

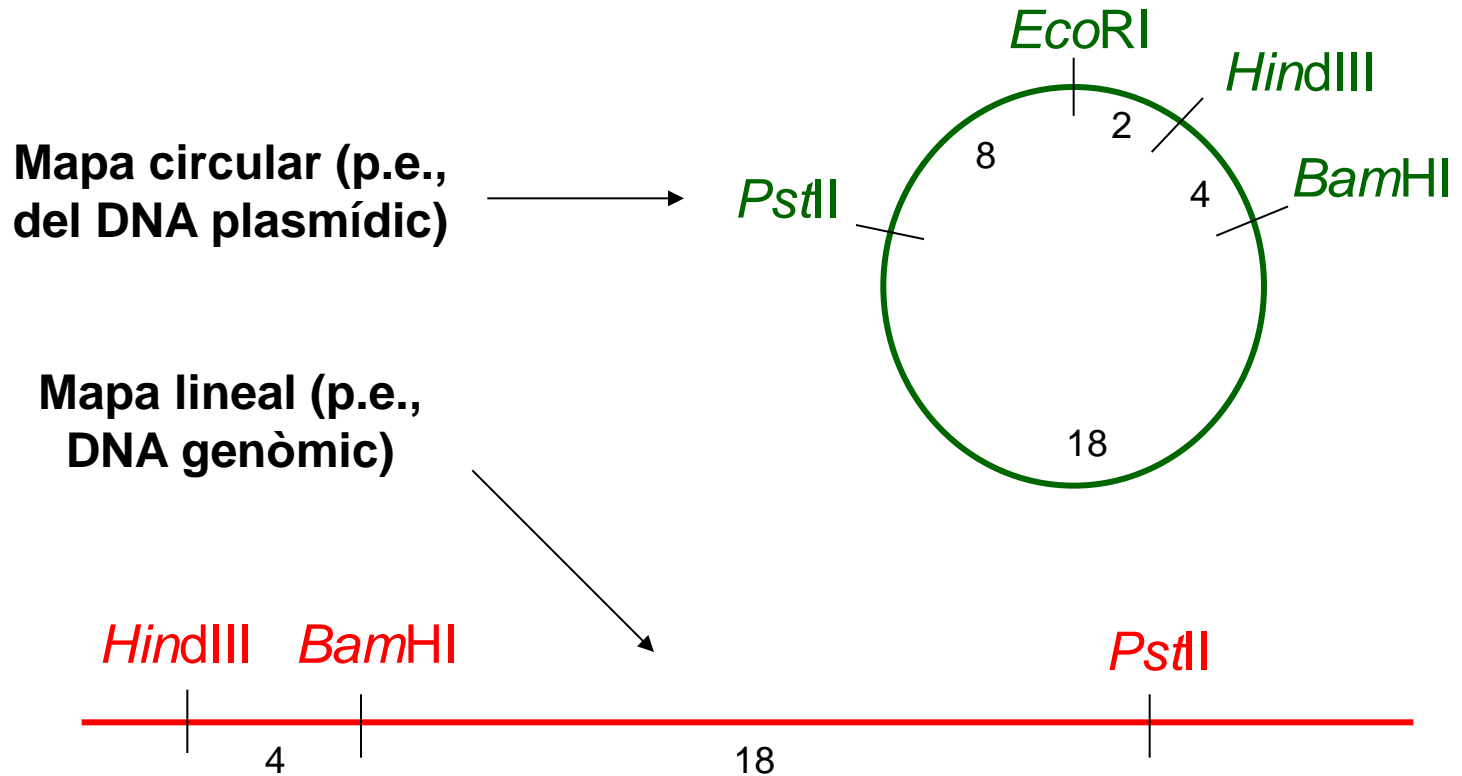
TEMA 8

Elaboració de mapes de restricció

1. Mapes de restricció
2. Utilització de sondes
3. Elaboració de mapes circulars
4. Elaboració de mapes lineals
5. Resolució de problemes

1. Mapes de restricció

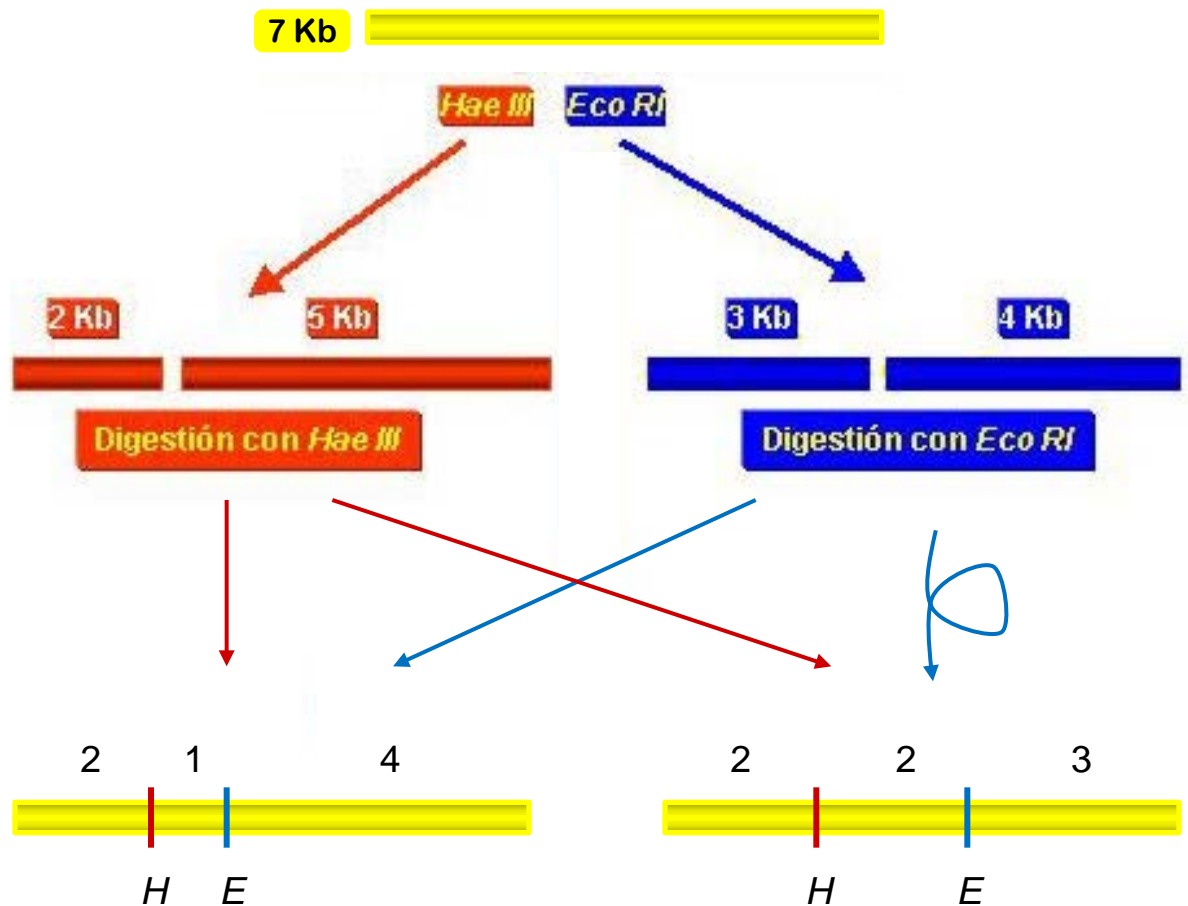
Un mapa de restricció és una seqüència lineal o circular de llocs de restricció al DNA, separats per distàncies definides (p.e., kb).



La tècnica més utilitzada per a la realització de mapes de restricció són les digestions dobles: es tracta el DNA amb dos enzims de restricció, per separat i conjuntament, i es determinen (en gel) les mides dels fragments generats.

Suposem que tenim un fragment clonat de 7 kb:

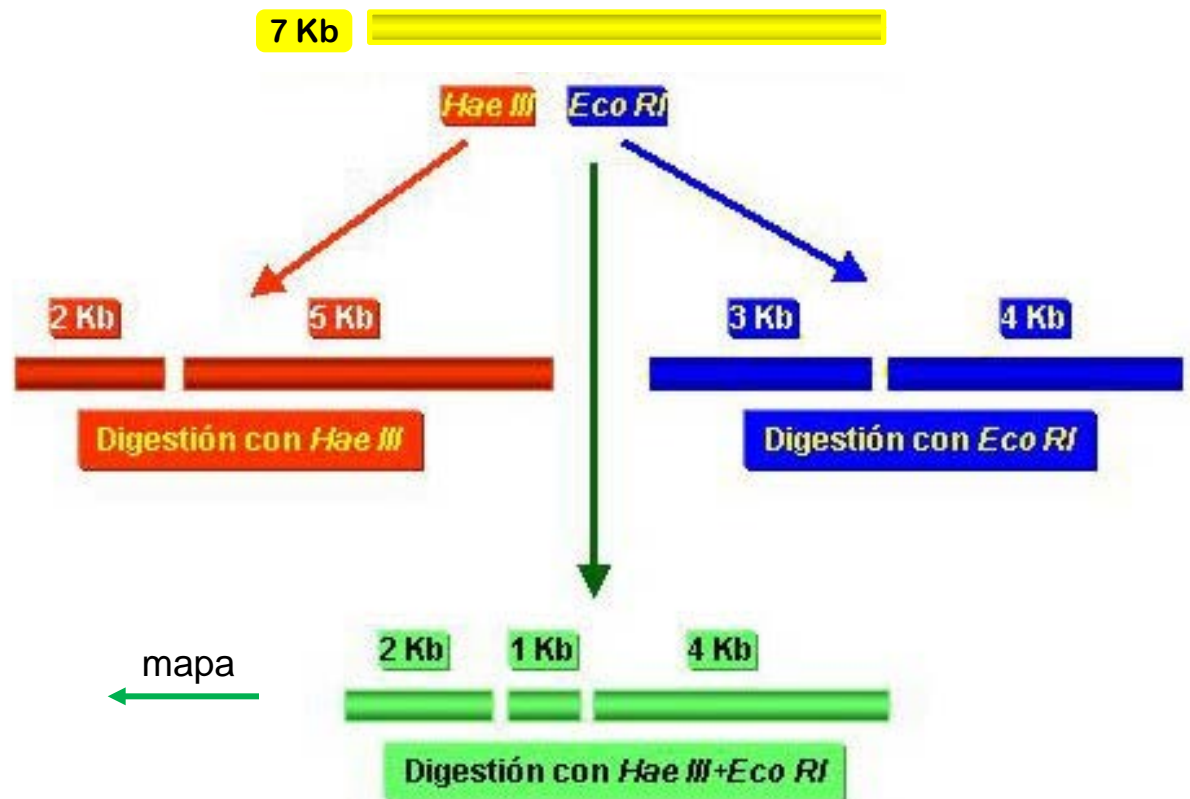
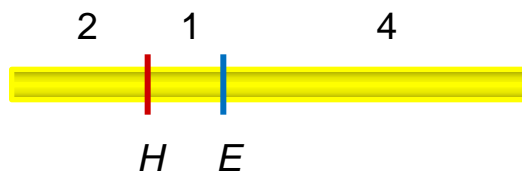
Només amb els dos enzims per separat no podem determinar el mapa.



La tècnica més utilitzada per a la realització de mapes de restricció són les digestions dobles: es tracta el DNA amb dos enzims de restricció, per separat i conjuntament, i es determinen (en gel) les mides dels fragments generats.

Suposem que tenim un fragment clonat de 7 kb:

La digestió doble (conjunta) decideix entre les dues possibilitats.



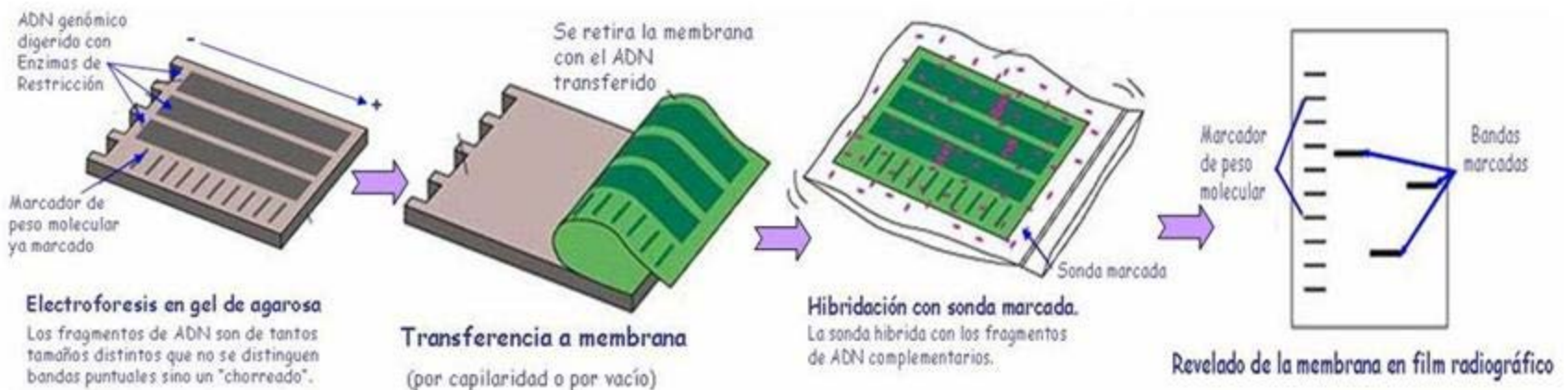
2. Utilització de sondes

Quan treballem amb DNA genòmic, únicament interessa mapejar una zona del genoma (pròxima o que incloga el gen a estudiar). Per això fem servir una sonda de DNA. Això ens permet visualitzar únicament la zona d'interès, sense que interferisca la resta de DNA (**tècnica de Southern**).



