

Herramientas básicas para la síntesis de ADN recombinante

TEMA 4: HERRAMIENTAS BÁSICAS EN LAS TECNOLOGÍAS DEL ADN RECOMBINANTE.

Nucleasas (exonucleasas y endonucleasas), enzimas modificadoras de extremos, ligasas, polimerasas. Generación de ADN recombinante. Fragmentación del ADN. Enzimas de restricción: propiedades y aplicaciones. Ligación de extremos cohesivos y extremos romos. Ingeniería de extremos. Linkers, adaptadores. Métodos de ensamblaje de moléculas de ADN. Vectores de ADN. Tipos de Vectores. Vectores plasmídicos de clonado, de expresión y otros tipos de vectores. Clonación de vectores de expresión. Técnicas de clonación de secuencias de ADN. Técnicas de transformación, transfección y selección celular.

Enzimas básicas en la tecnología del ADN recombinante:

- Nucleasas
- Ligasas
- Polimerasas
- Otras enzimas



Nucleasas:

Las nucleasas son enzimas capaces de hidrolizar los enlaces fosfodiéster que se dan entre los nucleótidos de los ácidos nucleicos.

Pueden clasificarse según diversos criterios:

1) Sustrato sobre el que actúan.

2) Lugar de corte.

3) Dejan fosfato 5' o fosfato 3'.

4) Especificidad de corte:

Dependiente de la secuencia de bases nitrogenadas o no

Clasificación Nucleasas:

1) Sustrato:

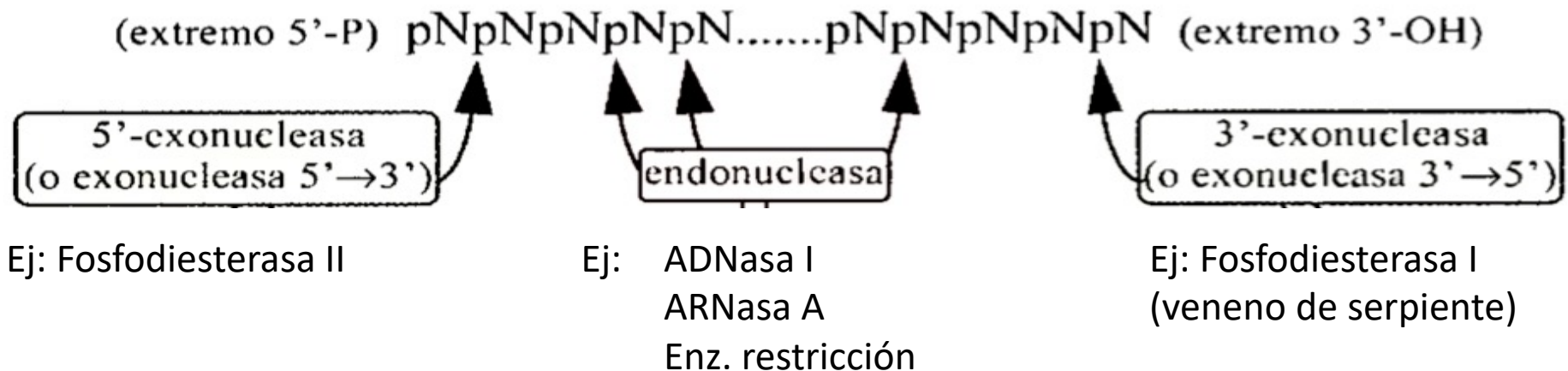
- ADN: desoxiribonucleasa
 - ADN simple cadena
 - ADN doble cadena
- ARN: ribonucleasa
- Híbrido ARN-ADN

Ej: Ribonucleasa H, elimina ARN de híbridos doble cadena ADN-ARN (en la replicación elimina el cebador de ARN sintetizado por la primasa).

