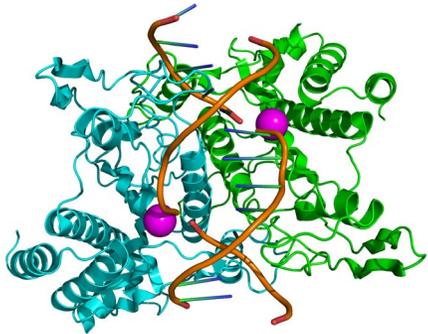
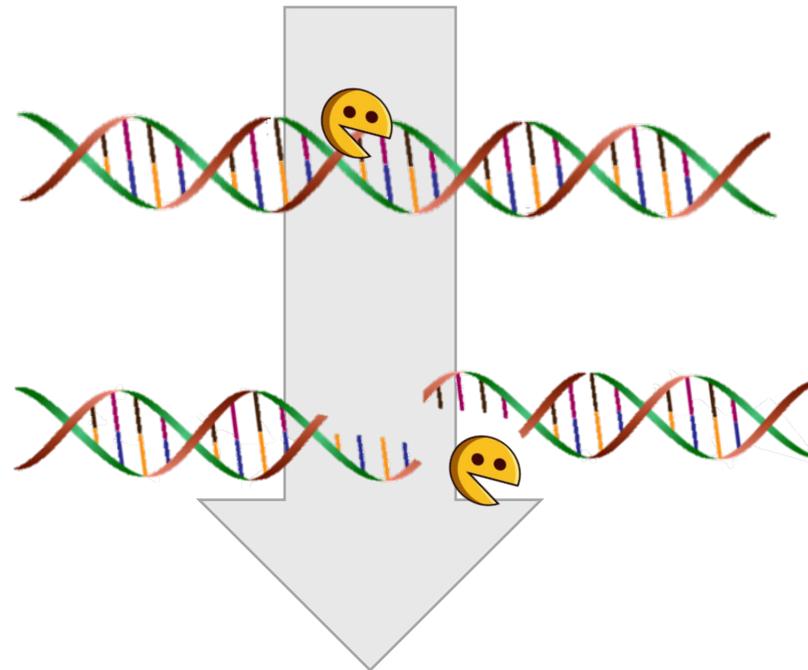




# Enzimas de Restricción en Biotecnología



Fuente: <https://www.freepng.es/png-kdm4or/>



# ¿Qué es la Biotecnología?

Uso de microorganismos vivos o sus derivados para generar productos de interés para el ser humano

Manipulación genética

Ingeniería genética

ADN

ADN recombinante

Cultivo celular

Transgénico

Clonación

Mutación

Genoma

# ¿Qué es la Biotecnología?

- **Biotecnología clásica**



*Selección artificial*



Fuentes:

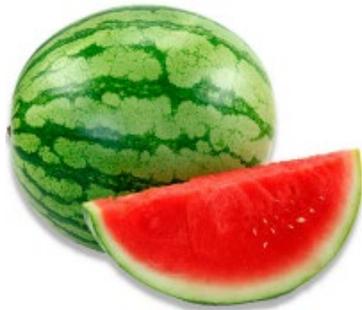
<https://cienciasofa.com/2014/03/el-oscurο-pasado-de-los-platanos.html> / <https://www.youtube.com/watch?v=CTUxWcnUPDk> / [https://web.extension.illinois.edu/veggies\\_sp/eggplant.cfm](https://web.extension.illinois.edu/veggies_sp/eggplant.cfm) / [https://elpais.com/elpais/2016/11/17/ciencia/1479379389\\_999864.html](https://elpais.com/elpais/2016/11/17/ciencia/1479379389_999864.html) / <https://www.farmersalmanac.com/what-queen-annes-lace>

# ¿Qué es la Biotecnología?

- **Biotecnología clásica**



*Selección artificial*



Fuentes:

<https://cienciadesofa.com/2014/03/el-oscurito-pasado-de-los-platanos.html> / <https://www.youtube.com/watch?v=CTUxWcnUPDk> / [https://web.extension.illinois.edu/veggies\\_sp/eggplant.cfm](https://web.extension.illinois.edu/veggies_sp/eggplant.cfm) / [https://elpais.com/elpais/2016/11/17/ciencia/1479379389\\_999864.html](https://elpais.com/elpais/2016/11/17/ciencia/1479379389_999864.html) / <https://www.farmersalmanac.com/what-queen-annes-lace> / <https://www.elcorreo.com/jantour/dice-platano-engorda-20210205174452-nt.html> / <https://5aldia.cl/frutas-y-vegetales/sandia/> / <https://www.gastronomiavasca.net/es/gastro/glossary/berenjena> / <https://fruteriadevalencia.com/producto/mazorca-de-maiz/> / <https://pimpamfruit.com/verduras/172-aanahorias-hoja.html>

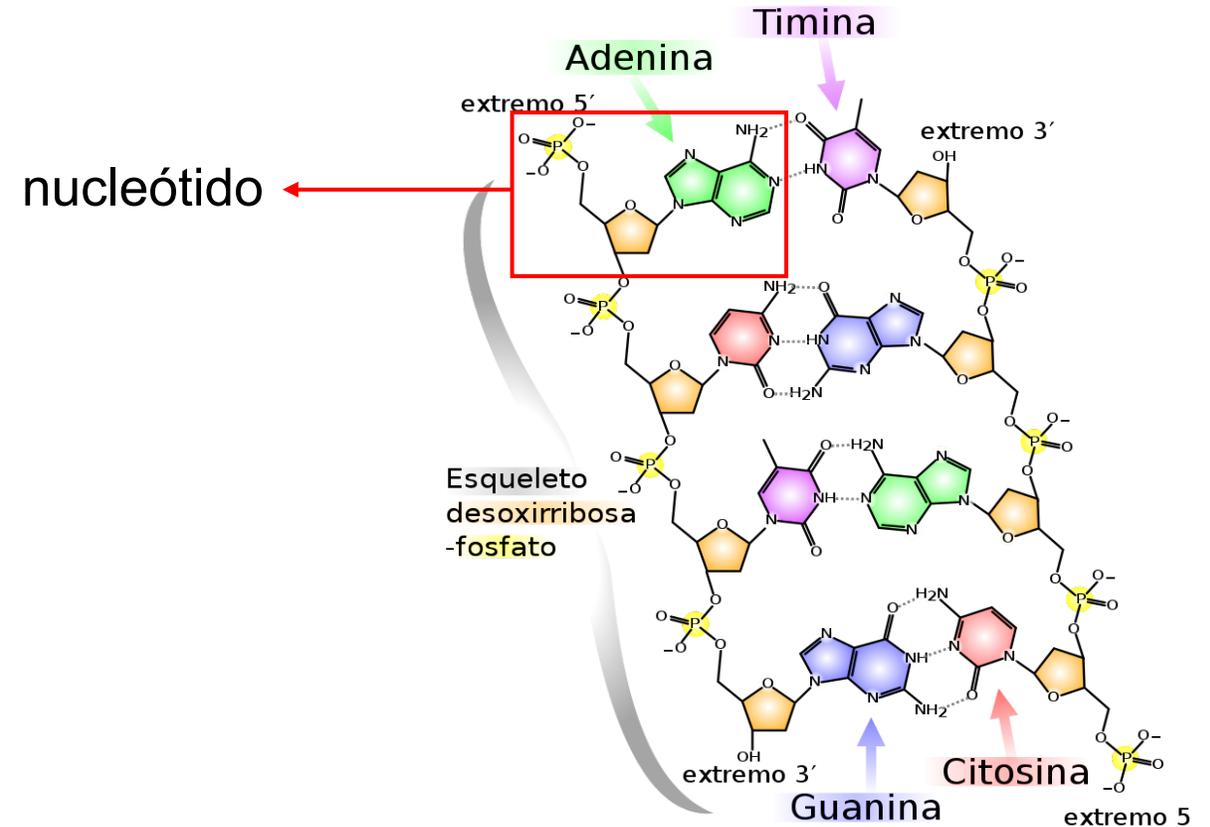
# ¿Qué es la Biotecnología?

- Biotecnología moderna

**ADN**  
(material hereditario)



Fuente: <https://www.freepng.es/png-9wmdlx/>



Fuente: [https://es.wikipedia.org/wiki/Contenido\\_GC](https://es.wikipedia.org/wiki/Contenido_GC)

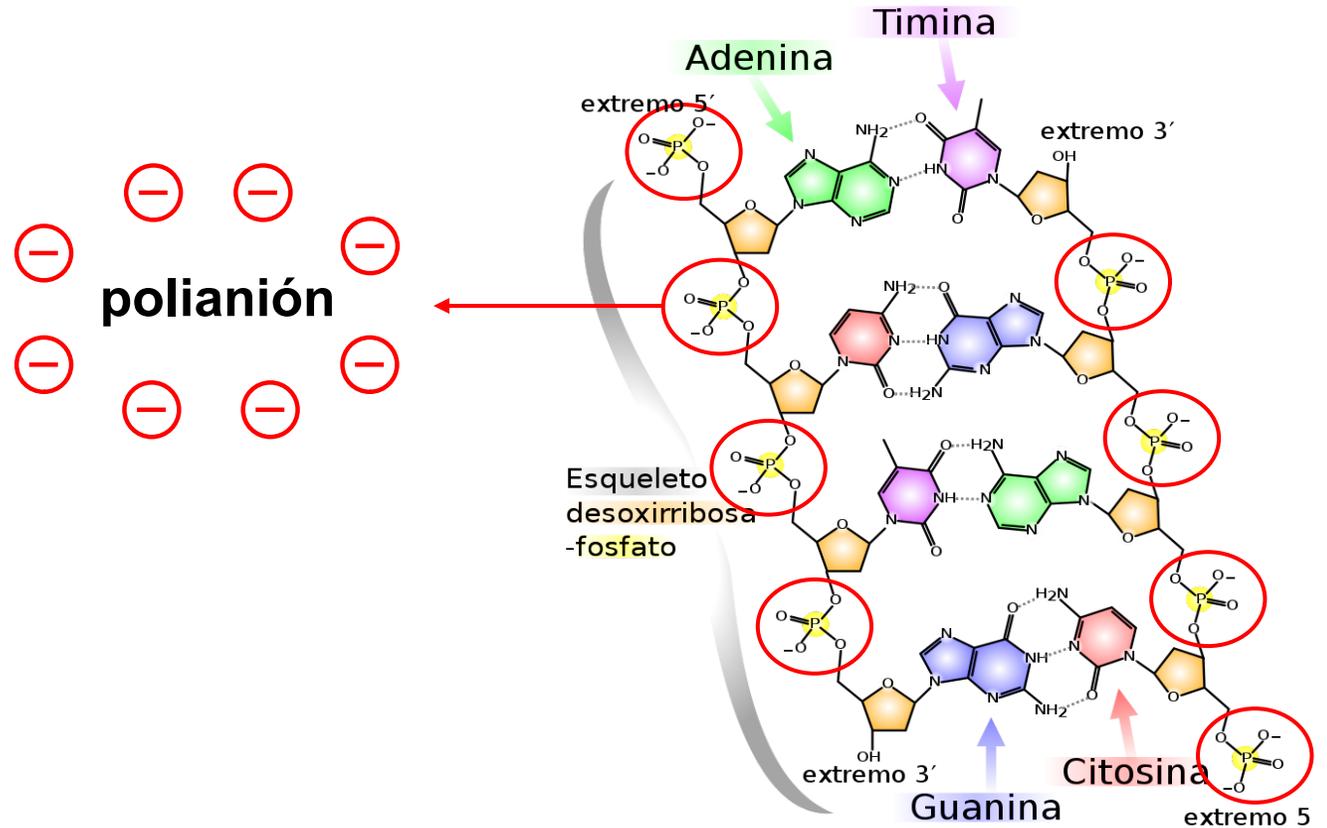
# ¿Qué es la Biotecnología?

- Biotecnología moderna

**ADN**  
(material hereditario)



Fuente: <https://www.freepng.es/png-9wmdlx/>



Fuente: [https://es.wikipedia.org/wiki/Contenido\\_GC](https://es.wikipedia.org/wiki/Contenido_GC)

# ¿Qué es la Biotecnología?

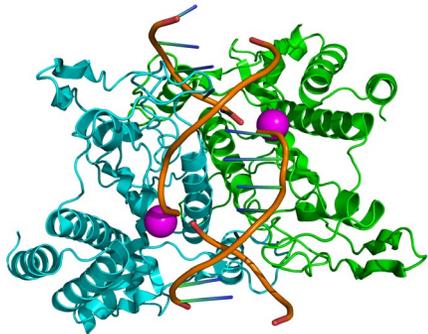
- **Biotecnología moderna**

**ADN**  
(material hereditario)



Fuente: <https://www.freepng.es/png-9wmdlx/>

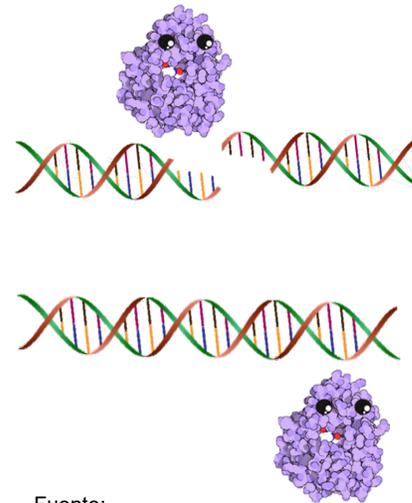
**Enzimas de restricción**



Fuente: <https://www.freepng.es/png-kdm4or/>

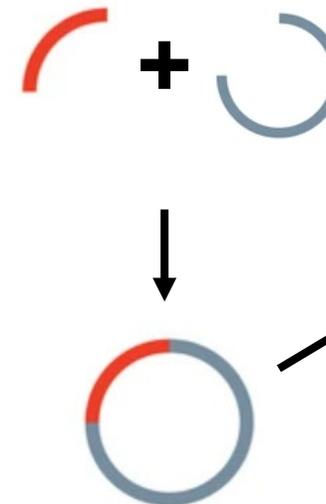


**ADN ligasa**

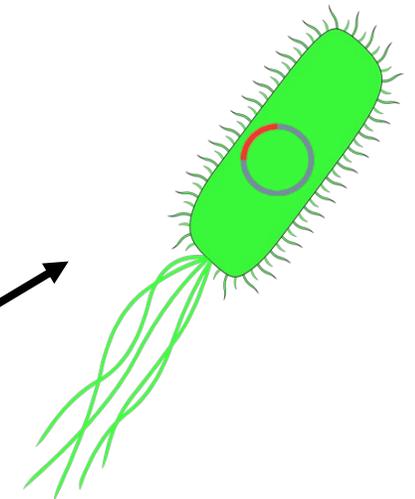


Fuente: <https://premiosibt.wordpress.com/2011/09/13/nominaciones/la-ligasa/>

**ADN recombinante**



**Clonaje ADN**

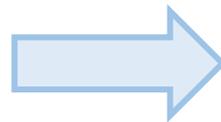
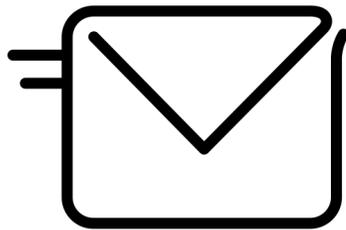


Fuente: <https://www.freepng.es/png-eec5id/>

# Actividad: Enzimas de Restricción en Biotecnología

Acabas de empezar a trabajar en una empresa biotecnológica que ofrece servicios analíticos a la carta. Uno de los puntos fuertes de tu empresa es la rapidez, grado de detalle y calidad de los informes que elaboráis con relación a las peticiones que recibís por parte de los clientes.

