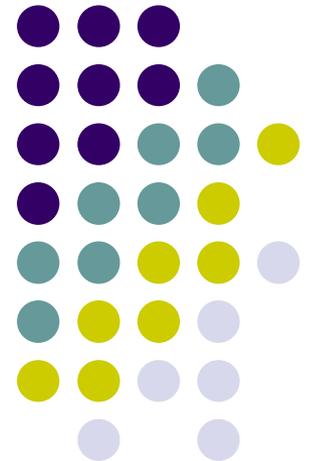


Digestión de DNA usando Enzimas de Restricción

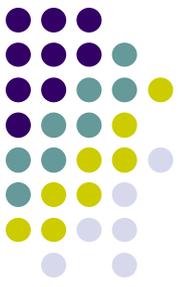


Objetivos

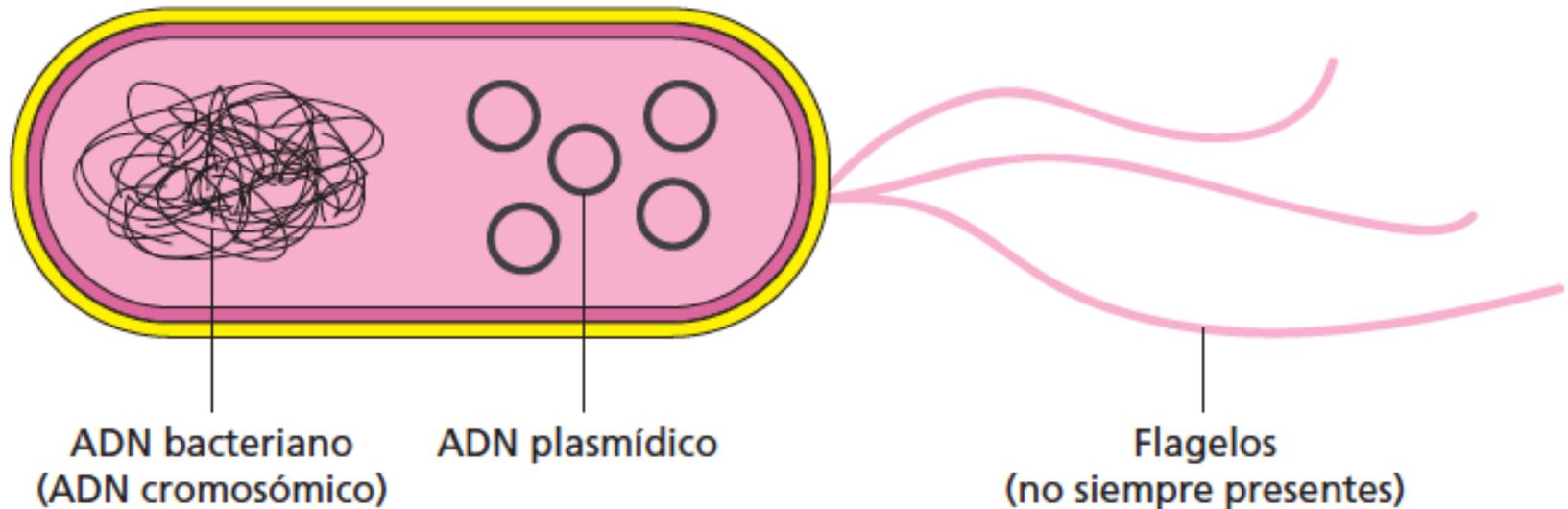


El cortar el DNA con enzimas de restricción es muchas veces el primer paso de los investigadores para estudiar un gen. En este laboratorio se hará lo siguiente:

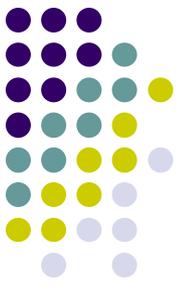
- Usar enzimas de restricción para cortar el DNA.
- Separar los fragmentos usando electroforésis.
- Analizarán un gel con DNA cortado con diferentes enzimas de restricción.



- En bacterias, un plásmido, una pieza circular de DNA, constituye una gran parte del material genético.
- El plásmido tiene que hacerse lineal para poder recombinarse.



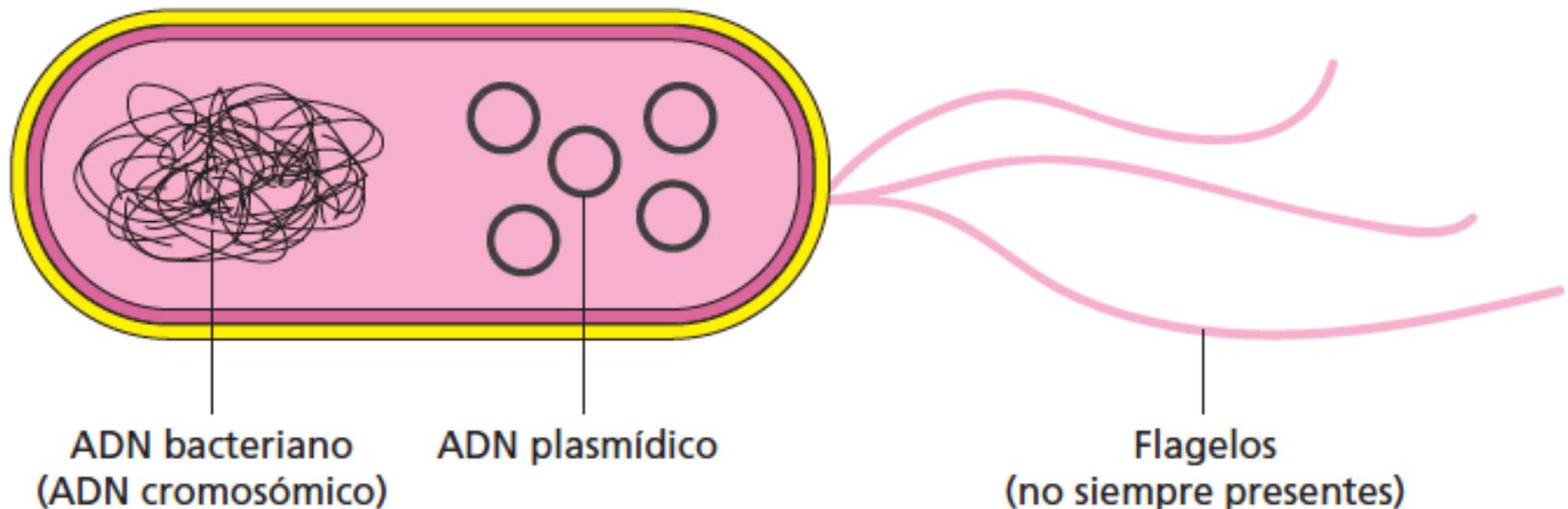
- **En bacterias, un plásmido, una pieza circular de DNA, constituye una gran parte del material genético.**

