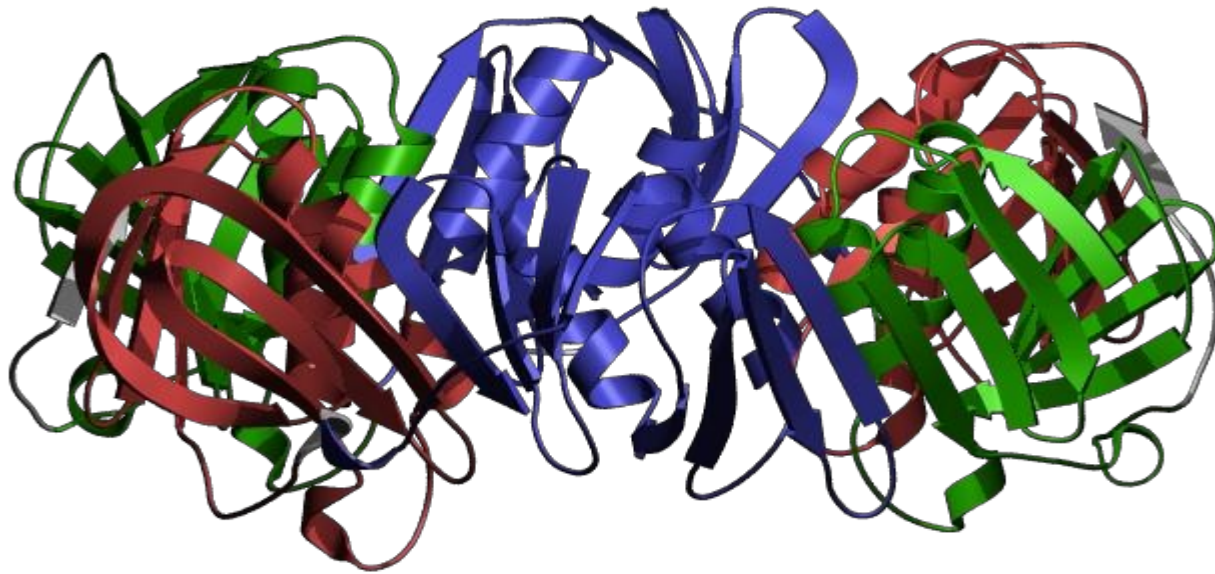


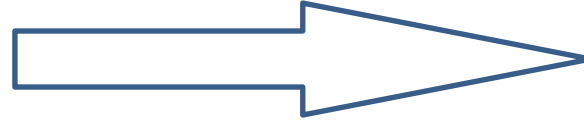
UD2: ENZIMAS EMPLEADAS EN BIOLOGIA MOLECULAR



ENZIMAS EMPLEADAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

Las técnicas de biología molecular implican manipulaciones de ácidos nucleicos, tales como:

- Amplificación
- Degradación
- Corte
- Unión
- Secuenciación



ENZIMAS

Se llevan a cabo gracias a la acción catalizadora de...

ENZIMAS



Realizan in vitro la misma actividad que llevarían a cabo in vivo en condiciones fisiológicas



Las enzimas son una **parte muy importante de las herramientas que se van a utilizar en biología molecular**

ENZIMAS EMPLEADAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

NUCLEASAS

Las nucleasas son enzimas que **cortan y degradan** los **ácidos nucleicos mediante hidrólisis de enlace fosfodiéster** entre dos nucleótidos.