Nada más llegar a tu puesto de trabajo, enciendes el ordenador y tienes un email en la bandeja de entrada que dice lo siguiente:



# Actividad: Enzimas de Restricción en Biotecnología



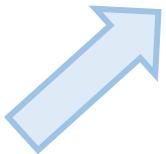
*Buenos días,*

*Soy Ramón Salcedo, investigador en el Centro de Biología Molecular de Valencia, un centro de investigación de reciente creación. La semana pasada trasladamos los aparatos de nuestro antiguo laboratorio a este nuevo centro. Durante el traslado se estropeó nuestra fuente de corriente para realizar electroforesis, lo que nos impide poder analizar el resultado de unas muestras que nos urge tener cuanto antes.*

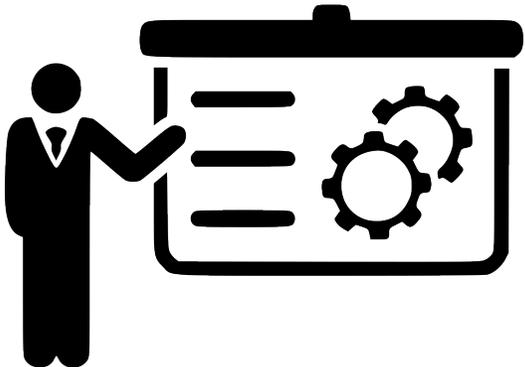
*Le pongo en contexto. En nuestro laboratorio hemos logrado aislar y purificar dos enzimas de restricción, a las que hemos llamado EcoRI y PstI. Actualmente estamos comprobando su funcionalidad tras el proceso de purificación para verificar si realmente mantienen su actividad. Hemos digerido con estas enzimas el ADN del fago lambda y el plásmido comercial pBR322, pero sin poder realizar electroforesis no podemos comprobar el resultado. Además, también hemos hecho la digestión del ADN del fago lambda con el enzima de restricción HindIII para utilizarla como estándar. Esta mañana a primera hora os he enviado las muestras, por lo que deberían de llegaros a lo largo de la mañana de hoy. Agradecería si me pudieseis enviar los resultados de la electroforesis cuanto antes. Muchas gracias.*

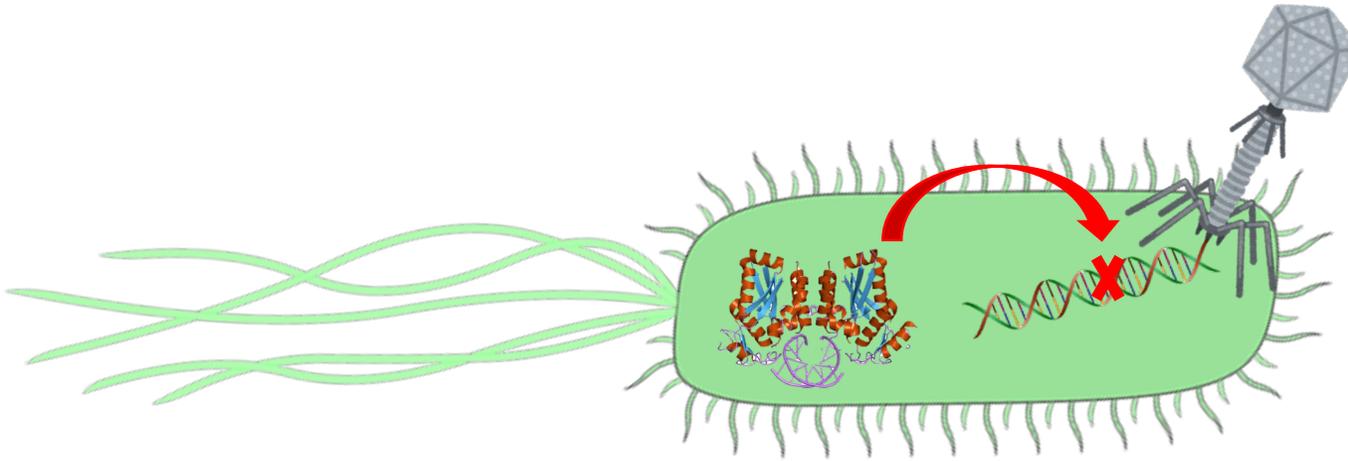
*Saludos,*

*Ramón.*



# Actividad: Enzimas de Restricción en Biotecnología

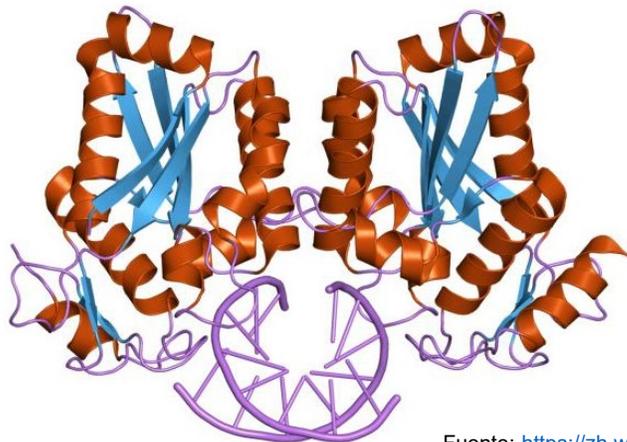




Fuentes: editado de <https://www.freepng.es/png-eec5id/> / <https://www.freepng.es/png-poxcys/>

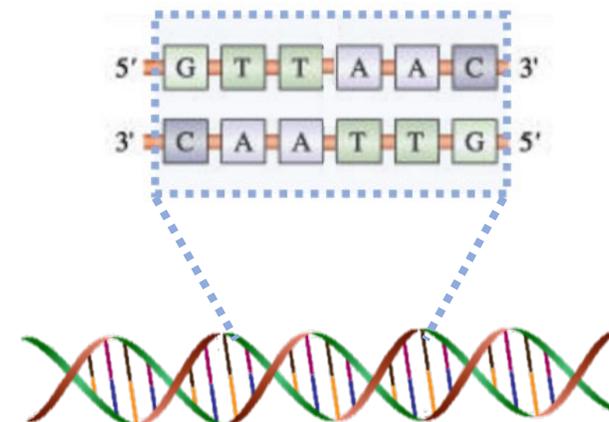
## Endonucleasas

Rompen enlaces fosfodiéster



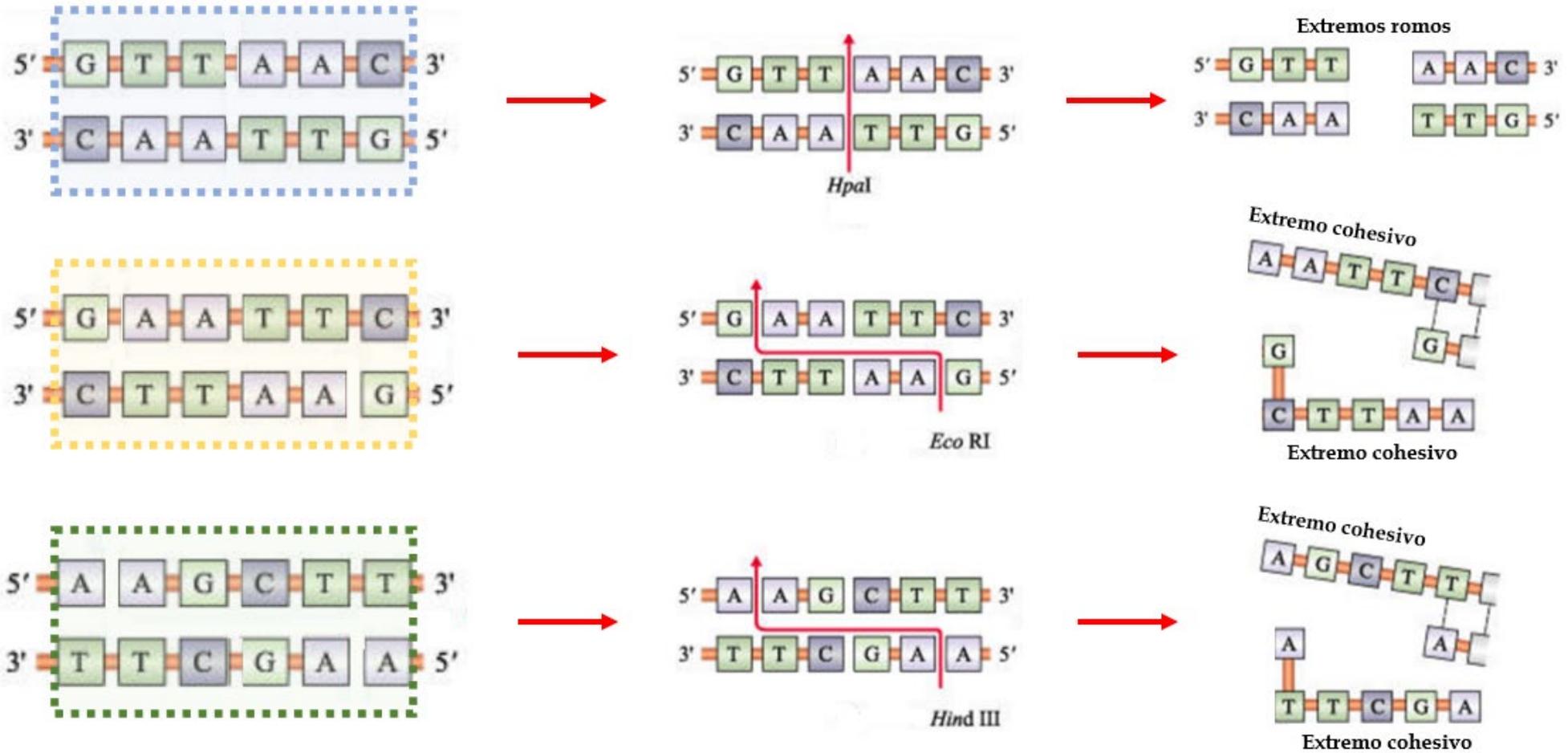
Fuente: [https://zh.wikipedia.org/wiki/File:PDB\\_1esg\\_EBI.jpg](https://zh.wikipedia.org/wiki/File:PDB_1esg_EBI.jpg)

## Sitio de restricción



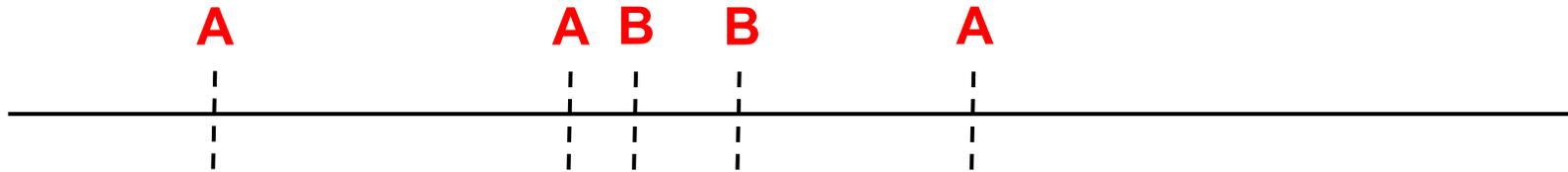
Fuente: editado de <http://www.vi.ci/gepe/Seccion%203/3%20-%20Capitulo%2016.htm>

# Enzimas de Restricción



# Enzimas de Restricción: Cuestión 1

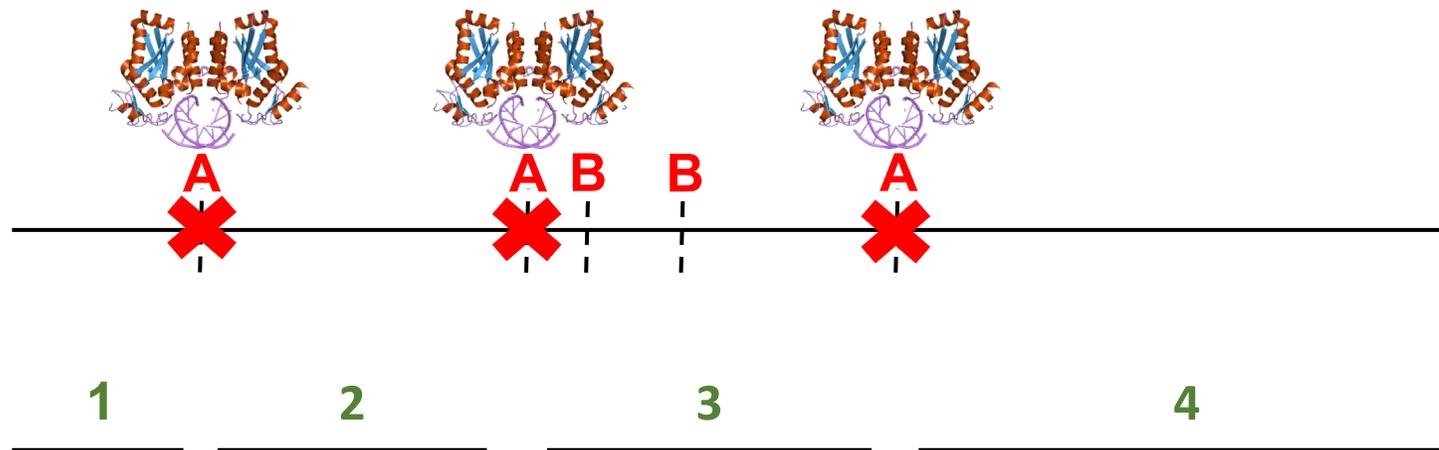
Se pretende digerir una molécula de ADN con dos enzimas de restricción: EcoRI, que reconoce el sitio de restricción A; y PstI, que reconoce el sitio de restricción B. Responde a la siguientes preguntas teniendo en cuenta el diagrama:



- ¿Cuántos fragmentos resultarán de la digestión del ADN con EcoRI?
- ¿Cuántos fragmentos resultarán de la digestión con PstI?
- ¿Cuántos fragmentos obtendremos al digerir con ambas enzimas de restricción?  
Numera los fragmentos resultantes y ordénalos de mayor a menor.