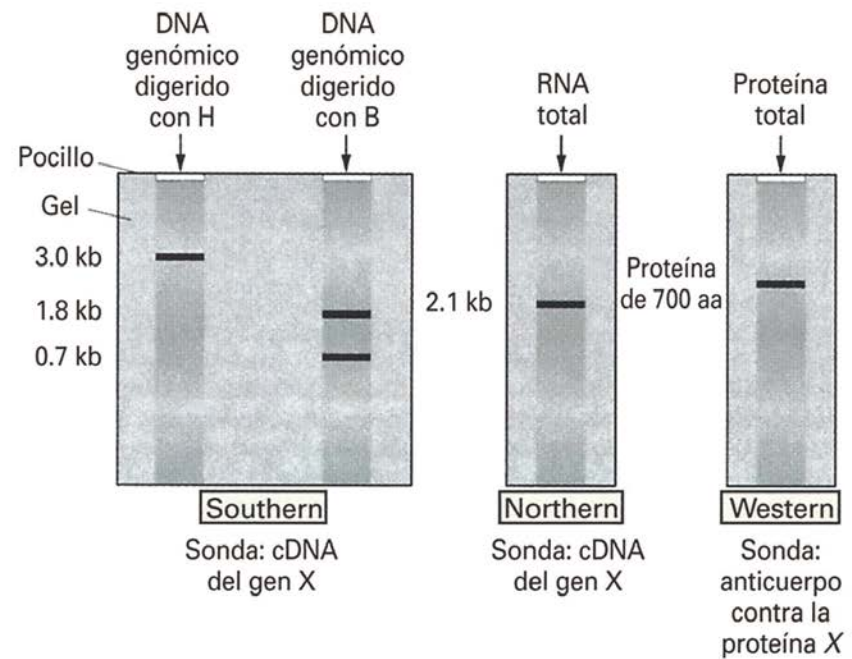
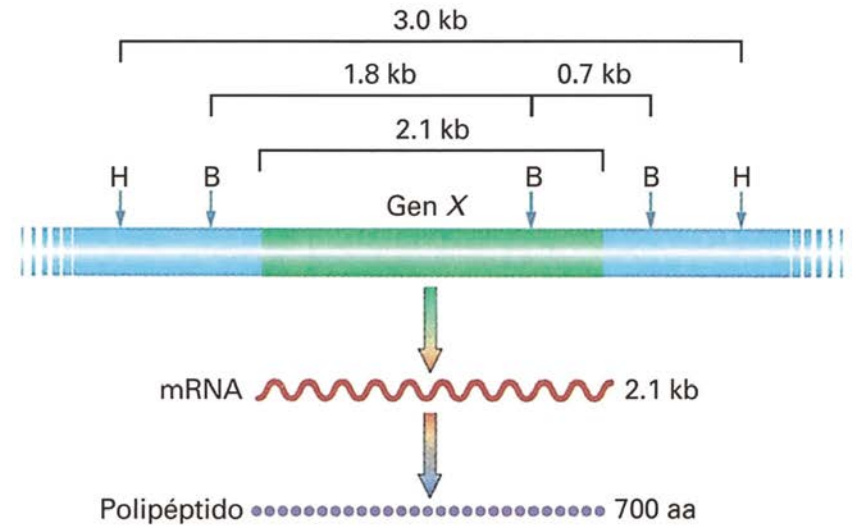
Després de la separació dels fragments de DNA, es posa una membrana absorbent sobre el gel i es transfereixen les bandes de DNA a la membrana per capil·laritat (o mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric).

La membrana se submergeix en una solució amb una sonda marcada. Per revelar la presència de bandes en el gel que tinguen seqüències homòlogues amb la sonda, s'exposa la membrana a una pel·lícula sensible a raigs X (si la sonda estava marcada radioactivament) o a una solució de color (si la sonda estava marcada amb un enzim).



➤ La tècnica de Southern pot fer-se extensiva a la detecció de molècules d'RNA (tècnica de **Northern**).

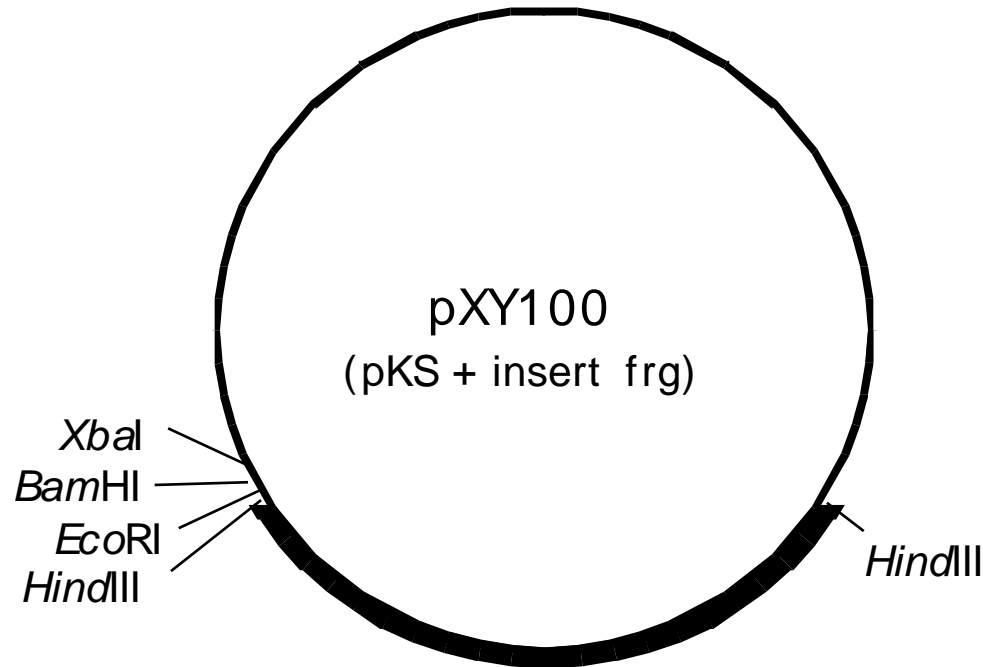
➤ Una tècnica paral·lela (tècnica de **Western**) consisteix en la transferència a membrana de proteïnes fraccionades en un gel, seguida de la seua visualització mitjançant la utilització d'anticossos.



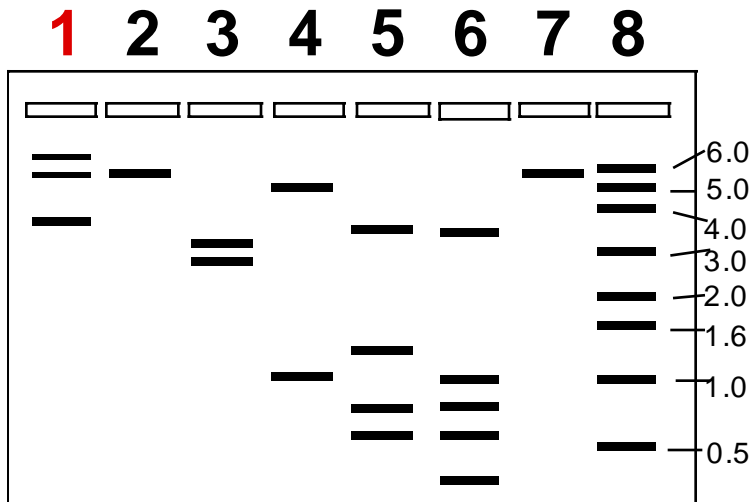
3. Elaboració de mapes circulars

Els plasmidis donen lloc a mapes circulars. Per la seua xicoteta mida, no acostuma a ser necessari fer servir sondes.

Suposem que tenim clonat un fragment de DNA en el següent vector i volem saber quins llocs de restricció hi ha dins del fragment clonat (insert).

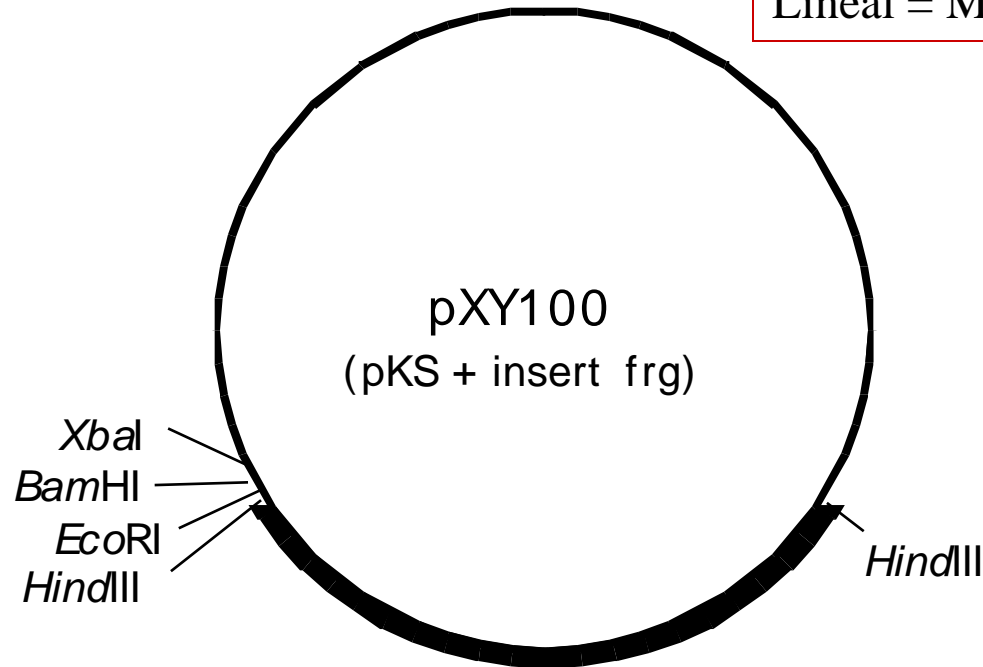


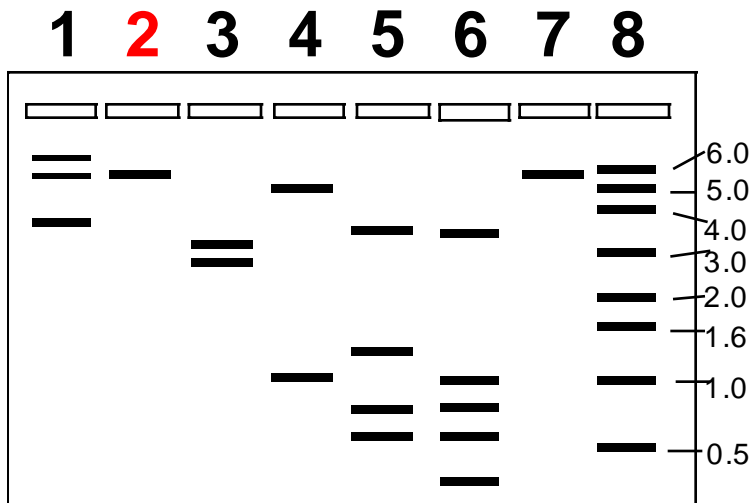
Resultat de les digestions:



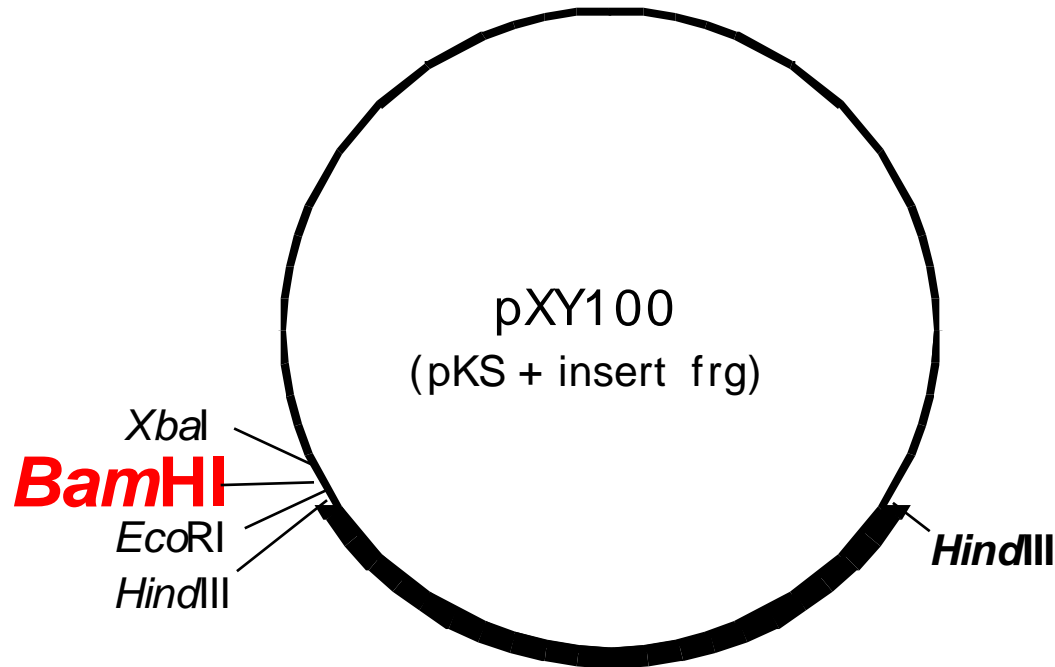
- Lane 1 = Uncut
- Lane 2 = *Bam*HI -Linearized
- Lane 3 = *Hind*III -2 Frgs.
- Lane 4 = *Eco*RI - 2 Frgs
- Lane 5 = *Xba*I - 4 frgs.
- Lane 6 = *Eco*RI/ *Xba*I - 5 (6) Frgs
- Lane 7 = *Bgl*II
- Lane 8 = Markers

Superenrotllat = $\sim 1/2x$ MW
Tall en una cadena = $\sim 2x$ MW
Lineal = MW

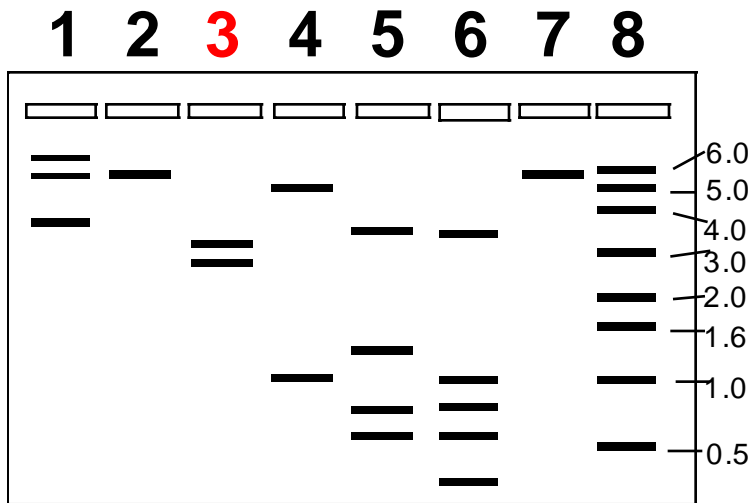




- Lane 1 = Uncut
- Lane 2 = *Bam*HI -Linearized
- Lane 3 = *Hind*III -2 Frgs.
- Lane 4 = *Eco*RI - 2 Frgs
- Lane 5 = *Xba*I - 4 frags.
- Lane 6 = *Eco*RI/ *Xba*I - 5 (6) Frgs
- Lane 7 = *Bg*II
- Lane 8 = Markers

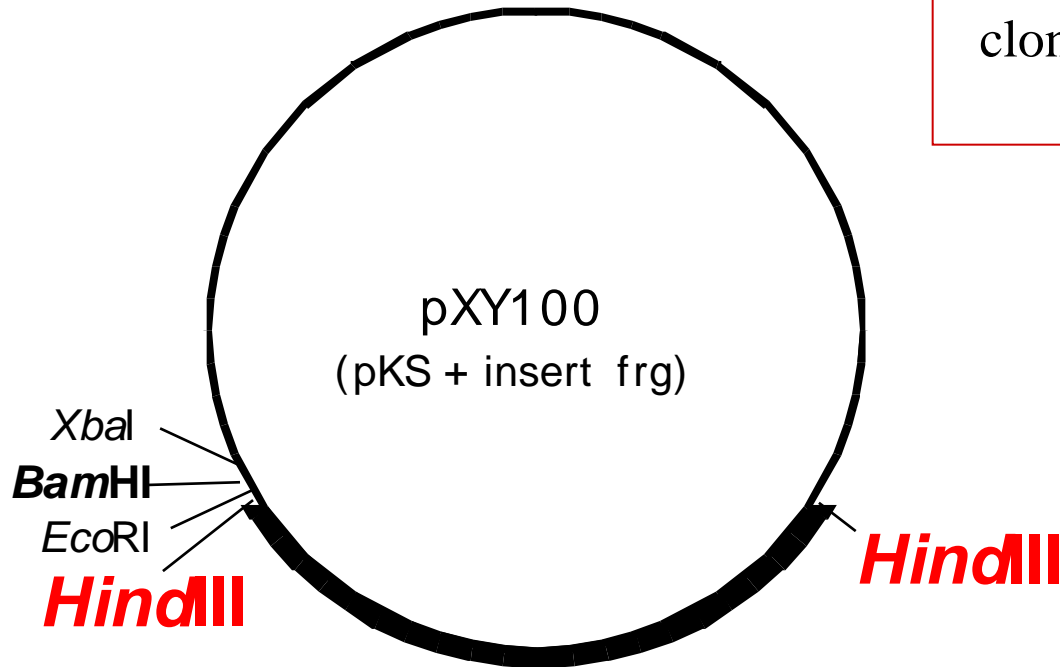


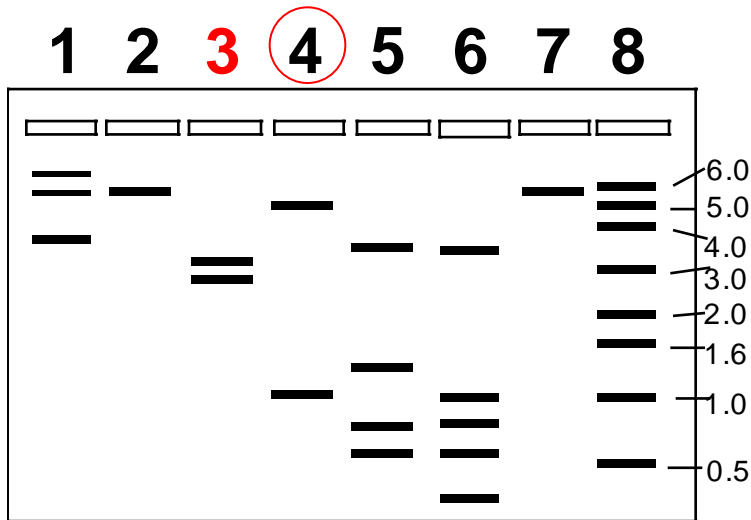
Lineal = 6 kb
 Vector = 2.9 kb
 Insert → 3.1



- Lane 1 = Uncut
- Lane 2 = *Bam*HI -Linearized
- Lane 3 = *Hind*III -2 Frgs.
- Lane 4 = *Eco*RI - 2 Frgs
- Lane 5 = *Xba*I - 4 frgs.
- Lane 6 = *Eco*RI/ *Xba*I - 5 (6) Frgs
- Lane 7 = *Bg*II
- Lane 8 = Markers

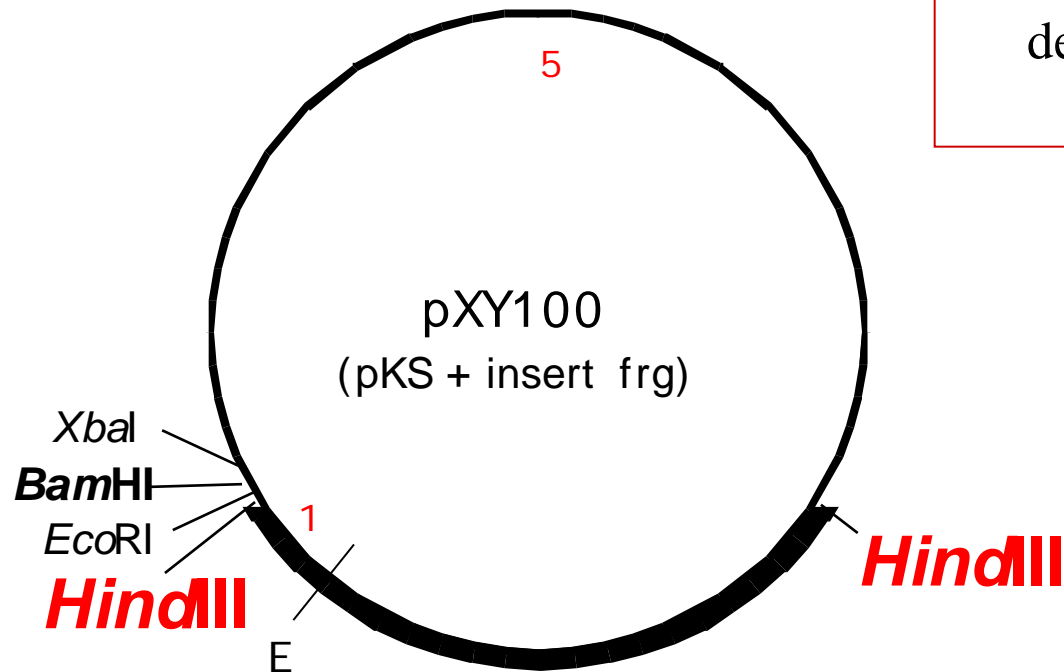
L'insert ha sigut clonat en un lloc *Hind* III

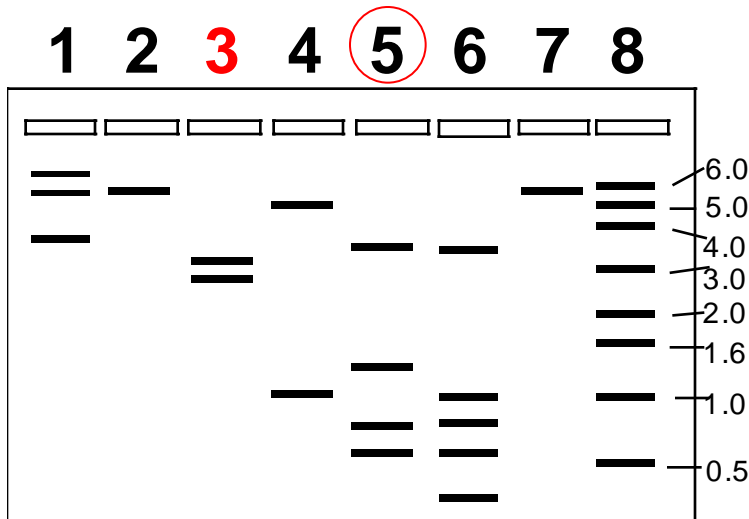




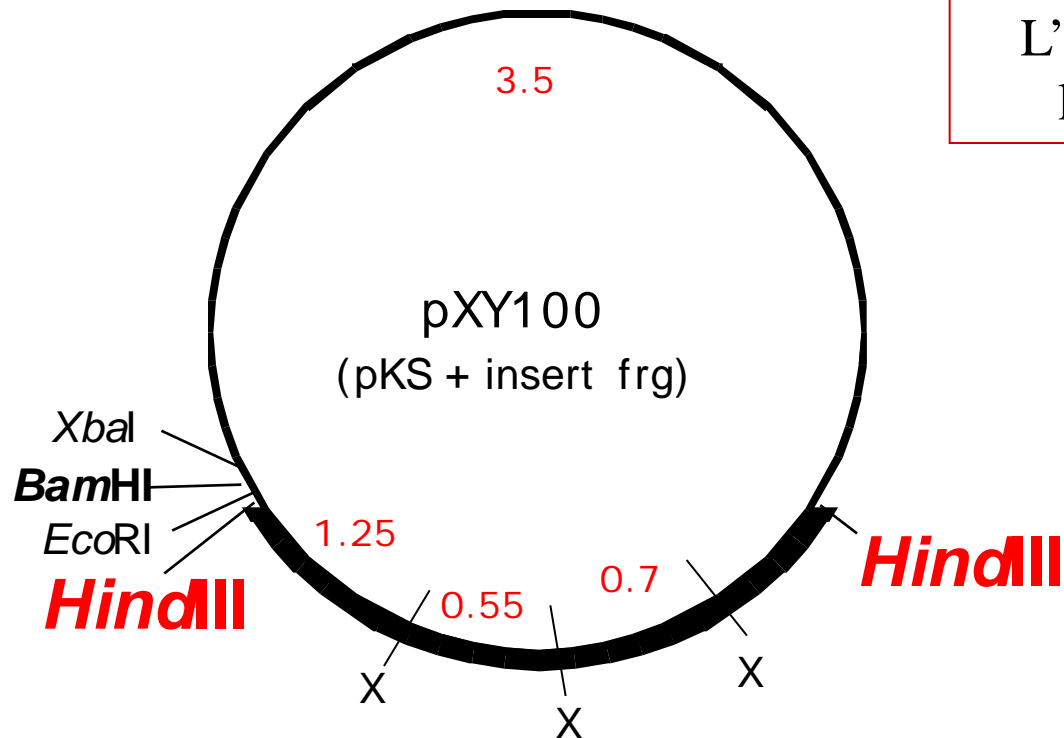
- Lane 1 = Uncut
- Lane 2 = *Bam*HI -Linearized
- Lane 3 = *Hind*III -2 Frgs.
- Lane 4 = *Eco*RI - 2 Frgs
- Lane 5 = *Xba*I - 4 frags.
- Lane 6 = *Eco*RI/ *Xba*I - 5 (6) Frgs
- Lane 7 = *Bg*II
- Lane 8 = Markers

