

## Segunda sesión de clase

### Fragmentos de restricción del fago lambda

Endonucleasas de restricción también llamadas enzimas de restricción, son proteínas bacterianas que cortan en fragmentos la larga molécula linear del DNA. Las enzimas de restricción son las principales herramientas de la tecnología del DNA recombinante. Una enzima de restricción reconoce una secuencia específica de nucleótidos, como AGCT, cortando el DNA en los lugares en donde esta combinación de "letras" ocurra. Estas enzimas son aisladas de bacterias y designadas con una secuencia de tres o cuatro letras seguidas por un número romano. Por ejemplo, EcoRI es una enzima de restricción aislada de la *Escherichia coli*.

Parece peculiar que una enzima como EcoRI pueda existir. ¿Por qué una bacteria produciría una enzima que fragmenta el DNA en una secuencia específica de nucleótidos? La función de estas enzimas, descubiertas en los años 60 y 70, es la de destruir bacteriófagos o virus que invadan la bacteria. Una vez cortados, los virus se vuelven inofensivos. Las bacterias se protegen de sus propias enzimas de restricción a través de la modificación química de su DNA después de la síntesis. Esta modificación consiste en la adición de un radical metilo en nucleótidos específicos a lo largo de la cadena del DNA. Ese proceso es llamado de metilación. Muchos de los nucleótidos en el genoma de la bacteria son químicamente metilados. Una vez metilados, están protegidos de ser digeridos por la enzima de restricción. Siendo así las enzimas de restricción son capaces de distinguir el DNA exógeno (del virus) de su propio DNA.

Este sistema, por el cual las endonucleasas de restricción distinguen al DNA exógeno de su propio DNA, puede ser considerado un sistema inmune primitivo de la bacteria. Cómo la enzima evoluciona hasta obtener este grado de especificidad en destruir el DNA viral en cuanto preserva el DNA bacteriano es desconocido. Organismos más evolucionados no presentan tal sistema. Vamos a usar el genoma humano como ejemplo. En los 6 billones de pares de bases del DNA humano (comparado con 1 millón en las bacterias) es imposible encontrar una combinación específica de nucleótidos que ocurra específicamente en los virus pero que también no sea frecuente en el genoma humano.

La EcoRI, por ejemplo, corta el DNA humano en 10.000 fragmentos que varían, típicamente, de 1.000 a 20.000 pares de bases. Para que la EcoRI funcione como un agente antiviral en humanos todos esos miles de sitios de restricción deberían ser metilados. ¡La cantidad de energía que sería necesaria para realizar este proceso sería inmensa! La digestión de DNA por enzimas de restricción es un proceso simple. Basta colocar el DNA en contacto con la enzima a una temperatura ideal (generalmente 37 °C) y la enzima inicia el proceso de digestión inmediatamente, cortando el DNA en diversos pedacitos. El número de pedacitos producido es establecido por el número de sitios de restricción reconocido por la enzima utilizada. La enzima EcoRI, por ejemplo, corta el DNA cada vez que encuentra la secuencia G/AATTC mientras que la enzima HINDIII corta en la secuencia A/AGCTT.

Los fragmentos generados a través de la digestión por enzimas de restricción pueden ser analizados a través de la técnica de electroforesis de agarosa. Electroforesis es la técnica por la cual los fragmentos de DNA de diferentes tamaños son separados. El DNA es cargado en un pozo de gel (que tiene aspecto de gelatina) y este es sometido a un campo eléctrico. El DNA se moverá en la dirección del polo positivo ya que la molécula de DNA es negativa debido a la presencia de agrupamientos de fosfato.

Durante la carrera electroforética los fragmentos de menor tamaño corren más rápidamente que los fragmentos mayores y de este modo la posición relativa de los fragmentos en el gel depende de los tamaños de los mismos. La carrera electroforética dura horas o apenas de 20 a 30 minutos. Después de la carrera electroforética, el gel debe ser tratado con un colorante específico que intercala con las moléculas del DNA permitiendo la visualización del mismo cuando es expuesto a luz ultravioleta.

