

Biología molecular

¿Preguntas?

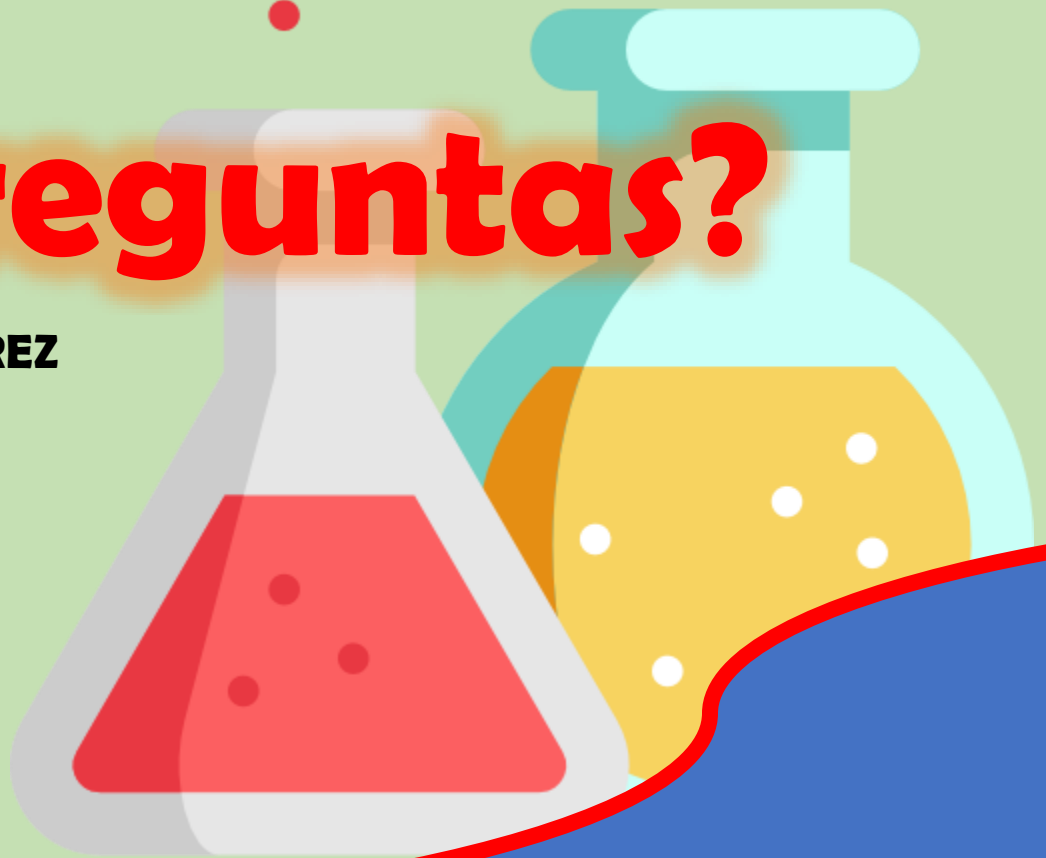
**ROLANDO DE JESUS PEREZ
MENDOZA**

**I.Q JOSE LUIS MUÑOZ
MORALES**

**UDS UNIVERSIDAD DEL
SURESTE**

**SAN CRISTOBAL DE LAS
CASAS CHIAPAS**

24 DE JUNIO DEL 2021



A continuación se presenta la secuencia de ADN de un plásmido que consta de 4650 pares de bases.

1. Identifica que los sitios de restricción en la cadena en base a la secuencia de nucleótidos de las siguientes enzimas de restricción.