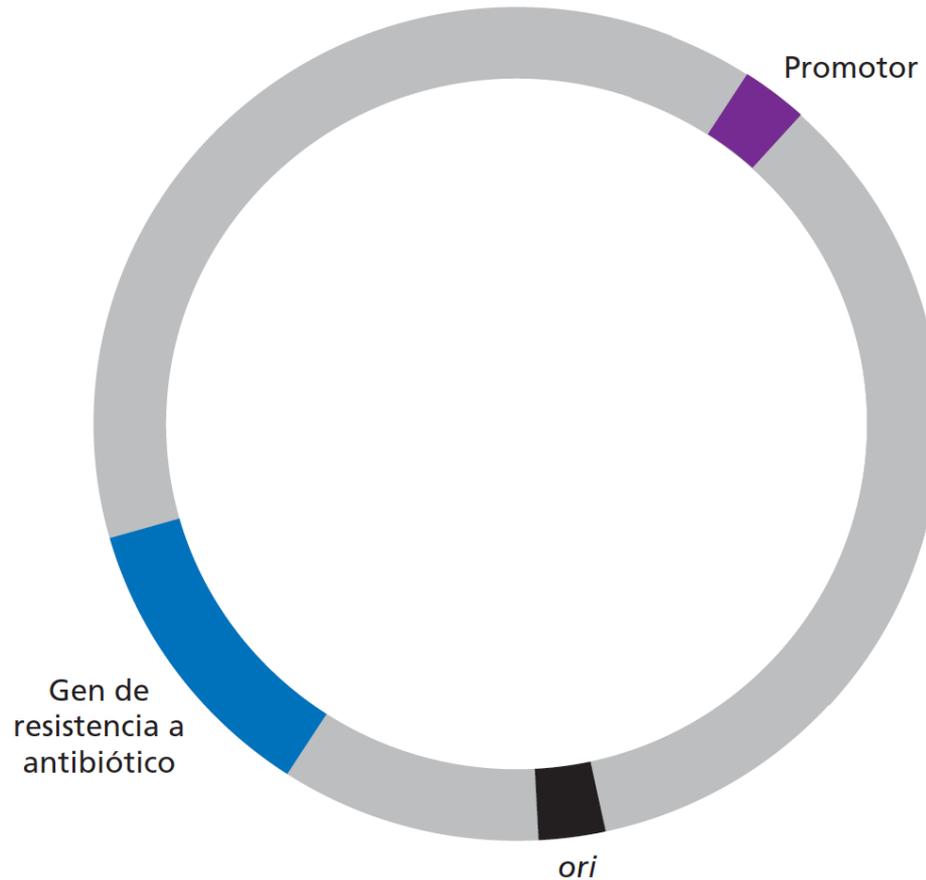


Muchos tipos diferentes de bacterias tienen dos formas de ADN:

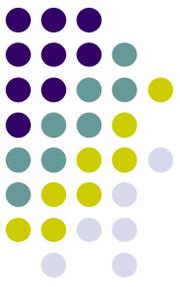
(1) un solo cromosoma compuesto por una molécula grande de ADN que contiene toda la información que necesita el organismo para sobrevivir y reproducirse

(2) plásmidos, que son pequeñas moléculas circulares de ADN, con un tamaño que varía de 1,000 a 200,000 pares de bases (dos bases nitrogenadas unidas para conectar cadenas complementarias de ADN) que se encuentran en diversas copias separadas del ADN cromosómico. Algunas bacterias tienen hasta 500 plásmidos en cada célula





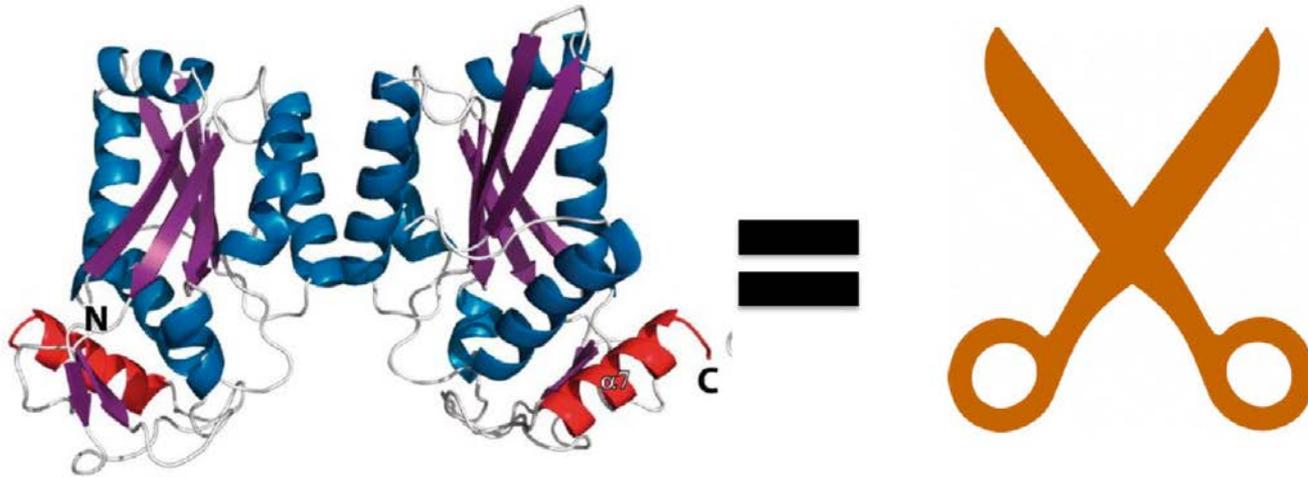
Los componentes básicos de un plásmido son el punto *ori* para el inicio de la replicación del ADN, un promotor para el inicio de la transcripción y un gen para la *resistencia a antibióticos* (estado en que las bacterias ya no son sensibles a un antibiótico, y seguirán multiplicándose y dividiéndose en presencia del antibiótico).



Enzimas de restricción

- También conocidas como endonucleasas, cortan los enlaces fosfodiéster a partir de una secuencia que reconocen..

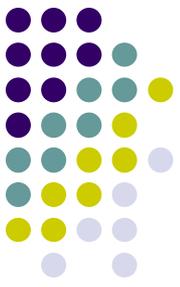
Enzimas de Restricción



Endonucleasas

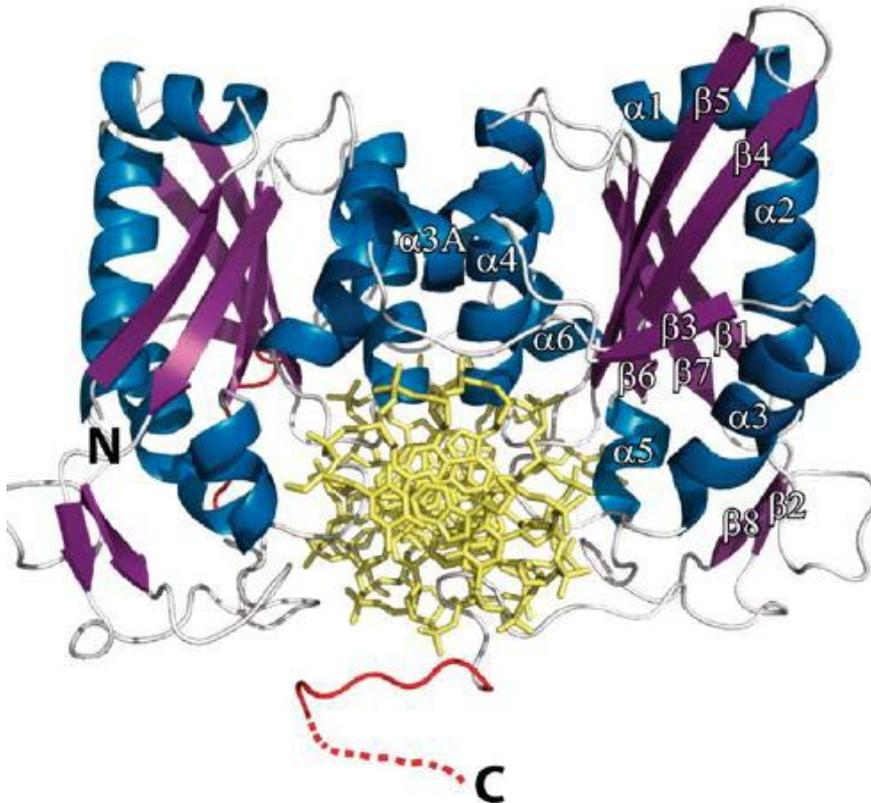


- **Endonucleasas de restricción.**
- Las bacterias poseen las endonucleasas de restricción como un sistema enzimático **de defensa** en contra de la invasión de DNA exógeno, como por ejemplo; el ataque de un **bacteriófago**.



Enzimas de restricción

- La secuencia que reconocen es una secuencia palindrómica (secuencia que se lee igual en ambas direcciones).



Secuencias Palindrómicas:

- Amad a la dama
- Adán no calla con nada

5' ATTGGCGGTTAACCGCCAAT 3'
3' TAACCGCCAATTGGCGGTTA 5'

Las enzimas de restricción al cortar DNA pueden producir dos tipos de cortes:



- Cohesivos o pegajosos: cortan a manera escalonada en dos puntos diferentes.
- Abruptos o romos: cortan en un sólo punto.



Extremos cohesivos

- Es cuando la enzima de restricción rompe la cadena del ADN en posiciones **no simétricas** y producen fragmentos con secuencias complementarias de una cadena.



