

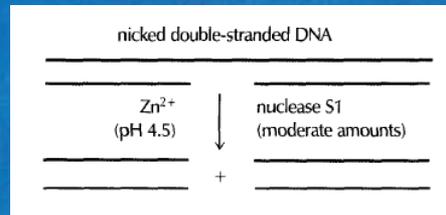
# *Enzimas utilizadas en Biología molecular*



# Nucleasas → DNAsas

## Endonucleasas inespecíficas.

<b>Enzima</b>	<b>Molde</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>DNAsa I</b> (páncreas bovino)	Degrada DNA dc, sc. A bajas concentraciones genera nicks	Sondas, Nick translation Dnasa footprinting
<b>RQ I</b>	Degrada DNA dc, sc Libre de Rnasas	Extracciones de RNA
<b>S I</b>	Degrada DNA y RNA sc	Reparación de extremos DNA Análisis estructura de híbridos DNA:RNA
<b>Mung Bean</b>	Degrada DNA y RNA sc	Reparación de extremos DNA



# Nucleasas → DNAsas

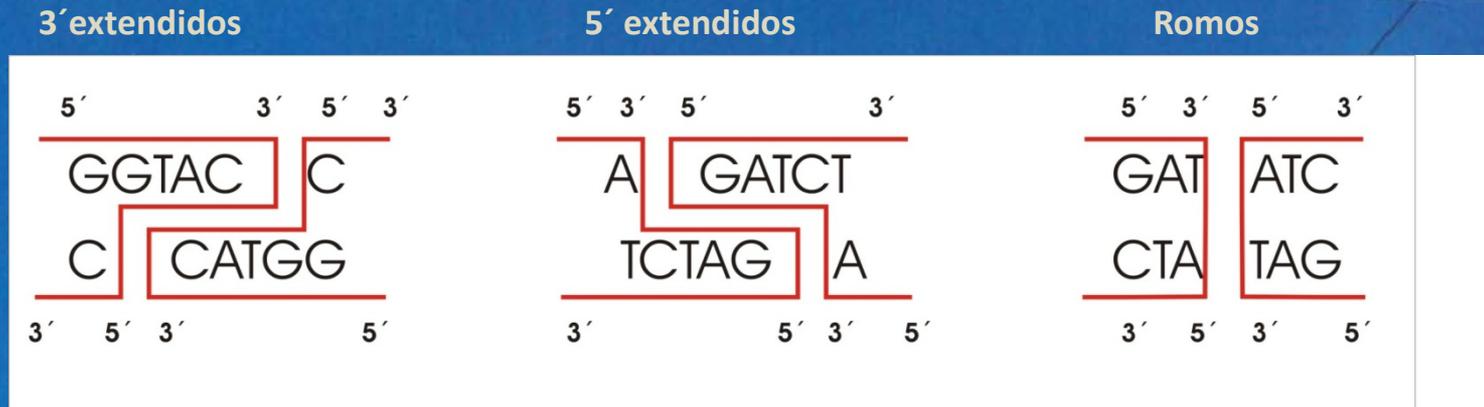
## Endonucleasas sitio específicas – Enzimas de restricción.

Molde DNA dc

	<b>Tipo I</b>	<b>Tipo II</b>	<b>Tipo III</b>
<b>Cofactor</b>	ATP, Mg +2	Mg +2	ATP, Mg +2
<b>Sitio de reconocimiento</b>	Se pega en sitio específico y corta al azar	Se pega en sitio específico, corta y se disocia De 4-8 nt	Se pega en sitio específico, corta y se disocia De 4-8 nt
<b>Palindrómico</b>	No	Si	No
<b>Metilación</b>	Mismo Polipéptido	Diferente Polipéptido	Mismo Polipéptido
<b>Ejemplos</b>	EcoAI GAG(Nx7)GTCA BI TGA(Nx8)TGCT	Bgl II A*GATCT BamH I G*GATCC N de I CATATG EcoRV GAT*ATC Kpn I GGTAC*C Sau3A I GATC Not I GC*GGCCGC	

# Otras características de las ER

## Tipos de extremos



- Procedencia del nombre
- Frecuencia de corte con 50% GC
- Definición de Unidad enzimática
- Nomenclatura
  - Isoesquizómeros
  - Neoesquizómeros
  - Compatibilidad de extremos
- Actividad estrella
- Homing endonucleasas 15-30. Digestion y mapeo de genomas grandes