AatII: 5' G A C G T--C 3'

BspHI: 5' T--C A T G A 3'

1 CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA
CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG

51 CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCC
GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC

101 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC
TAGGGGTTCC TGCGGCCGCA

151 CGCGTGGAGC TAGTTATTA TAGTAATCAA
TTACGGGGTC ATTAGTTCAT

201 AGCCCATATA TGGAGTTCGG CGTTACATAA
CTTACGGTAA ATGGCCCGC

251 TGGCTGACCG CCCAACGACC CCCGCCATT
GACGTCAATA ATGACGTATG

301 TTCCCATAGT AACGTCAATA GGGACTTTCC
ATTGACGTCA ATGGGTGGAG

351 TAITTACGGT AAATGCCCCA CTGGCAGTA
CATCAAGTGT ATCATATGCC

401 AAGTACGCC CCTATTGACG TCAATGACGG
TAAATGGCCC GCCTGGCATT

451 ATGCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC
CTACTTGGCA GTACATCTAC

501 GTATTAGTCA TCGCTATTAC CATGGTGATG
CGGTTTTGGC AGTACATCAA

551 TGGGCGTGA TAGCGTTTG ACTCACGGGG
ATTTCCAAGT CTCCACCCCA

601 TTGACGTCAA TGGGAGTTG TTTTGCACCA
AAATCAACGG GACTTTCCAA

651 AATGTCGTAA CAATCCGCC CCAATTGACGC
AAATGGGCGG TAGGCGTGA

701 CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTCGT
TTAGTGAACC GTCAGATCGC

751 CTGGAGACGC CATCCACGCT GTTTTGACCT
CCATAGAAGA CACCGGGACC

801 GATCCAGCCT CCGCGGATTC GAATCCCGGC
CGGGAACGGT GCATTGGAAC

851 GCGGATTCCC CGTGCCAAGA GTGACGTAAG
TACCGCTAT AGAGTCTATA

901 GGCCACAAA AAATGCTTTC TTCTTTAAT
ATACTTTTT GTTATCTTA

951 TTTCTAATAC TTTCCCTAAT CTCITTTCTT
CAGGGAATA ATGATACAAT

1001 GTATCATGCC TCTTTGCACC ATTCTAAAGA
ATAACAGTGA TAATTTCTGG

1051 GTTAAGGCAA TAGCAATATT TCTGCATATA
AATATTTCTG CATATAAATT

1101 GTAACGTATG TAAGAGGTTT CATATTGCTA
ATAGCAGCTA CAATCCAGCT

1151 ACCATTCTGC TTTTATTTA TGGTTGGGAT
AAGGCTGGAT TATTCTAGT

1201 CCAAGCTAGG CCCTTTTGGT AATCATGTTT
ATACCTCTTA TCTTCTCC

1251 ACAGCTCTG GGCAACGTGC TGGTCTGTGT