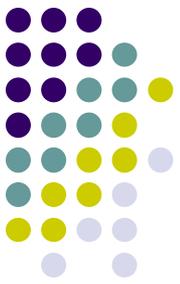


Extremos romos

- Es cuando la enzima de restricción corta exactamente sobre los **dos ejes de simetría.**

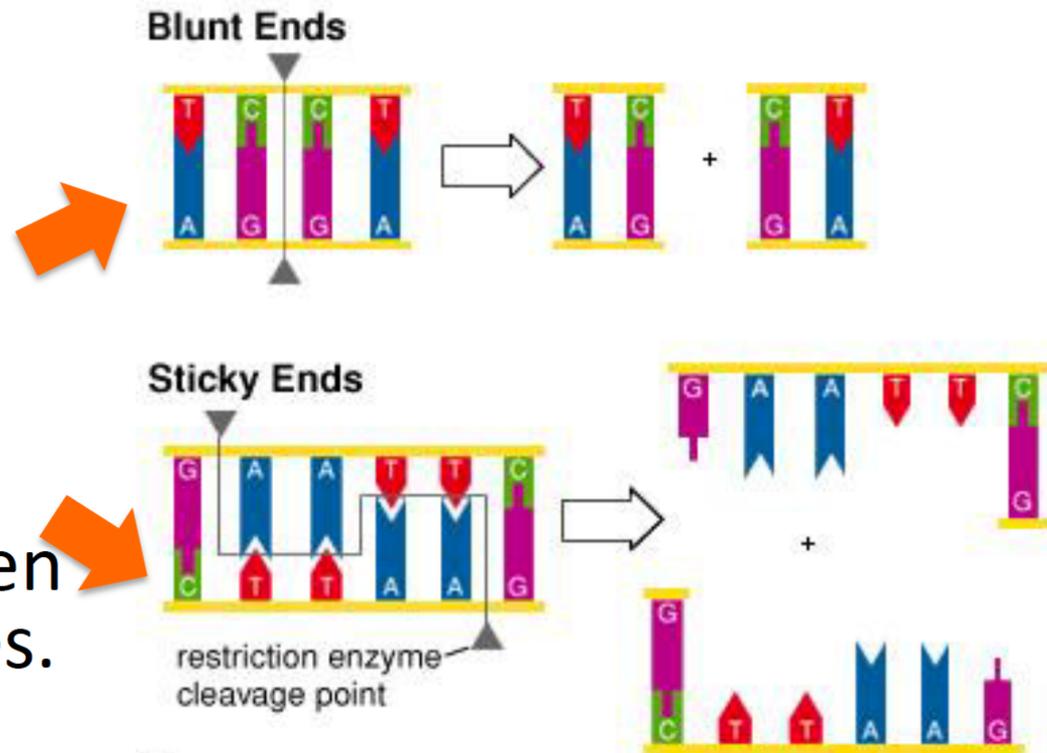


Las enzimas de restricción al cortar DNA pueden producir dos tipos de cortes:

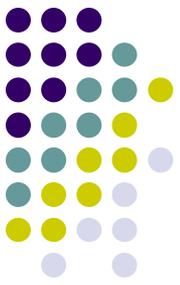


Las **enzimas** de restricción al cortar DNA pueden producir dos tipos de cortes:

- Abruptos: cortan en un sólo punto.
- Cohesivos o pegajosos: cortan a manera escalonada en dos puntos diferentes.



Frecuencia de reconocimiento



- Las enzimas que reconocen una secuencia de 4 bases, cortan con más frecuencias que las que reconocen una secuencia de 6 bases
- La frecuencia esta determinada por la probabilidad:
- Una secuencia de 4 bases tiene la probabilidad de ocurrir en un genoma cada 256 pb ($4^4 = 256$)
- Una secuencia de 6 bases tiene la probabilidad de ocurrir en un genoma cada 4,096 pb ($4^6 = 4096$).
- Una secuencia de 8 bases tiene la probabilidad de ocurrir en un genoma aproximadamente cada 65,000 pb ($4^8 \approx 65,000$).



E coli vs H. influenza

- Descubiertas por Stewart Lynn y Werner Arber en 1960 en la bacteria *Echerichia coli*.
- Se speraba que esta cortara cualquier DNA en una secuencia de nucleótido específico
- No ocurrió como ellos esperaban, la enzima no cumplió con sus expectativas.
- Más adelante, Hamilton Smith descubrió una endonucleasa de restricción en la bacteria *Haemophilus influenza* sepa Rd (figura 1), llamada *HindII*.





Nomenclatura

- La primera letra del nombre de la enzima proviene del género
- Las próximas dos letras de la especie
- La cuarta letra de la sepa.
- El número romano hace referencia a la cantidad de endonucleasas de restricción que han sido extraídas de la misma bacteria.

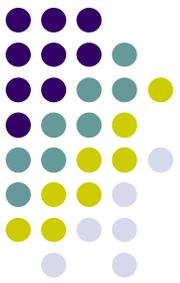
Enzimas de restricción



- La enzima toma el nombre de las bacterias que la produce:
 - *EcoRI*: E = género *Escherichia*.
co = especie *coli*
R = cepa RV 13
I = primera endonucleasa aislada de esta cepa

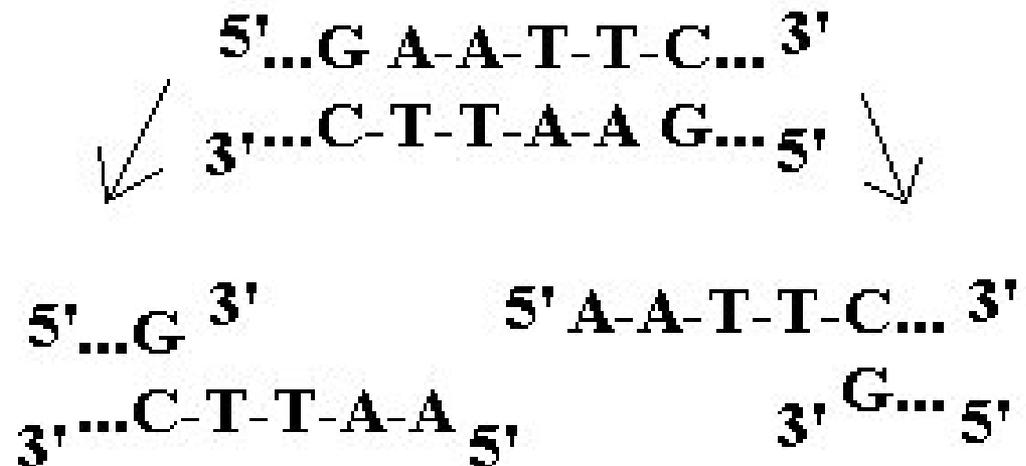
Fuente	Enzima de restricción	Sitio de reconocimiento
<i>Escherichia coli</i>	EcoRI	5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5' ↓ ↑
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	BamHI	5' GGATCC 3' 3' CCTAGG 5' ↓ ↑
<i>Haemophilus influenzae</i>	HindIII	5' AAGCTT 3' 3' TTCGAA 5' ↓ ↑

Los símbolos ↑ y ↓ indican dónde se corta el ADN.



Corte cohesivo con EcoRI:

Cleavage by EcoRI



Enzimas de restricción



Endonucleasa de restricción	Secuencia de reconocimiento
<i>AluI</i>	AG↓CT
<i>BamHI</i>	G↓GATCC
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC
<i>HaeIII</i>	GG↓CC
<i>HindII</i>	GTPy↓PuAC
<i>HindIII</i>	A↓AGCTT
<i>PstI</i>	CTGCA↓G
<i>HpaII</i>	C↓CGG
<i>NotI</i>	GC↓GGCCGC



Enzimas de Restricción

Restriction and methylation activities may be associated or may be separate.