L'insert té un lloc de restricció *Eco*RI

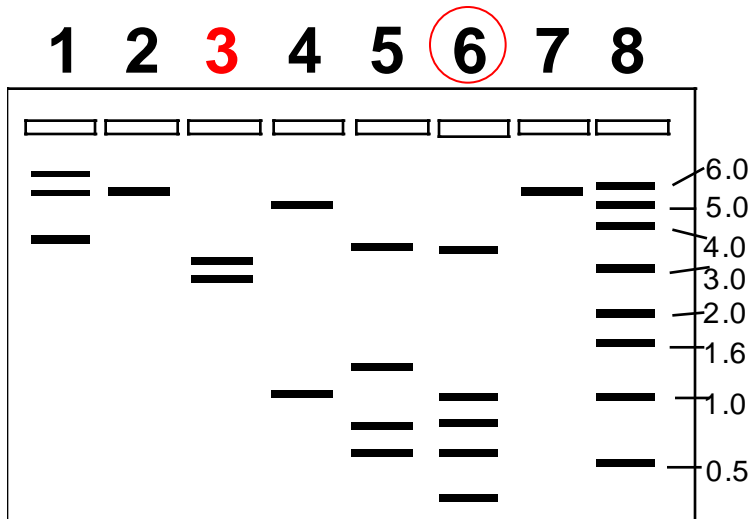




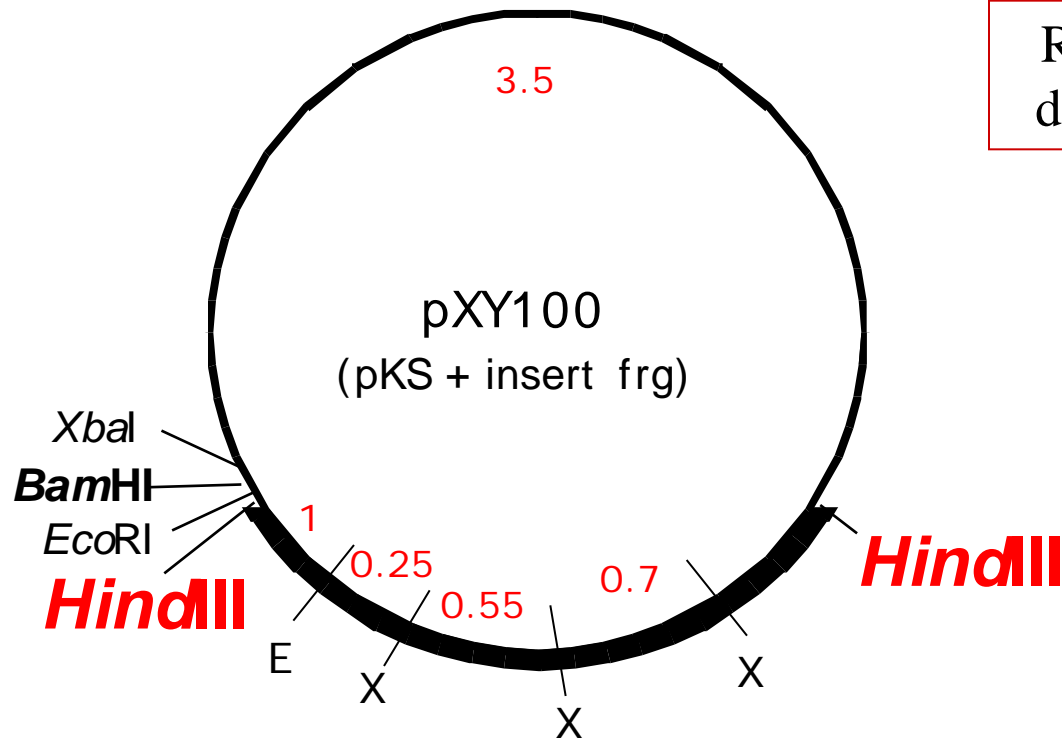
- Lane 1 = Uncut
- Lane 2 = *Bam*HI -Linearized
- Lane 3 = *Hind*III -2 Frgs.
- Lane 4 = *Eco*RI - 2 Frgs
- Lane 5 = *Xba*I - 4 frgs.
- Lane 6 = *Eco*RI/ *Xba*I - 5 (6) Frgs
- Lane 7 = *Bg*III
- Lane 8 = Markers



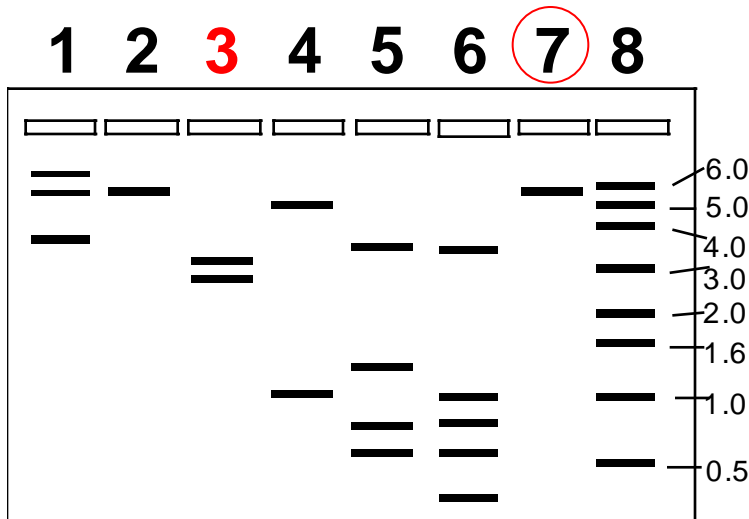
L'insert té tres llocs *Xba*I



- Lane 1 = Uncut
- Lane 2 = *Bam*HI -Linearized
- Lane 3 = *Hind*III -2 Frgs.
- Lane 4 = *Eco*RI - 2 Frgs
- Lane 5 = *Xba*I - 4 frgs.
- Lane 6 = *Eco*RI/ *Xba*I - 5 (6) Frgs
- Lane 7 = *Bg*II
- Lane 8 = Markers

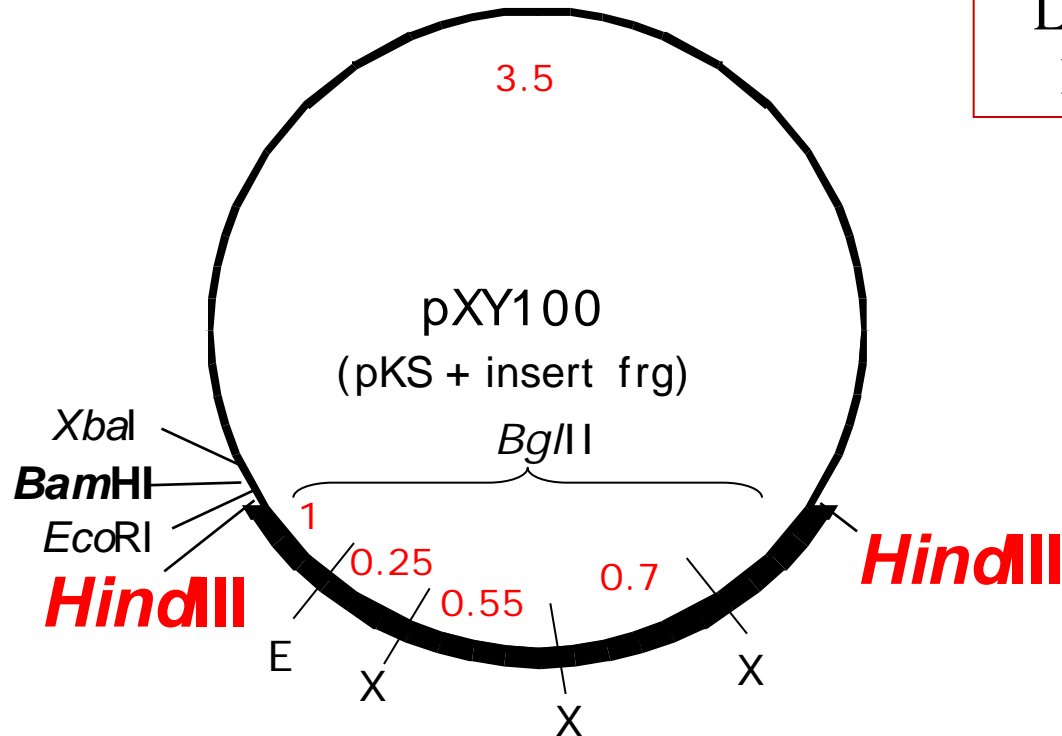


Resultat de la digestió doble



- Lane 1 = Uncut
- Lane 2 = *Bam*HI -Linearized
- Lane 3 = *Hind*III -2 Frgs.
- Lane 4 = *Eco*RI - 2 Frgs
- Lane 5 = *Xba*I - 4 frgs.
- Lane 6 = *Eco*RI/ *Xba*I - 5 (6) Frgs
- Lane 7 = *Bgl*II
- Lane 8 = Markers

L'insert té un lloc *Bgl* II



COM HEM ARRIBAT A ORDENAR ELS LLOCS DE RESTRICCIÓ?

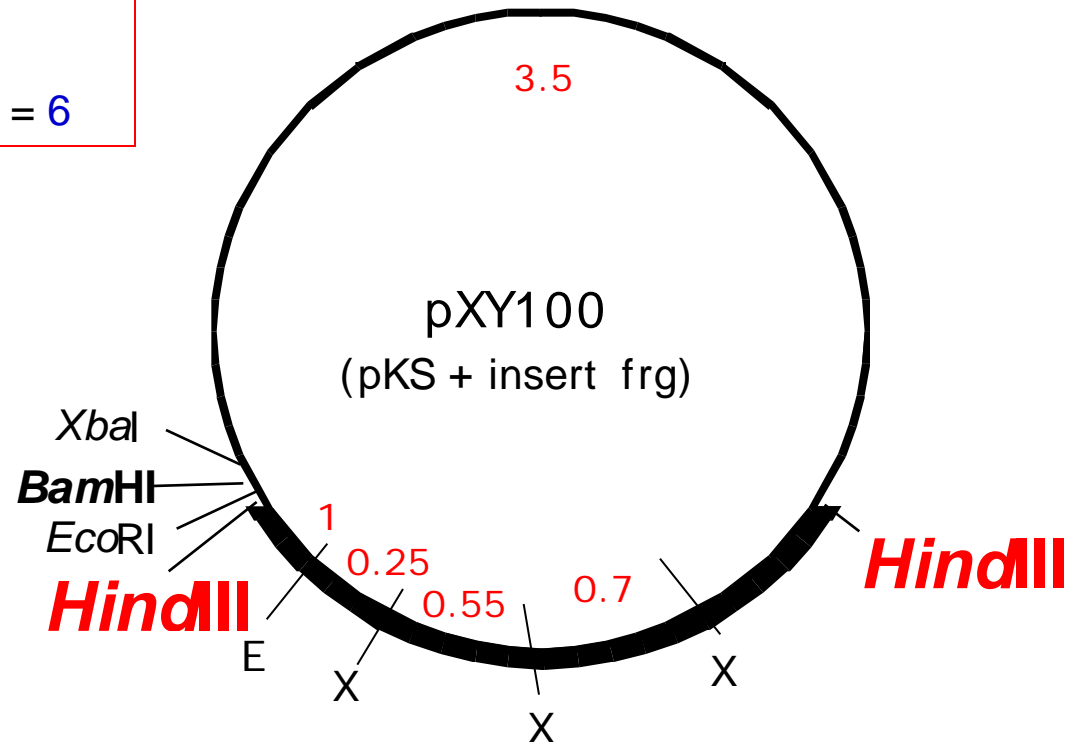
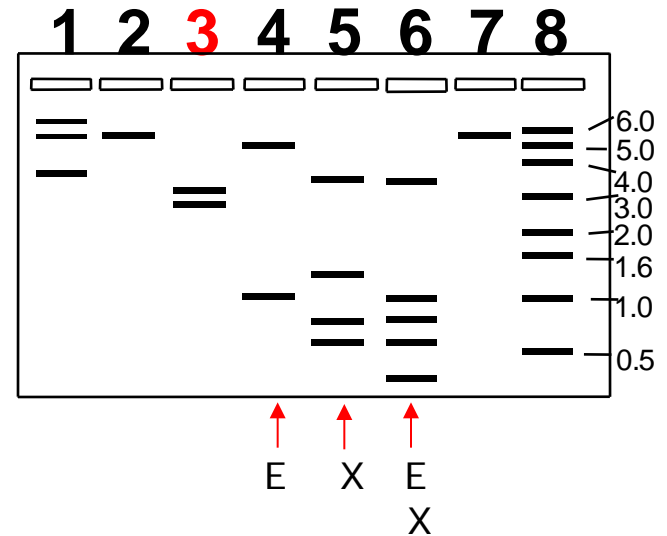
1) Hem comprovat que tots els fragments sumen el mateix total (només per a mapes sense utilitzar sonda).