Clasificación Nucleasas:

2) Lugar de corte:

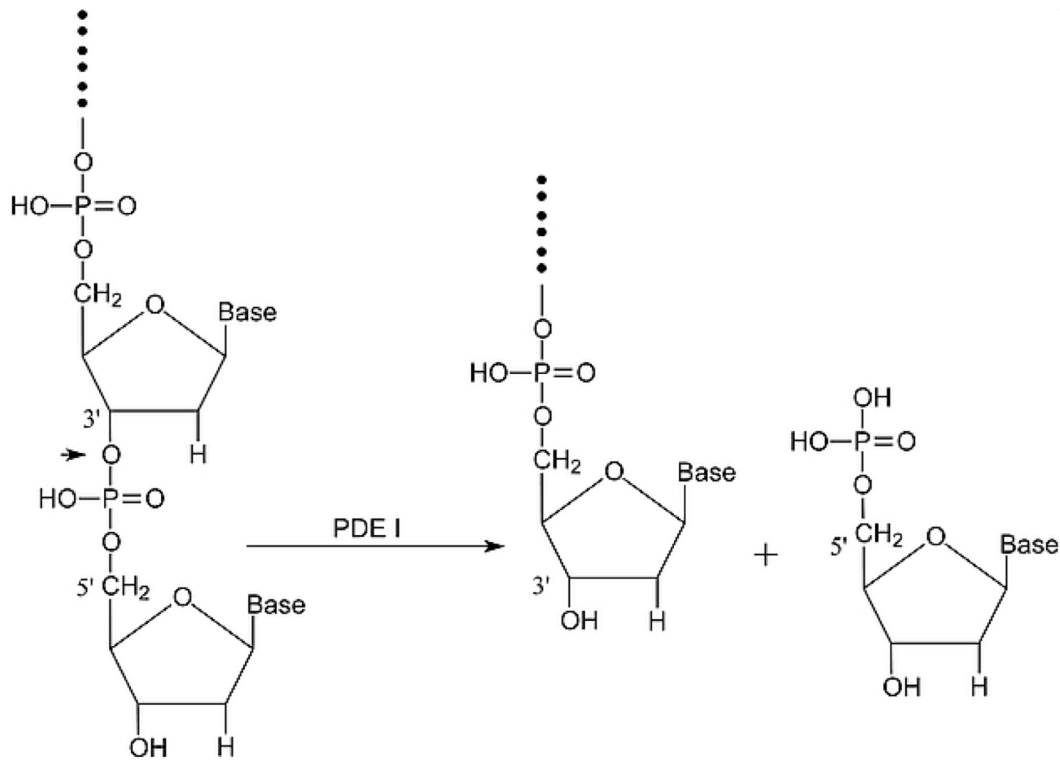
Extremo 5' o 3' o Interno.



Exonucleasa

Ej: Fosfodiesterasa I (Phosphodiesterase ,PDE I) rompe los enlaces fosfodiester del extremo 3' (tipo a, 5'P).

- También llamada de veneno de serpiente.



3' Hydroxy terminus

Sigma, la vende extraída de crótalo adamantino





Nucleases for DNA & RNA Digestion

Purification of proteins and specific nucleic acids often requires the digestion of DNA, RNA or both. Viscosity problems resulting from high DNA concentrations and enzymatic cell dissociation methods are often enhanced utilizing DNase.

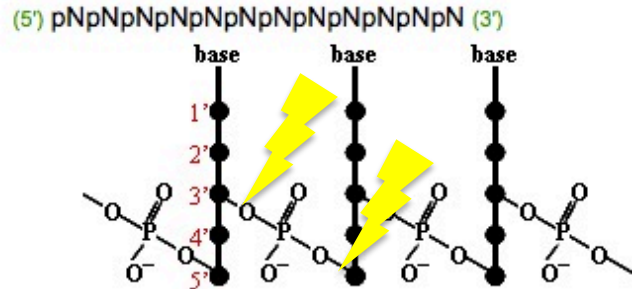
| Non-Specific Nucleases | Endo-nuclease | Exo-nuclease | DNA | DNA | RNA | Hybrid | Yields | |
|-------------------------|---------------|--------------|---------------|---------------|-----|--------|--------------|--------------|
| | | | Single Strand | Double Strand | | RNA | 3'-Phosphate | 5'-Phosphate |
| Benzonase | X | | X | X | X | | | X |
| DNase I | X | | X | X | | | | X |
| DNase II | X | | X | X | | | X | |
| Exonuclease III | | X | | X | | | | X |
| Micrococcal Nuclease | X | X | X | X | | | X | |
| Nuclease P ₁ | | | X | | X | | | X |
| Nuclease S ₁ | X | X | X | | X | | | X |
| Phosphodiesterase I | | X | | | | | | X |
| Phosphodiesterase II | | X | X | X | X | | | X |
| RNase A | X | | | | X | | X | |
| RNase H | X | | | | | X | | X |
| RNase T ₁ | X | | | | X | | X | |