GCTGGCCCAT CACTTTGGCA

1301 AAGAATTGGG ATTCGAACAT CGATTGAATT
CCCCGGGAT CCTCTAGAT

1351 CGACCTCAG AAGCTTGCTT CGAGCAGCGC
TGCTCGAGAG ATCTACGGGT

1401 GGCATCCCTG TGACCCCTCC CCAGTGCCTC
TCCTGGCCCT GGAAGTTGCC

1451 ACTCCAGTGC CCACCAGCCT TGTCTAATA
AAATTAAGT GCATCATTTT

1501 GTCTGACTAG GTGTCCTTCT ATAATATTAT
GGGGTGGAG GGGGTGTAT

1551 GGAGCAAGGG GCAAGTTGGG AAGACAACCT
GTAGGGCCTG CGGGGTCTAT

1601 TGGGAACCAA GCTGGAGTGC AGTGGCACAA
TCTTGGCTCA CTGCAATCTC

1651 CGCCTCTGG GTTCAAGCGA TTCTCTGCC
TCAGCCTCCC GAGTTGTTGG

1701 GATTCCAGGC ATGCATGACC AGGCTCAGCT
AATTTTTGIT TTTTTGGTATG

1751 AGACGGGGTT TCACCATATT GGCCAGGCTG
GTCTCCAACCT CTAATCTCA

1801 GGTGATCTAC CCACCTTGGC CTCCCAAATT
GCTGGGATTA CAGGCGTGAA

1851 CCACTGCTCC CTTCCCTGTC CTTCTGATTT
TGTAGGTAAC CACGTGCGGA

1901 CCGAGCGGCC GCAGGAACCC CTAGTGATGG
AGTTGGCCAC TCCCTCTCTG

1951 CGCGCTCGCT CGCTCACTGA GGCCGGGCGA
CCAAAGGTCG CCCGACGCC

2001 GGGCTTTGCC CGGGCGCCT CAGTGAGCGA
GCGAGCGCGC AGCTGCCTGC

2051 AGGGGGCCT GATGCGGTAT TTTCTCCTTA CGCATCTGTG
CGGTATTCA

2101 CACCGCATAC GTCAAAGCAA CCATAGTACG CGCCCTGTAG
CGGCGCATA

Ejercicios de integración

2151 AGCGCGGCGG GTGTGGTGGT TACGCGCAGC
GTGACCGCTA CACTTGCCAG

2201 CGCCCTAGCG CCCGCTCCTT TCGCTTCTT CCCTTCCTTT
CTGCCACGT

2251 TCGCGGCTT TCCCCGTCAA GCTCTAAATC GGGGGCTCCC
TTTAGGGTTC

2301 CGATTTAGTG CTTTACGGCA CCTCGACCCC AAAAACTTG
ATTTGGGTGA

2351 TGGTTCACGT AGTGGGCCAT CGCCCTGATA GACGGTTTTT
CGCCCTTTGA

2401 CGTGGAGTC CACGTTCTTT AATAGTGGAC TCTTGTCCA
AACTGGAACA

2451 AACTCAACC CTATCTCGGG CTATTCTTTT GATTATAAG
GGATTTGGC

2501 GATTTCCGCC TATTGGTTAA AAAATGAGCT GATTTAACAA
AAATTTAACG

2551 CGAATTTTAA CAAAATATTA ACGTTTACAA TTTTATGGT
CACTCTCAGT

2601 ACAATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAAGC CAGCCCGAC
ACCCGCCAAC

2651 ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT GCTCCCGCA
