

## INTERPRETACIÓN DE GELES DE DNA DIGERIDOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El empleo de las enzimas de restricción y los plásmidos es habitual en el laboratorio de Biología Molecular. Con este ejercicio se pretende que el alumno conozca cómo se emplean y cuál es su utilidad básica a la hora de realizar el mapa de un fragmento de DNA a estudiar<sup>(Ver anexo)</sup>.

Para detectar los productos de restricción obtenidos, se debe proceder previamente a la extracción de ADN, la amplificación mediante PCR, y finalmente cortes con enzimas de restricción. Las enzimas de restricción, también conocidas como endonucleasas, son enzimas que permiten cortar DNA de hebra doble, donde reconocen secuencias palindrómicas (secuencias que se leen igual en ambas direcciones). Las enzimas de restricción son endonucleasas que reconocen una secuencia entre 4-8 pb en DNA. El sitio de reconocimiento se llama sitio de restricción, y la enzima rompe un enlace fosfodiéster en la hebra de arriba y otro enlace fosfodiéster en la hebra complementaria.

Estas enzimas se encuentran en muchas especies de bacterias, donde funcionan in vivo como parte de un sistema de restricción y modificación (sistema R/M). Este sistema es análogo a un sistema inmune, y le permite distinguir a la bacteria entre su propio DNA y el DNA exógeno, siendo este último degradado por la enzima de restricción. El DNA propio no es reconocido por sus enzimas de restricción, puesto que previamente lo ha modificado por metilación mediada por una metiltransferasa (enzima que transfiere grupos metilo desde S-adenosilmetionina a bases específicas).

Las endonucleasas se nombran a partir de las bacterias de las que son extraídas, su nombre está dado según el género y la especie de la bacteria de donde se aisló por primera vez esta enzima. La primera letra representa el género de la bacteria, las próximas dos indican la especie, una cuarta letra indica la cepa, y un número al final indica la cantidad de enzimas que se han aislado de esa cepa. Ej:

Eco RI \_ E = género *Escherichia*

Co = especie *coli*

R = cepa RV 13

I = primera endonucleasa aislada de esta cepa

Las enzimas de restricción al cortar el DNA pueden producir 2 tipos de cortes:

Cohesivos o pegajosos: Cortes escalonados, dejando productos con extremos complementarios (cohesivos)

Ej: Eco RI

Para la enzima: Eco RI

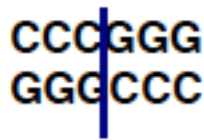
Para la enzima: Pst I



Abruptos: Cortes simétricos, dejando productos con extremos ciegos Ej: Alu I



*SspI*



*SmaI*

En este ejercicio, nos centraremos en la digestión con enzimas de restricción y en la utilización de la electroforesis como metodología analítica que permite visualizar estos productos.

### OBJETIVOS DEL EJERCICIO

1. Adquirir la habilidad para realizar e interpretar mapas de restricción
2. Analizar diferentes productos enzimáticos obtenidos de la digestión con enzimas de restricción.
3. Analizar los resultados de una electroforesis de agarosa, como método de separación y análisis de los ácidos nucleicos.

El plásmido (DNA de origen procariota) que se muestra (figura 1) contiene varios sitios de restricción, que se correspondan con 3 enzimas de restricción, la EcoRI, BamHI y HindIII. El plásmido tiene en su totalidad 4Kb.

A partir de este DNA bicatenario se produce la hidrólisis con cada una de las enzimas anteriormente mencionadas, siguiendo un protocolo como el que se indica a continuación:



Deduzca el tamaño de los fragmentos que se obtendrían si se digirieran con cada enzima por separado y con EcoRI y HindIII a la vez. Qué enzima lineariza el plásmido. Anótelos en la tabla 1.