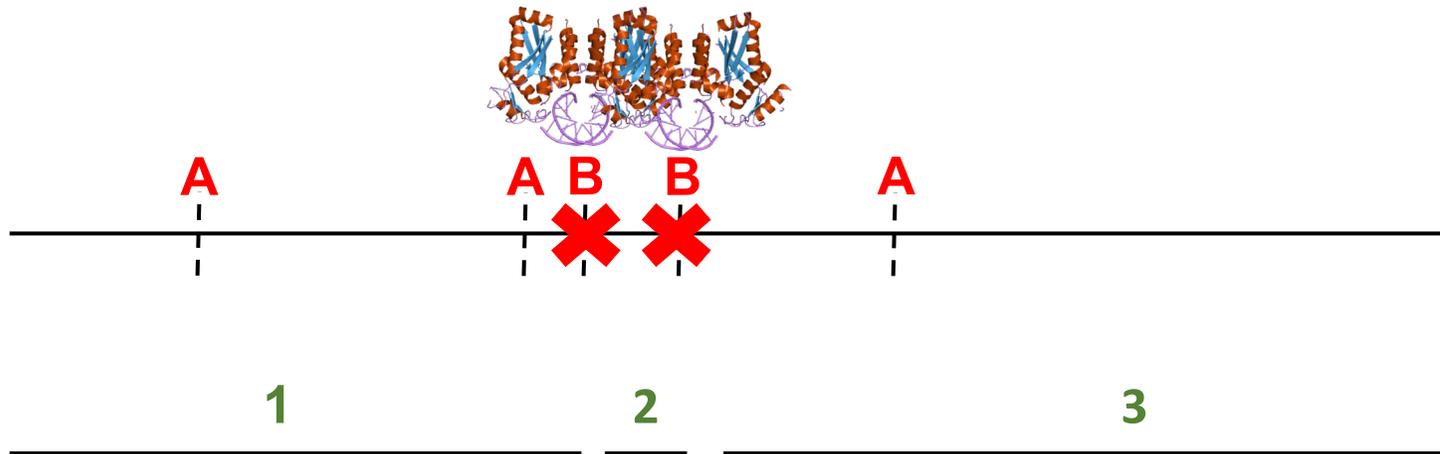
# Enzimas de Restricción: Cuestión 1

a) ¿Cuántos fragmentos resultarán de la digestión del ADN con EcoRI?



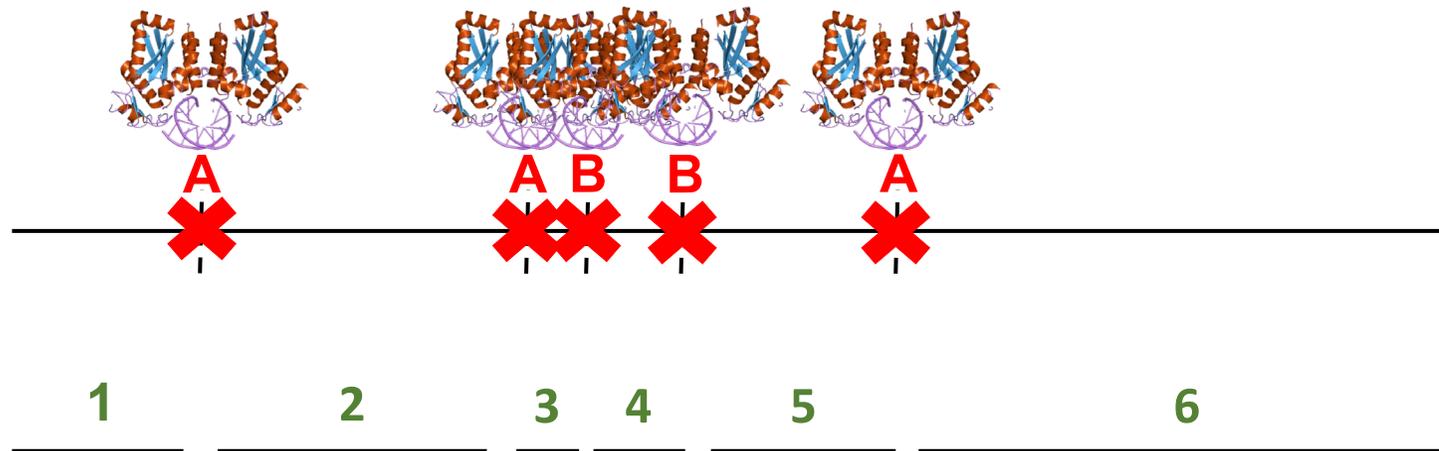
# Enzimas de Restricción: Cuestión 1

b) ¿Cuántos fragmentos resultarán de la digestión con PstI?



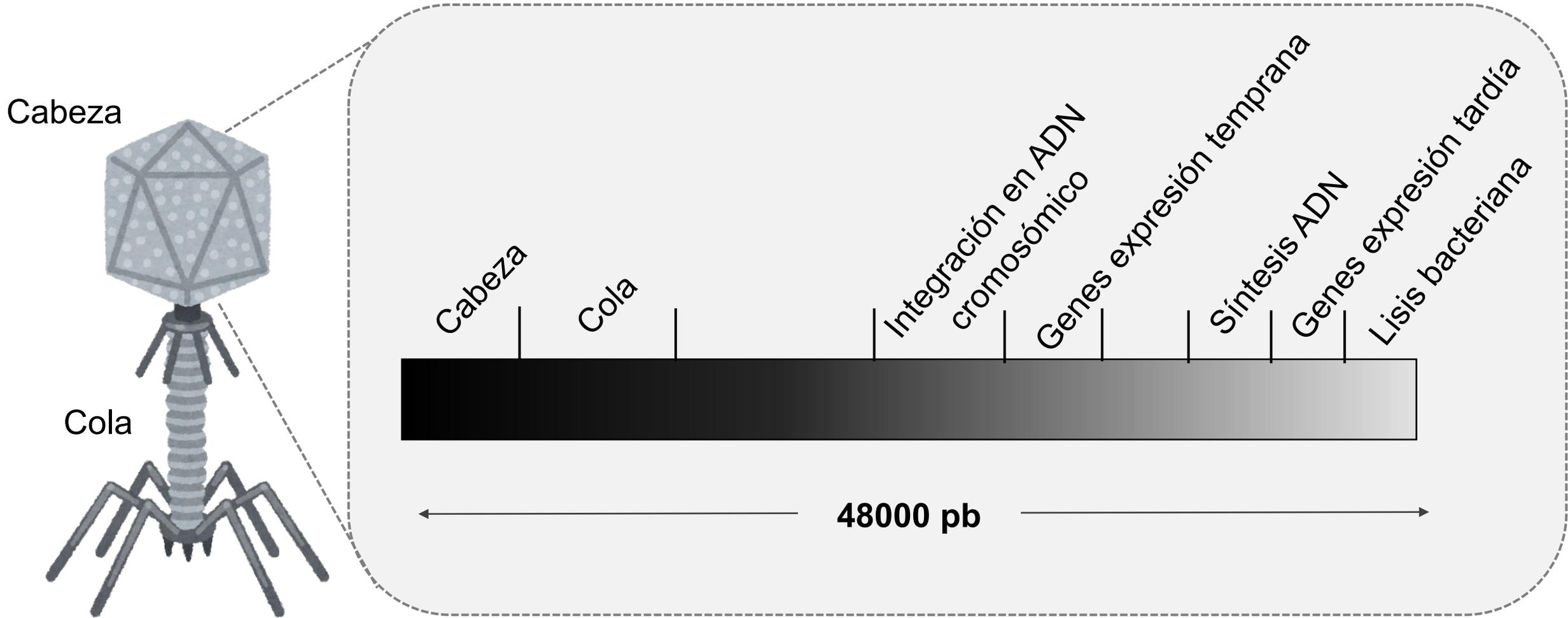
# Enzimas de Restricción: Cuestión 1

- c) ¿Cuántos fragmentos obtendremos al digerir con ambas enzimas de restricción?  
Numera los fragmentos resultantes y ordénalos de mayor a menor.

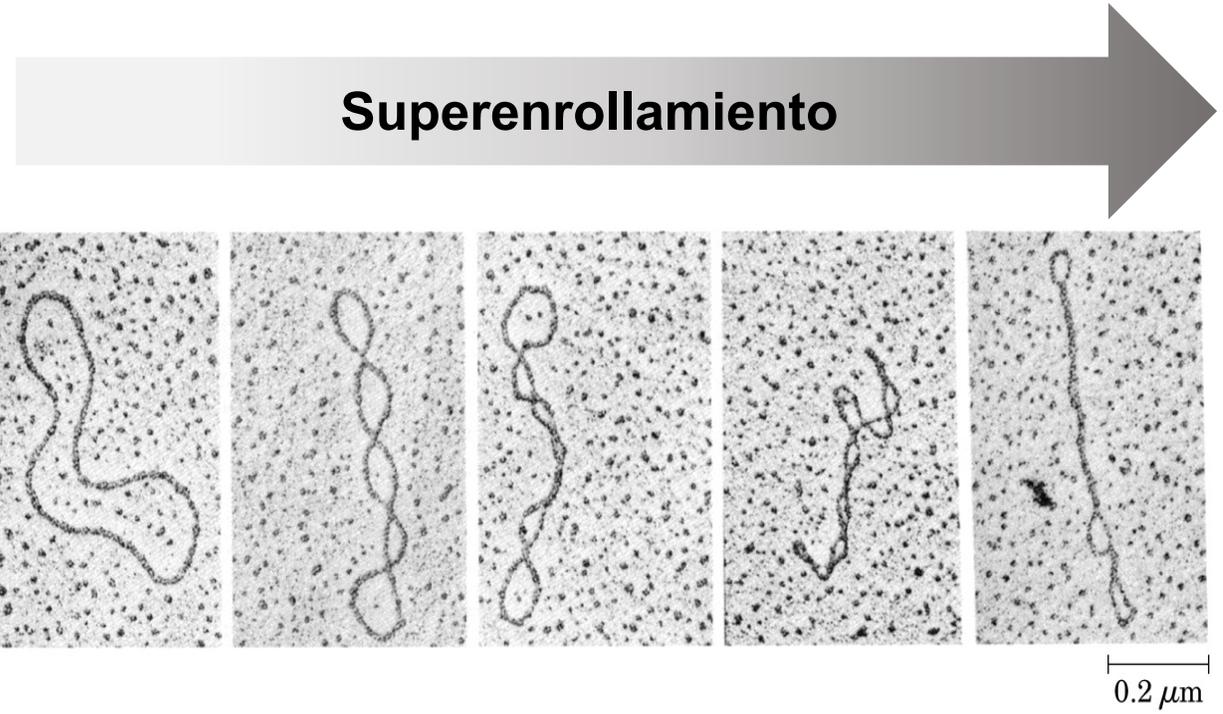
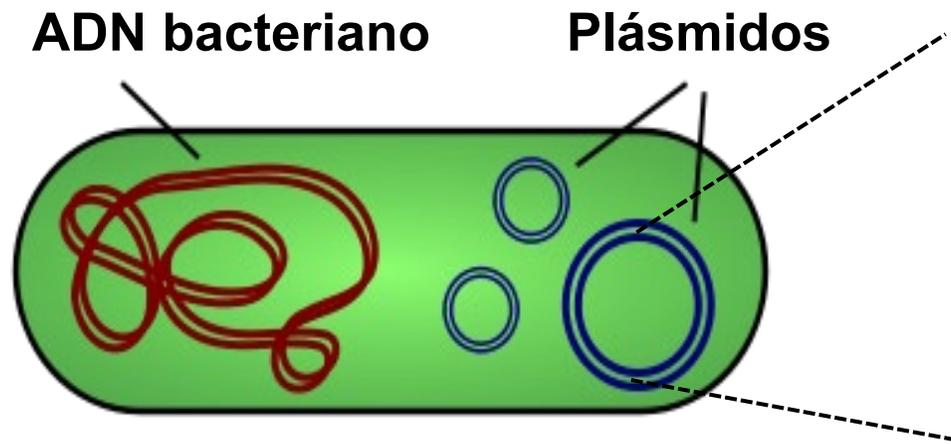


6 > 2 > 5 > 1 > 4 > 3

# DNA del Bacteriófago Lambda

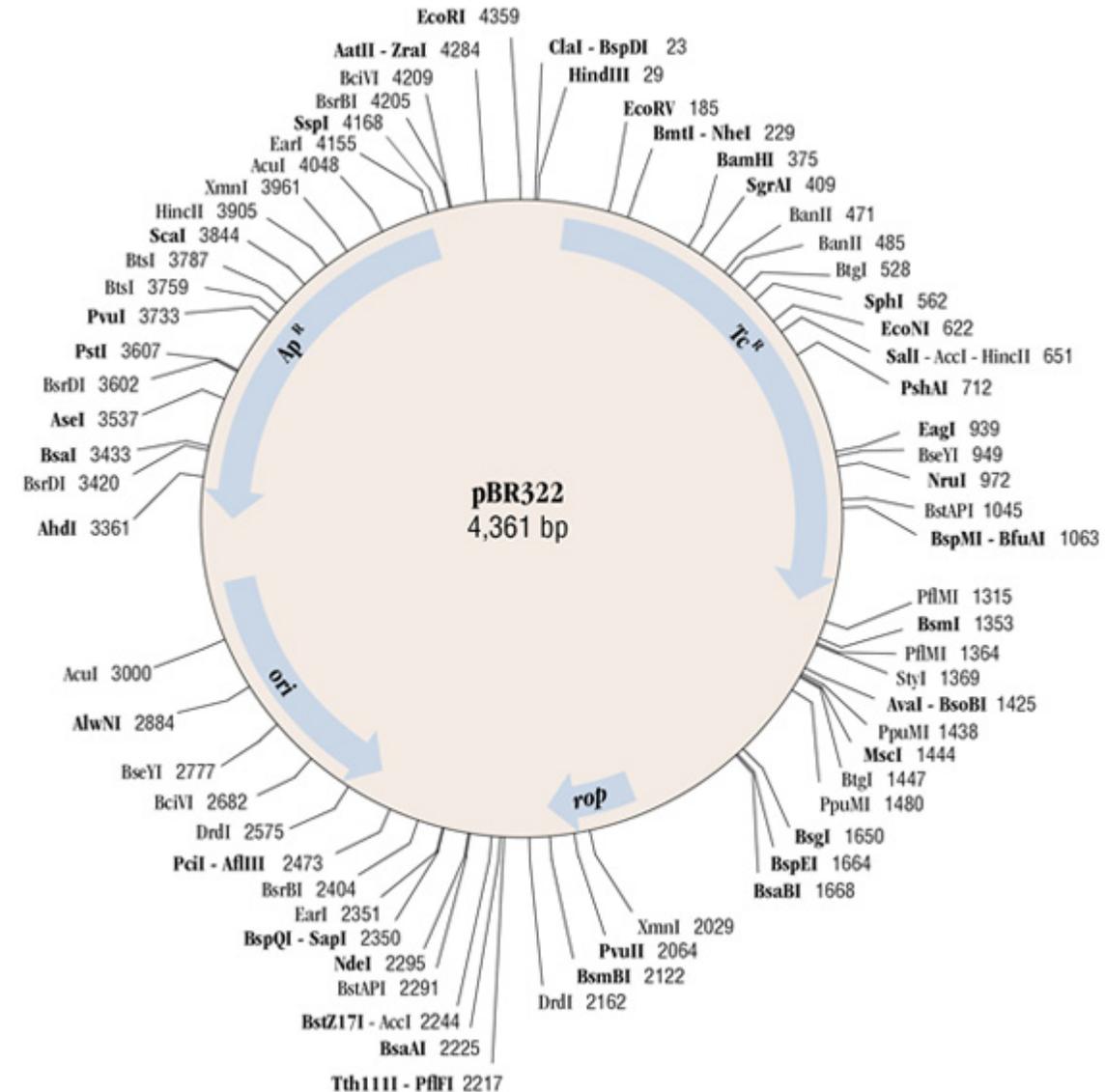


# DNA plasmídico



El plásmido **pBR322** es un plásmido para clonación en *E. coli*. Contiene los siguientes genes:

