



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

# Marcadores basados en restricción e hibridación: RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*)

<b>Apellidos, nombre</b>	Pérez de Castro, Ana María ( <a href="mailto:anpede1@btc.upv.es">anpede1@btc.upv.es</a> ) Picó Sirvent, María Belén ( <a href="mailto:mpicosi@btc.upv.es">mpicosi@btc.upv.es</a> )
<b>Departamento</b>	Biotecnología
<b>Centro</b>	ETSIAMN



## 1 Resumen de las ideas clave

Los primeros marcadores moleculares basados en polimorfismos en la secuencia de DNA fueron los marcadores RFLPs (*Restriction fragment length polymorphisms*) o polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción. Estos marcadores se basan en la identificación de diferencias en el tamaño de fragmentos generados mediante restricción con endonucleasas. Para detectar estas diferencias es necesario, en general, recurrir, tras la digestión, a un proceso de hibridación con una sonda marcada. Los polimorfismos surgen como consecuencia de diferencias en la presencia de dianas de restricción o debido a diferencias en el tamaño limitado por dos sitios de restricción dados. Los marcadores RFLPs fueron los primeros marcadores moleculares utilizados para el desarrollo de mapas genéticos (Botstein *et al.*, 1980). Como ejemplo, el primer mapa de ligamiento a gran escala del genoma humano se construyó en 1987 mediante la localización de 393 marcadores RFLPs a partir de datos de 21 familias formadas por tres generaciones cada una (Donis-Keller *et al.*, 1987). Por citar una especie vegetal, el primer mapa saturado de marcadores de tomate contenía más de 1000 RFLPs (Tanksley *et al.*, 1992).

## 2 Introducción

Un marcador es cualquier característica heredable que permite identificar diferencias entre individuos. Los primeros marcadores empleados fueron los marcadores morfológicos, es decir, las diferencias entre individuos debidas a diferencias genéticas pero que se manifiestan a nivel fenotípico. Un ejemplo de marcador morfológico es el color del grano en maíz. El principal inconveniente de los marcadores morfológicos es que se encuentran en número limitado. Además, para su evaluación es necesario que el individuo alcance el estado de desarrollo en que el carácter se manifiesta. En el ejemplo anterior, es necesario esperar a que la planta produzca el grano para evaluar el color.

Como alternativa a los marcadores morfológicos, unido al desarrollo de las técnicas de identificación de proteínas, surgió el empleo de los marcadores bioquímicos, basados en el análisis de diferencias a nivel de proteínas. Un ejemplo de marcador bioquímico son las proteínas de reserva en plantas. Este tipo de marcadores presenta también el inconveniente de ser poco abundantes en la naturaleza y del bajo nivel de polimorfismo en muchos casos. Además, la expresión de las proteínas puede verse afectada por las condiciones ambientales y son específicos de tejido.

Con el desarrollo de los marcadores de DNA ha sido posible superar muchas de las limitaciones de los marcadores morfológicos y bioquímicos; entre otras ventajas, permiten la identificación temprana a partir de cualquier tejido, son prácticamente ilimitados en número y pueden presentar niveles elevados de polimorfismo.

Los primeros marcadores moleculares basados en polimorfismos en la secuencia de DNA fueron los marcadores RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) o polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción

(Botstein *et al.* 1980). Se trata de marcadores en los que el polimorfismo surge como consecuencia de diferencias en el tamaño de fragmentos generados al digerir el DNA con enzimas de restricción.

### 3 Objetivos

El presente artículo docente tiene como objetivo proporcionar al alumno las bases para que sea capaz de:

- Describir el proceso para la detección de polimorfismos mediante marcadores RFLPs.
- Detallar las causas que conducen a la aparición de polimorfismos detectables mediante marcadores RFLPs.
- Justificar las ventajas e inconvenientes de este tipo de marcadores.

### 4 Desarrollo

Los marcadores RFLPs están basados, según se describieron inicialmente, en la restricción con endonucleasas y la posterior identificación de los fragmentos generados mediante hibridación con una sonda marcada. Se detallan a continuación los pasos para la visualización del polimorfismo detectado por RFLPs y las causas del mismo, además de las principales ventajas e inconvenientes de este tipo de marcadores.