CLASIFICACIÓN DE LAS NUCLEASAS

SEGÚN EL TIPO DE ÁCIDO NUCLEICO QUE ATACAN

NUCLEASAS DE ARN (ARNasa o Ribonucleasa)

Son enzimas capaces de romper enlaces fosfodiéster entre ribonucleótidos

NUCLEASAS DE ADN (ADNasa o Desoxiribonucleasa)

Son enzimas capaces de romper enlaces fosfodiéster entre desoxirribonucleótidos

SEGÚN LA SITUACIÓN DEL TIPO DE CORTE

EXONUCLEASAS

Eliminan nucleótidos uno a uno desde un extremo (5'---3') (3'---5' o en ambas)

ENDONUCLEASAS

Cortan en puntos intermedios de la molécula, estas roturas se denominan **mellas (nick)**

ENZIMAS EMPLEADAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

NUCLEASAS

CLASIFICACIÓN DE LAS NUCLEASAS

SEGÚN EL TIPO DE CADENA QUE ATACAN

ATACAN MOLÉCULAS BICATENARIAS

Rompen enlaces entre ambas cadenas.

ATACAN MOLÉCULAS MONOCATENARIAS

Solo atacan moléculas monocatenarias.
(Ejemplo: nucleasas S1)

SEGÚN LA ESPECIFICIDAD DEL CORTE

CORTAN ALEATORIAMENTE

Cortan la cadena en cualquier punto

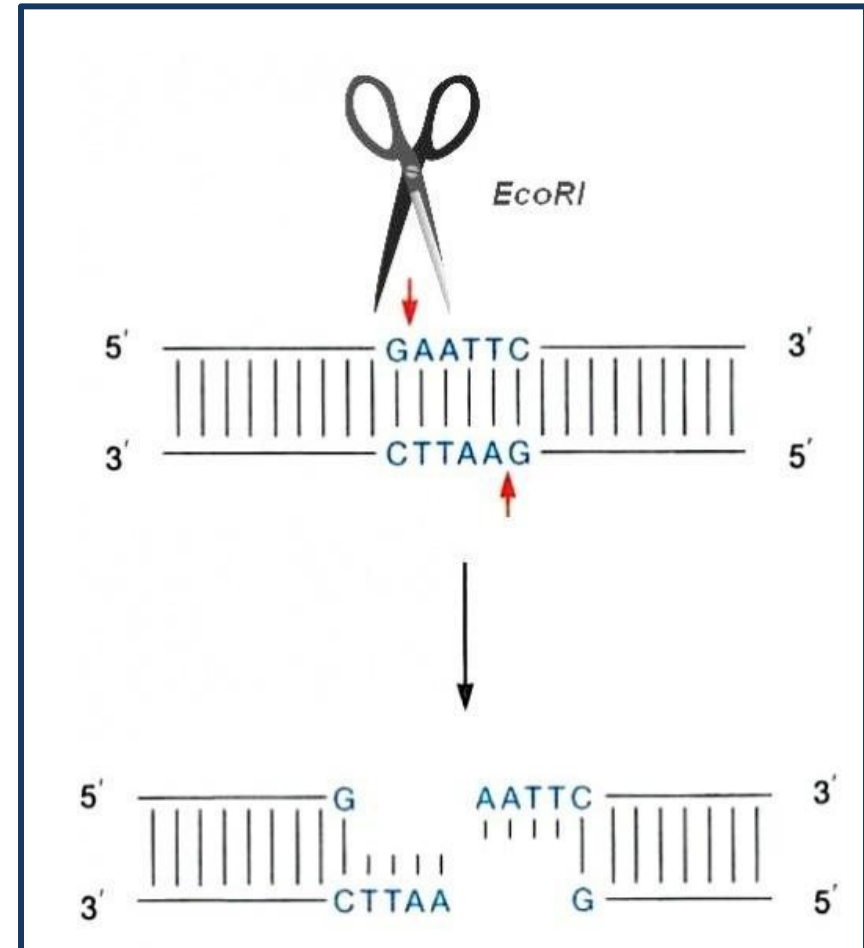
CORTAN EN SITIOS CONCRETOS

Se unen a una cadena de nucleótidos **en una secuencia específica** y la cortan, como es el caso de las endonucleasas de restricción.