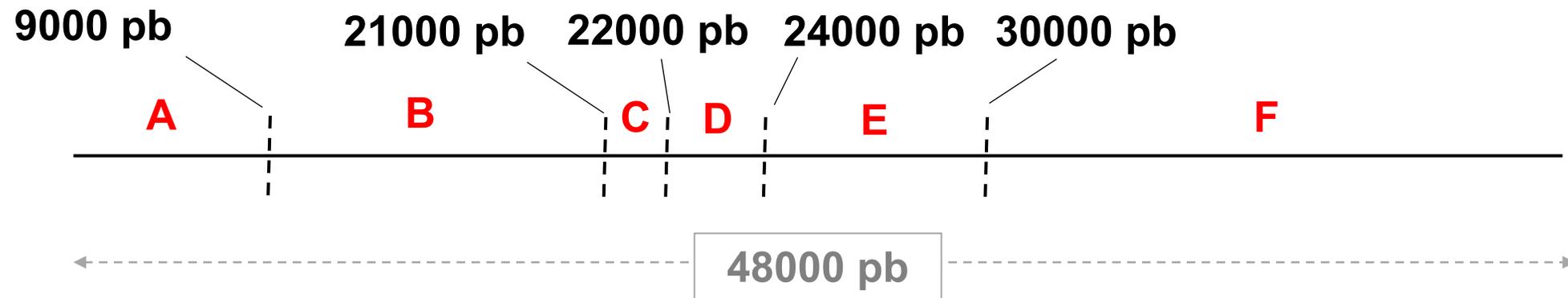
- **ori**: origen de replicación del plásmido natural de *E. coli*
- **rop**: gen que codifica una proteína que regula la replicación del plásmido y mantiene su número de copias en unas 20 por célula
- **Ap<sup>R</sup>**: gen de resistencia a la ampicilina
- **Tc<sup>R</sup>**: gen de resistencia a la tetraciclina



# DNA del Bacteriófago Lambda: Cuestión 2

Se pretende digerir el ADN del bacteriófago lambda (48000 pares de bases) con un enzima de restricción. En el siguiente diagrama se indica la posición de los sitios de restricción de dicho enzima.

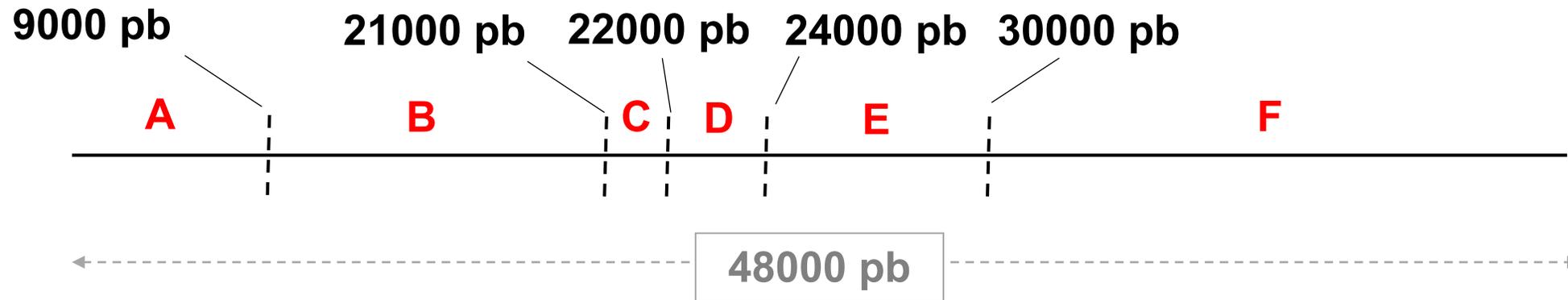
¡Ojo! Se indica la posición donde corta el enzima, pero no el tamaño de los fragmentos.  
¡Debéis averiguar estos tamaños vosotros!



- Calcula el tamaño en pares de bases (pb) de cada uno de los fragmentos resultantes y ordénalos de mayor a menor.
- ¿Cuál será la conformación de estos fragmentos?

# DNA del Bacteriófago Lambda: Cuestión 2

- a) Calcula el tamaño en pares de bases (pb) de cada uno de los fragmentos resultantes y ordénalos de mayor a menor.



$$A = 9000 \text{ pb}$$

$$B = 21000 \text{ pb} - 9000 \text{ pb} = 12000 \text{ pb}$$

$$C = 22000 \text{ pb} - 21000 \text{ pb} = 1000 \text{ pb}$$

$$D = 24000 \text{ pb} - 22000 \text{ pb} = 2000 \text{ pb}$$

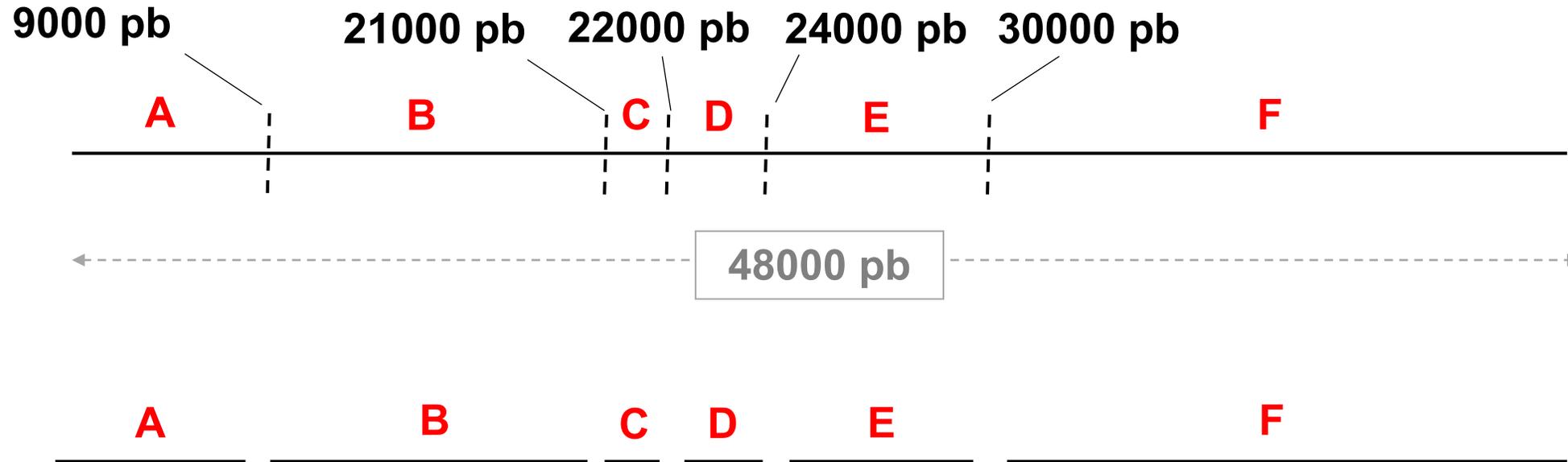
$$E = 30000 - 24000 = 6000 \text{ pb}$$

$$F = 48000 \text{ pb} - 30000 \text{ pb} = 18000 \text{ pb}$$

$$F > B > A > E > D > C$$

# DNA del Bacteriófago Lambda: Cuestión 2

b) ¿Cuál será la conformación de estos fragmentos?

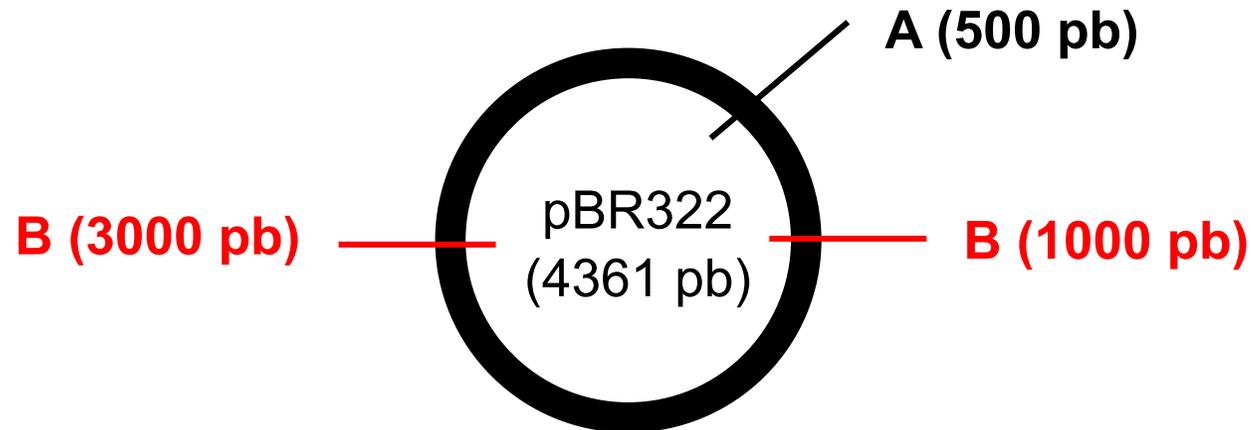


**LINEAL**

# DNA plasmídico: Cuestión 3

El enzima EcoRI corta el plásmido pBR322 (4361 pb) en el sitio de restricción A, mientras que el enzima HincII en el sitio de restricción B. Indica el tamaño de los fragmentos resultantes y su conformación en las siguientes situaciones:

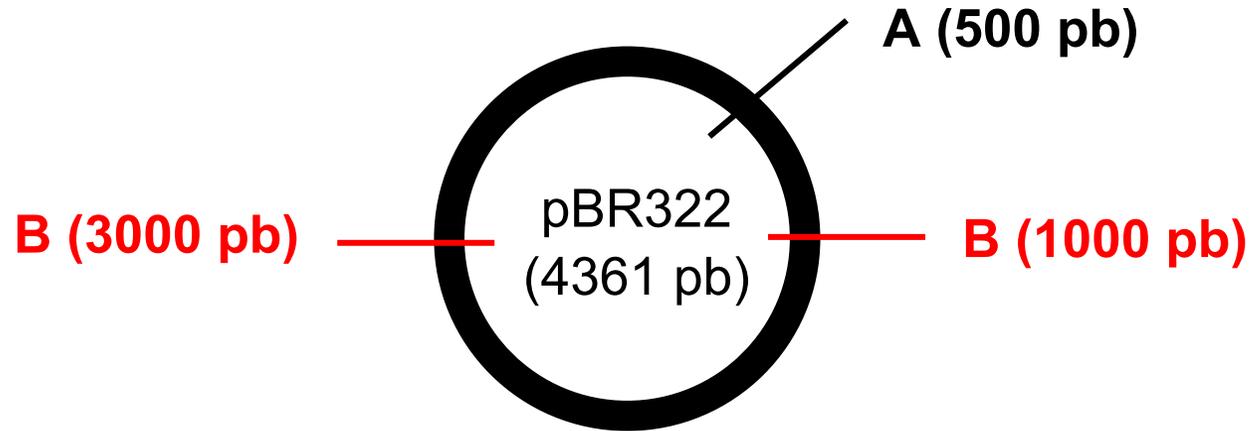
¡Ojo! Se indica la posición donde corta el enzima, pero no el tamaño de los fragmentos.  
¡Debéis averiguar estos tamaños vosotros!



- Digestión con PstI
- Digestión con EcoRI
- Digestión con EcoRI + HincII

# DNA plasmídico: Cuestión 3

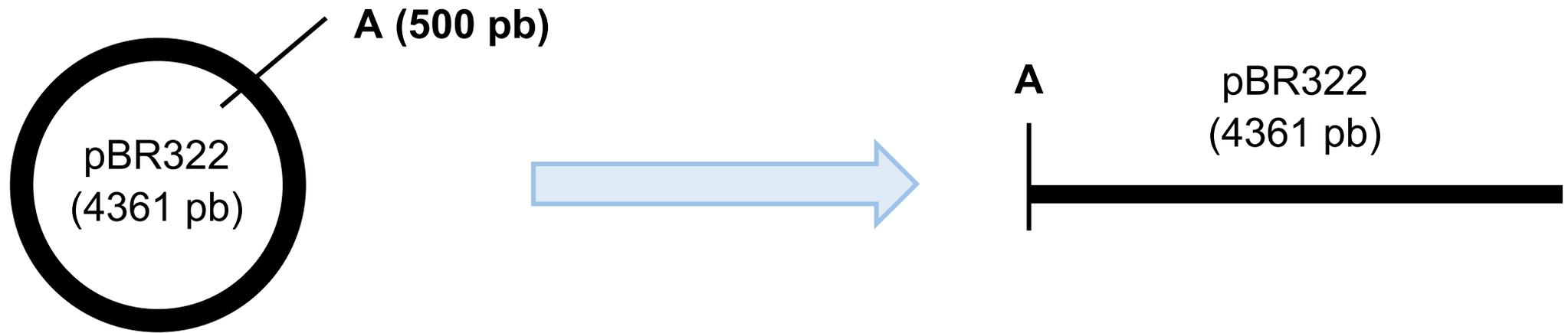
a) Digestión con PstI



PstI no tiene sitio de corte en la secuencia del plásmido. Por tanto, el plásmido quedará en condiciones nativas, lo que implica que puede estar en forma **circular relajada** o **circular superenrollada**.