#### 4.1 Visualización del polimorfismo

##### Extracción del DNA

El paso inicial para la identificación del polimorfismo detectado mediante RFLPs es la extracción del DNA, generalmente el DNA genómico total. Es necesario obtener gran cantidad de DNA, limpio y sin romper. Es importante cuantificar el DNA extraído (Figura 1), con objeto de analizar aproximadamente la misma cantidad de DNA por muestra.

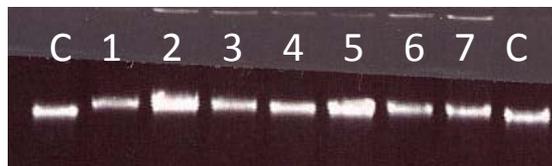


Figura 1. Gel de agarosa para la cuantificación del DNA extraído, con siete muestras y dos controles (C) utilizados para la cuantificación.

##### Digestión del DNA extraído

A continuación, se lleva a cabo la digestión del DNA, durante el tiempo suficiente para que se realice la digestión completa, con la enzima de restricción apropiada. Es conveniente comprobar mediante electroforesis, utilizando parte del producto de la digestión, si se ha completado la digestión correctamente (Figura 2).

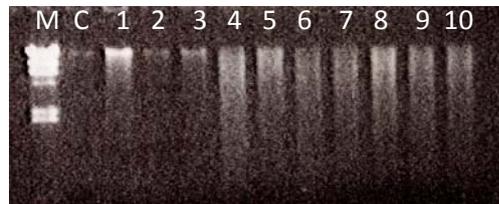


Figura 2. Gel de agarosa para la comprobación de la digestión de las muestras. M: marcador de pesos moleculares. C: control sin digerir. Las tres primeras muestras (1-3) no se han digerido correctamente, mientras que en las siete restantes (4-10) la digestión es completa.

Si la digestión no se ha completado correctamente (como es el caso de las muestras 1 a 3 de la Figura 2), es necesario volver a realizar la digestión. En ocasiones una mala digestión puede ser consecuencia de una mala calidad del DNA. De hecho, en el caso de repetirse la digestión y no lograrse un resultado adecuado es conveniente repetir la extracción de DNA.

### Separación mediante electroforesis

Una vez comprobada la digestión, el proceso continúa cargando en un gel de agarosa todo el producto restante de aquellas muestras en las que ésta se ha realizado correctamente y llevando a cabo una separación de los fragmentos resultantes de la digestión (Figura 3).

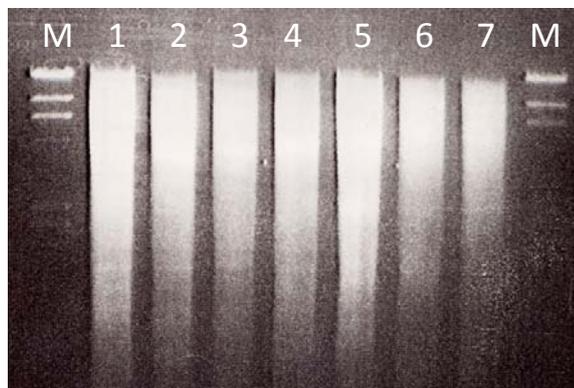


Figura 3. Gel de agarosa con el producto completo de la digestión de las siete muestras bien digeridas de la Figura 2. Este gel es el que se transferirá a una membrana para su posterior hibridación. M: marcador de pesos moleculares.

La electroforesis debe realizarse a bajo voltaje, para mejorar la resolución y disminuir la degradación por calor. Este gel de agarosa es el que se transferirá a una membrana para su posterior hibridación.

### Transferencia

La transferencia del contenido del gel a la membrana se realiza mediante la técnica "Southern blot" (Southern, 1975). Se trata de disponer del DNA en una superficie sólida que pueda ser sometida a hibridación. Los fragmentos de DNA, separados en el gel por su tamaño migran verticalmente, sin variar su posición relativa, hasta una membrana. Las membranas que se utilizan son de nylon o



nitrocelulosa. El DNA se fija a la misma, de forma que puede ser sometido a un proceso de hibridación.

