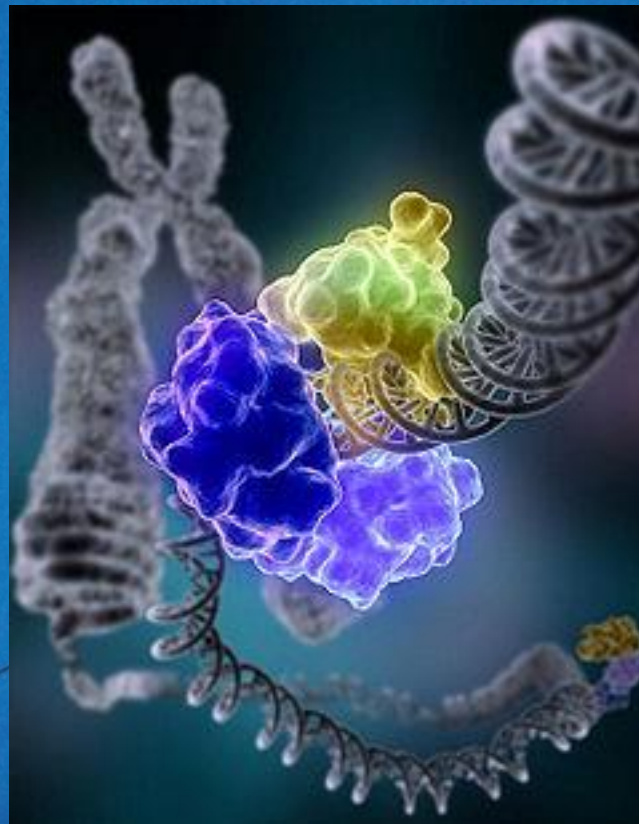


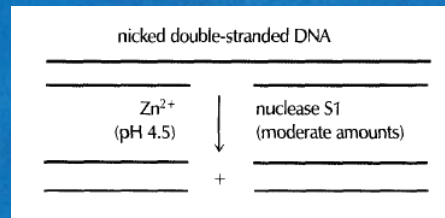
Enzimas utilizadas en Biología molecular



Nucleasas → DNAsas

Endonucleasas inespecíficas.

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



Nucleasas → DNAsas

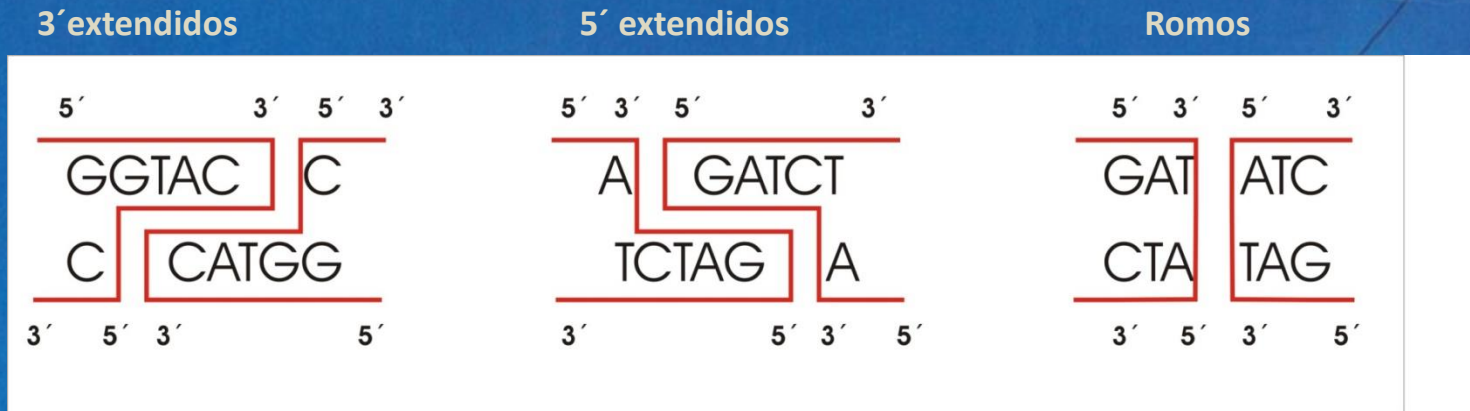
Endonucleasas sitio específicas – Enzimas de restricción.

Molde DNA dc

	<i>Tipo I</i>	<i>Tipo II</i>	<i>Tipo III</i>
Cofactor	ATP, Mg +2	Mg +2	ATP, Mg +2
Sitio de reconocimiento	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
Palindrómico	No	Si	No
Metilación	Mismo Polipéptido	Diferente Polipéptido	Mismo Polipéptido
Ejemplos	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?