ENZIMAS EMPLEADAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

- Las endonucleasas de restricción
 - Son endonucleasas bacterianas que reconocen secuencias cortas de ADN bicatenario (de entre 4 y 8 pares de bases)
 - Producen un corte en la doble cadena en esa secuencia o cerca de ella, fragmentando la molécula.
 - Se llaman tb **enzimas de restricción**.
- A las secuencias de ADN específicas que reconocen se les denomina **dianas de restricción**.



ENZIMAS EMPLEADAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción se nombran normalmente con tres letras y un número romano.

- Las tres **letras** se escriben en cursiva y corresponden al **nombre científico de la bacteria de la que se han obtenido**.
 - La primera letra es la inicial del género.
 - Las dos siguientes, las primeras letras de la especie.
 - En ocasiones cuando la enzima se ha aislado en una cepa concreta se añade una cuarta letra mayúscula que la representa.
- El número romano indica **el orden en el que se ha aislado la enzima en la misma especie**.

Enzima Pvu II: Segunda enzima de restricción aislada de *Proteus Vulgaris*.

Enzima EcoR V: Quinta enzima de restricción aislada de *Escherichia coli*, cepa RY13

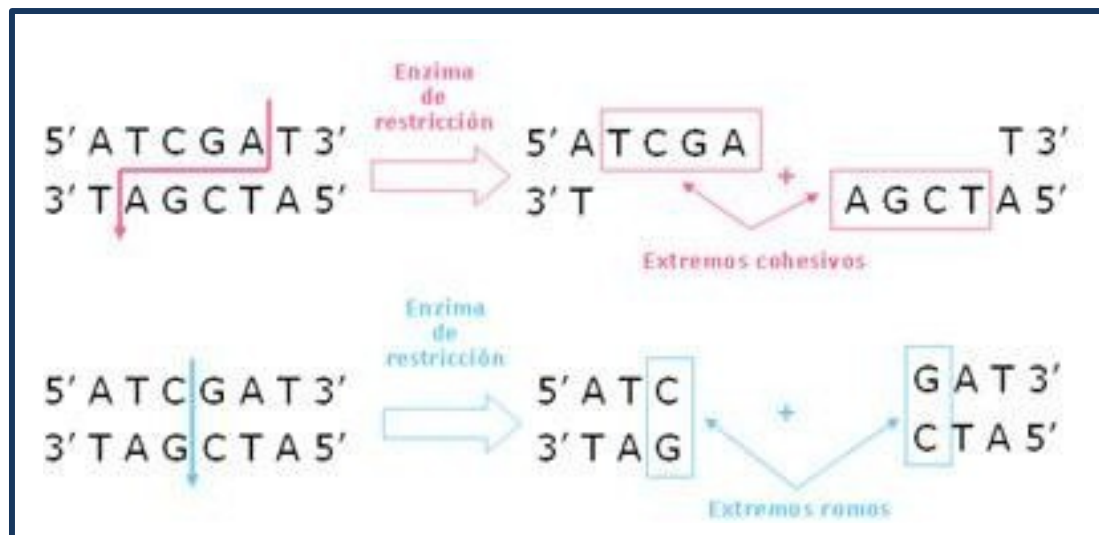
ENZIMAS EMPLEADAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

TIPOS DE CORTE

El corte realizado por una enzima de restricción puede ser de dos maneras distintas que se caracterizan por los extremos generados.

- **Extremos romos**: el corte se produce en el mismo punto en las dos cadenas, generalmente en el centro de la diana de restricción.
- **Extremos cohesivos**: el corte se produce en puntos distintos de ambas cadenas, normalmente en los extremos de la diana de restricción.