	Type II Enzyme	Type III Enzyme	Type I Enzyme
Protein structure	separate endonuclease and methylase	bifunctional enzyme of 2 subunits	bifunctional enzyme of 3 subunits
Recognition site	short sequence (4-6 bp), often palindromic	asymmetrical sequence of 5-7 bp	bipartite and asymmetrical (e.g., TGAN ₈ TGCT)
Cleavage site	same as or close to recognition site	24-26 bp downstream of recognition site	nonspecific >1000 bp from recognition site
Restriction & methylation	separate reactions	simultaneous	mutually exclusive
ATP needed for restriction?	no	yes	yes

Electroforesis de DNA:



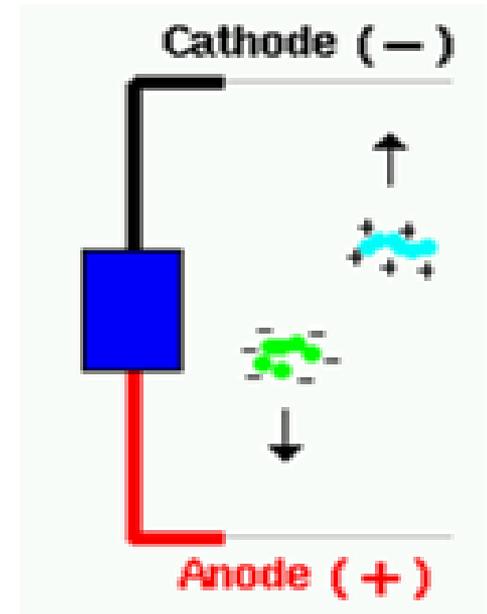
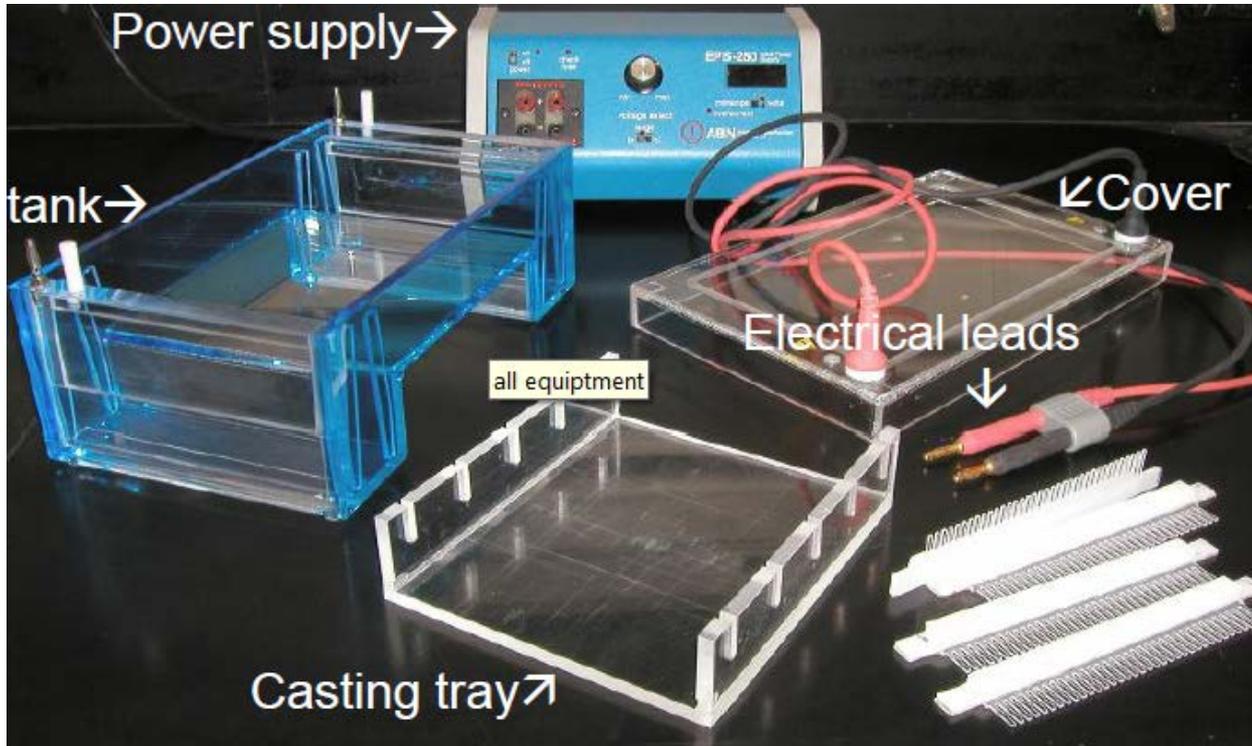
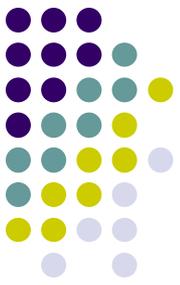
- Después de tratar el DNA con las diferentes enzimas, los fragmentos son separados por su tamaño usando un gel de electroforesis.
- Después de la carrera del DNA en el gel, este se tiñe para revelar los patrones de bandas formados en el gel que corresponden a fragmentos de diferentes tamaños.

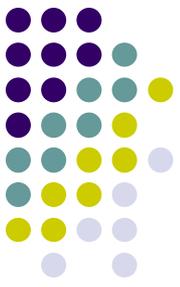
Principios de electroforesis



- Técnica usada para separar y purificar macromoléculas (i.e. proteínas, ácidos nucleicos) que varían en tamaño, carga o conformación.
- Cuando moléculas cargadas son colocadas en un campo eléctrico, estas migran hacia el polo positivo (ánodo) o polo negativo (cátodo) de acuerdo a su carga.

- Permite producir fragmentos definidos que se pueden separar mediante una electroforesis horizontal.





Geles comúnmente usados:

- **Agarosa:** polisacárido extraído de algas. No tóxico. Poco poder de resolución pero alto grado de separación. Separa fragmentos de DNA de 200 a 50,000 pb.
- **Poliacrilamida:** polímero de acrilamida. Tóxico. Menor grado de separación pero alto poder de resolución. Usado para fragmentos de DNA de 500 pb. Usado para separar mezclas de proteínas.

Preparación de gel:

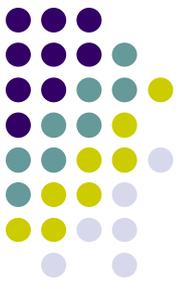
- La mezcla de agarosa y buffer tiene que ponerse a calentar, agitando frecuentemente hasta que llegue al punto donde comience a hervir.





- Una vez que el frasco con la agarosa ya pueda tocarse sin quemarse, verter con cuidado la mezcla en la bandeja.
- Dejar que se torne opaco y sólido.

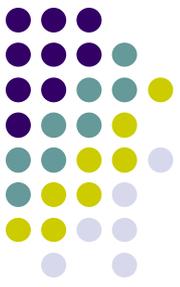




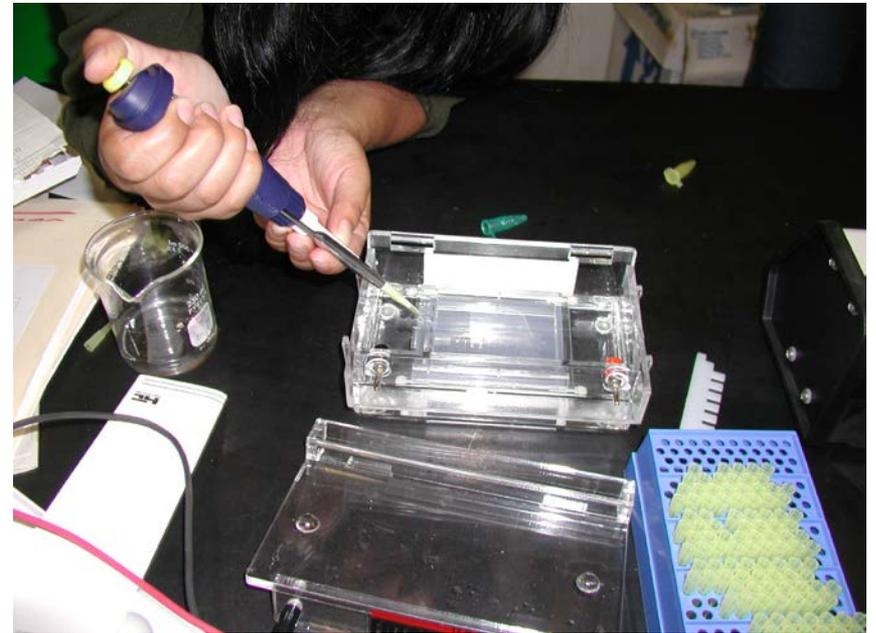
Práctica de uso de micropipetas:

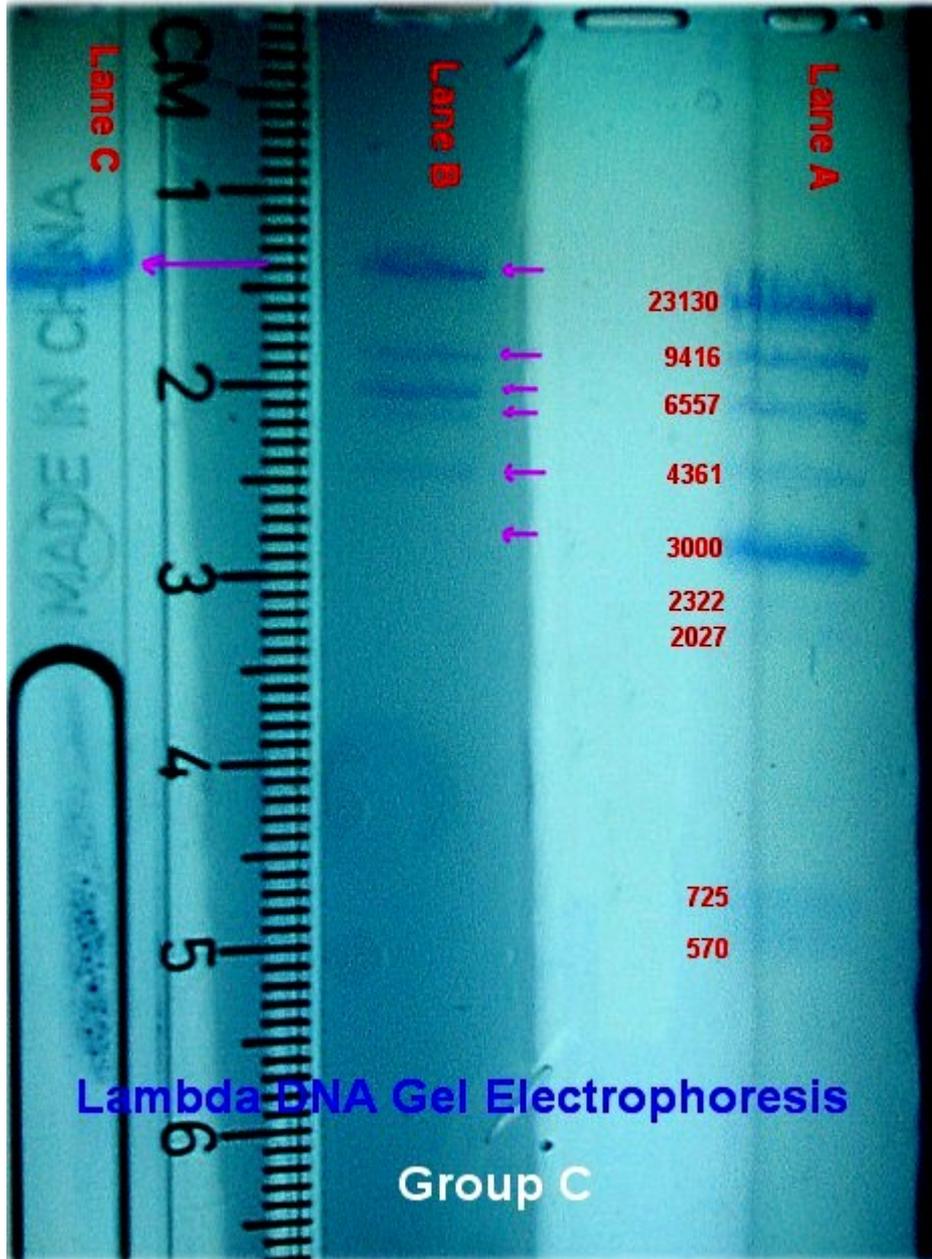
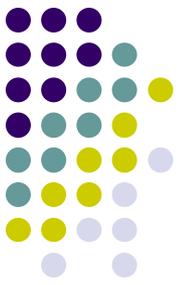
- Apoye brazo que esté agarrando micropipeta en superficie firme.
- Utilice la mano contraria para apoyar la micropipeta
- Introduzca punta de micropipeta dentro de fosa, sin tocar el gel
- Vierta el contenido en fosa, presionando botón de la pipeta hasta primer punto de resistencia





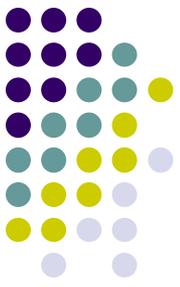
- Cuando la gel solidifique y se torne opaca, sacar la peinilla y poner gel en cámara de electroforésis con fosas del lado del polo negativo.
- Proceder a pipetear las muestras en las fosas.
- Correr gel.
- Teñir.





Resultados luego de teñir:

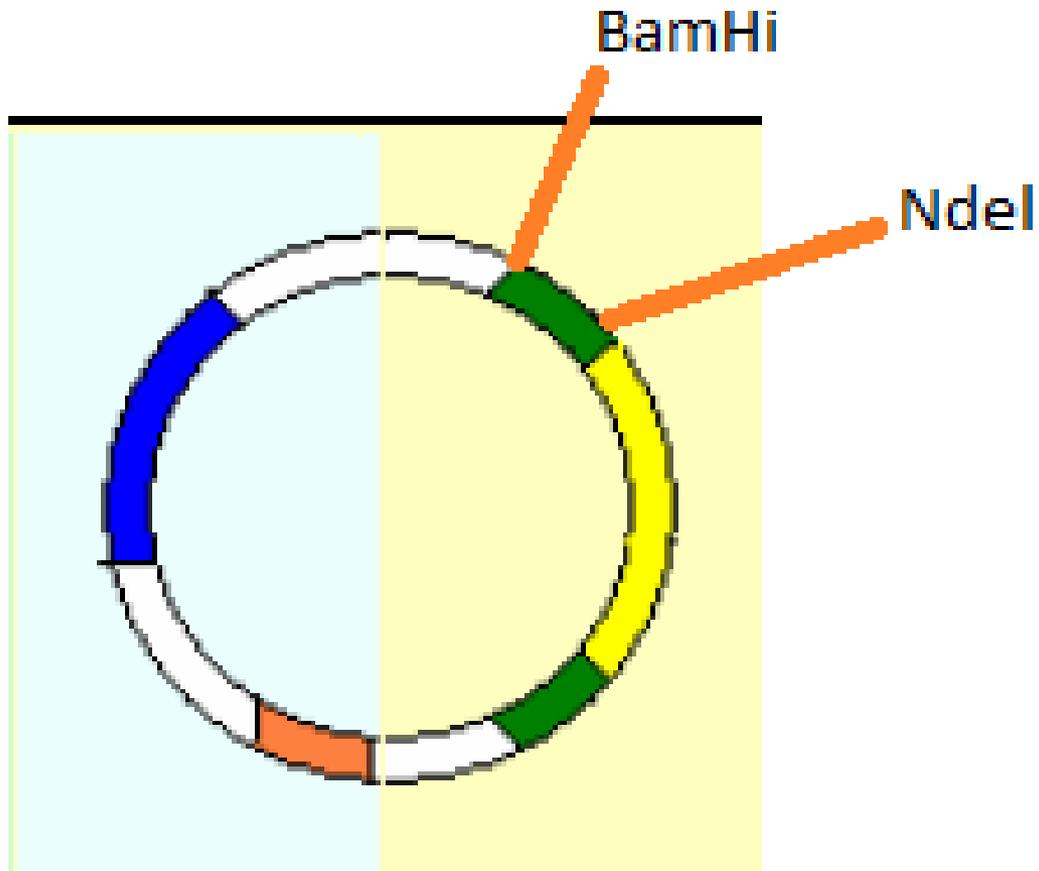
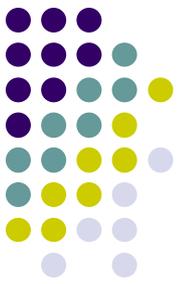
- A: marcador con pedazos de tamaño conocidos.
- B: Lamda cortado con Eco R1.
- C: Lamda sin cortar.