## *Ejemplos de compatibilidad de extremos*

```
5'... GGATCC... 3'
3'... CCTAGG... 5'
```

BamH I

```
5'... GATATC... 3'
3'... CTATAG... 5'
```

EcoR V

```
5'... GAATTC... 3'
3'... CTTAAG... 5'
```

EcoR I

```
5'... GATC... 3'
3'... CTAG... 5'
```

Sau3A I

```
5'... CAATTG... 3'
3'... GTTAAC... 5'
```

Mfe I

```
5'... AGATCT... 3'
3'... TCTAGA... 5'
```

Bgl II

```
5'... CAGCTG... 3'
3'... GTCGAC... 5'
```

Pvu II

```
5'... AAGCTT... 3'
3'... TTCGAA... 5'
```

Hind III

Cúal deja extremos compatibles con cual?

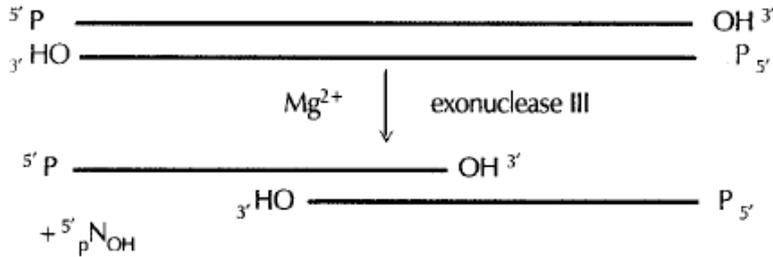
# Nucleasas → DNAsas

## Exonucleasas

Enzima/ Sentido	Molde	Aplicación
5' → 3'		
Exo λ	DNA dc, DNA con extremo 5' extendido	Modificación de extremos
Exo T7	DNA dc, DNA con extremo 5' extendido, híbridos DNA/RNA. digiere en nicks o gaps	
3' → 5'		
Exo I	DNA sc	Modificación de extremos
Exo III	DNA dc romo, circular con nicks o gaps, extremos 5' ext.	Modificación de extremos, Degradación direccionada, estudio de regiones
Bal31	DNA dc, sc (actúa como endonucleasa)	Modificación de extremos, Mapeo de regiones dc en el DNA
5' → 3'		
3' → 5'		
Exo VII	DNA sc	Degradación de DNA

# Algunos ejemplos

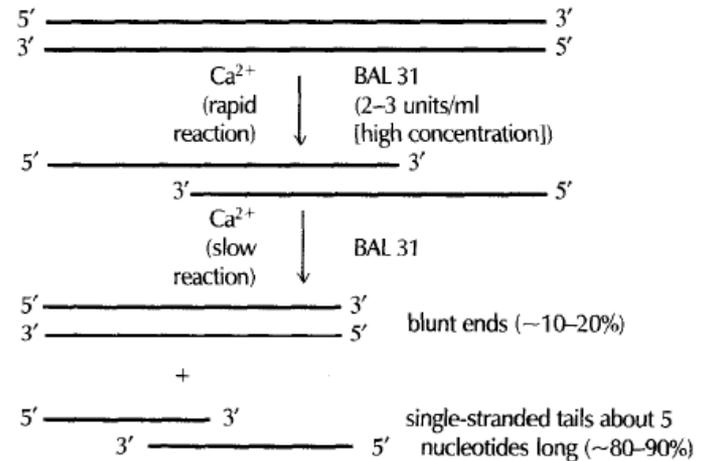
Reaction:



Exo III

Bal31

Reaction:



# Nucleasas → RNAsas.

## Endoribonucleasas.

<b>Enzima</b>	<b>Molde</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>RNasa A</b> (pancreas bovino)	Sc RNA en el 3' de pirimidina (U ó C)	Degradación de RNA en extracción y purificación de ADN
<b>T1</b>	Sc RNA en el 3' de purina (A ó G)	Generación de cDNA, Ensayo de protección a RNAsas
<b>T2</b>		
<b>Rnasa H</b>	Degrada RNA de híbridos RNA/DNA	Generación de cDNA,

# *Sistemas generales metilación-restricción en E. Coli.*

## **Metilasas**

## **Molde**

## **Aplicaciones**

### **Dam metilasas**

Metila dsDNA en la posición N6 de la Adenina en la secuencia GATC.