Figura 1. Plásmido mostrando puntos de corte y las enzimas de restricción

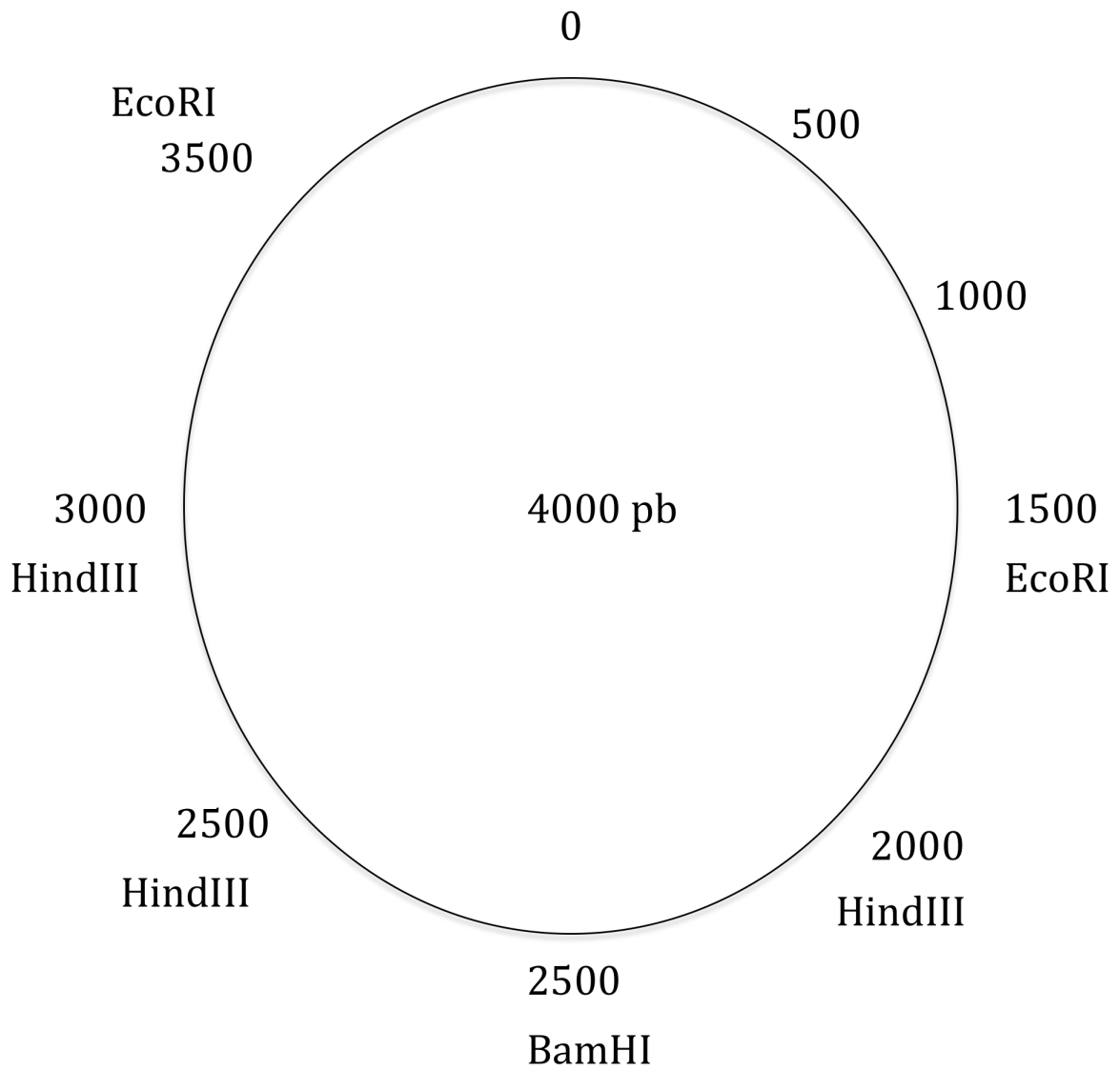


Tabla 1.