TCCGCTTACA

2701 GACAAGCTGT GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG
GTTTTACC

2751 TCATCACCGA AACGCGGAG ACGAAAGGGC CTCGTGATAC
GCCTATTTT

2801 ATAGGTTAAT GTCATGATAA TAATGGTTTC TTAGACGTCA
GGTGGCACTT

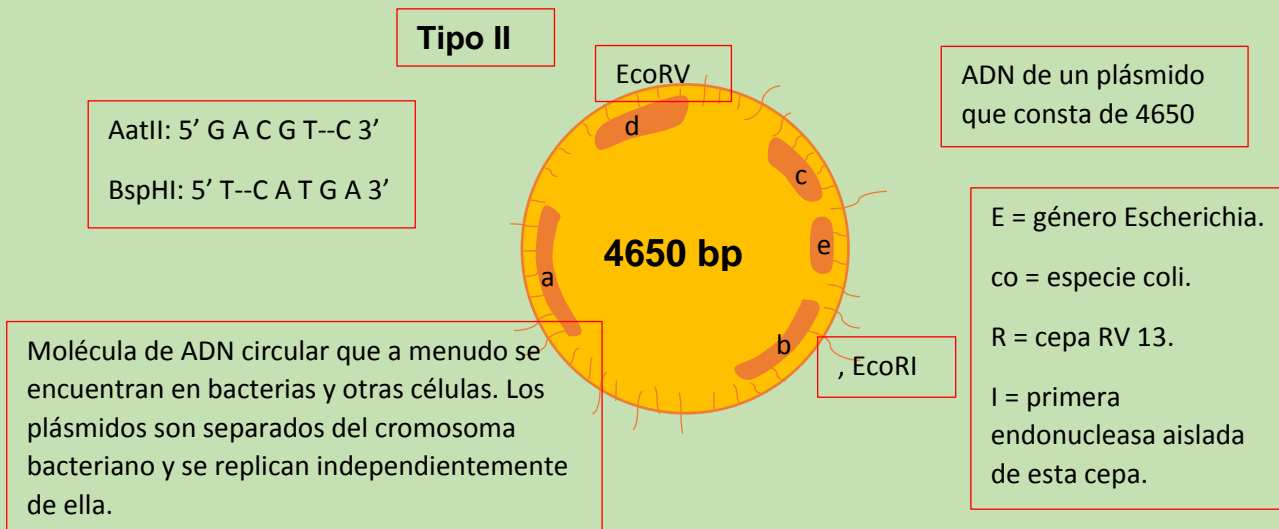
2851 TTCGGGGAAA TGTGCGCGGA ACCCCTAATT GTTTATTTT
CTAAATACAT

2901 TCAAATATGT ATCCGCTCAT GAGACAATAA CCCTGATAA
TGCTTCAATA

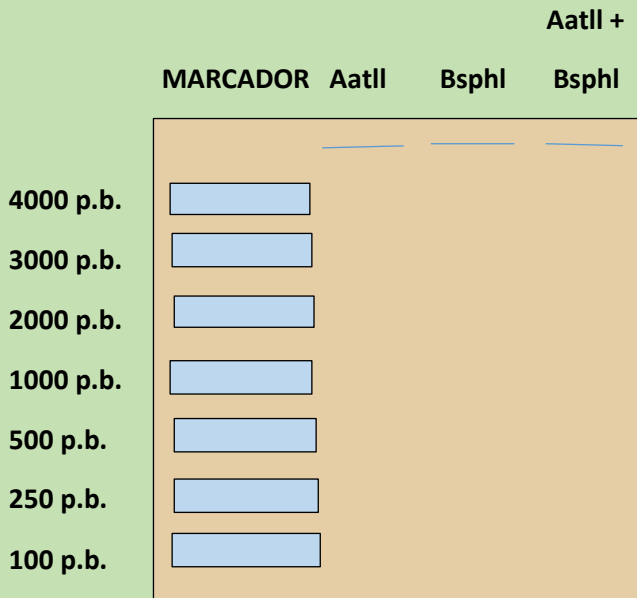
2951 ATATTGAAA AGGAAGAGTA TGAGTATTCA ACATTCCGT GTCGCCCTTA
 3001 TTCCCTTTTT TGCGGCATTI TGCCCTCCTG TTTTGTCTCA CCCAGAAACG
 3051 CTGGTGAAAG TAAAAGATGC TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA
 3101 CATCGAACTG GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTCCGCCCG
 3151 AAGAACGTTT TCCAATGATG AGCACTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG
 3201 GTATTATCCC GTATTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTG GCCGCATACA
 3251 CTATTCTCAG AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC
 3301 TTACGGATGG CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG
 3351 AGTGATAACA CTGCGGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA
 3401 GGAGCTAACC GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG
 3451 ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA CGAGCGTGAC
 3501 ACCACGATGC CTGTAGCAAT GGCAACAACG TTGCGCAAAC TATTAACCTG
 3551 CGAACTACTT ACTCTAGCTT CCCGGCAACA ATTAATAGAC TGGATGGAGG
 3601 CGGATAAAGT TGCAGGACCA CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG
 3651 TTTATTGCTG ATAAATCTGG AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC GCGGTATCAT
 3701 TGCAGCACTG GGGCCAGATG GTAAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA
 3751 CGACGGGGAG TCAGGCAACT ATGGATGAAC GAAATAGACA GATCGCTGAG
 3801 ATAGGTGCCT CACTGATTAA GCATTGGTAA CTGTCAGACC AAGTTTACTC