Bloquea y protege la acción de algunas ER que reconocen GATC, Ej: MboI (GATC) sensible, sSau3AI (GATC) no.  
Digestión por enzimas que reconocen dam metilación, Ej: DpnI.

### **Dcm metilasas**

Metila dsDNA en la posición C5 de la Citocina interna en la secuencia CCAGG o CCTGG.

Bloquea y protege la acción de algunas ER que reconocen CCAGG o CCTGG.

## **Sistemas de Restricción metilación dependiente**

### **mrr**

Digiere dsDNA metilados en la posición  $m^6A$ .

### **mcra**

Digiere dsDNA metilados en la posición  $m^5CG$

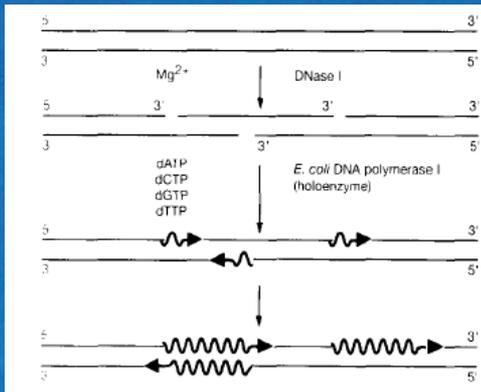
### **mcrb**

Digiere dsDNA metilados en la posición  $Pu^m^5C$ .

# Polimerasas → DNA polimerasas DNA dependientes (replicación)

## Enzima

DNA pol I  
(coli)



## Actividades

DNA polimerasa 5'-3'  
Exo 5'-3' (dsDNA)  
Exo 3'-5' (ssDNA, dsDNA)  
RNasa H

## Aplicaciones

Nick Translation  
Marcado y modificación de  
extremos 3' extendidos

## Fragmento klenow

DNA polimerasa 5'-3'  
Exo 3'-5' (ssDNA, dsDNA)

Extensión de primer  
Reparación extremos, fill in  
Marcado de extremos, sondas

# *Polimerasas → DNA polimerasas*

## *DNA dependientes (replicación)*

### **Enzima**

### **Actividades**

### **Aplicaciones**

**DNA pol  
fago T4**

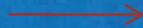


DNA polimerasa 5'-3'  
Alta Exo 3'-5' (ssDNA,  
dsDNA)



*Extensión de primer*  
*Reparación extremos, fill in*  
*Marcado de extremos fill in,*  
*sondas*  
*Generación de cDNA con*  
*primers al azar*

**DNA pol  
fago T7  
Sequenase**



DNA polimerasa 5'-3'  
muy procesiva  
Baja o nula Exo 3'-5' (ssDNA,  
dsDNA)



*Extensión de primer,*  
*secuenciación*

# Polimerasas → DNA polimerasas termoestables

## DNA dependientes (replicación)

---

<b>Enzima</b>	<b>Actividades</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>Taq polimerasa</b> <i>Thermus aquaticus</i>	DNA polimerasa 5'-3' Exo 5'-3' (ssDNA, dsDNA) Transferasa terminal. Agrega una A en el extremo 3'OH	Amplificación de fragmentos de DNA por PCR
<b>Pfu polimerasa</b> <i>Pyrococcus furiosus</i>	DNA polimerasa 5'-3' procesiva Exo 3'-5' (ssDNA, dsDNA)	Amplificación de fragmentos de DNA por PCR

# Polimerasas → DNA polimerasas

## RNA dependientes (Retrotranscriptasas)

### Enzima

### Actividades

### Aplicaciones

**AMV**  
*Avian myeloblastosis virus*

DNA polimerasa 5'-3'  
Alta actividad Rnasa H  
Funciona a 42 °C  
No tiene proofreading

Síntesis de cDNA

**Mo-MLV**  
*Moloney murine leukemia virus*

DNA polimerasa 5'-3'  
baja actividad Rnasa H  
Funciona a 38 °C

Síntesis de cDNA

**Tth**  
*Thermus thermophilus*

DNA polimerasa 5'-3'  
termoestable  
DNA dep. en presencia de  
Mg<sup>+2</sup>  
RNA dep. en presencia de  
Mn<sup>+2</sup>