Clasificación Nucleasas:

3) Dejan fosfato 5' o fosfato 3' (independiente de si son exo o endonucleasas)

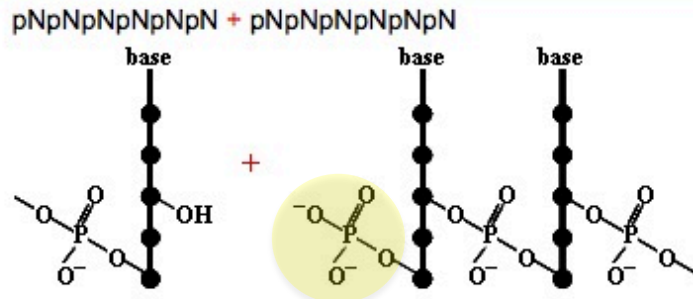
- TIPO a: 5' fosforilado.
- TIPO b: 3' fosforilado.

Ejemplo:



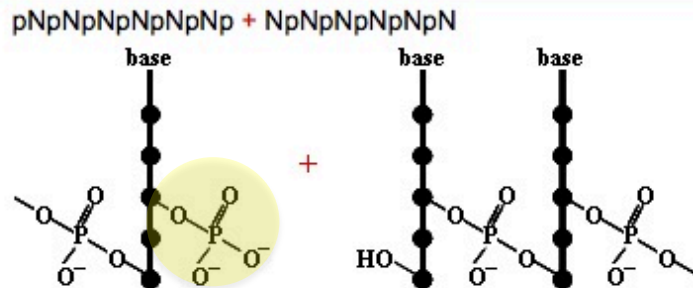
(Las bolitas negras representan el C de la ribosa)

acción de nucleasa "a" ✨



Hidrolizan los enlaces fosfato formados con el OH 3'
Producen extremos 3'-OH y 5'-P

acción de nucleasa "b" ✨



Hidrolizan los enlaces fosfato formados con el OH 5'
Producen extremos 3'-P y 5'-OH

Clasificación Nucleasas:

4) Especificidad de corte

Dependiente de la secuencia de bases nitrogenadas o no.

- Sin especificidad: ADNasa I
- Especificidad, diferentes grados:
 - Detrás de pirimidinas: ARNasa A
 - Específica de secuencia: endonucleasas de restricción.

Nucleasas de interés en biotecnología

- **Nucleasas usadas en la digestión de ADN o ARN** (estudiadas en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos).
- **Nucleasas que hacen extremos romos** (estudiadas más adelante)
 - Nucleasa S1.
 - Mung bean nuclease.
- **Enzimas de restricción.**