ENZIMAS EMPLEADAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

TIPOS DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	
TIPO I	La enzima reconoce su diana de restricción y efectúa <u>un corte en una región anterior o posterior de la diana</u> a una distancia aleatoria de hasta 1000 pb.
TIPO II	Reconocen la diana de restricción y <u>cortan en puntos específicos, generalmente dentro de la misma diana</u> . Estas enzimas generan patrones específicos y reproducibles de fragmentos, ya que siempre se enfrentan a la misma molécula cortan por los mismos puntos. Son una herramienta fundamental en biología molecular y se les llama <u>TIJERAS MOLECULARES</u>.
TIPO III	Reconocen dos secuencias invertidas dentro de la misma cadena y <u>cortan fuera de la diana de restricción</u> , pero a una distancia corta (25-30pb)

ENZIMAS EMPLEADAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

ADN POLIMERASAS



Permiten realizar copias de moléculas de **ADN** mediante replicación

La técnica básica en biología molecular es la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** que permite obtener millones de copias de una secuencia de interés.

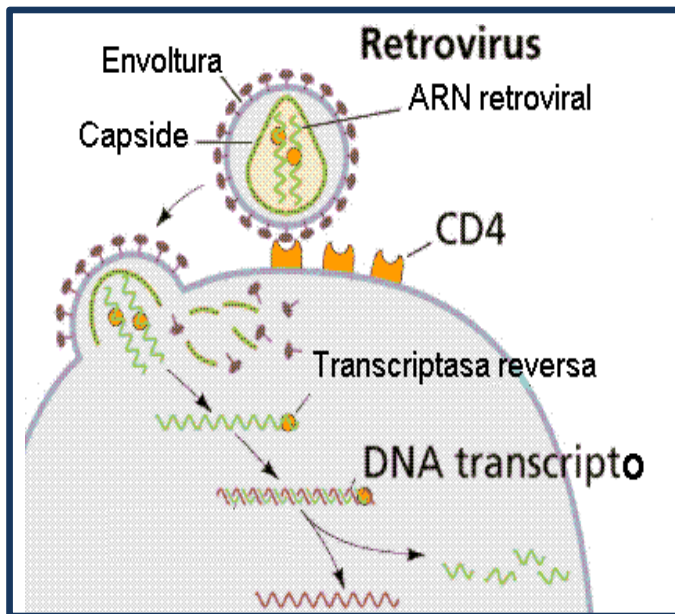
- Las ADN-polimerasas más usadas son de los tipos I y III.
- Para realizar su función requieren que en el medio de reacción estén presentes:
 - Los cuatro desoxinucleótidos
 - Un ADN molde.
 - Cebadores.
 - Mg^{2+} como cofactor.
- Actualmente se disponen de numerosas polimerasas que se diferencian en:
 - **Velocidad de polimerización** (nº de nucleótidos incorporados por seg)
 - **Fidelidad en la replicación** (proporción de errores)
 - **Termoestabilidad** (temperatura a la que se inactivan)
 - **Procesividad** (nº de nucleótidos que pueden incorporar antes de separarse de la cadena molde)
 - **Presencia o ausencia de actividad exonucleasa** además de la actividad polimerasa.

ENZIMAS EMPLEADAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

RETROTRANSCRIPTASAS

Las **retrotranscriptasas** o **transcriptasas inversas** son **ADN polimerasas-ARN dependientes** → **sintetizan moléculas de ADN utilizando ARN como molde.**

El ADN sintetizado se denomina **ADN copia (ADNc)**. Se han aislado de los retrovirus, virus cuyo material genético es ARN, el cual se retrotranscribe a ADN en la célula infectada y se integra en el genoma de la célula huésped.



El empleo de estas enzimas ha permitido:

- Realizar estudios masivos de ARN.
- La amplificación de ARN. El tipo de PCR que amplifica ARN se denomina RT-PCR

ENZIMAS EMPLEADAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

DESOXINUCLEOTIDIL TRANSFERASA TERMINAL (Tdt)

Las **desoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt)** es una ADN polimerasa que cataliza la incorporación de desoxinucleótidos al extremo 3' de una molécula de ADN.

