

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGUEZ
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

BIOL 3770L

MÓDULO III: TÉCNICA DE RFLP

(RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)

Objetivos:

1. Llevar a cabo una digestión utilizando enzimas de restricción.
2. Correr una electroforesis al producto de la digestión.
3. Determinar, luego de realizar un RFLP, si las bacterias desconocidas utilizadas pertenecen a una misma especie o no.

En [biología molecular](#), el término **polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción** o **RFLP** (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) se refiere a secuencias específicas de [nucleótidos](#) en el [ADN](#) que son reconocidas y cortadas por las [enzimas de restricción](#) (también llamadas [endonucleasas](#) de restricción) . Las enzimas de restricción son enzimas celulares que reconocen secuencias específicas cortas en el DNA y producen un corte en cada una de las cadenas sencillas de este. (Información sacada de Wikipedia y BROCK, décima edición.)

- RFLP se refiere a la diferencia que puede haber entre moléculas de DNA homólogas debido a la diferencia en la localización de sitios de restricción.
- La muestra es sometida a digestión por enzimas de restricción.
- Los productos de la digestión con una enzima de restricción pueden separarse al correr una gel de electroforesis. Observaremos diferentes bandas en la gel de agarosa donde cada banda representa un fragmento de DNA de diferente peso molecular.

EJ: Muestra cortada con enzima Pst I, la cual tiene sitio de restricción **CTGCA'G (enzima corta antes de G)**

¿Cuántos fragmentos se forman en los siguientes ejemplos?

- 1) ATGCAGT**CTGCA'** / GTTAGTAATGCATCA (dos fragmentos)
- 2) TTG**CTGCA'** / GAGCCT**CTGCA'** / GGTGTAC (tres fragmentos)

Parte Práctica: Para realizar la digestión

En un microtubo de PCR mezclar en este orden:

- Agua dd 2.6 μ L
 - 0.2 μ L de cada enzima
 - » BamHI *Bacillus amiloliquefaciens*
 - » PstI *Providencia stuartii*
 - 2 μ L del Buffer de la enzima
 - DNA 5 μ L (purificado en el Módulo II)
-
- Poner en termociclador a 37°C por una hora.
 - Luego, correr gel de electroforesis
 - Tiempo: 45 min.
 - Voltaje: 100 Voltios

Preparación de la muestra para correr la gel:

- 3 μ l TE 1X
- 2 μ l BB
- 10 μ l DNA (digestión)
- Mezclar y añadir a la fosa el volumen total

Se utilizará una gel de agarosa al 1% .