Digestión con endonucleasas	Tamaño de los fragmentos esperados (pb)
EcoRI	
HindIII	
BamHI	
EcoRI y HindIII	
Lineariza	

Una vez entendido el ejercicio anterior, hemos tomado otro plásmido (Figura 2) y se ha digerido con otras enzimas de restricción. Los fragmentos de la digestión son sometidos a una electroforesis en gel de agarosa. En el gel se separan los fragmentos en función del tamaño (figura 3). Ahora el alumno tiene analizar los resultados del gel y deducir con qué enzimas ha digerido el DNA cargado en los pocillos II, III y IV.

Figura 2. Plásmido (DNA circular) con un tamaño de 20000 pb (20 Kb). Como puede observar contiene varios sitios de restricción que corresponden a las endonucleasas BamHI y EcoRI.

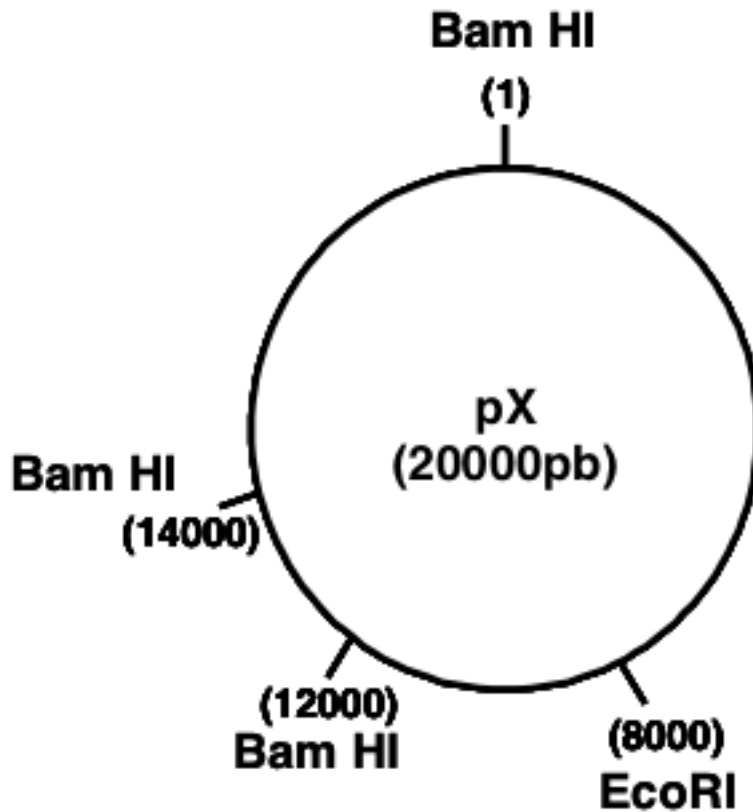
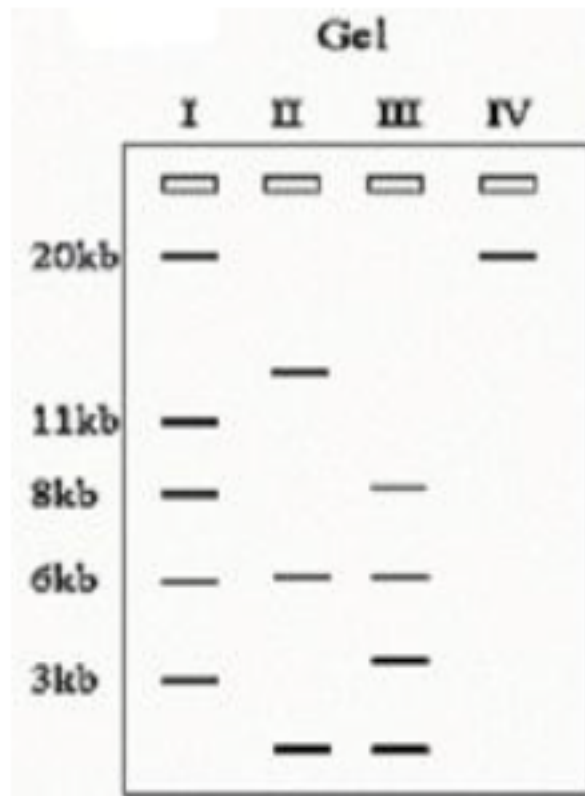


Figura 3. Resultado de una electroforesis en gel de agarosa de los productos de las digestiones del plásmido anterior con las enzimas de restricción.