$$EcoRI : 5 + 1 = 6$$

$$XbaI : 3.5 + 1.25 + 0.7 + 0.55 = 6$$

$$E + X : 3.5 + 1 + 0.7 + 0.55 + 0.25 = 6$$

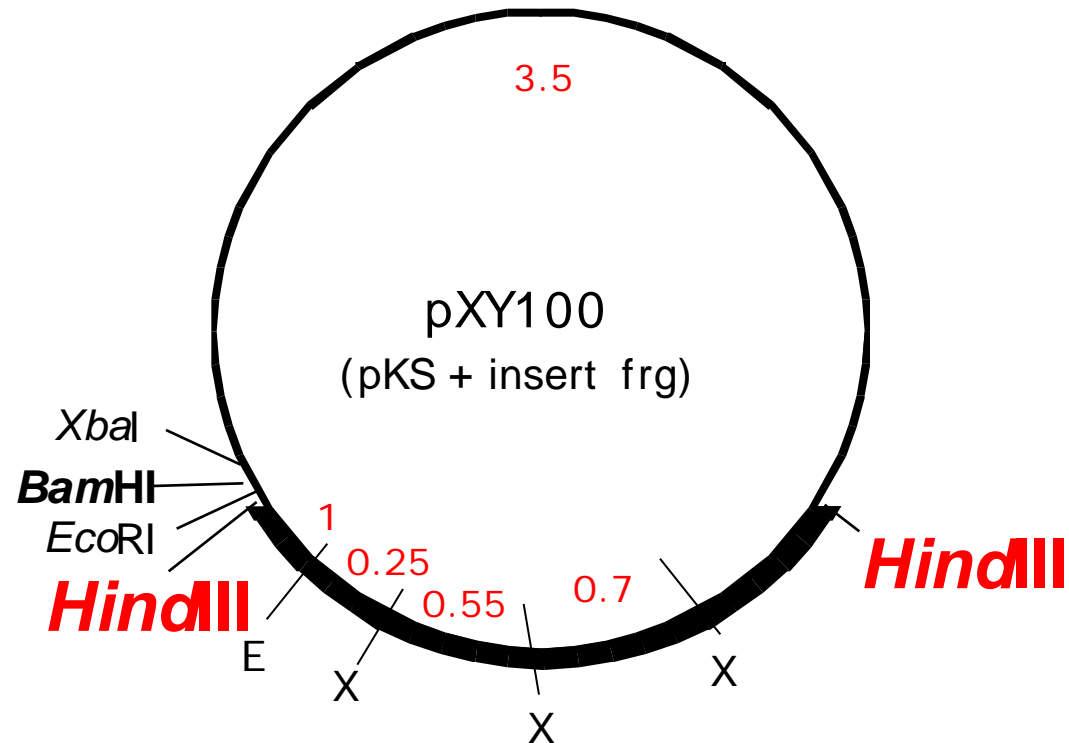
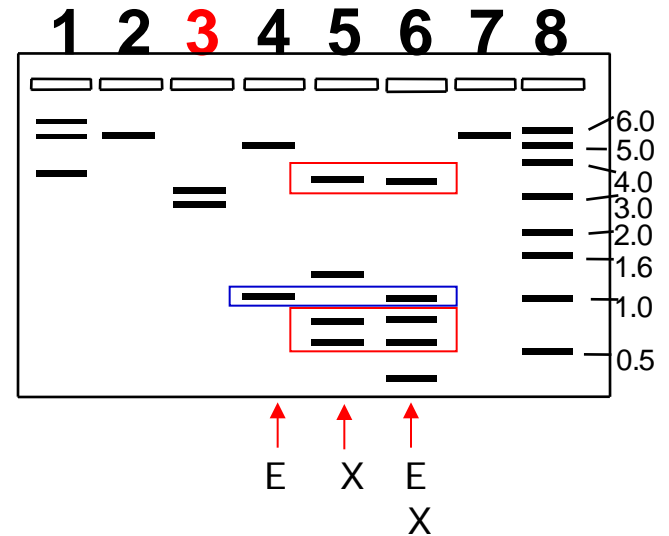
Si no haguessen sumat el mateix, haguérem deduït que o bé dos fragments tenen la mateixa mida o que algun s'ha perdut per ser massa menut.



2) Hem identificat aquells fragments que apareixen simultàniament en les digestions senzilles i en les digestions dobles.

<i>EcoRI</i>	<i>XbaI</i>	<i>E + X</i>
5		
	3.5	→ 3.5
	1.25	
1		→ 1
	0.7	→ 0.7
	0.55	→ 0.55
		0.25

D'aquesta manera identifiquem els fragments generats per un sol enzim de restricció.

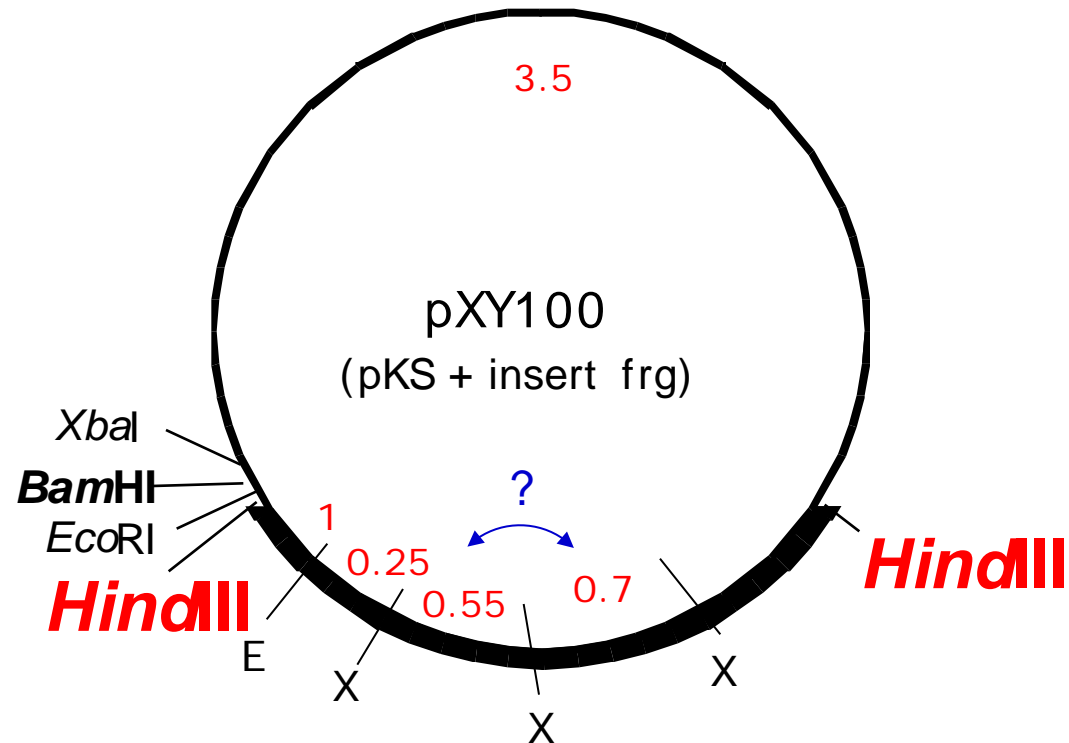
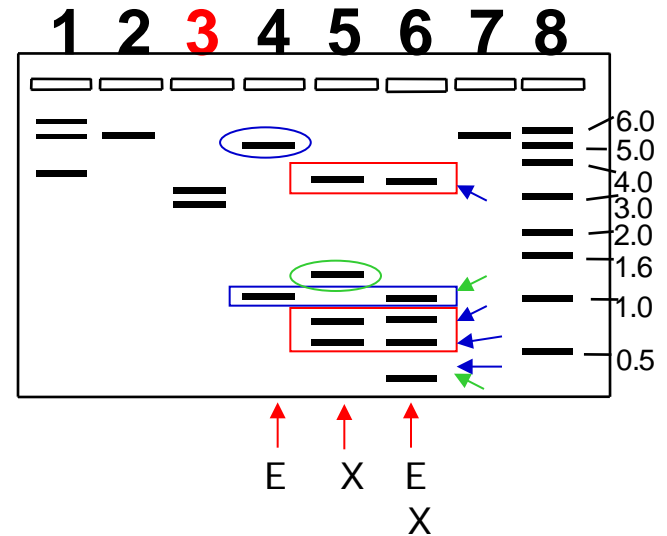


3) Finalment hem relacionat els fragments de les digestions senzilles amb combinacions de fragments de les digestions dobles.

<i>EcoRI</i>	<i>XbaI</i>	<i>E + X</i>
5		3.5
	3.5	1.25
1		1
	0.7	0.7
	0.55	0.55
		0.25

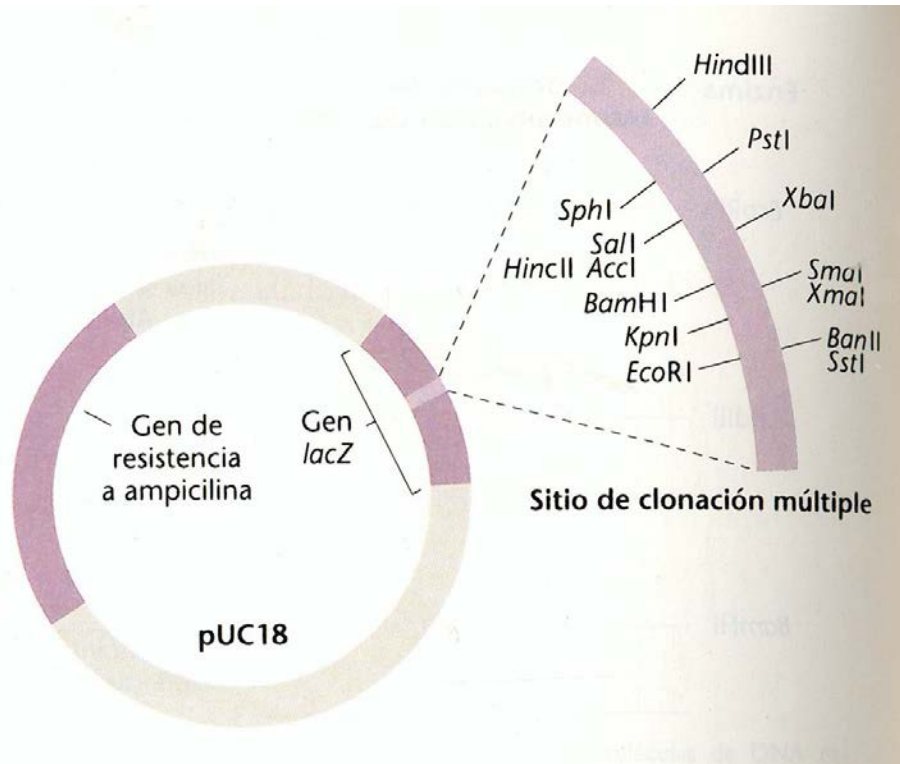
$$1.25 = 1 + 0.25$$

$$5 = 3.5 + 0.7 + 0.55 + 0.25$$

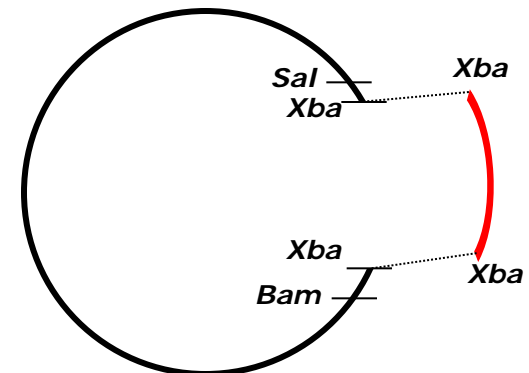


Nota sobre la utilització de vectors plasmídics per a la clonació de fragments específics de DNA:

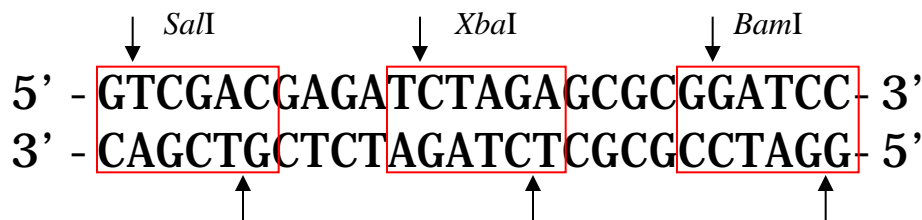
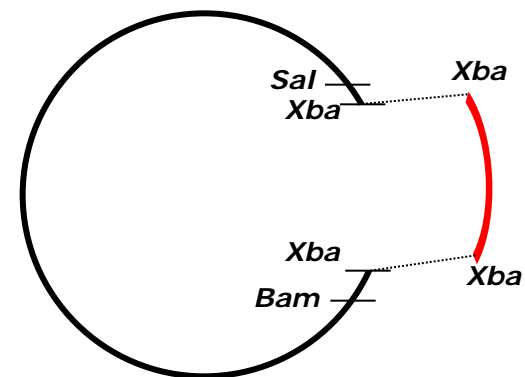
pUC18: És un vector usat comunament, de 2,69 kb. Posseeix un lloc de clonatge múltiple que s'utilitza per inserir el fragment de DNA a clonar.