Mapa de restricción

- Es un diagrama de la molécula de DNA en donde se muestra los sitios de corte de las enzimas de restricción.
- Se puede localizar secuencias de bases específicas en un cromosoma para estimar el grado de diferencia entre los cromosomas

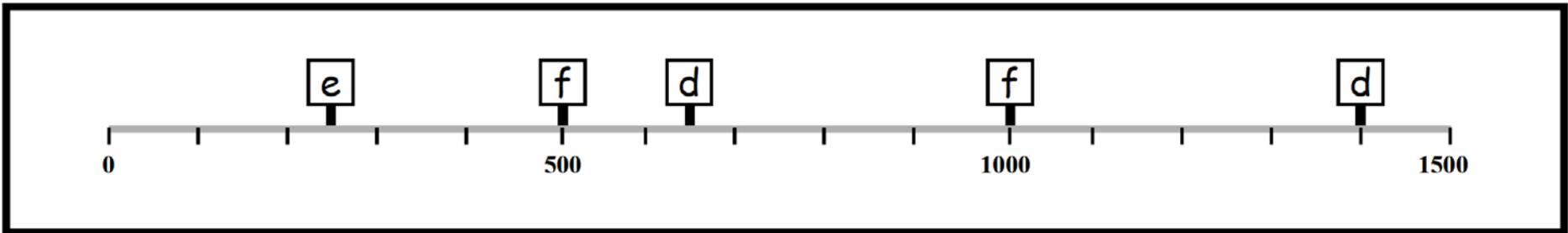
- En la práctica se utilizarán una mezcla de varias enzimas de restricción





EJERCICIO nº 1

1.- Si estuviéramos trabajando con un DNA lineal como el que se muestra en la figura siguiente, ¿cuál es el tamaño en pares de bases (pb) de los fragmentos de DNA que se obtienen al realizar las digestiones con la enzima d, con la enzima e, con la enzima f y con las distintas combinaciones entre las mismas? Los números corresponden al número de pares de bases del DNA (en total su tamaño es de 1500 pares de bases).





EJERCICIO nº 1

DIGESTIÓN d: 650 pb, 750 pb, 100 pb

DIGESTIÓN e: 250 pb, 1250 pb

DIGESTIÓN f: 500 pb, 500 pb, 500 pb

DIGESTIÓN de:





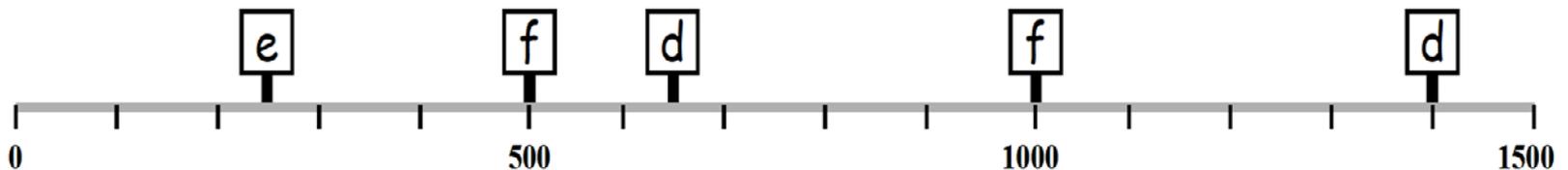
EJERCICIO nº 1

DIGESTIÓN d: 650 pb, 750 pb, 100 pb

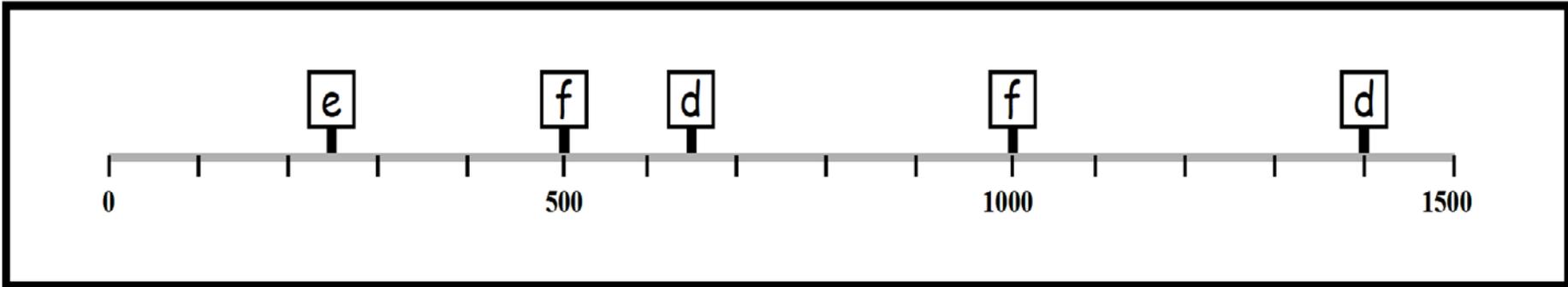
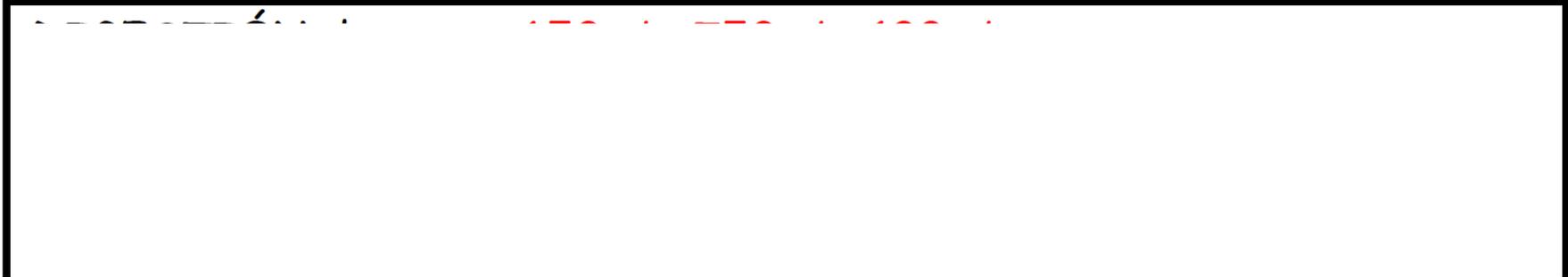
DIGESTIÓN e: 250 pb, 1250 pb

DIGESTIÓN f: 500 pb, 500 pb, 500 pb

DIGESTIÓN de: 250 pb, 400 pb, 750 pb, 100 pb



EJERCICIO nº 1

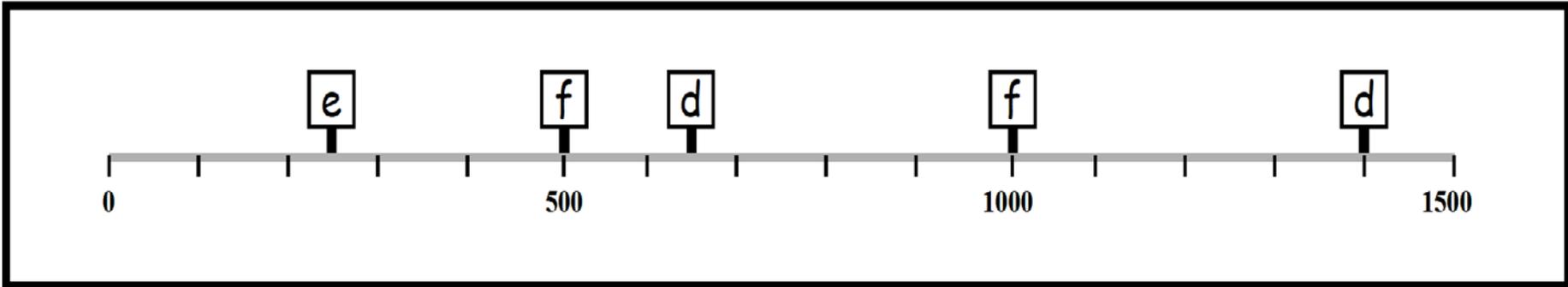


DIGESTIÓN df:

DIGESTIÓN ef:



EJERCICIO nº 1

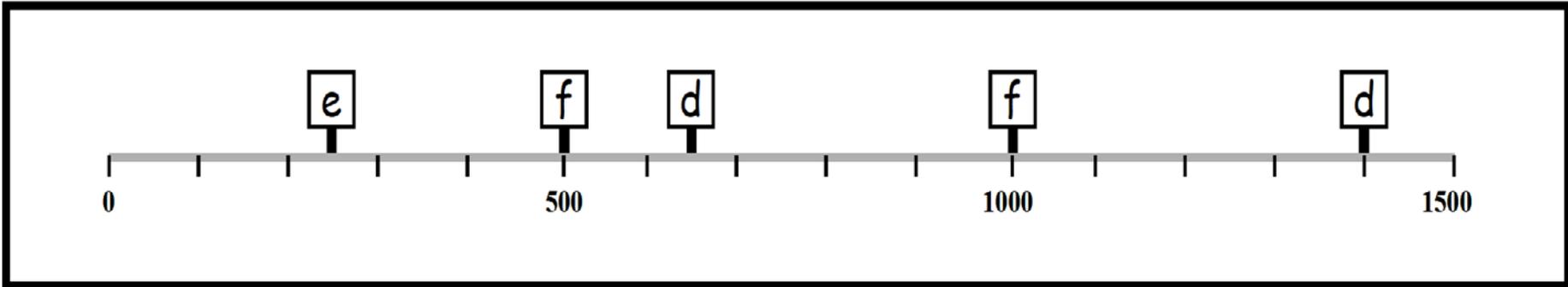


DIGESTIÓN df: 500 pb, 150 pb, 350 pb, 400 pb, 100 pb

DIGESTIÓN ef:



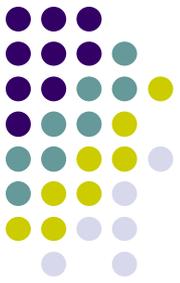
EJERCICIO nº 1



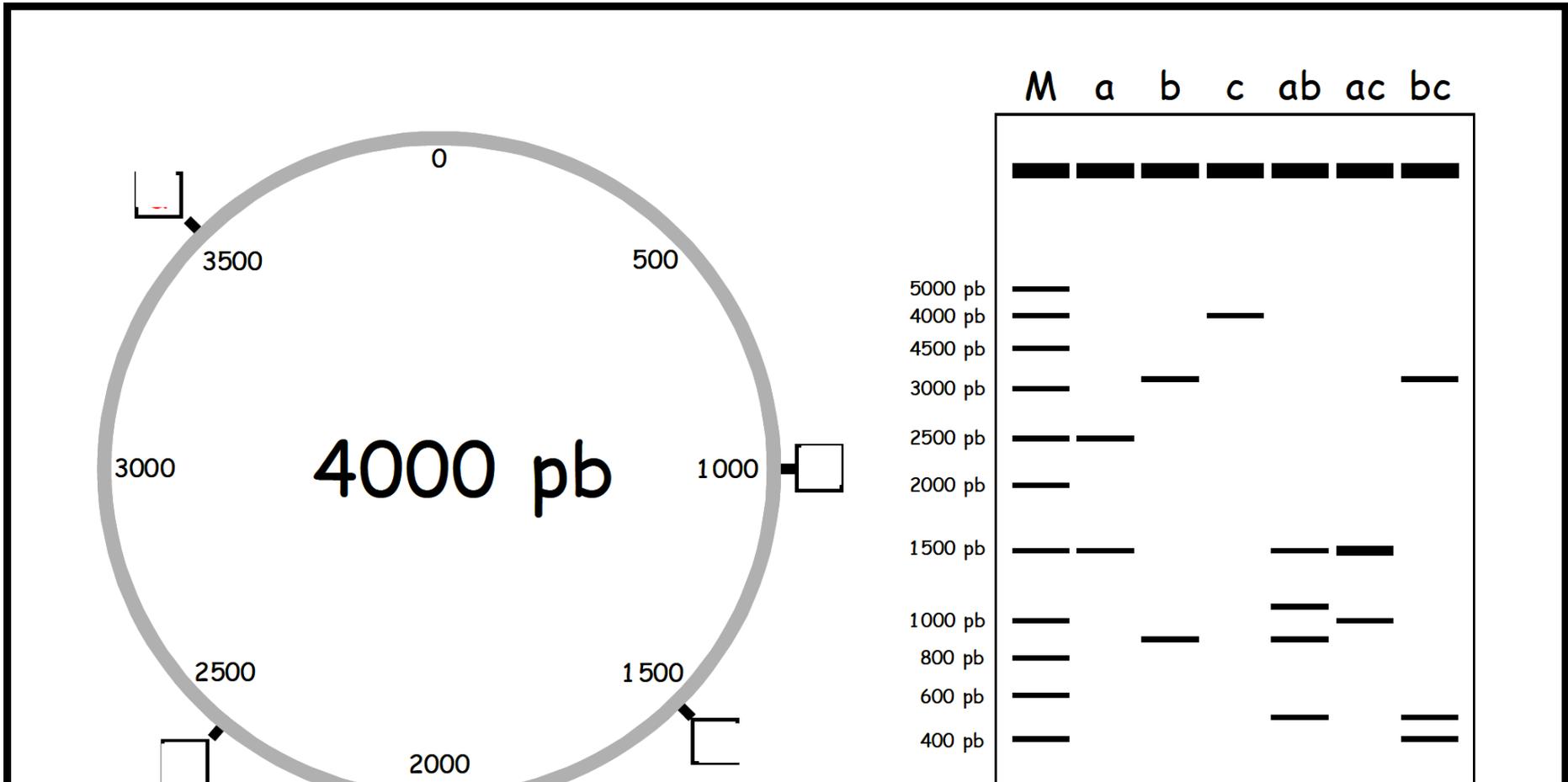
DIGESTIÓN df: 500 pb, 150 pb, 350 pb, 400 pb, 100 pb

DIGESTIÓN ef: 250 pb, 250 pb, 500 pb, 500 pb

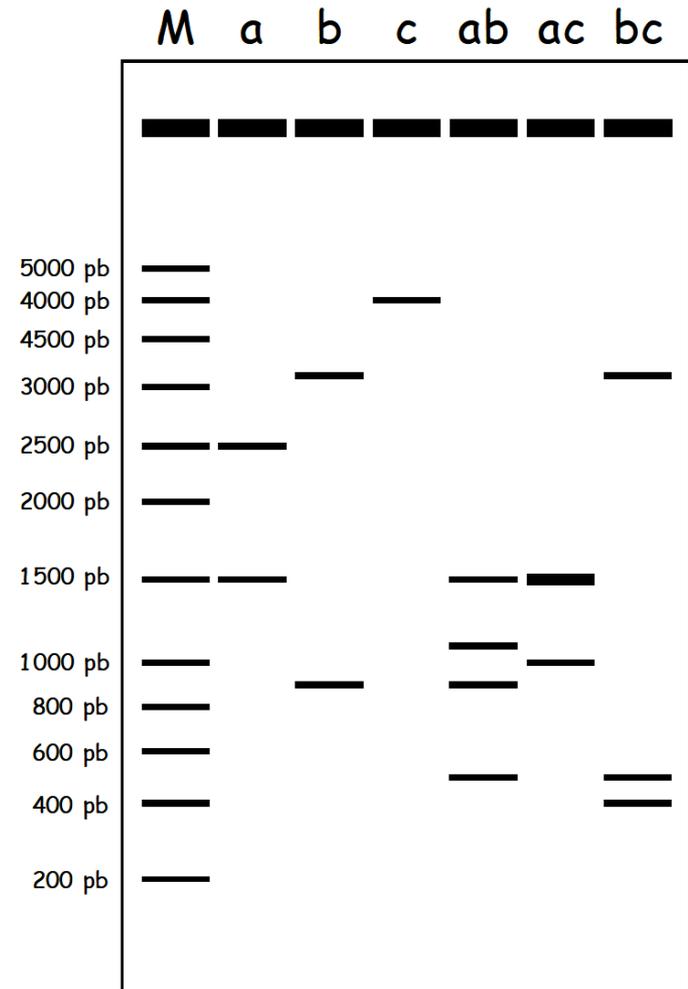
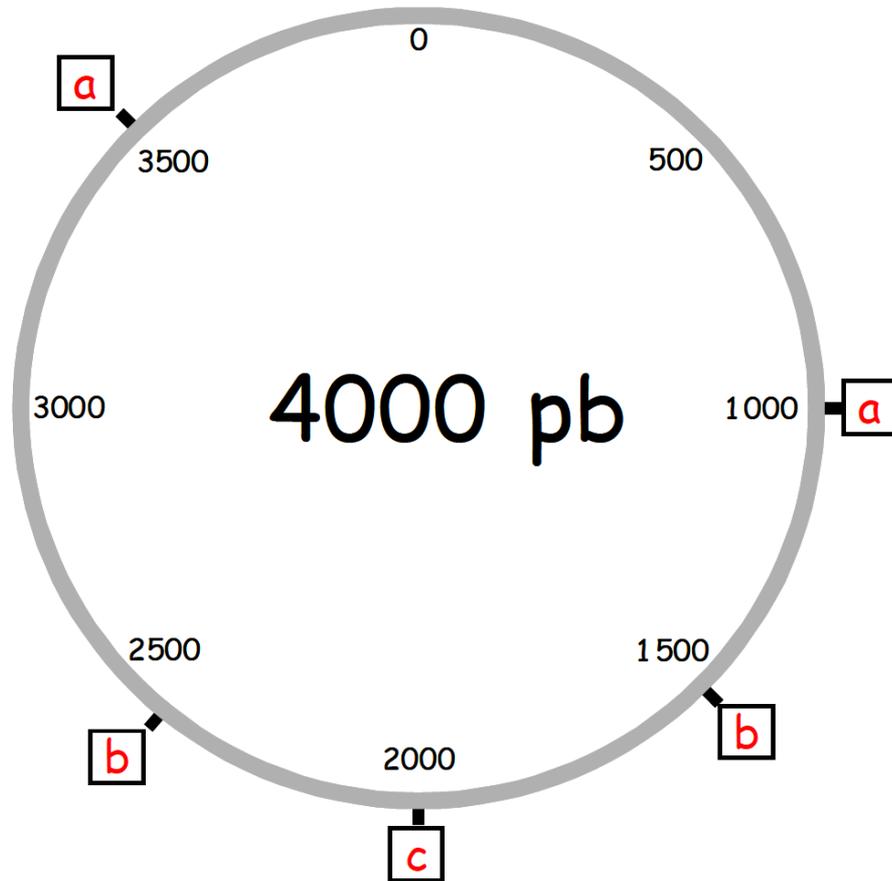
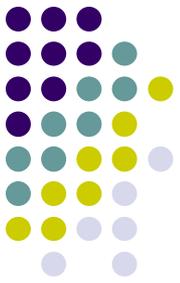
EJERCICIO nº 2