## CUESTIONARIO

1. ¿Qué son las enzimas de restricción? ¿y secuencias palindrómicas?
2. ¿A qué hace referencia los acrónimos de las enzimas de restricción? ¿qué secuencias corta?. Presente los datos en una tabla.
3. Atendiendo a la figura 1 ¿qué significa que existan más sitios de corte que enzimas de restricción?

## CRITERIOS EVALUACIÓN

1 pto. , cada pregunta del cuestionario.

3 ptos. Ejercicio Fig 1 y tabla 1.

3 ptos. Figs. 2 y 3.

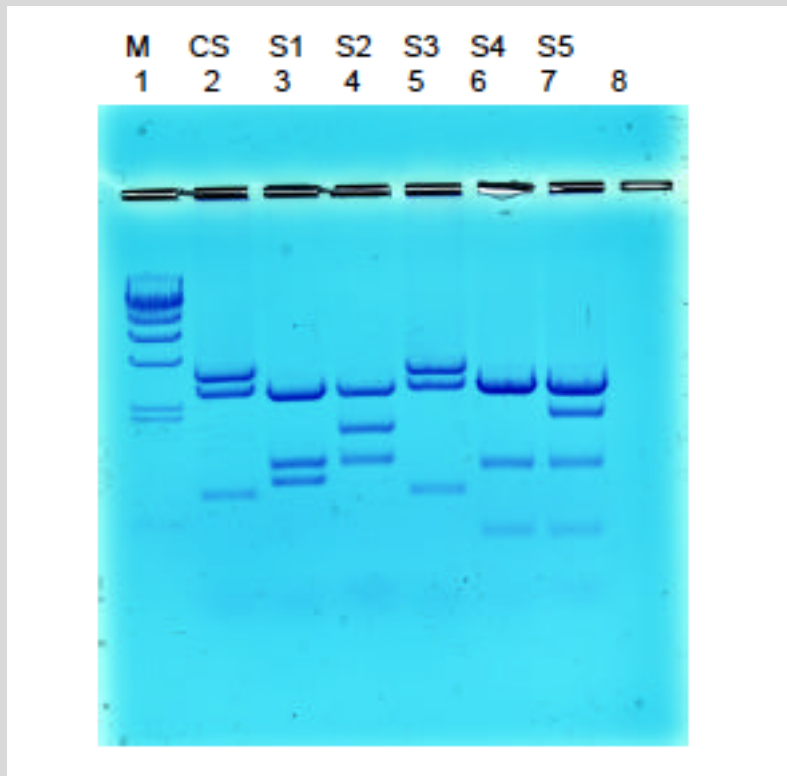
## ANEXO

El gel mostrado en la figura 4 corresponde a una muestra de DNA cortada con enzimas de restricción.

El DNA de la escena del crimen se ha marcado como CS, el del sospechoso 1 como S1, y así sucesivamente.

El DNA recogido en la escena del crimen se carga en el pocillo 2, y el ADN de cada sospechoso se carga en los pocillos 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente. El pocillo 1 contiene los marcadores (de tamaño conocido)

obtenidos de la digestión de un ADN por la enzima HindIII.



Se observa fácilmente que el DNA procedente de la escena del crimen y el del sospechoso 3 (S3) son idénticos. La realidad es que esta prueba sitúa al sospechoso en la escena del crimen, pero puede que se necesiten más pruebas para probar que es el o la culpable 5, 6.