Las enzimas de restricción constituyen una importante herramienta para el biólogo molecular. Las enzimas de restricción constituyen la principal herramienta de la tecnología del DNA recombinante. Gracias a ellas podemos cortar un gen específico que nos interese y colocarlo dentro de otro organismo. O sea, podemos recombinar, lo que también puede ser dicho de otra forma, ¡podemos crear organismos transgénicos!

Imagine, por ejemplo, una proteína tan necesaria como la insulina. La insulina permite que el azúcar penetre en las células pudiendo entonces ser utilizado como fuente de energía. Las personas que presentan deficiencia de insulina poseen Diabetes y precisan introducir a través de inyecciones diarias la insulina necesaria para que su organismo pueda desarrollar las funciones normales. Ahora imagine si cortáramos el gen de la insulina con enzimas de restricción de modo que pudiéramos separar este gen del resto. La próxima etapa sería clonarlo en otro organismo de modo que ese organismo pueda producir la tan necesaria insulina. Imagine entonces que este gen sea clonado en una bacteria, a una escala industrial. Esta estirpe de bacteria irá a producir insulina y a través de la purificación de las proteínas producidas por esta estirpe de bacteria se puede aislar la insulina. Esta insulina fue producida en un organismo transgénico (cualquier organismo, animal o vegetal, que tenga un gen de otro organismo transferido para su genoma, formando, de este modo parte de su material genético) y podrá ser utilizado por el ser humano. Este es también el principio de los animales transgénicos, animales que han tenido un gen introducido en sus células embrionarias, o un vegetal, conocidos como vegetales mejorados, o simplemente alimentos transgénicos.

### **Actividad 1**

Vamos a observar el DNA del fago lambda en una electroforesis de gel de agarosa.

Haga un gel de agarosa 0.8% y aplique las muestras de DNA del fago lambda digeridas con las enzimas HIND III y EcoRI y también con las dos enzimas simultáneamente. Deje el gel correr durante aproximadamente 30 minutos a 100volts. Coloree el gel y vea el DNA bajo la luz blanca. Mientras el gel corre, rellene el gráfico con los respectivos tamaños de cada uno de los fragmentos de DNA que usted espera observar en el gel.

### **Preguntas**

- 1)¿Por qué los fragmentos generados por cada una de las enzimas, separadamente, presentan tamaños diferentes?
- 2)¿Por qué, el DNA digerido con dos enzimas al mismo tiempo posee un número mayor de fragmentos ?
- 3)Observe el mapa genético del DNA del lambda. ¿Usted consigue establecer el tamaño de los fragmentos producidos por las enzimas?

Ahora que usted ya ha comprendido como las enzimas de restricción funcionan, vamos a analizar una secuencia de DNA de dos alelos diferentes. La diferencia entre estos dos alelos está apuntada en la secuencia de DNA. Mapa de restricción es el nombre que se da a un fragmento de DNA en donde todos los sitios de restricción para todas las enzimas descritas hasta hoy fueron establecidos. Usted notará que debido al intercambio de un nucleótido en la secuencia de DNA hay una creación o destrucción de un sitio de restricción para una determinada enzima. La digestión por enzimas de restricción es una técnica muy utilizada para identificar alteraciones en la secuencia del DNA y esta técnica debe ser utilizada cuando no se desee o no haya recursos para la realización de la secuenciación de DNA.

### **Actividad 2**

- Observe la secuencia del DNA de cada uno de los alelos. Encuentre la alteración de apenas un nucleótido en cada una de las secuencias.
- Analice el mapa de restricción de esta secuencia de DNA.

### **Pregunta**

Vamos a suponer que ahora esta alteración en el DNA sea responsable por una enfermedad genética que llamaremos de enfermedad Z. Si usted fuese a realizar un estudio en una familia que sea portadora de esta enfermedad, ¿qué enzima de restricción usted escogería para hacer el diagnóstico molecular en esta familia? ¿Como analizaría los resultados en un gel de agarosa?

<http://www.eldnavaalaescuela.com/>

Copyright © 2002 DNA goes to School™! Todos los derechos reservados.