# DNA plasmídico: Cuestión 3

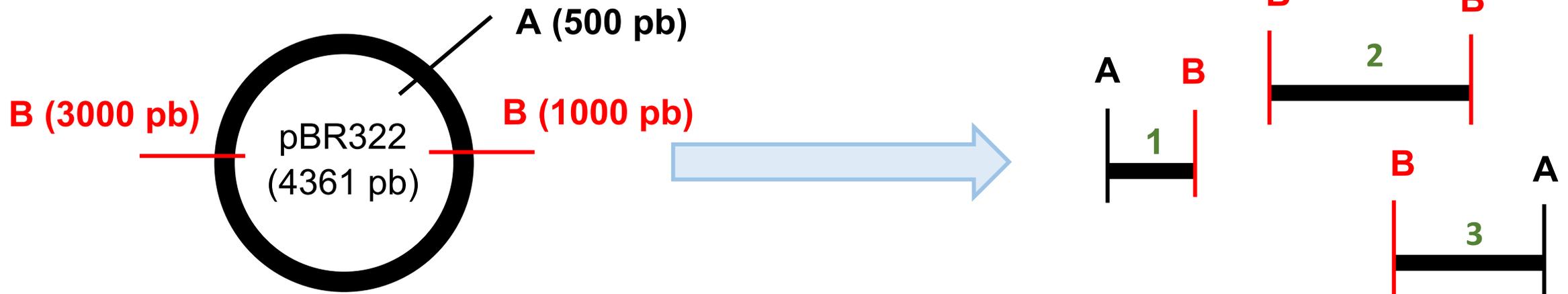
b) Digestión con EcoRI



EcoRI corta en el sitio A, que se encuentra una sola vez en la secuencia del plásmido. Al generar el corte, el plásmido dejará de ser circular resultando en una molécula de ADN lineal de **4361 pb**.

# DNA plasmídico: Cuestión 3

b) Digestión con EcoRI + HincII



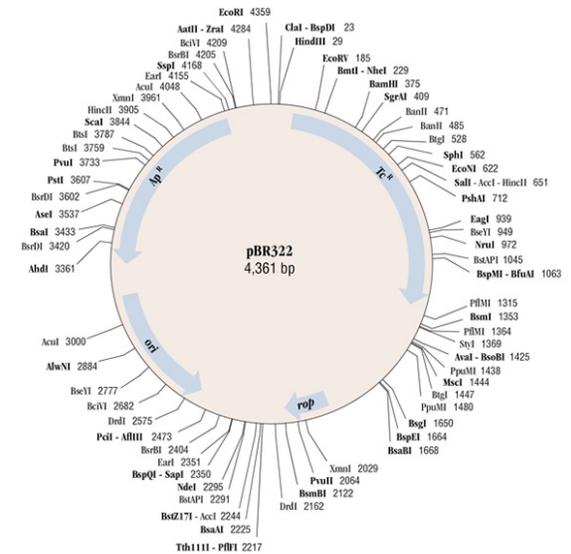
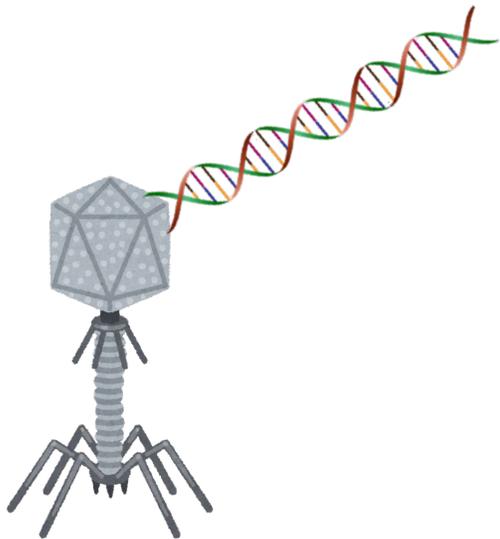
Al digerir con ambos enzimas de restricción se generarán tres fragmentos de ADN de conformación **lineal**. Un fragmento será de **500 pb**, otro de **2000 pb** y otro de **1861 pb**.

$$1 = 1000 \text{ pb} - 500 \text{ pb} = 500 \text{ pb}$$

$$2 = 3000 \text{ pb} - 1000 \text{ pb} = 2000 \text{ pb}$$

$$3 = 4361 \text{ pb} - 3000 \text{ pb} = 1861 \text{ pb}$$

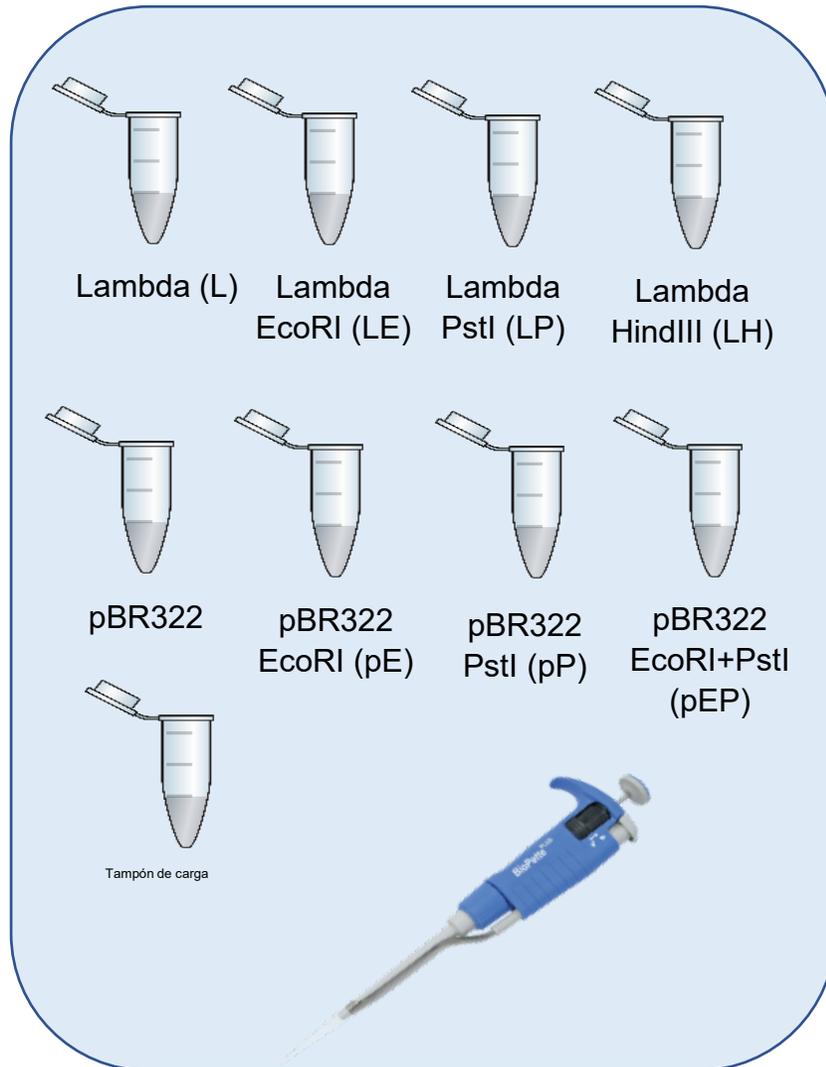
## Análisis electroforético de la digestión del ADN del fago Lambda y del plásmido pBR322 con los enzimas de restricción EcoRI, PstI, HindIII



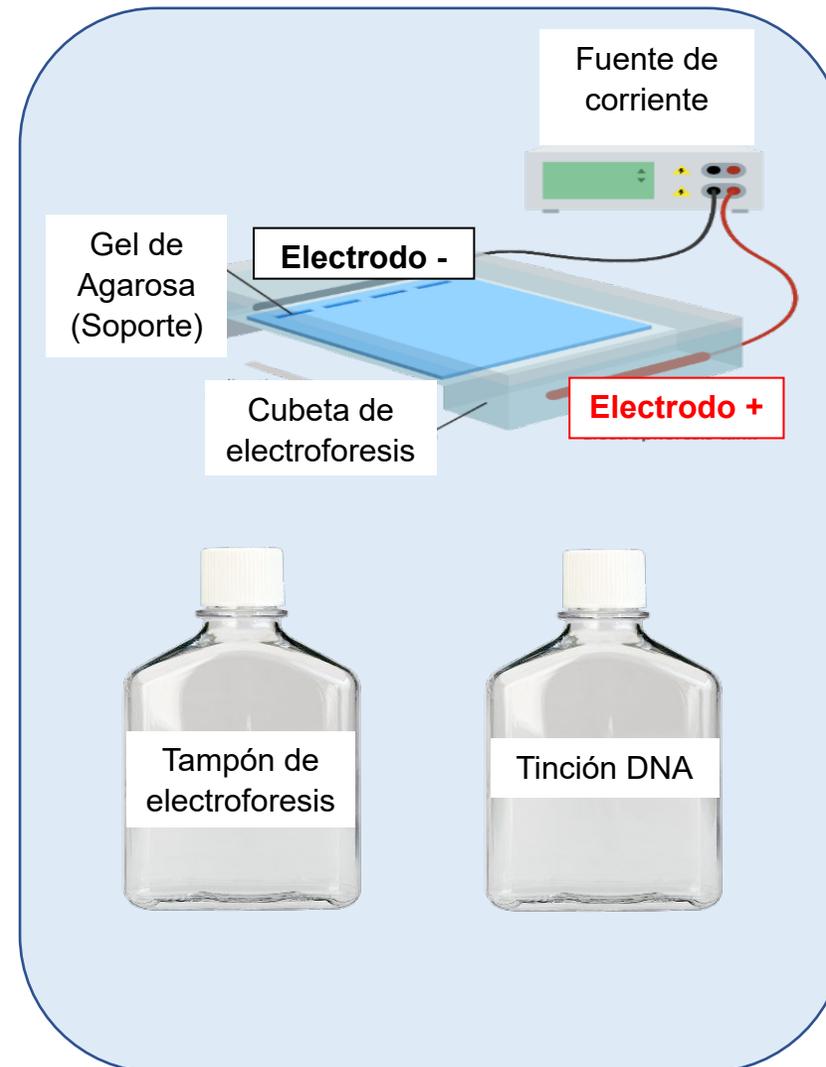
**Análisis electroforético de la digestión del ADN del fago  
Lambda y del plásmido pBR322 con los enzimas de restricción  
EcoRI, PstI, HindIII**

Acaban de llegar las muestras de tu cliente a la empresa. Gracias a la tarea de documentación que has estado haciendo ya sabes qué es cada muestra y cómo actúan las enzimas de restricción. Así pues, el siguiente paso será realizar la electroforesis en gel de agarosa para poder llevar a cabo el análisis de las muestras que pedía el cliente.

## Material por grupo:



## Material común:



# Sesión Práctica: Protocolo Experimental

Rotular

Coger las muestras

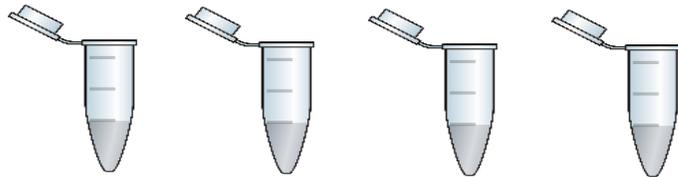
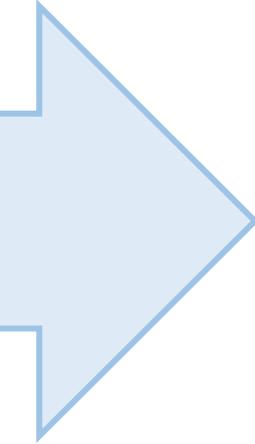
Tampón de carga

Mezclar

Poner las muestras en los pocillos del gel de agarosa

Electroforesis

Tinción del ADN

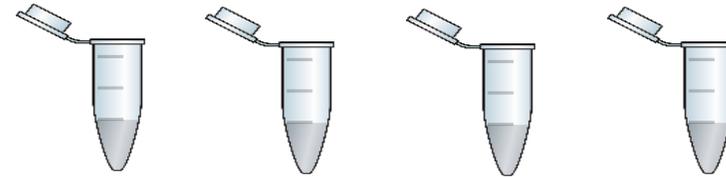


Lambda  
(L)

Lambda  
EcoRI  
(LE)

Lambda  
PstI  
(LP)

Lambda  
HindIII  
(LH)



pBR322

pBR322  
EcoRI  
(pE)

pBR322  
PstI  
(pP)

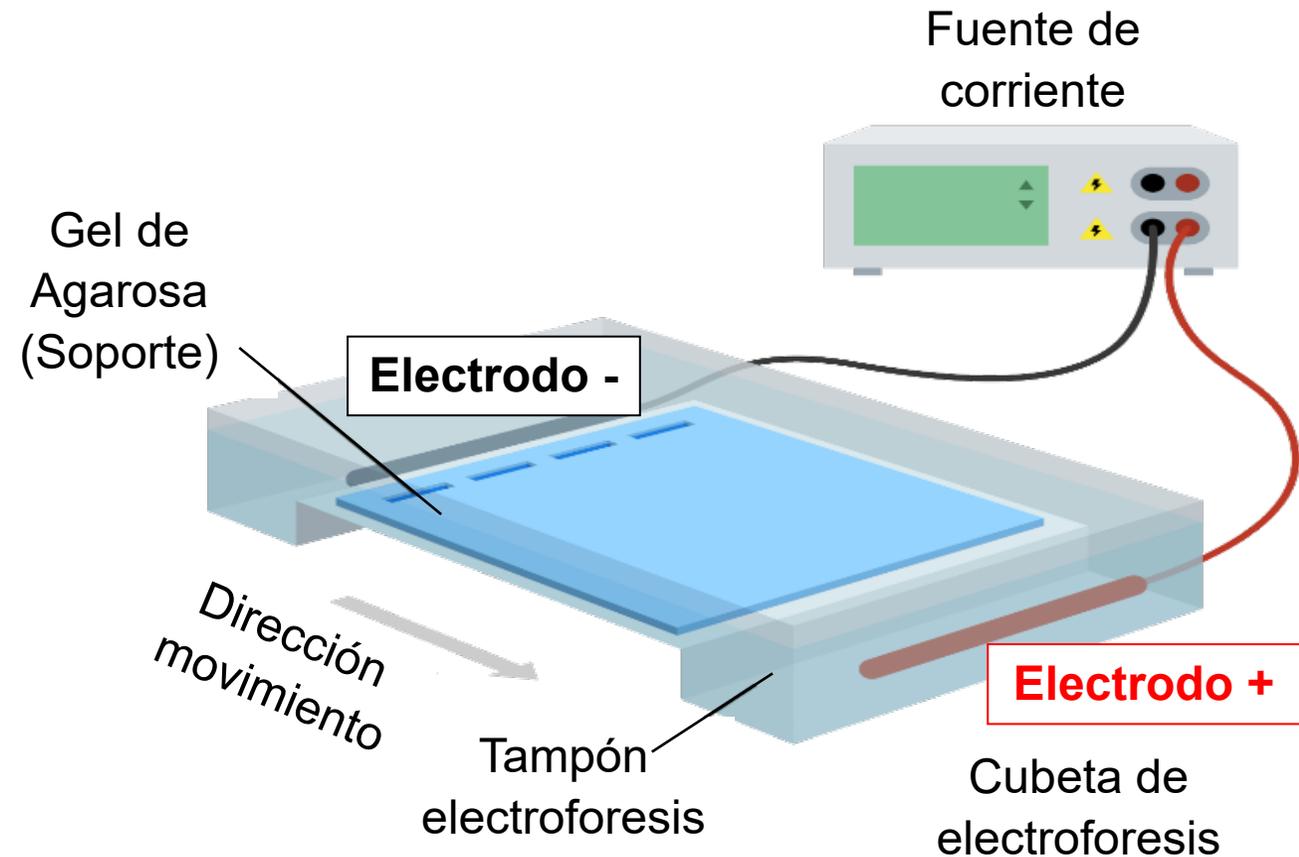
pBR322  
EcoRI+PstI  
(pEP)

# Electroforesis en gel de agarosa

Transporte de **moléculas cargadas** al someterlas a un campo eléctrico.