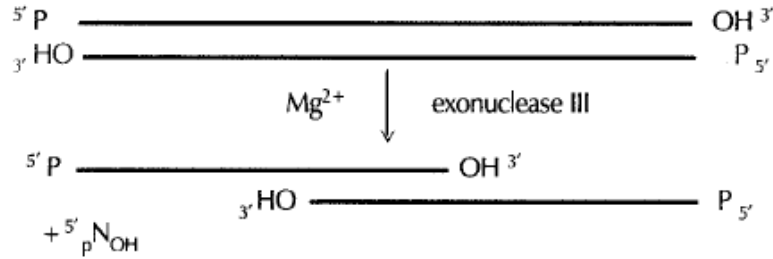
Nucleasas → DNAsas

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

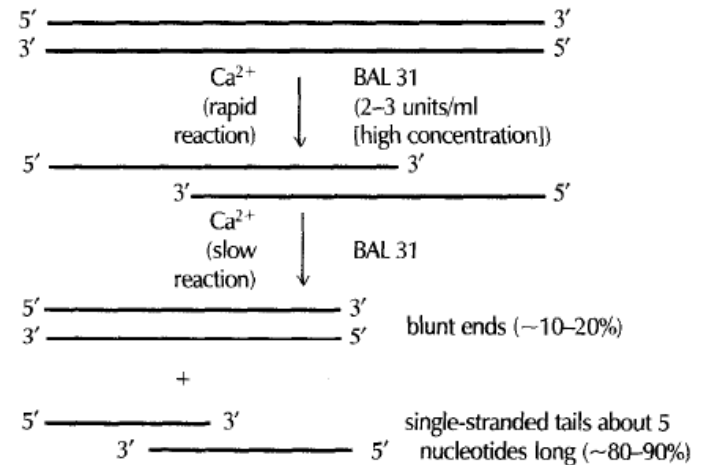
Reaction:



Exo III

Bal31

Reaction:



Nucleasas → RNAsas.

Endoribonucleasas.

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

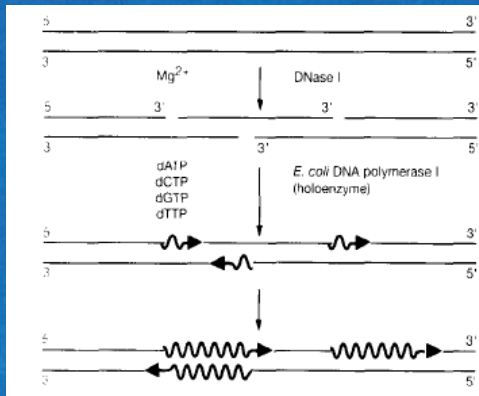
Digiere dsDNA metilados en la posición Pu^{m^5C} .

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)

<i>Enzima</i>	<i>Actividades</i>	<i>Aplicaciones</i>
Taq polimerasa <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
Pfu polimerasa <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^{+2}
RNA dep. en presencia de Mn^{+2}

RT-PCR

Polimerasas → DNA polimerasas sin molde

Enzima	Actividades	Aplicaciones
Transferasa Terminal	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

Enzima	Actividades	Aplicaciones
PoliA polimerasa	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

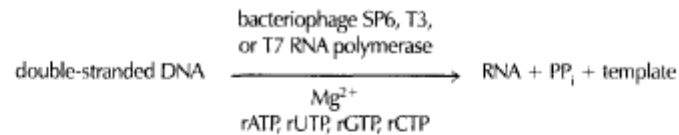
Para:

Transcripción in vitro

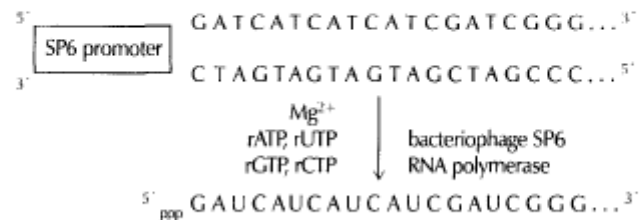
Sondas de RNA

Utilizadas en sistemas de expresión

Reaction:



For example:



Ligasas.

Enzima	Actividades	Aplicaciones
T4 DNA ligasa <i>E. coli</i> DNA ligasa	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
T4 RNA ligasa	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

Fosfatasa y Quinasas

Enzima	Actividades	Aplicaciones
T4 polinucleótido quinasa	Forward: Cataliza la transferencia del γ -fosfato del ATP a un extremo 5' de un DNA o RNA 5'OH Exchange: Cataliza la transferencia del γ -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'
Fosfatasa alcalina Bacteria (BAP)	Remueve fosfatos 3' y 5' de DNA y RNA BAP más activa y estable	Evitar ligación
Fosfatasa alcalina Intestino de ternera (CIP)		

Otras enzimas

Enzima	Actividades	Aplicaciones
Proteinasa K	Proteólisis de proteínas	Degradación de proteínas En extracciones de DNA o RNA (Dnasas, Rnasas, Proteínas de membrana)
Rnasin	Se une no covalentemente a Rnasas. No inhibe rna H	Inhibición de Rnasas en técnicas que manipulen RNA
Lisozima	Cataliza la hidrólisis de la unión β (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!!!

The image features a solid blue background. A thin, dark line starts near the bottom left and curves upwards and to the right, ending in a small, glowing red oval in the top right corner. In the bottom right area, there is a dark, irregular, ink-blot-like shape.