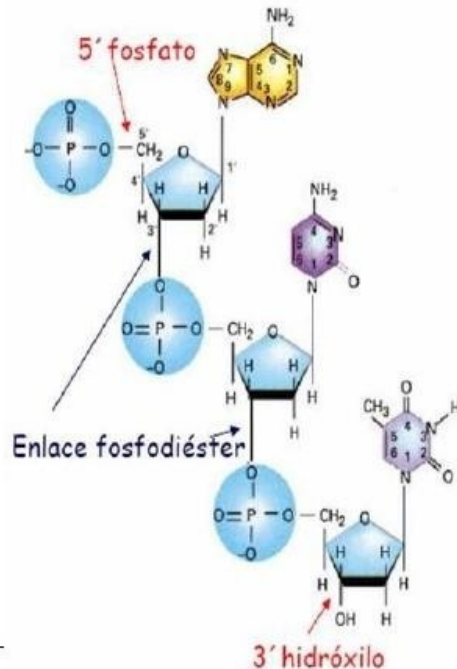
A diferencia de otras ADN polimerasas, no requiere de un cebador ni de una cadena molde para ejercer su actividad.

Se han aislado de **células linfoides inmaduras y de células de ciertos linfomas y leucemias**. Una de sus principales utilidades es el marcaje terminal de sondas con nucleótidos marcados.

ENZIMAS EMPLEADAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

LIGASAS

Las ligasas unen dos moléculas de ADN mediante formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3' de una molécula y 5' de la otra.



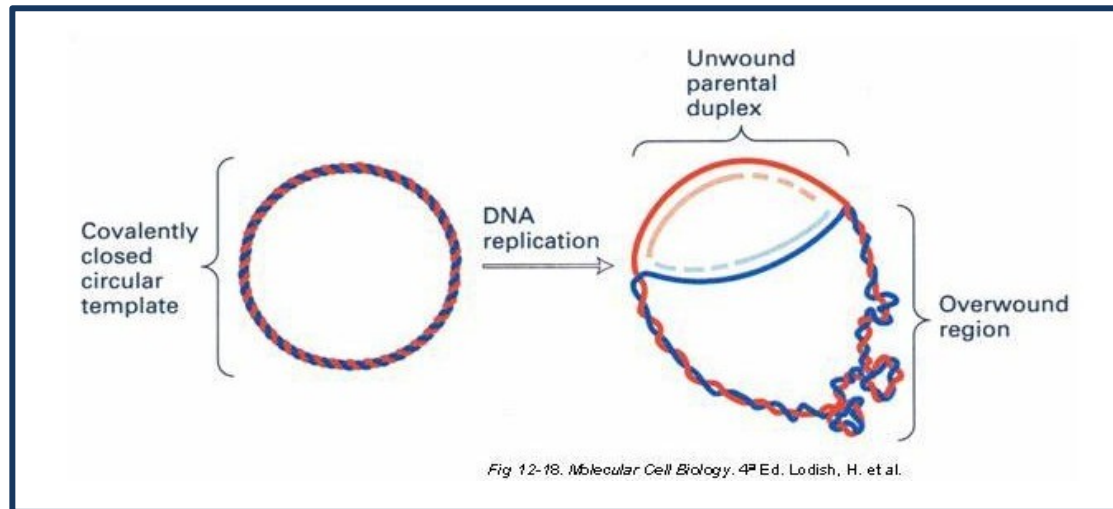
Son muy útiles para unir fragmentos de ADN de distintas procedencia previamente cortados por la misma enzima de restricción.

Existen también ligasas de ARN que permiten circularizar moléculas monocatenarias.

ENZIMAS EMPLEADAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

TOPOISOMERASAS

Las topoisomerasas relajan la tensión de la doble hélice de ADN próximas a las burbujas de replicación o transcripción.



Se utilizan para relajar estructuras superenrolladas de ADN, como paso previo a la aplicación de otras técnicas de biología molecular.