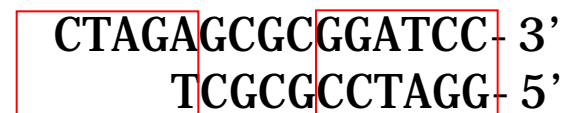
➤ La utilització d'un determinat enzim de restricció per clonar un fragment de DNA generarà la duplicació del lloc de restricció al plasmidi resultant:



Detall de com és un lloc de clonació múltiple i de com es duplica el lloc de restricció utilitzat per clonar un fragment de DNA:



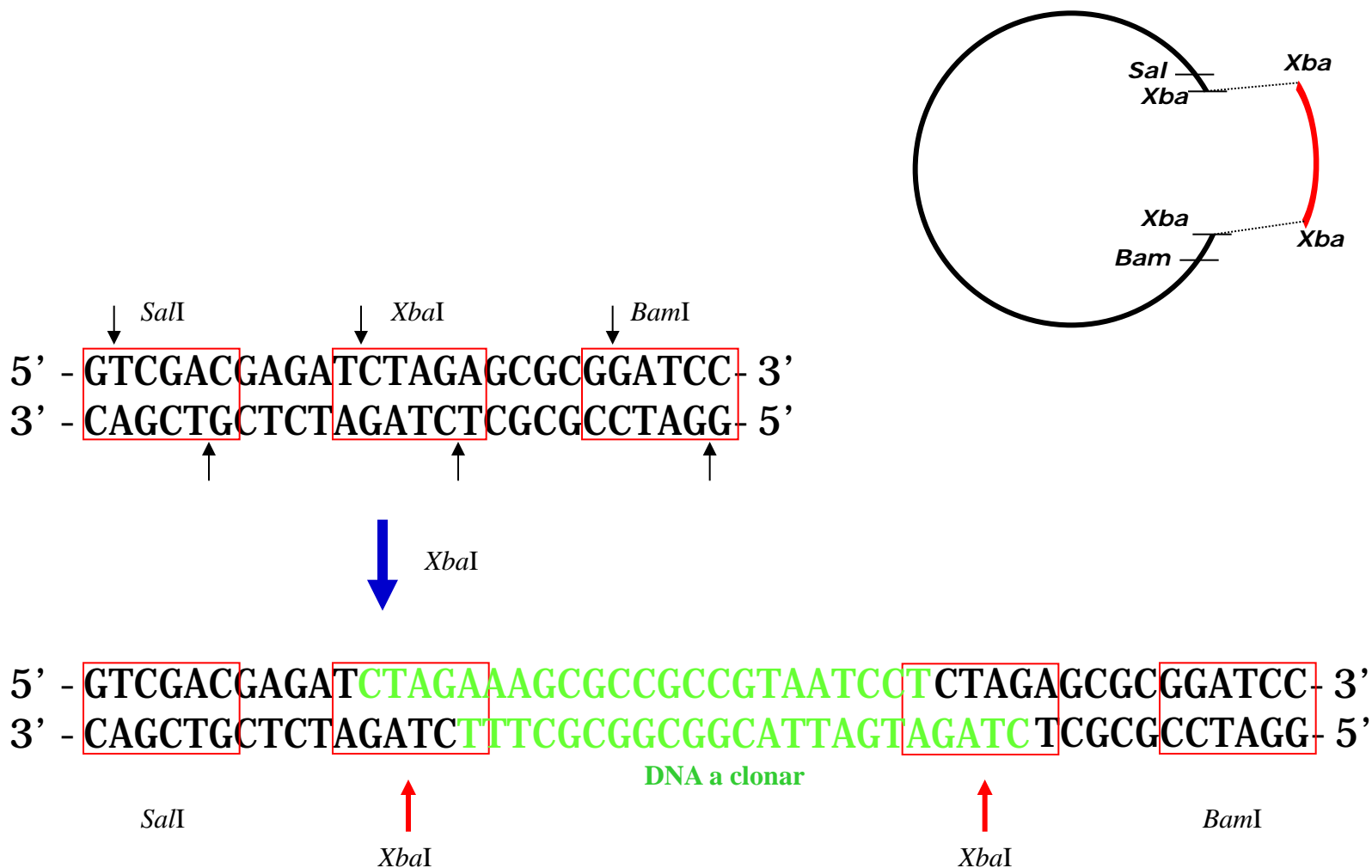
SalI



BamI

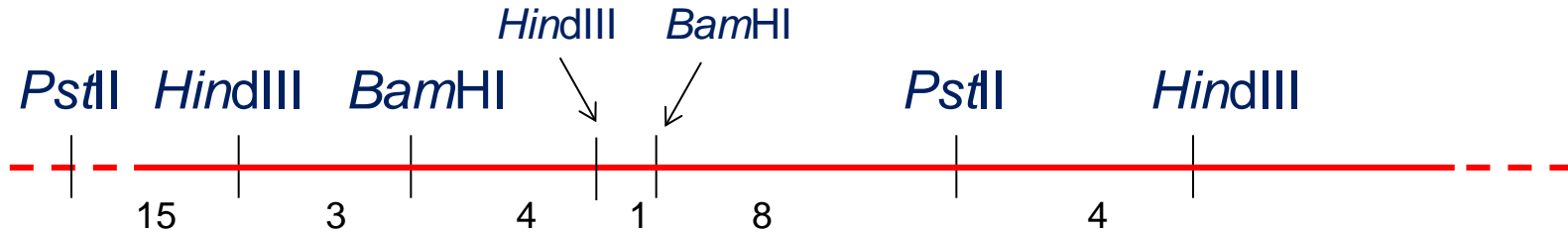
CTAGAAAGCGCCGCGTAATCCT
 TTTCGCGGCGGCATTAGTAGATC
 DNA a clonar

Detall de com és un lloc de clonació múltiple i de com es duplica el lloc de restricció utilitzat per clonar un fragment de DNA:



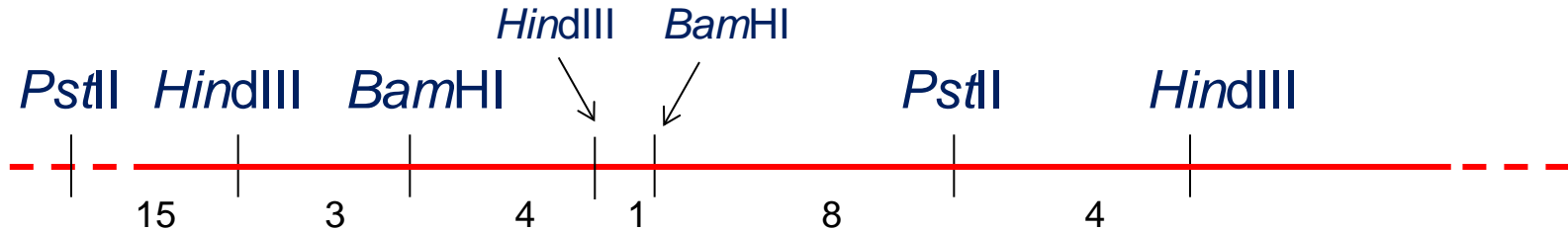
4. Elaboració de mapes lineals

Suposem el mapa del següent fragment de DNA genòmic (distàncies en kb):

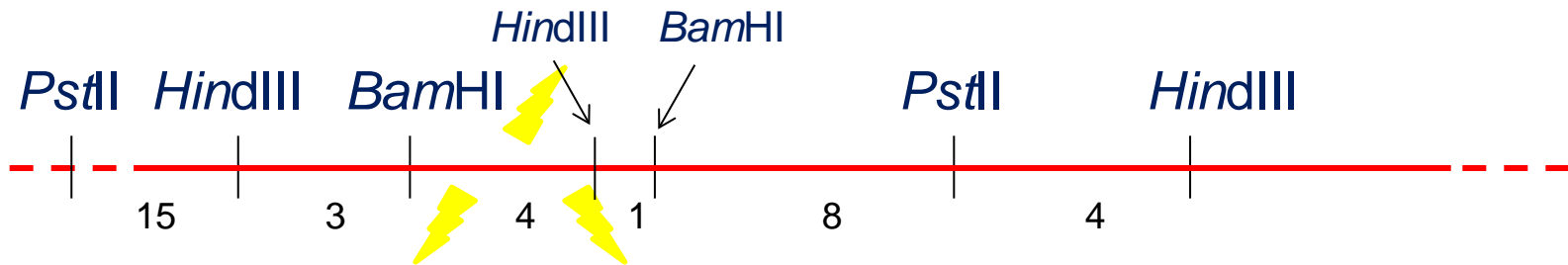


4. Elaboració de mapes lineals

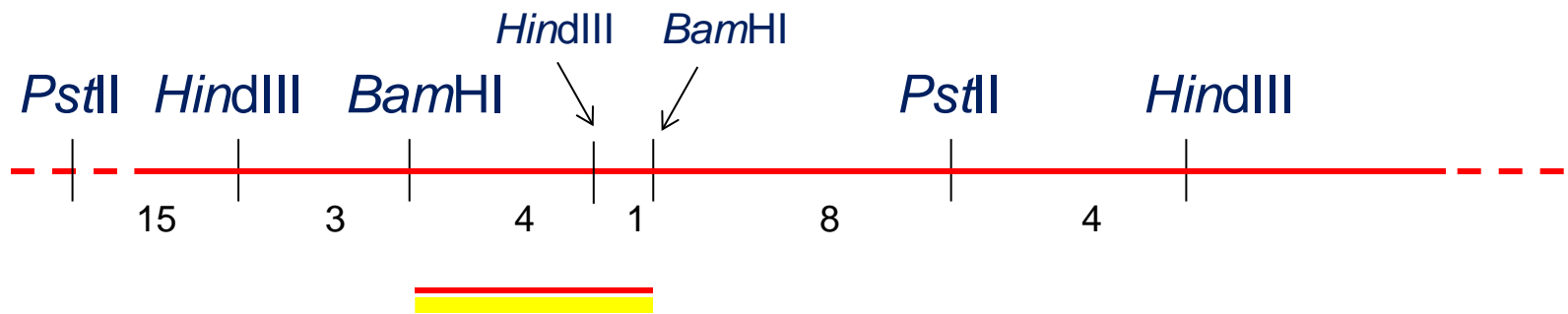
Suposem el mapa del següent fragment de DNA genòmic (distàncies en kb):



Suposem ara que hem tallat amb *Bam*HI i aquest fragment l'hem marcat (amb radioactivitat o amb fluorescència) i, per tant, el podem fer servir de sonda per a aquesta zona del DNA.