### Hibridación

El paso siguiente es la hibridación con una sonda marcada. La sonda puede tener distintos orígenes (Cuadro 1).

#### **Cuadro 1. Fuentes de las sondas en la hibridación molecular de marcadores RFLPs.**

Para poder realizar la hibridación molecular es necesario disponer de una sonda. Existen distintas fuentes posibles de sondas. Inicialmente, se obtenían a partir de genotecas o de DNA clonado en general, ya que la clonación era el medio de obtener muchas copias de un fragmento de DNA.

Actualmente, es posible desarrollar sondas a partir de otras fuentes. Basta con disponer físicamente del fragmento de DNA y poder diseñar cebadores, para poder hacer copias del mismo mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa). Por otra parte, la gran cantidad de información disponible a nivel de secuencia para ciertos organismos, facilita el diseño de sondas.

En cualquiera de los casos, las secuencias de partida pueden ser de la misma especie en la que se van a aplicar los RFLPs o de alguna especie relacionada. Si la sonda no procede de la misma especie, será necesario emplear condiciones de hibridación poco astringentes (fundamentalmente, empleando temperaturas de hibridación no muy altas y concentraciones de sales elevadas), ya que es de esperar que la secuencia de la sonda y la secuencia del organismo con el que se está trabajando no sean exactamente iguales.

Como caso particular, se pueden utilizar secuencias repetitivas tipo minisatélite como sonda, dando lugar a un tipo especial de RFLPs, los polimorfismos debidos a un número variable de repeticiones en tandem o VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*).

El marcaje de la sonda puede realizarse también por distintos métodos, siendo los más frecuentes el marcaje con radioactividad o con digoxigeninas. En cualquier caso, la sonda debe desnaturalizarse, para, a continuación, llevar a cabo la incubación de la membrana. Es posible regular la astringencia de la hibridación, de forma que, por ejemplo, en condiciones muy astringentes, únicamente se producirá hibridación con las moléculas exactamente complementarias a la sonda.

### Detección

La forma de visualización de los resultados dependerá del sistema de marcaje empleado. Como ejemplo, si la sonda se ha marcado con radioactividad, la visualización se puede realizar por exposición de una película fotográfica (Figura 4). Si el marcaje se ha realizado con digoxigeninas, la detección se puede realizar añadiendo un sustrato que proporcione, bien una señal de color,

bien una señal quimioluminiscente, en aquellas posiciones en las que la sonda ha hibridado.

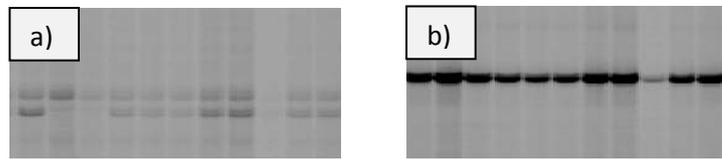


Figura 4. Imagen de autorradiografías por exposición de membranas hibridadas con sondas marcadas con radioactividad. Se muestra el resultado de un marcador RFLP polimórfico en 11 individuos (a) y otro RFLP monomórfico en estos mismos individuos (b).

Ya se ha descrito la forma en que se visualizan los resultados de un marcador RFLP. Ahora bien, *¿qué cambios entre individuos dan lugar a diferencias en el patrón obtenido para cada uno de ellos?*

## 4.2 Causas de polimorfismo

El polimorfismo en el caso de los marcadores RFLPs se visualiza, según se ha descrito, como una diferencia en el tamaño de fragmentos generados tras la digestión del DNA con una enzima de restricción. *¿Cuáles son las mutaciones que pueden generar polimorfismo entre dos individuos?* Aquellas que afectan bien a los sitios de restricción, bien al tamaño del fragmento limitado por dos sitios de restricción dados. Por lo tanto, las causas de polimorfismo son las mutaciones puntuales y las pequeñas inserciones o deleciones.

Las mutaciones puntuales generan polimorfismo como consecuencia de la creación o la eliminación de sitios de restricción. Si una mutación puntual implica la aparición de un nuevo sitio de restricción entre dos sitios de restricción flanqueantes, entonces se detectará un fragmento de restricción de menor tamaño (Figura 5.a). La naturaleza codominante de los marcadores RFLPs implica que los individuos heterocigotos mostrarán los fragmentos correspondientes a ambos homocigotos.