RT-PCR

## *Polimerasas* → *DNA polimerasas sin molde*

<b>Enzima</b>	<b>Actividades</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>Transferasa Terminal</b>	Polimerización de ssDNA a partir de un extremo OH-3' libre Actúa sobre DNA sc, DNA dc 3' extendidos	Síntesis de homopolímeros Determinación de extremos de RNA Generar extremos conocidos para pegado de primers

## *Polimerasas* → *RNA polimerasas sin molde*

<b>Enzima</b>	<b>Actividades</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>PoliA polimerasa</b>	Polimerización de ssRNA a partir de un extremo OH-3' libre	Síntesis de homopolímeros de A

## *Polimerasas* → *RNA polimerasas RNA dependientes*

Enzima que replica el genoma de algunos virus de RNA. No hay comerciales disponibles

# Polimerasas → RNA polimerasas DNA dependientes (Transcripción)

## Enzima

## Actividades

## Aplicaciones

RNA pol del fago Sp6

RNA polimerasa 5'-3'

RNA pol del Fago T7

RNA pol del Fago T3

Síntesis de RNA simple cadena

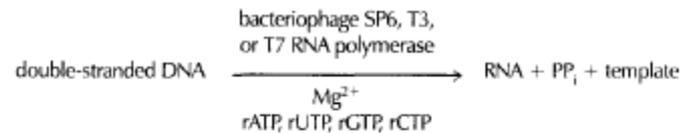
Para:

Transcripción in vitro

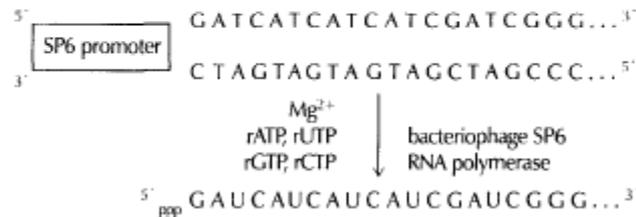
Sondas de RNA

Utilizadas en sistemas de expresión

### Reaction:



### For example:



# Ligasas.

<b>Enzima</b>	<b>Actividades</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>T4 DNA ligasa</b> <i>E. coli</i> <b>DNA ligasa</b>	Cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre 3'-OH y un 5'-P en los extremos o nicks de DNA ATP (cofactor) PEG aumenta actividad	Unir fragmentos de DNA doble cadena con extremos compatibles o romos. Uno de los extremos debe ser OH- 3' y el otro 5'-P La de <i>E. coli</i> liga romos menos eficientemente
<b>T4 RNA ligasa</b>	Cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre 3'-OH y un 5'-P en los extremos de DNA o RNA sc ATP (cofactor)	Circularizar Molecula RNa. Ligación de Adapters marcados o no

# Fosfatasas y Quinasas

<b>Enzima</b>	<b>Actividades</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>T4 polinucleótido quinasa</b>	Forward: Cataliza la transferencia del $\gamma$ -fosfato del ATP a un extremo 5' de un DNA o RNA 5'OH Exchange: Cataliza la transferencia del $\gamma$ -fosfato del extremo 5' de un DNA o RNA a un ADP, incorporando un nuevo fosfato sacado de un ATP.	Marcado de extremos DNA para sonda o fingerprint. Fosforilación de linkers o <i>primers</i> sintéticos que carecen del fosfato 5'
<b>Fosfatasa alcalina Bacteria (BAP)</b>	Remueve fosfatos 3' y 5' de DNA y RNA BAP más activa y estable	Evitar ligación
<b>Fosfatasa alcalina Intestino de ternera (CIP)</b>		

# Otras enzimas

<b>Enzima</b>	<b>Actividades</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>Proteinasa K</b>	Proteólisis de proteínas	Degradación de proteínas En extracciones de DNA o RNA (Dnasas, Rnasas, Proteínas de membrana)
<b>Rnasin</b>	Se une no covalentemente a Rnasas. No inhibe rnasas H	Inhibición de Rnasas en técnicas que manipulen RNA
<b>Lisozima</b>	Cataliza la hidrólisis de la unión $\beta$ (1,4) entre la N-acetylglucosamina y residuos de ácido N-acetilmurámico en el proteoglicano de la pared celular de bacterias	Degradación de paredes celulares bacterianas en extracción de DNA

***Muchas Gracias!!!***

A blue background with a thin, wavy line that starts from the bottom left and curves upwards towards the top right. At the end of this line, in the top right corner, is a small, glowing red circle. In the bottom right area, there is a solid black oval shape.