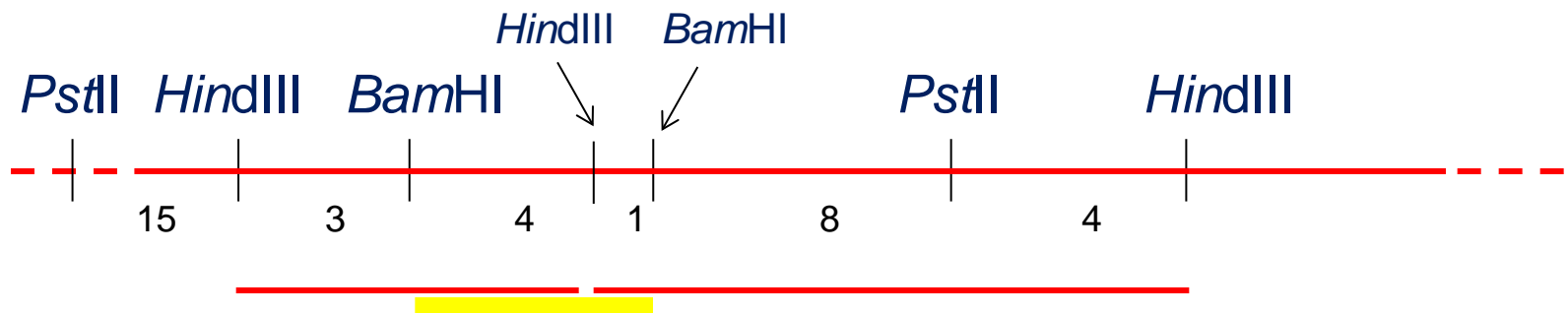



sonda *Bam*HI-*Bam*HI



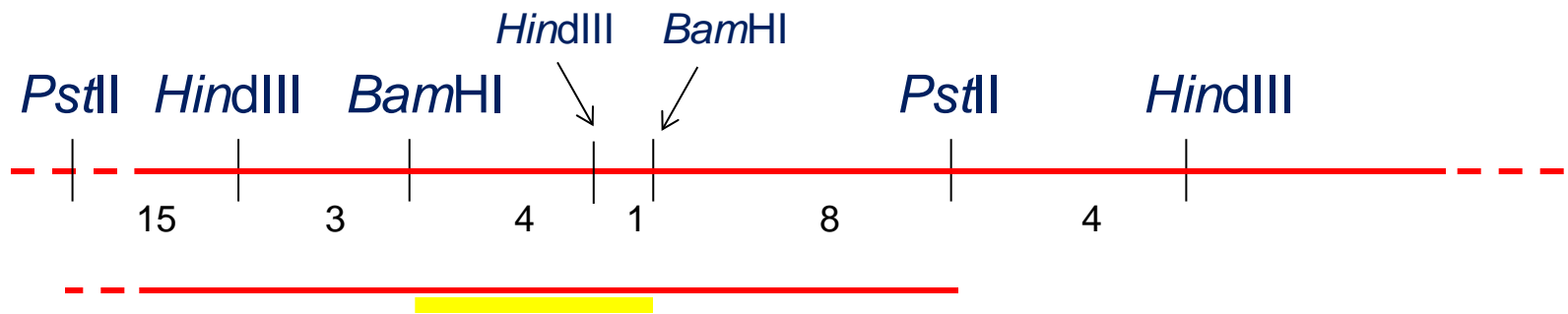
Quins fragments generaran les incubacions amb els diferents enzims de restricció i quins seran visualitzats amb la sonda?

*Bam*HI *Hind*III *Pst*I *Bam*HI + *Hind*III *Bam*HI + *Pst*I *Hind*III + *Pst*I



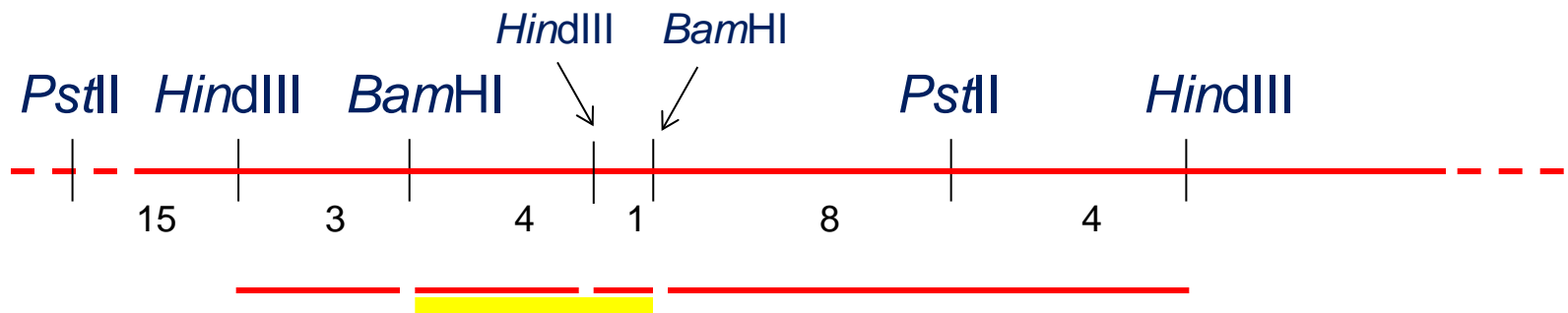
Quins fragments generaran les incubacions amb els diferents enzims de restricció i quins seran visualitzats amb la sonda?

<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	<i>Pst</i> I	<i>Bam</i> HI + <i>Hind</i> III	<i>Bam</i> HI + <i>Pst</i> I	<i>Hind</i> III + <i>Pst</i> I
5	13				
	7				



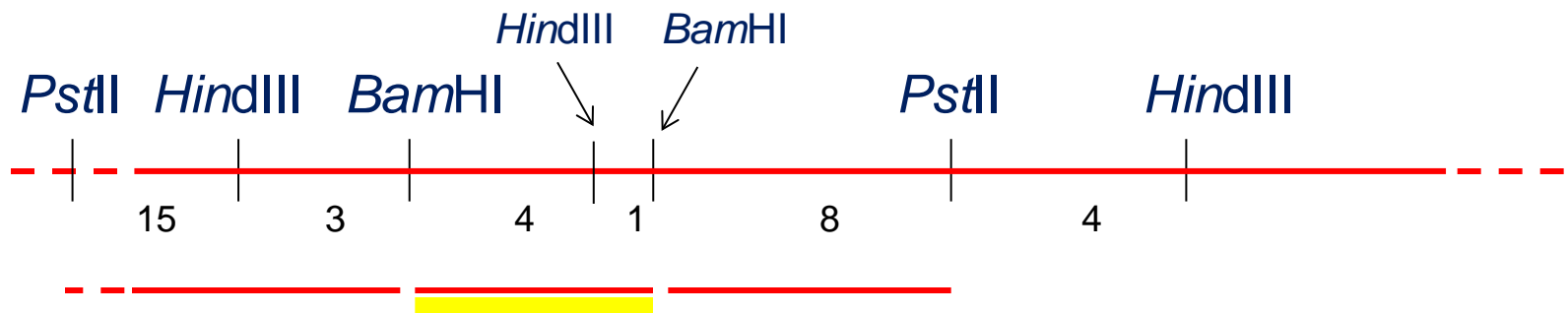
Quins fragments generaran les incubacions amb els diferents enzims de restricció i quins seran visualitzats amb la sonda?

<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	<i>Pst</i> I	<i>Bam</i> HI + <i>Hind</i> III	<i>Bam</i> HI + <i>Pst</i> I	<i>Hind</i> III + <i>Pst</i> I
5	13	31			
	7				



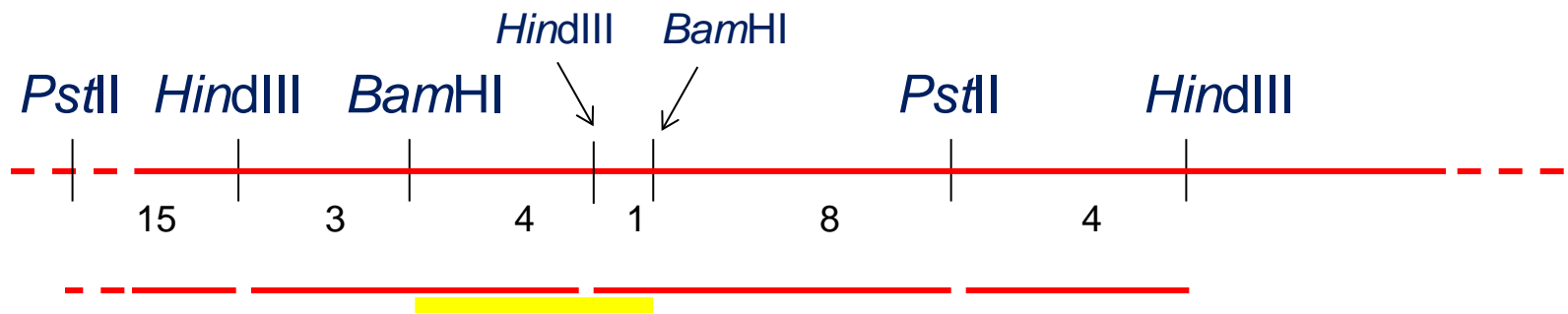
Quins fragments generaran les incubacions amb els diferents enzims de restricció i quins seran visualitzats amb la sonda?

<i>BamHI</i>	<i>HindIII</i>	<i>PstI</i>	<i>BamHI + HindIII</i>	<i>BamHI + PstI</i>	<i>HindIII + PstI</i>
5	13	31	4		
	7		1		



Quins fragments generaran les incubacions amb els diferents enzims de restricció i quins seran visualitzats amb la sonda?

<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	<i>Pst</i> I	<i>Bam</i> HI + <i>Hind</i> III	<i>Bam</i> HI + <i>Pst</i> I	<i>Hind</i> III + <i>Pst</i> I
5	13	31	4	5	
	7		1		

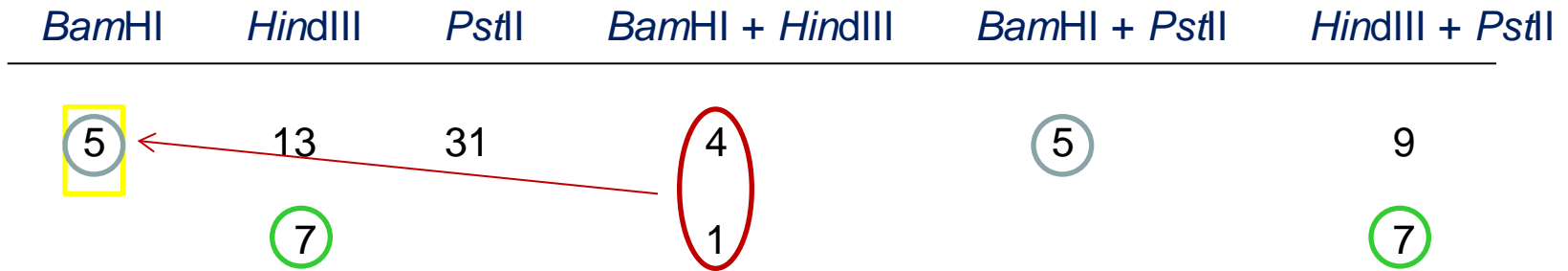


Quins fragments generaran les incubacions amb els diferents enzims de restricció i quins seran visualitzats amb la sonda?

<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	<i>Pst</i> II	<i>Bam</i> HI + <i>Hind</i> III	<i>Bam</i> HI + <i>Pst</i> II	<i>Hind</i> III + <i>Pst</i> II
5	13	31	4	5	9
	7		1		7

La pregunta ara és: com ho faríem per obtenir el mapa a partir de la informació dels fragments generats pels diferents enzims de restricció?

PASSOS A SEGUIR PER DETERMINAR ELS LLOCS DE RESTRICCIÓ



- 1) A diferència dels mapes circulars sense fer servir sonda, els fragments no sumen el mateix total.
- 2) Identificarem el fragment que coincideix amb la sonda.
- 3) Identificarem aquells fragments que apareixen simultàniament en les digestions senzilles i en les digestions dobles.
- 4) Finalment relacionarem els fragments de les digestions senzilles amb combinacions de fragments de les digestions dobles.

PASSOS A SEGUIR PER DETERMINAR ELS LLOCS DE RESTRICCIÓ

<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	<i>Pst</i> II	<i>Bam</i> HI + <i>Hind</i> III	<i>Bam</i> HI + <i>Pst</i> II	<i>Hind</i> III + <i>Pst</i> II
5	13	31	4	5	9
	7		1		7

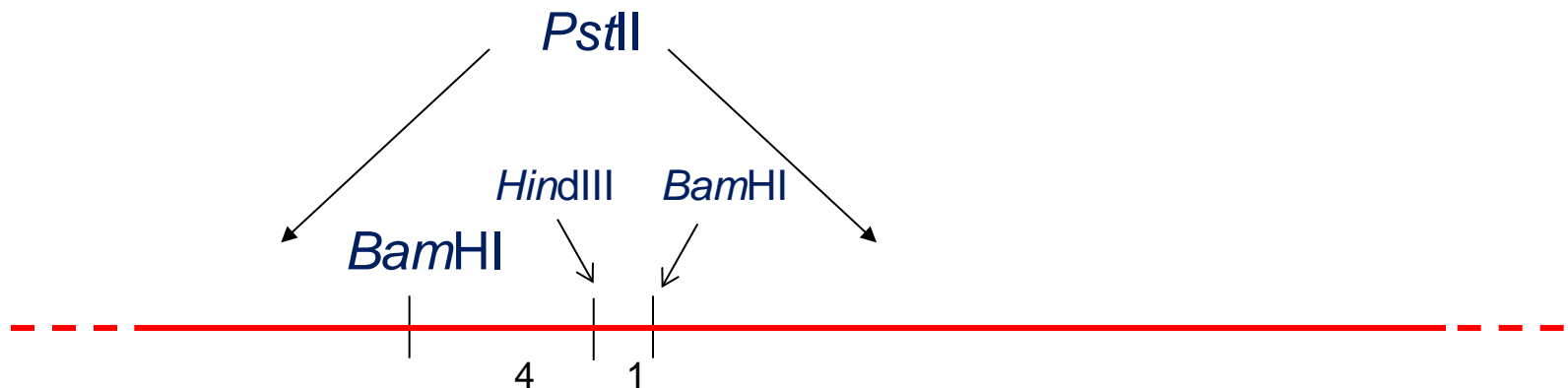
- 1) El mapa, el començarem amb el fragment que coincideix amb la sonda.