En el caso de que la mutación cree un nuevo sitio de restricción que afecte a la región con la que hibrida la sonda, ésta podrá hibridar con los dos fragmentos que se generan. Como consecuencia, en los individuos homocigotos para esta mutación se observarán las dos bandas correspondientes a estos dos fragmentos (Figura 5.b).

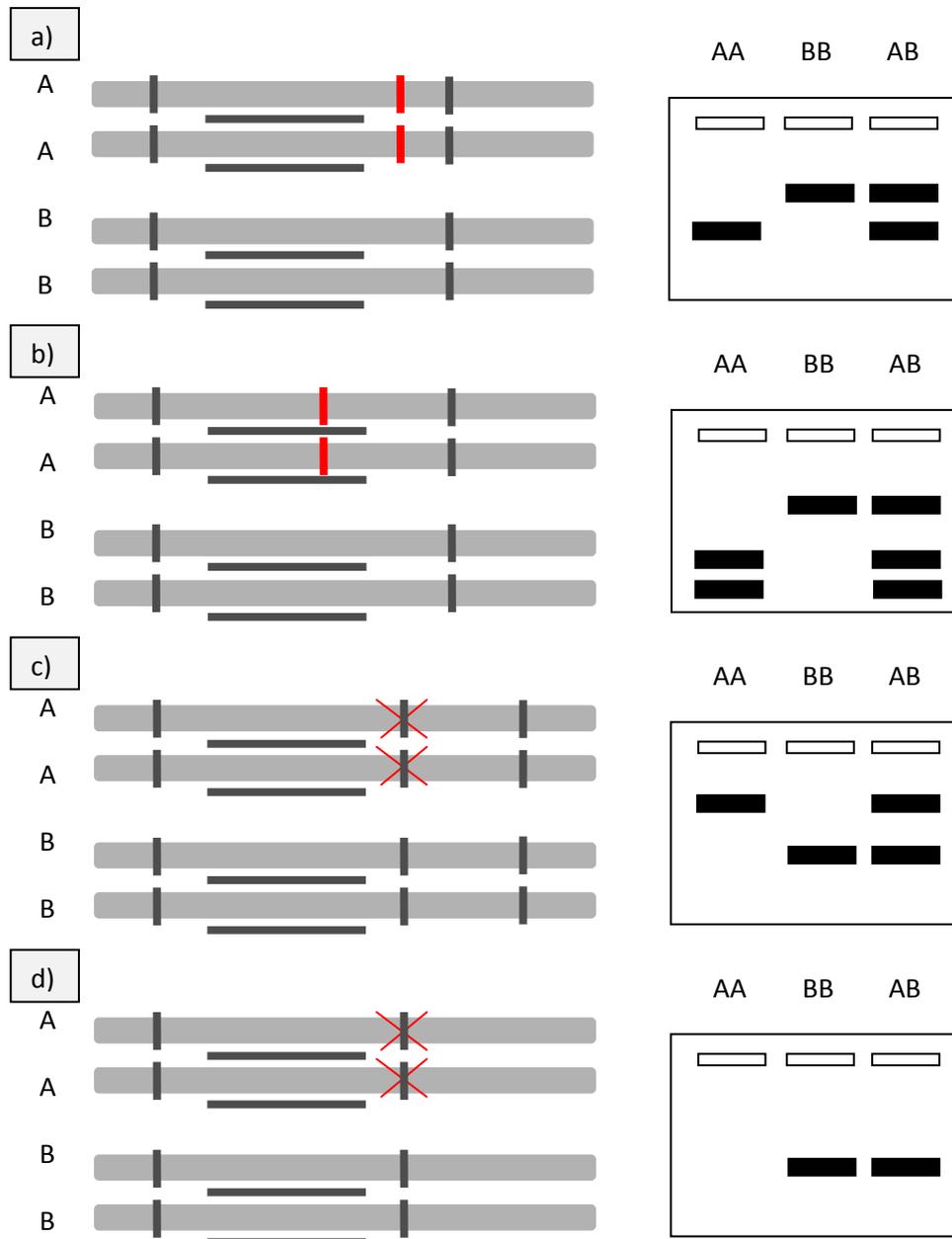


Figura 5. Generación de polimorfismo como consecuencia de una mutación puntual en diferentes casos. En todos los casos se muestra a la izquierda una representación de una región del genoma de dos individuos homocigotos, AA y BB, para el marcador RFLP. Las líneas verticales muestran los sitios de restricción (en rojo los sitios de restricción creados de nuevo, con una cruz roja superpuesta los sitios de restricción desaparecidos). Las líneas horizontales representan la sonda. En todos los casos se muestra a la derecha un esquema de la visualización del polimorfismo generado. Se muestra el patrón de ambos homocigotos y el del heterocigoto entre ellos.

Es posible también que una mutación puntual genere un cambio que lleve a la pérdida de un sitio de restricción. En este caso, si existe un sitio de restricción cercano al que se ha perdido, el resultado de la mutación será la generación

de un fragmento que se podrá visualizar como una banda de mayor tamaño (Figura 5.c).

Sin embargo, en determinados casos, la desaparición de un sitio de restricción puede provocar que un fragmento no se visualice. Si el sitio de restricción contiguo al que se ha perdido se encuentra a mucha distancia, es posible que el fragmento que se genera sea demasiado grande como para transferirse de forma eficiente. En ese caso, los individuos homocigotos para la mutación no presentarán banda (Figura 5.d). **¿Sería en este caso el marcador RFLP un marcador codominante?** Dado que únicamente aparece banda en uno de los homocigotos y, por tanto, el heterocigoto no puede distinguirse del homocigoto que presenta banda, un RFLP con estas características sería dominante.

Se han descrito los cambios debidos a mutaciones puntuales que originan polimorfismo en los marcadores RFLPs. Resulta inmediato deducir que las pequeñas inserciones y deleciones que afectan a los sitios de restricción provocarán cambios similares a los explicados hasta el momento. Por otro lado, las inserciones y deleciones que se producen entre los sitios de restricción del fragmento de interés también generan polimorfismo. Una deleción entre los dos sitios de restricción da lugar a un fragmento de restricción más corto (Figura 6.a), mientras que una inserción crea un fragmento más largo (Figura 6.b).