3851 ATATATACTT TAGATTGATT TAAAACCTCA TTTTAAATTT AAAAGGATCT
 3901 AGGTGAAGAT CCTTTTGTAT AATCTCATGA CCAAAATCCC TTAACGTGAG
 3951 TTTTCGTTC ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC
 4001 TTGAGATCCT TTTTCTGTC GCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAAAAAAC
 4051 CACCGCTACC AGCGGTGGTT TGTTGCGCG ATCAAGAGCT ACCAACTCTT
 4101 TTTCCGAAGG TAACTGGCTT CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCCT
 4151 TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG GCCACCCTT CAAGAACTCT GTAGCACCGC
 4201 CTACATACCT CGCTCTGCTA ATCTGTTC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC
 4251 GATAAGTCGT GTCTTACCGG GTTGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA
 4301 GCGCAGCGG TCGGGCTGAA CGGGGGGTTG GTGCACACAG CCCAGCTTGG
 4351 AGCGAACGAC CTACACCGAA CTGAGATACC TACAGCGTGA GCTATGAGAA
 4401 AGCGCCACGC TTCCCGAAGG GAGAAAGCGG GACAGGTATC CGGTAAGCGG
 4451 CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GGAAACGCCT
 4501 GGTATCTTIA TAGTCTGTG GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCA
 4551 TTTTGTGAT GCTCTGCAGG GGGGCGGAGC CTATGGAAAA ACGCCAGCAA
 4601 CGCGGCCTTT TTACGGTTC TGGCCTTTG CTGGCCTTTT GCTCACATGT

En el siguiente esquema, determine los pares de bases de los fragmentos resultantes después del corte y complete el mapa de restricción del plásmido.



El corte con las siguientes enzimas de restricción genera fragmentos de ADN los cuales serán analizados mediante electroforesis en gel. Indique de manera aproximada de acuerdo a su peso molecular las bandas que estos segmentos de ADN generarían



Preguntas de repaso

1. ¿Cuáles son las condiciones de almacén y conservación de las enzimas de restricción?

Las enzimas de restricción, al igual que muchas otras proteínas, pueden disminuir su vida media y en consecuencia su actividad, al ser conservadas y manejadas de forma inadecuada fuera de su rango ideal de temperatura; deben conservarse a -20°C , así que para evitar su congelamiento y su consecuente pérdida de actividad son diluidas en un volumen determinado de glicerol. Para usarlas se requiere un contenedor que asegure la menor variación de temperatura posible.

2. ¿Cómo se determina la enzima de restricción ideal para realizar un corte en una secuencia específica de ADN?

Los cortes que realizan las enzimas de restricción sobre la cadena de ADN pueden generar dos estructuras o formas: cohesivas o romas. Los cortes cohesivos, también llamados pegajosos, se generan porque la enzima corta en cada cadena en secuencia de ADN

3. ¿Cómo se logra la mayor eficiencia en la actividad de las enzimas de restricción?

Las hojas de instrucciones o insertos que facilita el proveedor incluyen las características y descripción de las condiciones óptimas de actividad de las enzimas de restricción disponibles comercialmente. Dichas condiciones están ajustadas para el volumen de reacción requerido, de acuerdo a la tecnología que se requiere aplicar. Se debe tener en cuenta la temperatura óptima de acción, presentación comercial de la enzima (unidades de enzima por microlitro), tiempo de incubación, así como los posibles requerimientos de aditivos, como albúmina, ATP, etcétera.

4. ¿Cómo se determina la cantidad de enzima de restricción para un ensayo?

La cantidad de enzima utilizada en una reacción dependerá de la concentración de ADN en la muestra a digerir. La concentración de la enzima está descrita en la hoja de instrucciones del proveedor, como unidades por microlitro (u/μl). Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima requerida para producir la digestión completa de un microgramo de ADN sustrato en 60 minutos a la temperatura óptima de acción de la enzima.

5. ¿Aumenta la eficiencia de la actividad de restricción si se rebasa el tiempo recomendado de incubación?

El tiempo de incubación de la reacción puede ser incrementado si la enzima utilizada está cerca de su fecha de caducidad y su actividad está mermando. Sin embargo, el tiempo no debe incrementarse demasiado, pues aunque el ADN es una molécula resistente, se corre el riesgo de su degradación.