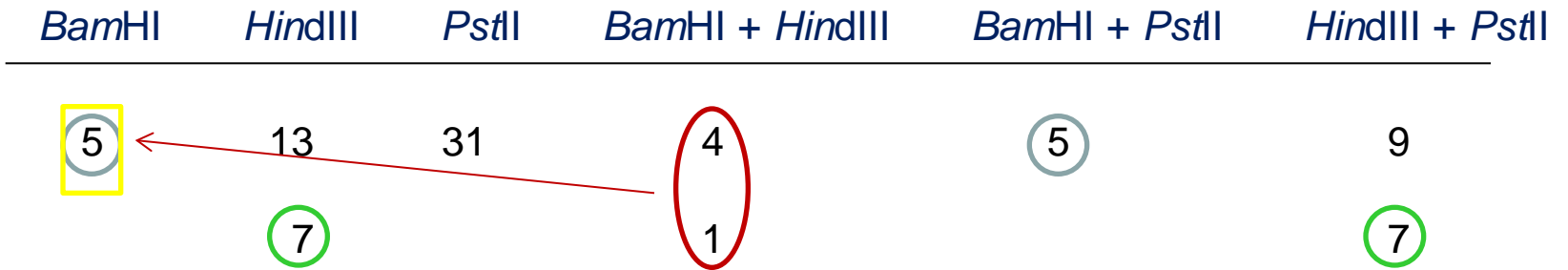
PASSOS A SEGUIR PER DETERMINAR ELS LLOCS DE RESTRICCIÓ

<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	<i>Pst</i> II	<i>Bam</i> HI + <i>Hind</i> III	<i>Bam</i> HI + <i>Pst</i> II	<i>Hind</i> III + <i>Pst</i> II
5	13	31	4	5	9
	7		1		7

- 1) El mapa, el començarem amb el fragment que coincideix amb la sonda.
- 2) Seguirem amb una combinació d'enzims que incloga el que genera la sonda.

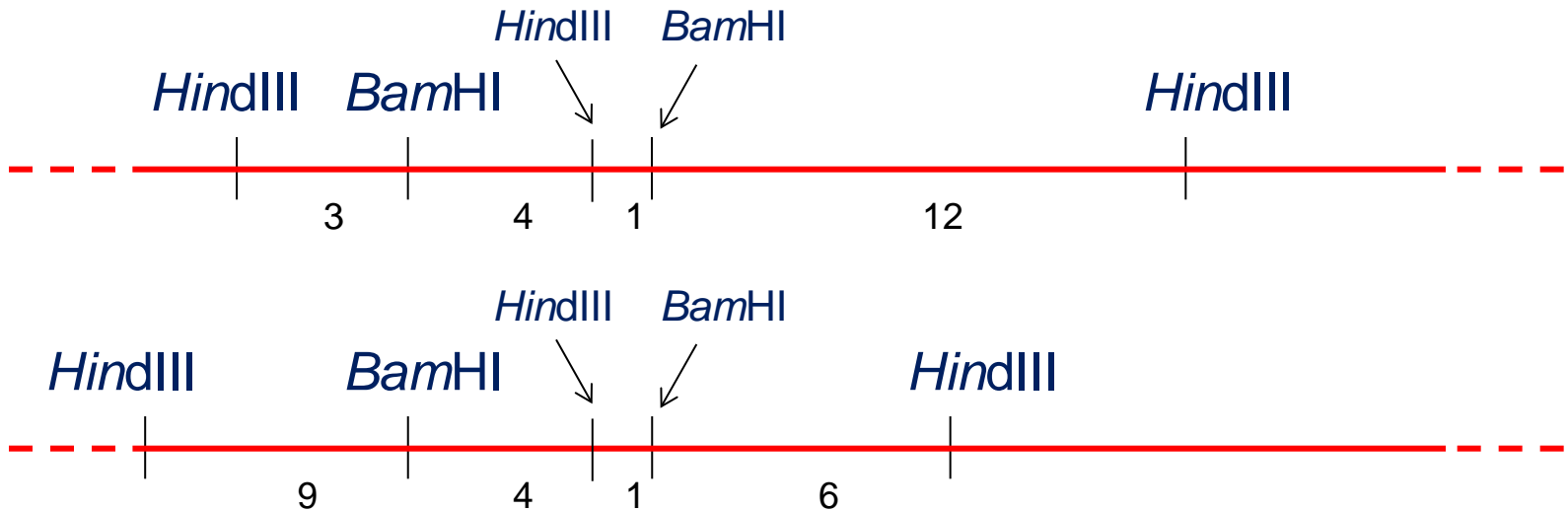


PASSOS A SEGUIR PER DETERMINAR ELS LLOCS DE RESTRICCIÓ

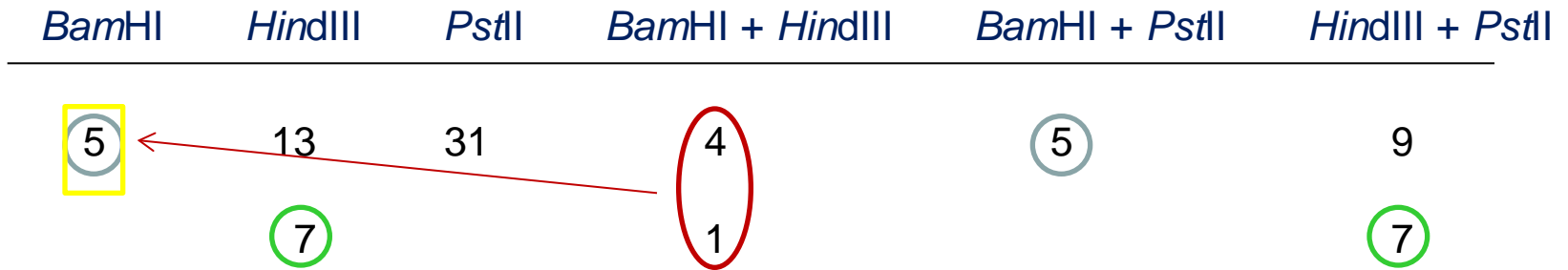


- 1) El mapa, el començarem amb el fragment que coincideix amb la sonda.
- 2) Seguirem amb una combinació d'enzims que incloga el que genera la sonda.
- 3) Continuarem amb la informació d'aquest segon enzim.

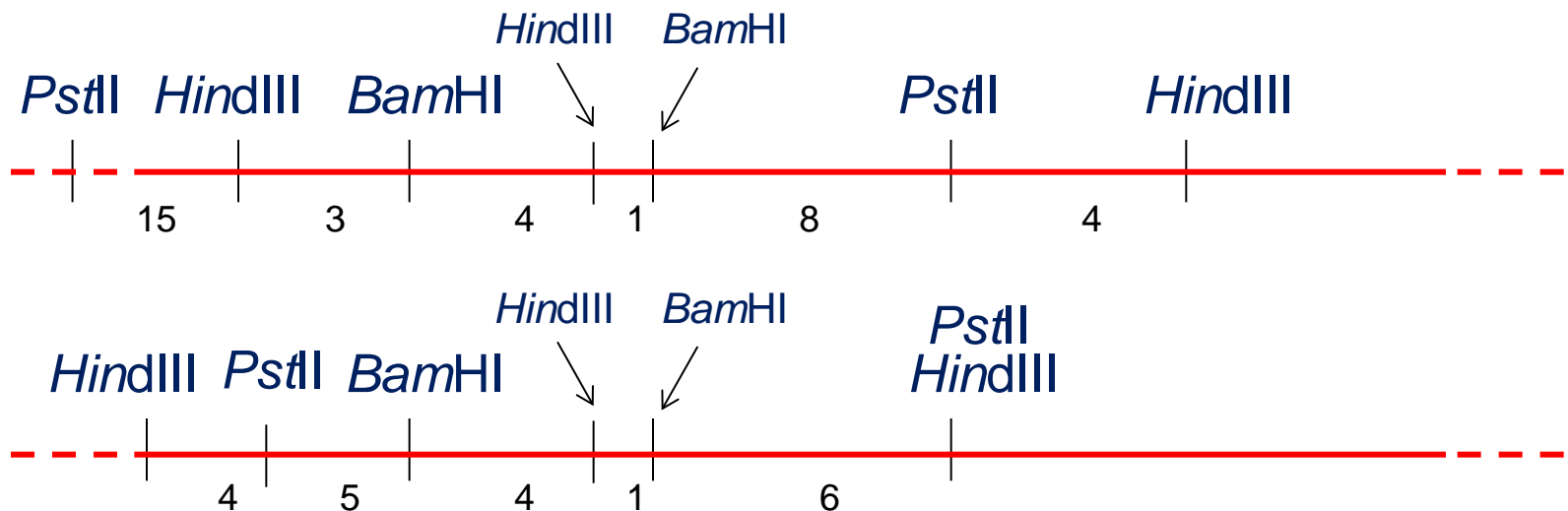
?



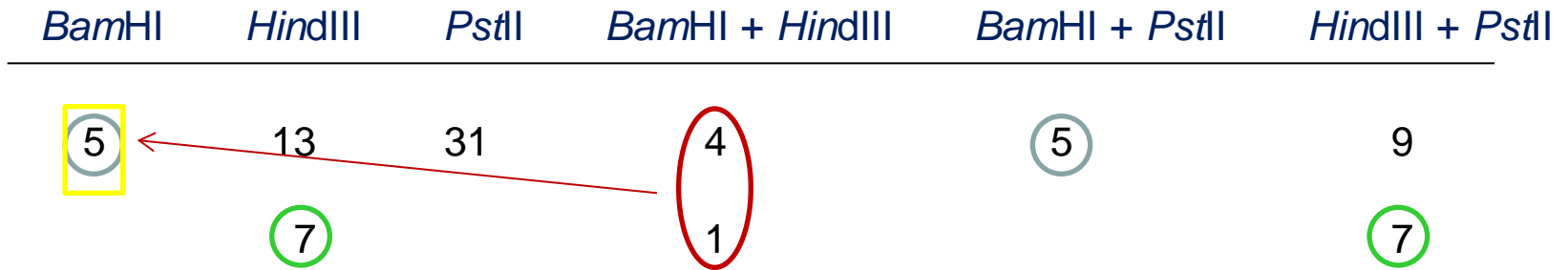
PASSOS A SEGUIR PER DETERMINAR ELS LLOCS DE RESTRICCIÓ



- 1) El mapa, el començarem amb el fragment que coincideix amb la sonda.
- 2) Seguirem amb una combinació d'enzims que incloga el que genera la sonda.
- 3) Continuarem amb la informació d'aquest segon enzim.
- 4) Afegirem la informació del tercer enzim.

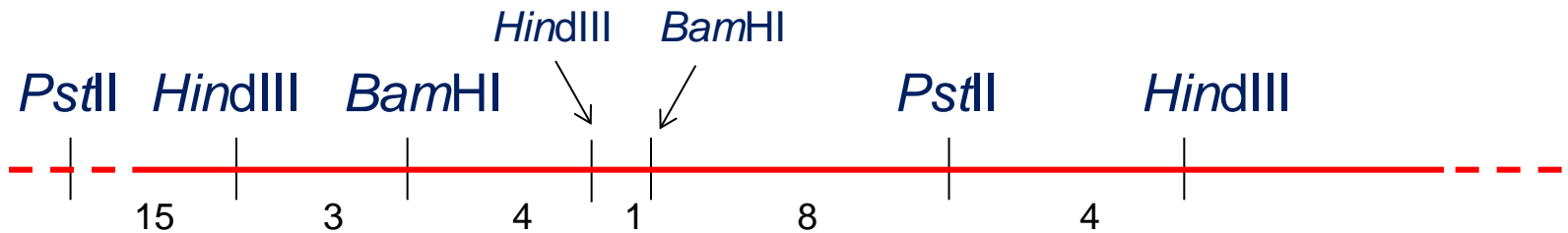


PASSOS A SEGUIR PER DETERMINAR ELS LLOCS DE RESTRICCIÓ



- 1) El mapa, el començarem amb el fragment que coincideix amb la sonda.
- 2) Seguirem amb una combinació d'enzims que incloga el que genera la sonda.
- 3) Continuarem amb la informació d'aquest segon enzim.
- 4) Afegirem la informació del tercer enzim.

$$PstII - PstII = 31$$



?

$$PstII - PstII \neq 31$$

