac gtctgttggg cacatcctgt aataagcagg gccagcgag tagcgagtag
46741 catttttttc atgggtttat tcccgatgct ttttgaagtt cgcagaatcg tatgtgtaga
46801 aaattaaaca aaccctaac aatgagttga aatttcatat tgtaaatatt tattaatgta
46861 tgtcagggtc gatgaatcgt cattgtattc ccgattaac tatgtccaca gccctgacgg
46921 ggaacttctc tgcgggagtg tccgggaata attaaaacga tgcacacagg gtttagcgcg
46981 tacacgtatt gcattatgcc aacgcccgg tgctgacacg gaagaaaccg gacgttatga
47041 tttagcgtgg aaagatttgt gtatgtttct gaatgctctc agtaaatagt aatgaattat
47101 caaaggata gtaatatctt ttatgttcat ggatatttgt aacctatcgg aaaactcctg
47161 ctttagcaag attttccctg tattgtcga atgtgatttc tcttgatttc aacctatcat
47221 aggacgtttc tataagatgc gtgtttcttg agaatttaac atttacaacc tttttaagtc
47281 cttttattaa cacggtgta tcgttttcta acacgatgtg aatattatct gtggctagat
47341 agtaaaata atgtgagacg ttgtgacggt ttagttcaga ataaaacaat tcacagtcta
47401 aatcctttcg cacttgatcg aatatttctt taaaaatggc aacctgagcc attggtaaaa
47461 ccttccatgt gatacgaggg cgcgtagttt gcattatcgt ttttatcgtt tcaatctggt
47521 ctgacctcct tgtgttttgt tgatgattta tgtcaaata taggaatggt ttacttaat
47581 agtattggtt gcgtaacaaa gtgcccgtct gctggcattc tggagggaaa tacaaccgac
47641 agatgtatgt aaggccaacg tgctcaaatc ttcatacaga aagatttgaa gtaaatattt
47701 aaccgctaga tgaagagcaa gcgcatggag cgacaaaatg aataaagaac aatctgctga
47761 tgatccctcc gtggatctga ttctgtgtaa aaatagctt aatagcaca tttctatgag
47821 ttaccctgat gttgtaattg catgtataga acataagggtg tctctggaag cattcagagc
47881 aattgaggca gcgttgggtg agcacgataa taatatgaag gattattccc tgggtggtga
47941 ctgatcacca taactgctaa tcattcaaac tatttagtct gtgacagagc caacacgcag
48001 tctgtcactg tcaggaaagt ggtaaaactg caactcaatt actgcaatgc cctcgttaatt
48061 aagtgaattt acaatatcgt cctgttcgga gggaagaacg cgggatggtc attcttcatc
48121 acttttaatt gatgtatatg ctctcttttc tgacgttagt ctccgacggc aggettcaat
48181 gaccaggct gagaaattcc cggacccttt ttgctcaaga gcgatgttaa tttgttcaat
48241 catttgggta ggaaagcgga tgttgcgggt tgttgtctg cgggttctgt tcttctgga
48301 catgaggttg ccccgatttc agtgcctgctg atttgtattg tctgaagttg tttttacggt
48361 aagttgatgc agatcaatta atacgatacc tgctcataa ttgattattt gacgtgggtt
48421 gatggcctcc acgcacgttg tgatatgtag atgataatca ttatcacttt acgggtcctt
48481 tccggtgac cgacaggtta cg