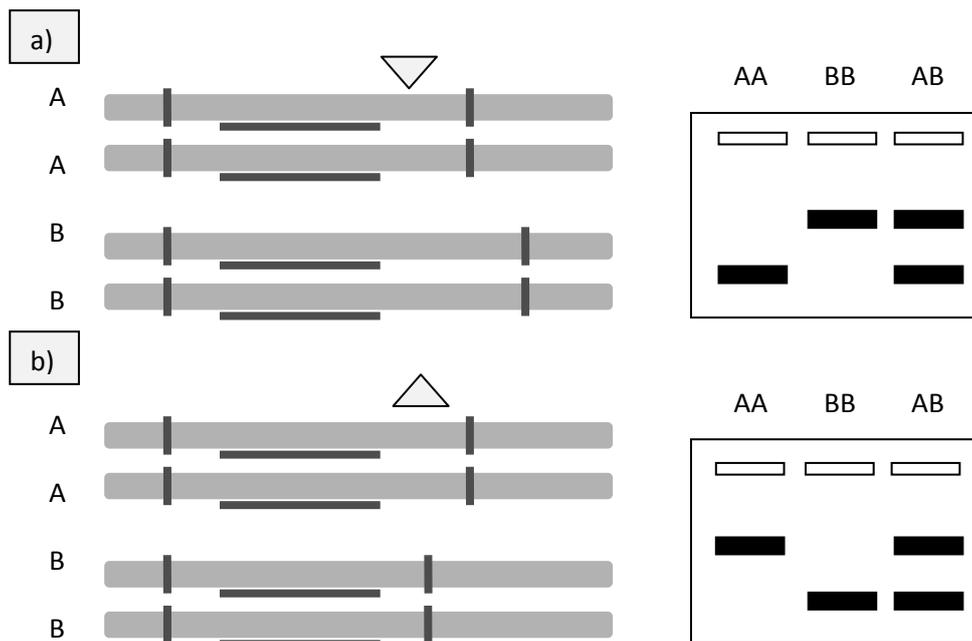


Figura 6. Generación de polimorfismo como consecuencia de una deleción (a) o una inserción (b). En todos los casos se muestra a la izquierda una representación de una región del genoma de dos individuos homocigotos, AA y BB, para el marcador RFLP. El triángulo representa el punto en el que se ha producido la deleción (a) o la inserción (b), respectivamente. Las líneas horizontales representan la sonda. En todos los casos se muestra a la derecha un esquema de la visualización del polimorfismo generado. Se muestra el patrón de ambos homocigotos y el del heterocigoto entre ellos.

**¿Qué crees que sucedería si la inserción o deleción se produce en la región con la que hibrida la sonda?**

### 4.3 Ventajas e inconvenientes

Los RFLPs presentan ciertas ventajas sobre otros sistemas de marcadores desarrollados con posterioridad. La primera ventaja la proporciona su naturaleza codominante. Además, la metodología para la obtención del polimorfismo hace que se trate de marcadores muy robustos y transferibles entre laboratorios (únicamente hace falta distribuir las sondas entre los laboratorios colaboradores). Sin embargo, es necesario disponer de gran cantidad de DNA de los individuos a analizar, no permiten la automatización, tienen ciertos requisitos técnicos y resultan costosos, tanto en tiempo como en dinero. No se requiere tener información de secuencia, pero hace falta disponer de una fuente de sondas. Dado que el polimorfismo surge como consecuencia de una combinación entre enzima de restricción y sonda, es posible aprovechar una misma sonda para identificar polimorfismo empleando distintas enzimas. En cualquier caso, otro inconveniente de este sistema de marcadores es que únicamente se detectan uno o pocos *loci* por reacción. Además, en algunas especies los niveles de polimorfismo identificados mediante este tipo de marcadores son bajos.

Con el desarrollo de nuevos tipos de marcadores moleculares, los RFLPs han sido desplazados en muchas aplicaciones por otros más sencillos o eficaces, que evitan sus inconvenientes.

## 5 Cierre

Los marcadores RFLPs fueron los primeros marcadores de DNA desarrollados. Se basan en la digestión del DNA con una enzima de restricción, la separación mediante electroforesis de los fragmentos generados, la hibridación con una sonda y la visualización de los resultados por distintas técnicas según el marcaje de la sonda. Las mutaciones que generan polimorfismo en este tipo de marcadores son las mutaciones puntuales o las inserciones o deleciones que afectan a los sitios de restricción o al tamaño del fragmento limitado por dos sitios de restricción dados. A pesar de ser marcadores codominantes y muy reproducibles, el hecho de que no permitan automatización, de que sean costosos en tiempo y en dinero y las limitaciones en cuanto a *loci* identificados por reacción, ha llevado en muchos casos a la sustitución de los RFLPs por nuevos marcadores más sencillos o eficaces.

## 6 Bibliografía

### Referencias citadas en el texto

Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M.; Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.

Donis-Keller, H.; Green, P.; Helms, C.; et al. (1987). A genetic linkage map of human genome. *Cell*, 51: 319-337.



Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98: 503-517.

#### **Referencias no citadas en el texto**

Avise, J.C. (2004). *Molecular markers, natural history, and evolution*. Massachusetts, Sinauer Associates cop. 2nd ed.

Bioversity International. (2014). *Molecular marker learning modules: Vols 1 and 2*. Disponible en:

[http://www.bioversityinternational.org/nc/publications/publication/issue/molecular\\_marker\\_learning\\_modules\\_vols\\_1\\_and\\_2.html](http://www.bioversityinternational.org/nc/publications/publication/issue/molecular_marker_learning_modules_vols_1_and_2.html)

Nuez, F.; Carrillo, J.M. (2000). *Los marcadores genéticos en la mejora vegetal*. Valencia. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas; Universidad Politécnica de Valencia; Sociedad Española de Genética.

Phillips, R.L; Vasil, I. K. (1994). *DNA-based markers in plants*. Dordrecht, Kluwer Academic cop.

Vienne, D. (2003). *Molecular markers in plant genetics and biotechnology*. Plymouth: Science Publishers cop.