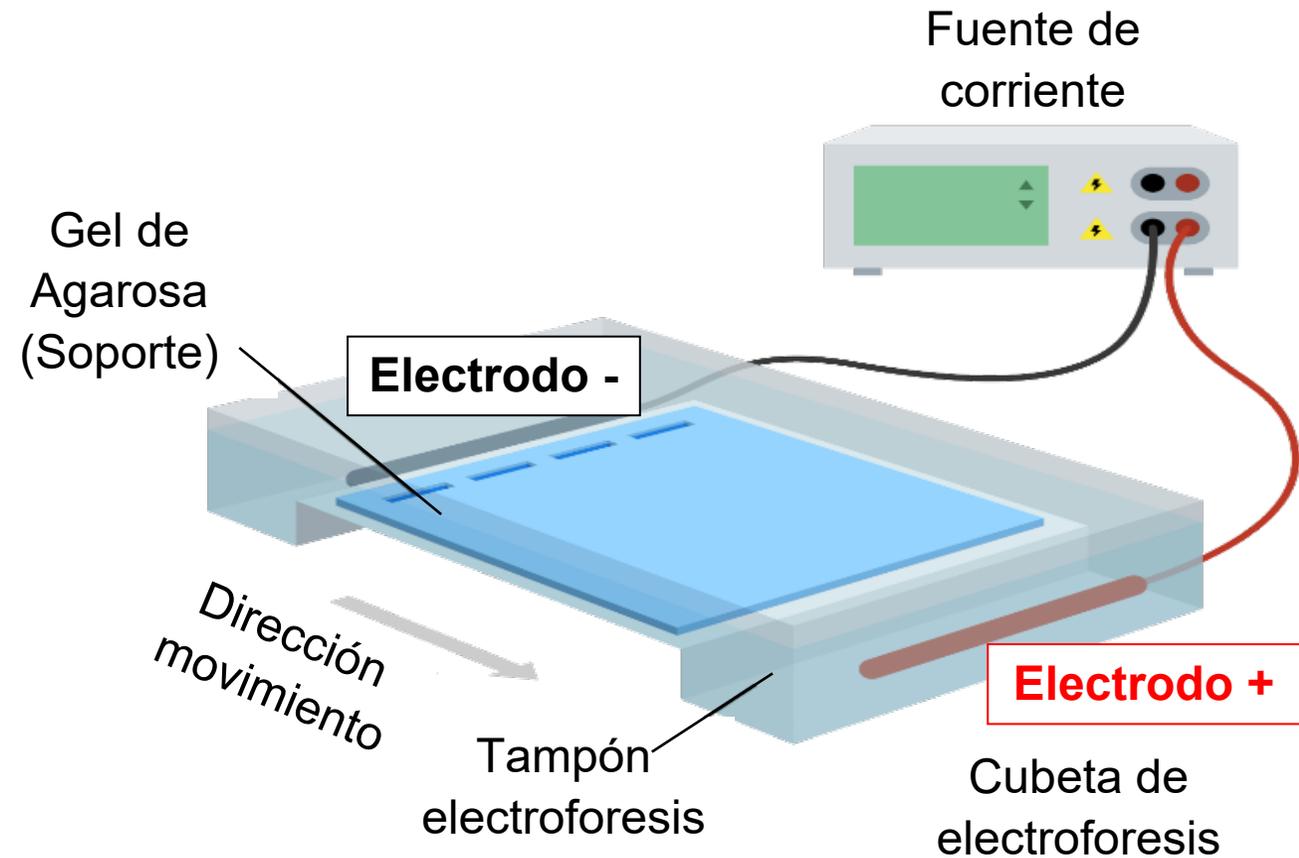
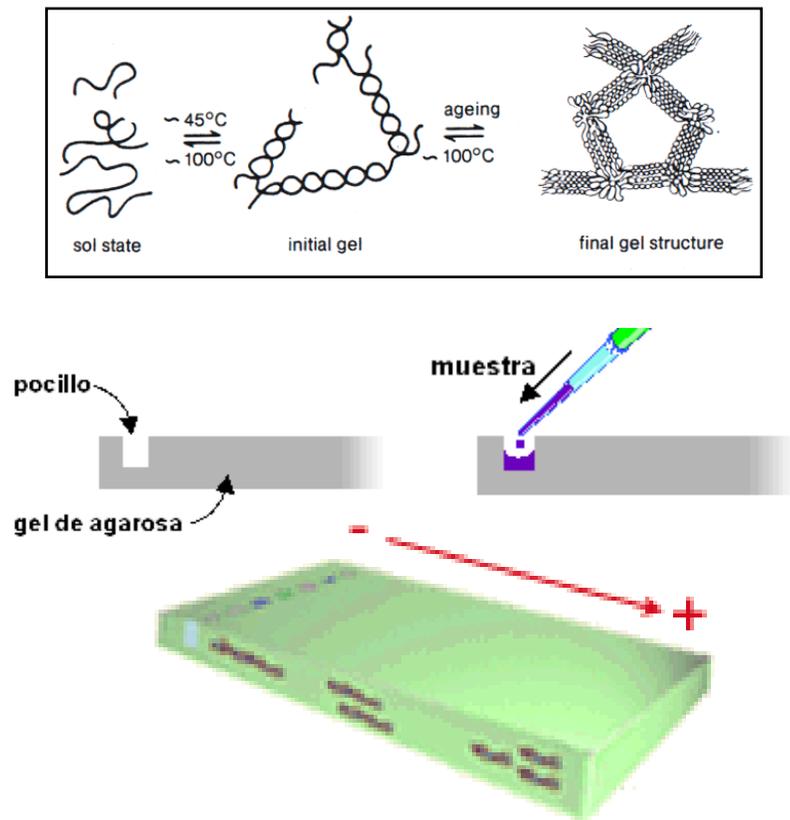
Separación en función de:

- **Tamaño**
- **Conformación**



# Electroforesis en gel de agarosa

Transporte de **moléculas cargadas** al someterlas a un campo eléctrico.



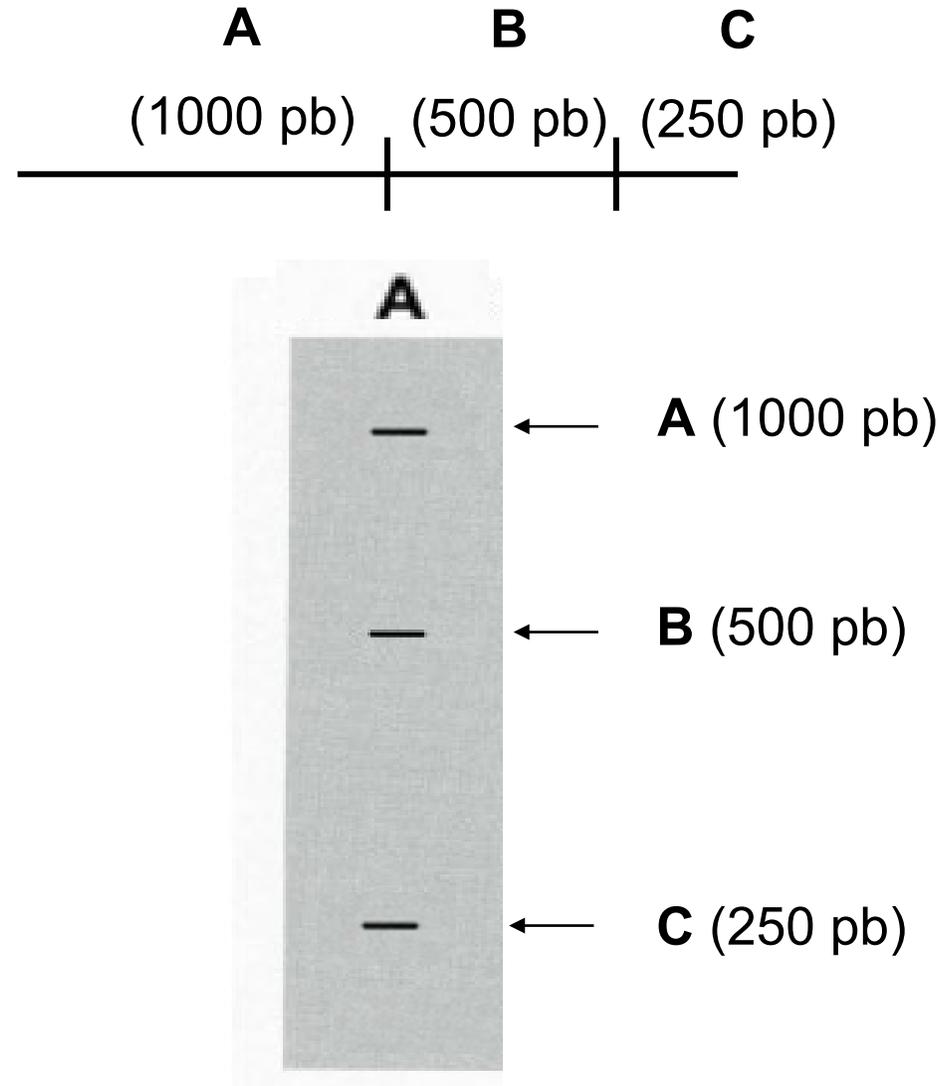
Fuente: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-gel-electrophoresis/>

# Electroforesis en gel de agarosa

Transporte de **moléculas cargadas** al someterlas a un campo eléctrico.

Separación en función de:

- **Tamaño:**
  - ✓ **Fragmentos pequeños:** más avanzan
  - ✓ **Fragmentos grandes:** menos avanzan



# Electroforesis en gel de agarosa

Transporte de **moléculas cargadas** al someterlas a un campo eléctrico.

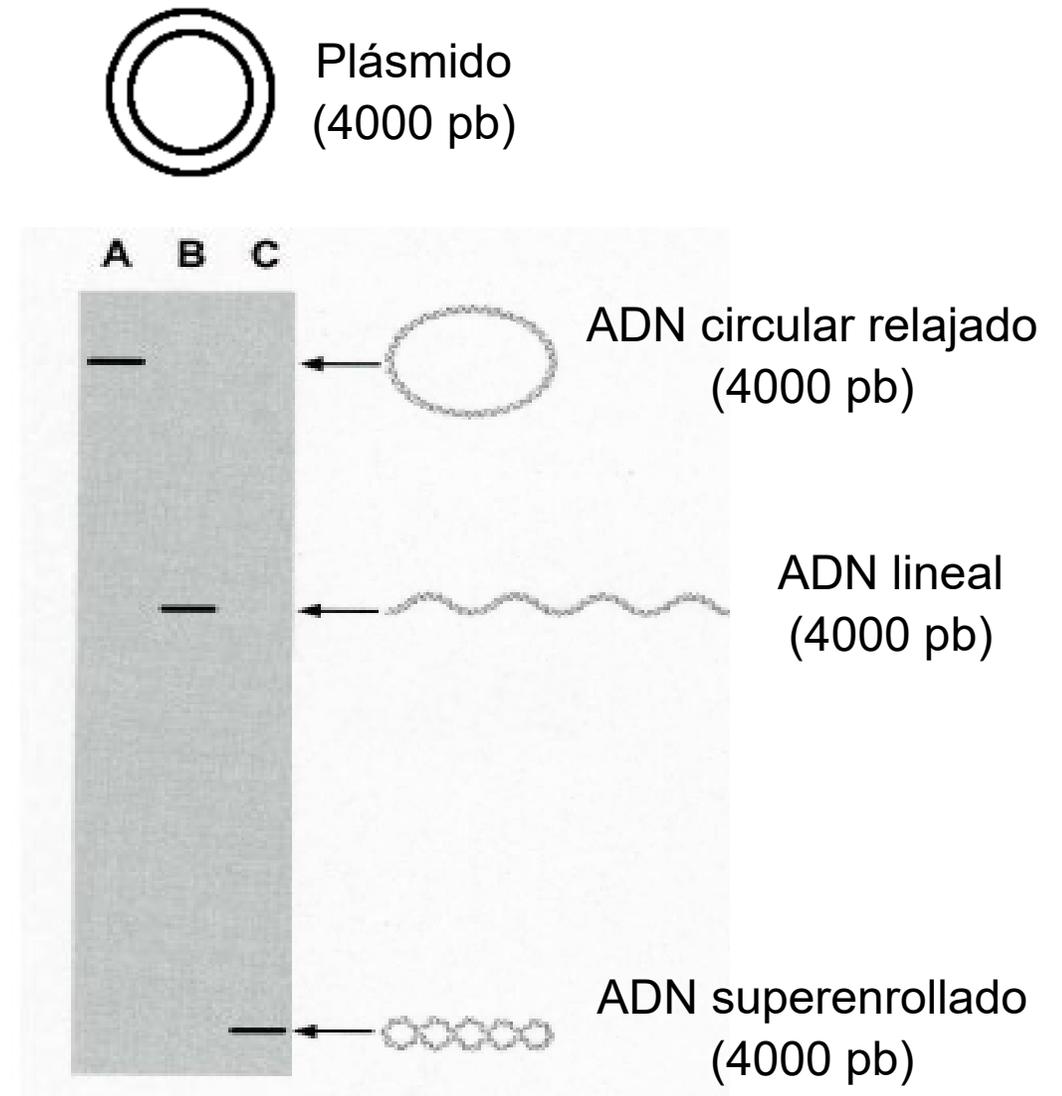
Separación en función de:

- **Tamaño:**

- ✓ **Fragmentos pequeños:** más avanzan
- ✓ **Fragmentos grandes:** menos avanzan

- **Conformación:**

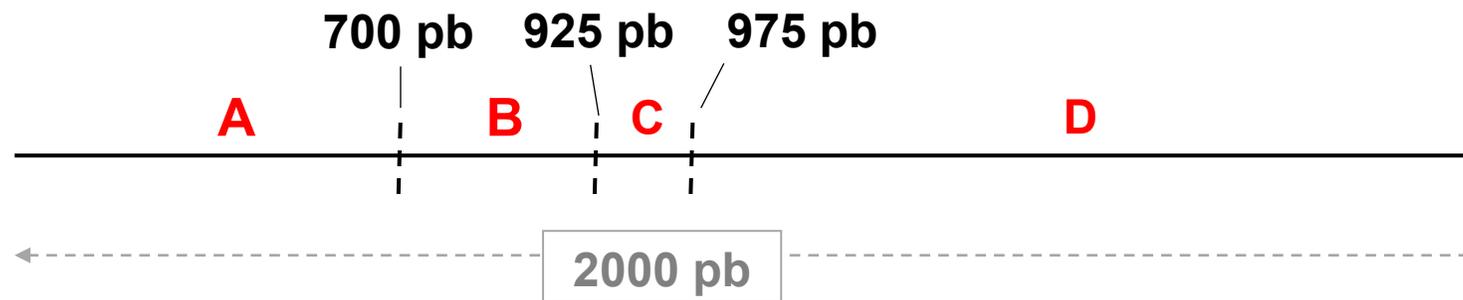
- ✓ **DNA circular relajado:** menos avanza
- ✓ **DNA circular superenrollado:** más avanza
- ✓ **DNA lineal:** movilidad normal (indica el tamaño del fragmento de ADN)



# Electroforesis en gel de agarosa: Cuestión 4

Una molécula de DNA de 2000 pb se ha cortado en 4 fragmentos tal y como se muestra en el diagrama.

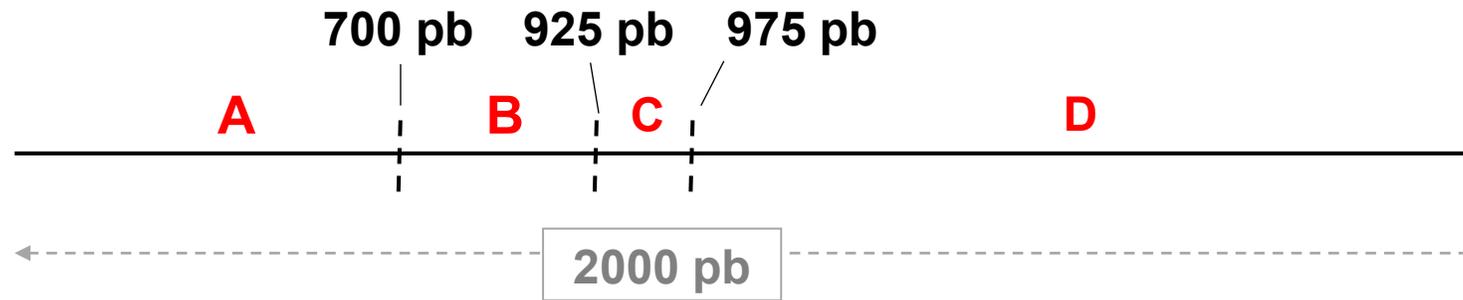
¡Ojo! Se indica la posición donde corta el enzima, pero no el tamaño de los fragmentos. ¡Debéis averiguar estos tamaños vosotros!



- Calcula el tamaño en pares de bases (pb) de cada uno de los fragmentos resultantes y ordénalos de mayor a menor.
- Dibuja en el siguiente gel de agarosa como ha migrado cada uno de los fragmentos una vez realizada la electroforesis, teniendo en cuenta el patrón de tamaños conocidos. No olvides nombrar cada fragmentos con su letra correspondiente.
- ¿Cuál es el fragmento que ha avanzado más en el gel de agarosa? ¿y el que menos?

# Electroforesis en gel de agarosa: Cuestión 4

- a) Calcula el tamaño en pares de bases (pb) de cada uno de los fragmentos resultantes y ordénalos de mayor a menor.



$$A = 700 \text{ pb}$$

$$B = 925 \text{ pb} - 700 \text{ pb} = 225 \text{ pb}$$

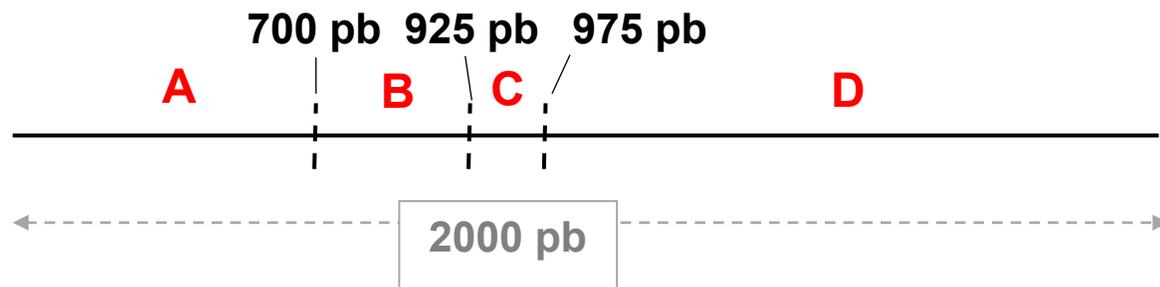
$$C = 975 \text{ pb} - 925 \text{ pb} = 50 \text{ pb}$$

$$D = 2000 \text{ pb} - 975 \text{ pb} = 1025 \text{ pb}$$

$$D > A > B > C$$

# Electroforesis en gel de agarosa: Cuestión 4

b) Dibuja en el siguiente gel de agarosa como ha migrado cada uno de los fragmentos una vez realizada la electroforesis, teniendo en cuenta el patrón de tamaños conocidos. No olvides nombrar cada fragmentos con su letra correspondiente.



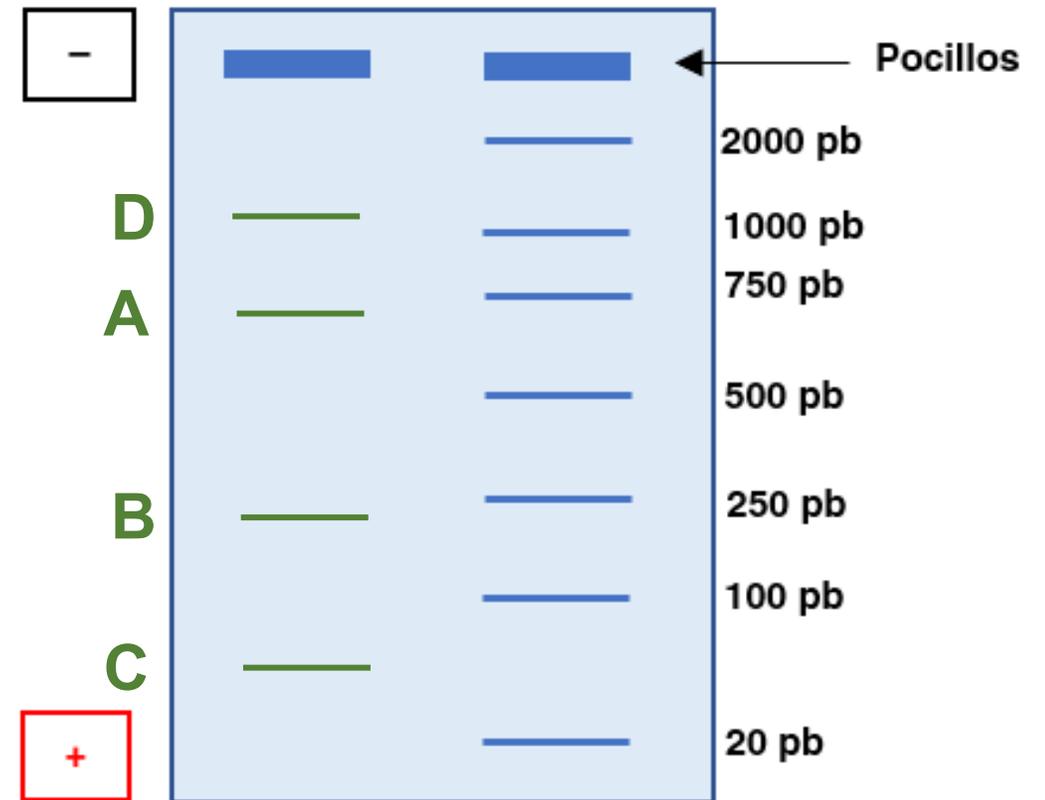
$$A = 700 \text{ pb}$$

$$B = 925 \text{ pb} - 700 \text{ pb} = 225 \text{ pb}$$

$$C = 975 \text{ pb} - 925 \text{ pb} = 50 \text{ pb}$$

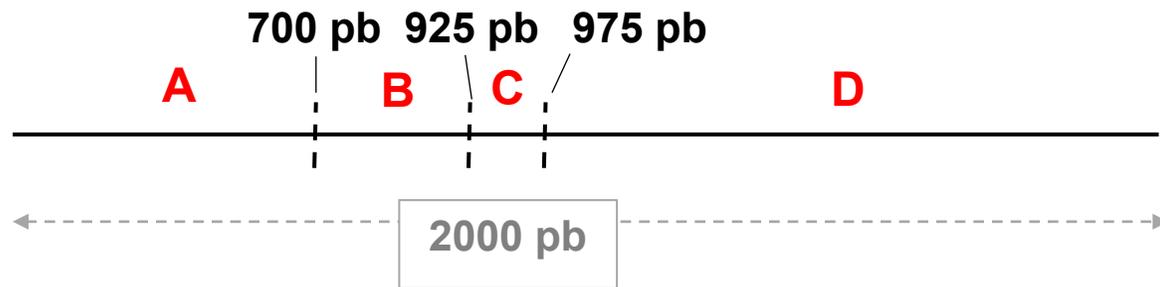
$$D = 2000 \text{ pb} - 975 \text{ pb} = 1025 \text{ pb}$$

$$D > A > B > C$$



# Electroforesis en gel de agarosa: Cuestión 4

c) ¿Cuál es el fragmento que ha avanzado **más** en el gel de agarosa? ¿y el que **menos**?



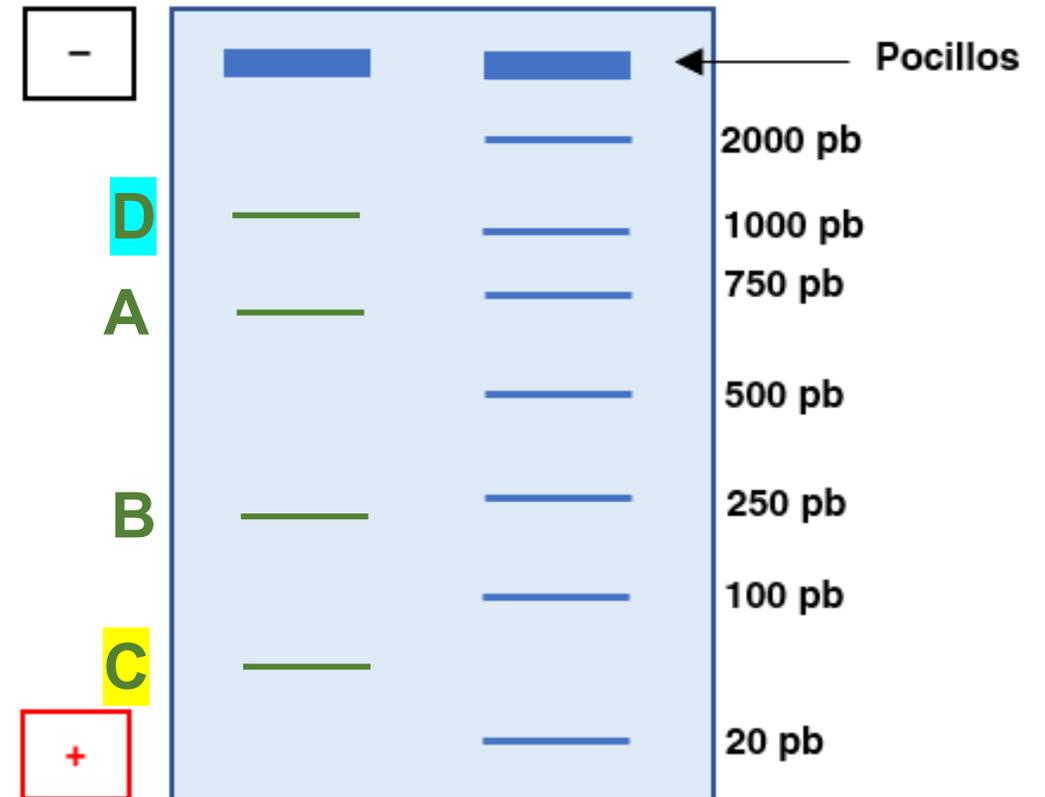
$$A = 700 \text{ pb}$$

$$B = 925 \text{ pb} - 700 \text{ pb} = 225 \text{ pb}$$

$$C = 975 \text{ pb} - 925 \text{ pb} = 50 \text{ pb}$$

$$D = 2000 \text{ pb} - 975 \text{ pb} = 1025 \text{ pb}$$

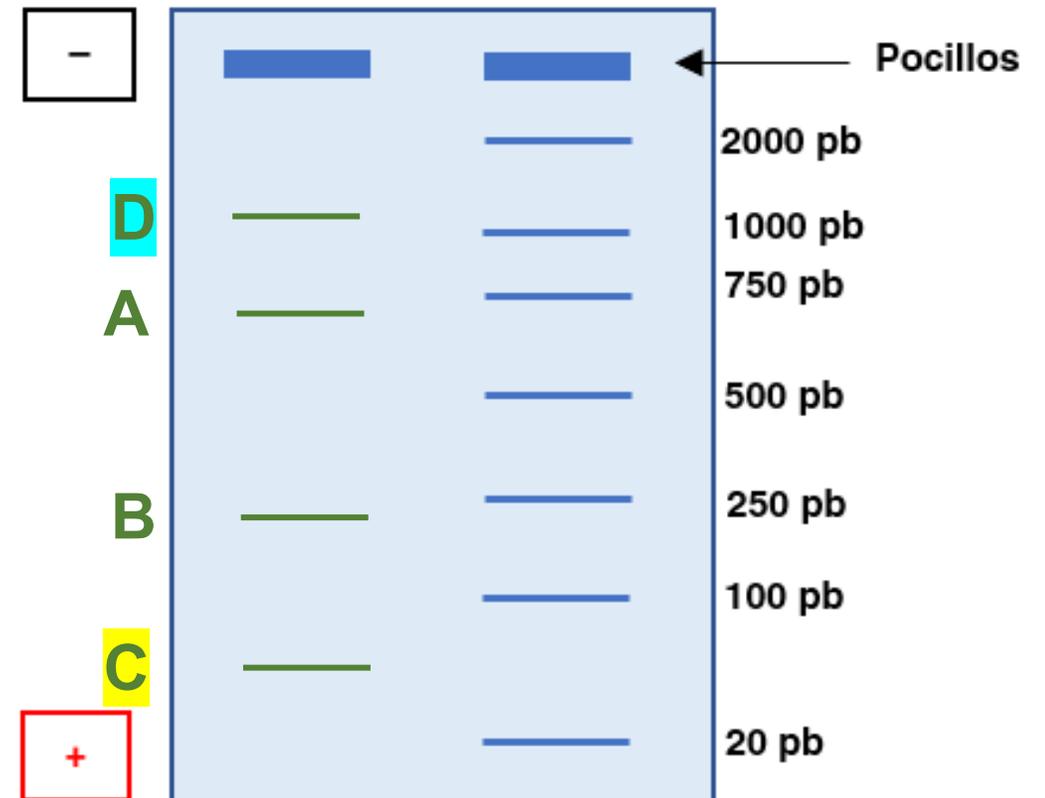
$$D > A > B > C$$



# Electroforesis en gel de agarosa: Cuestión 4

d) Completa las siguientes frases:

- Los fragmentos de ADN pequeños (menos pb) podrán desplazarse más fácilmente por los poros del gel de agarosa, de forma que **AVANZARÁN MÁS** a través del gel.
- Los fragmentos de ADN grandes (más pb) tendrán más dificultades para introducirse por los poros del gel de agarosa, de forma que **AVANZARÁN MENOS** a través del gel.



# Electroforesis en gel de agarosa: Cuestión 4

Indica la movilidad electroforética en un gel de agarosa del siguiente plásmido de 4000 pb. No olvides tener en cuenta su conformación.

**A. Plásmido en conformación circular superenrollado**



Circular superenrollado  
(4000 pb)

**B. Plásmido en conformación circular relajada**



Circular relajado  
(4000 pb)

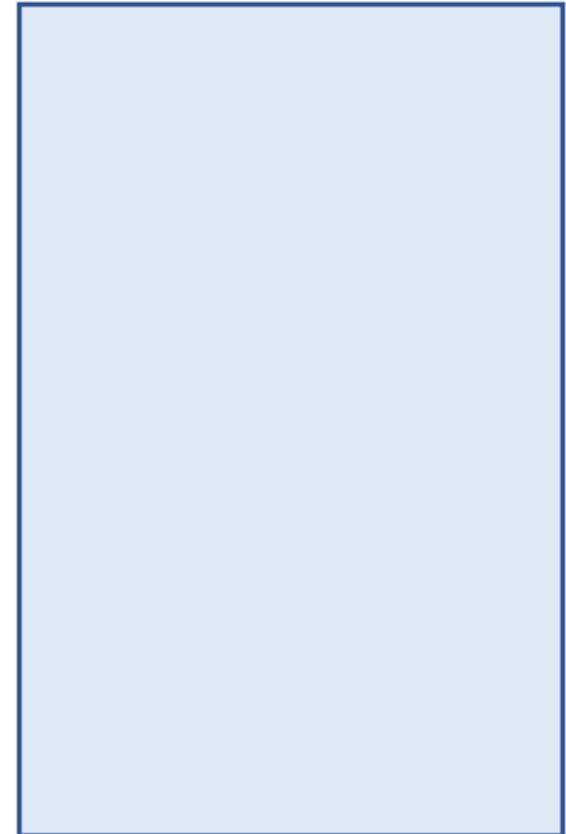
**C. Plásmido digerido con un enzima de restricción que tiene un sitio de corte**



Cortado en 1 sitio  
(4000 pb)

-

+



# Electroforesis en gel de agarosa: Cuestión 4

Indica la movilidad electroforética en un gel de agarosa del siguiente plásmido de 4000 pb. No olvides tener en cuenta su conformación.

**A. Plásmido en conformación circular superenrollado**



Circular superenrollado  
(4000 pb)

**B. Plásmido en conformación circular relajada**



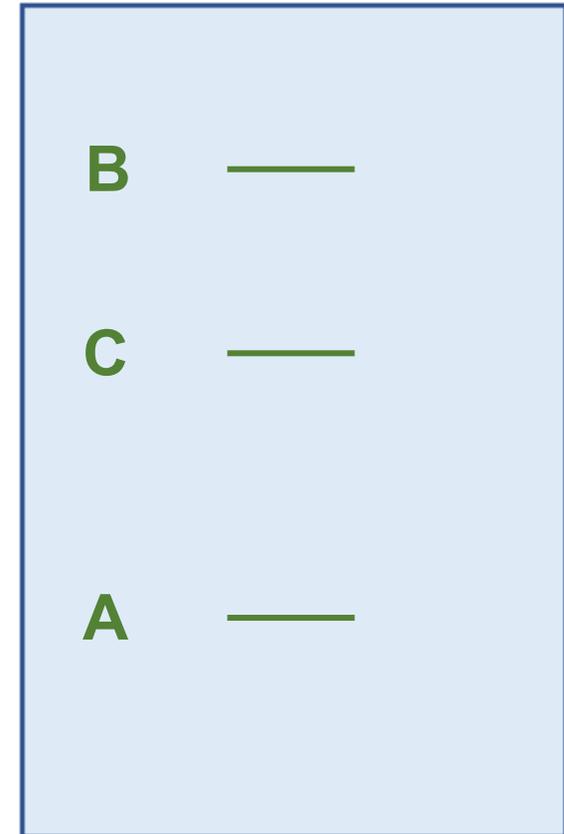
Circular relajado  
(4000 pb)

**C. Plásmido digerido con un enzima de restricción que tiene un sitio de corte**



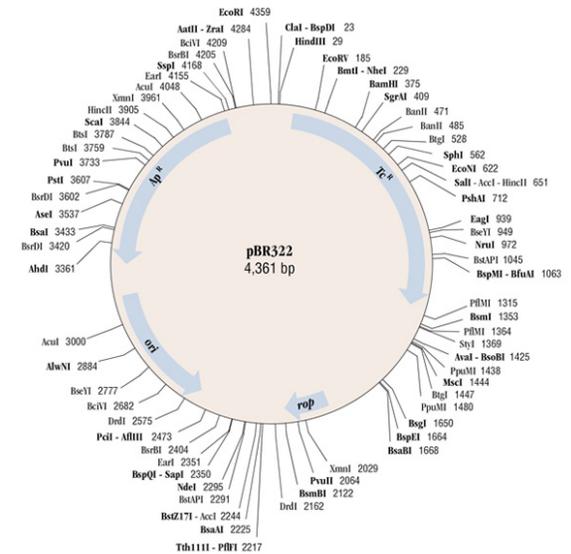
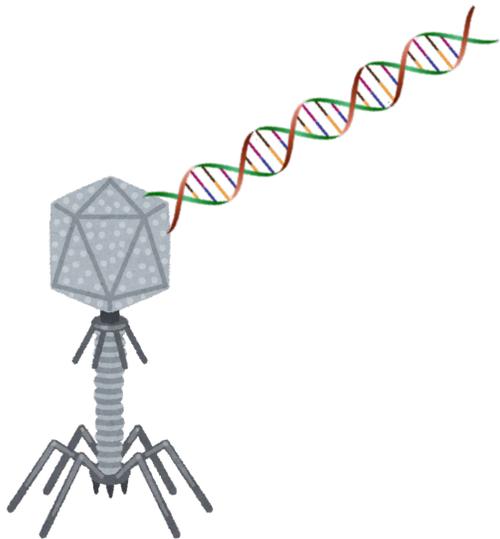
Cortado en 1 sitio  
(4000 pb)

-

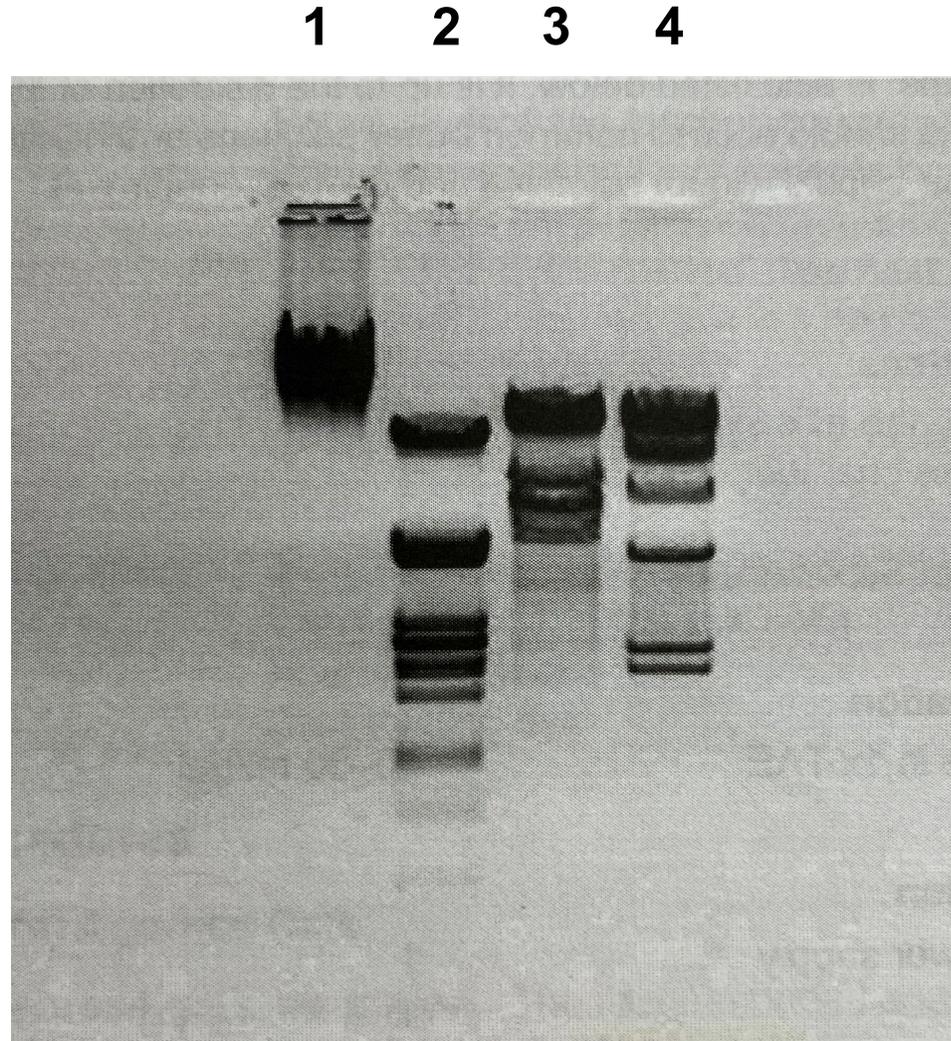


+

## ¡Análisis e interpretación de los resultados!



# Sesión Práctica: Análisis e interpretación resultados

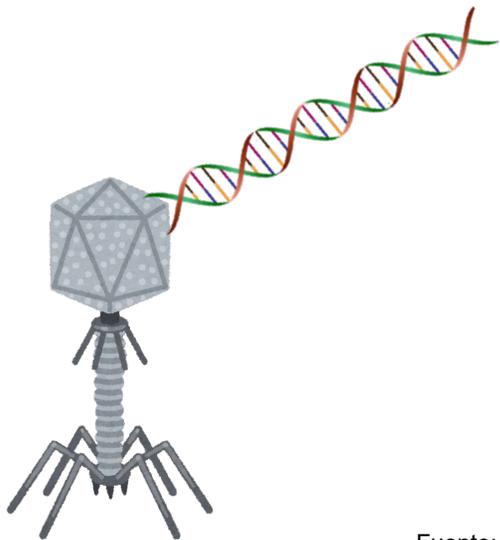


1 = DNA Lambda sin digerir

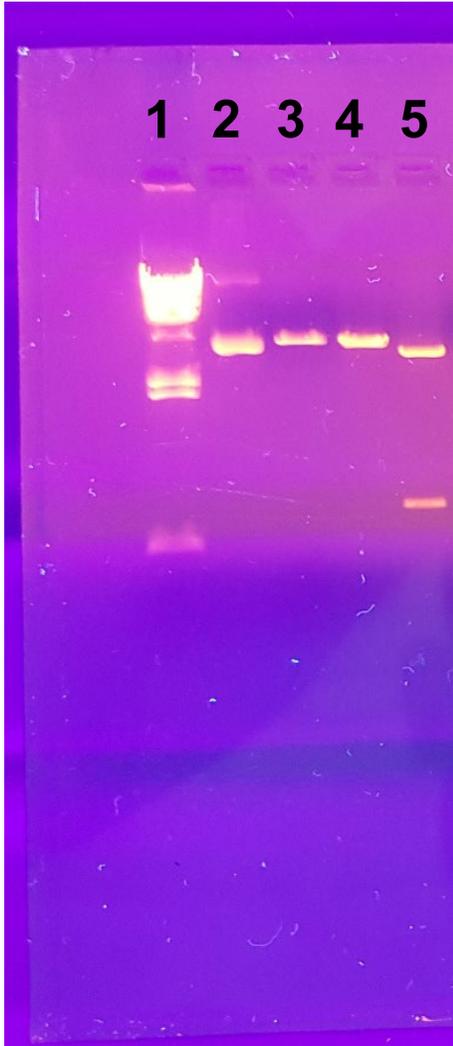
2 = DNA Lambda digerido con PstI

3 = DNA Lambda digerido con EcoRI

4 = DNA Lambda digerido con HindIII



# Sesión Práctica: Análisis e interpretación resultados



- 1 = DNA Lambda digerido con HindIII
- 2 = Plásmido pBR322 sin digerir (nativo)
- 3 = Plásmido pBR322 digerido con EcoRI
- 4 = Plásmido pBR322 digerido con PstI
- 5 = Plásmido pBR322 digerido con EcoRI+PstI