En la figura se muestra un plásmido, con un tamaño de 4000 pares de bases. En el mismo hay cinco sitios de restricción, que corresponden a tres enzimas (a, b y c). Al lado se muestra el resultado de una electroforesis en un gel de agarosa, de los productos de las digestiones con las enzimas de restricción.



EJERCICIO nº 2

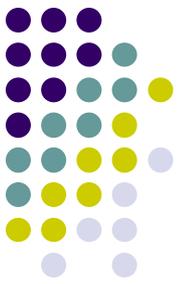


Aplicaciones: Clonación

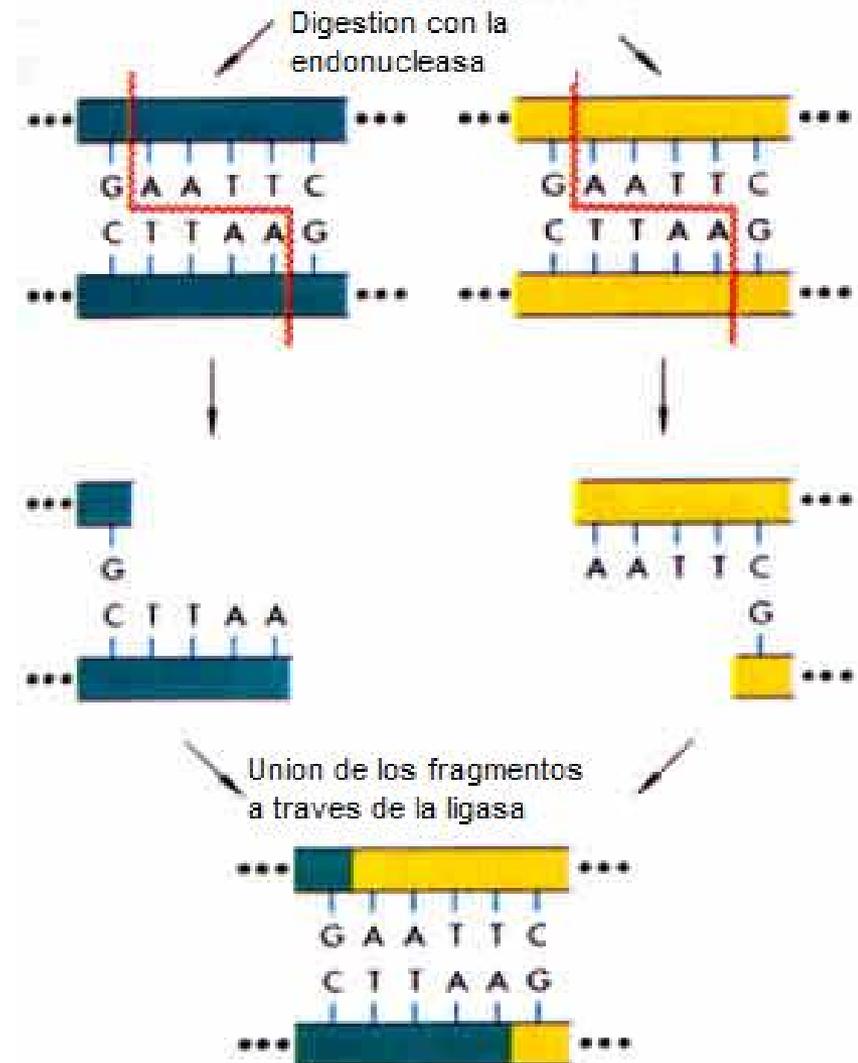


- La **clonación** es la técnica central de la tecnología de DNA recombinante.
- permite replicar (clonar) en grandes cantidades un pedazo específico de DNA.
- El DNA de interés es cortado y ligado a un elemento genético, **vector de clonación**, que se puede replicar autónomamente cuando se introduce a una bacteria en crecimiento, en la mayoría de los casos *E. coli*.
- El vector de clonación puede ser un **plásmido** o un **bacteriófago**.

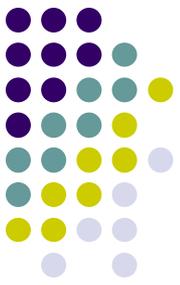
Aplicaciones: Clonación



- Tanto el DNA de interés como el vector de clonación deben ser cortados con la misma enzima.
- Las enzimas más utilizadas en esta técnica son aquellas que producen terminales pegajosos. En esencia, dos fragmentos de DNA generados por la misma endonucleasa de restricción pueden unirse por el pareo de las bases complementarias en los fragmentos sencillos de cada terminal.



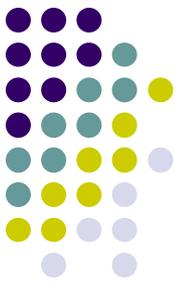
Aplicaciones: Fingerprinting



2) “DNA fingerprinting”

- Los análisis de los patrones formados por los fragmentos que se producen cuando el DNA es cortado por las endonucleasas de restricción han sido utilizados,
- para estudiar en detalle los genomas de diversos organismos,
- diagnosticar enfermedades genéticas
- resolver crímenes violentos.
- Estos análisis tienen como base el hecho de que dos personas que no son gemelos idénticos poseen diferente secuencia de nucleótidos en el DNA

Aplicaciones: Fingerprinting



- Aunque la diferencia en la secuencia de bases en el DNA entre dos personas sea pequeña, los fragmentos producidos por las endonucleasas de restricción son de diferentes tamaños.
- Esta diferencia en el tamaño de los fragmentos, conocido como **patrones polimórficos de endonucleasas de restricción (restriction fragment length polymorphisms, RFLP's)**, pueden ser analizados por electroforesis
- Los resultados en los patrones son distintivos para cada persona, por lo que funcionan como huellas dactilares (“DNA fingerprinting”).

Aplicaciones: Fingerprinting