Endonucleasas de Restricción

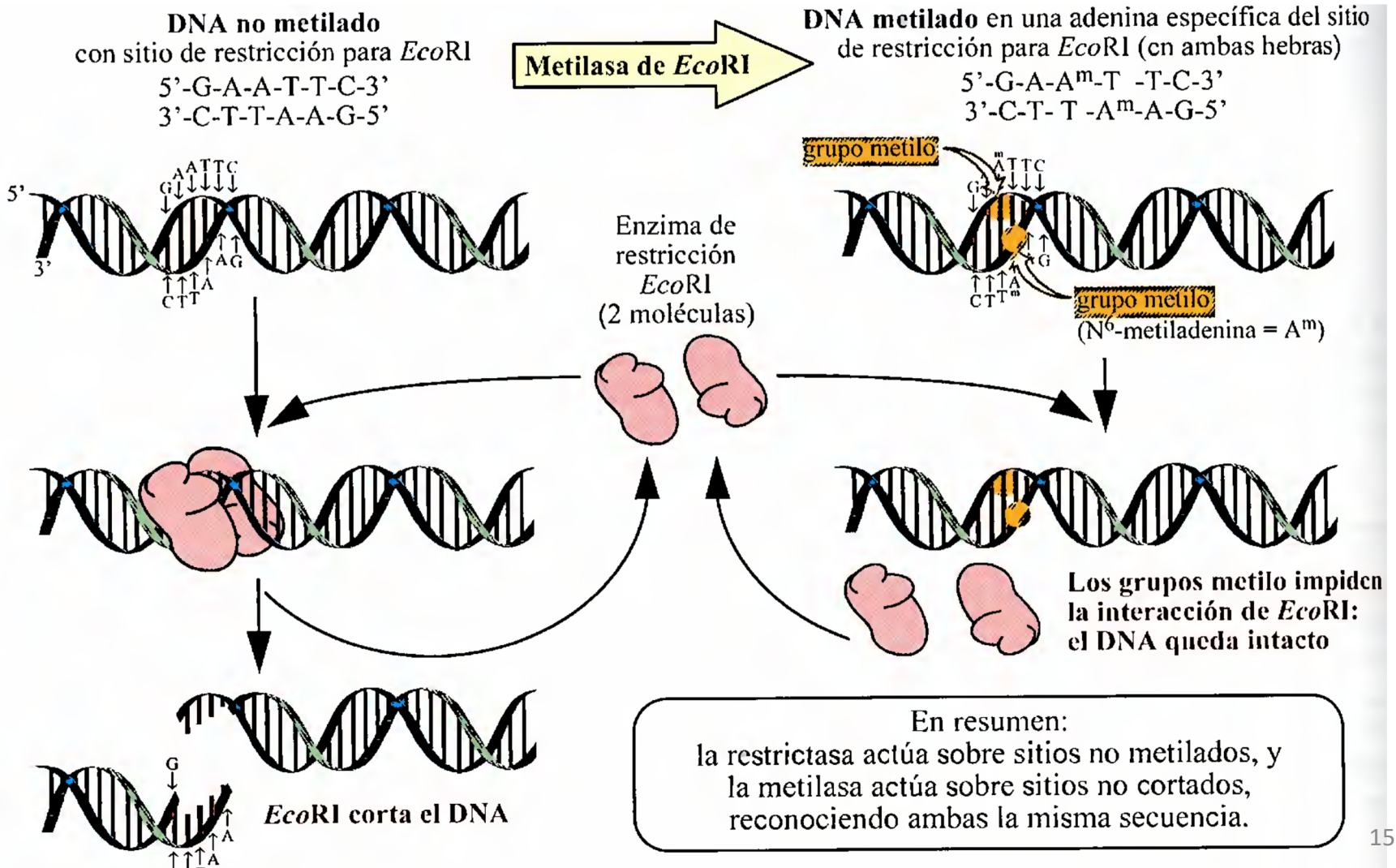
- Enzimas nucleolíticas que catalizan la hidrólisis de enlaces fosfodiéster **internos** en las **dos hebras** de una molécula de **dsDNA** de forma **específica**.
- En la naturaleza **forman parte del sistema de restricción-modificación bacteriano** (abreviadamente sistema R-M), que sirven a las bacterias para reconocer y destruir material exógeno.

- Existen varios sistemas de R-M, los de **tipo II**, son los más comunes en el mundo bacteriano.
 - Tienen las actividades metilasa y endonucleasa separadas en diferentes subunidades.
 - Son los más utilizados en biología molecular:
 - Gran especificidad.
 - Estructuralmente sencillas, lo que facilita su aislamiento, producción y manejo.
- Existen más de un millar caracterizadas.
 - Pueden conocer una secuencia específica.
 - Pueden reconocer varias secuencias.

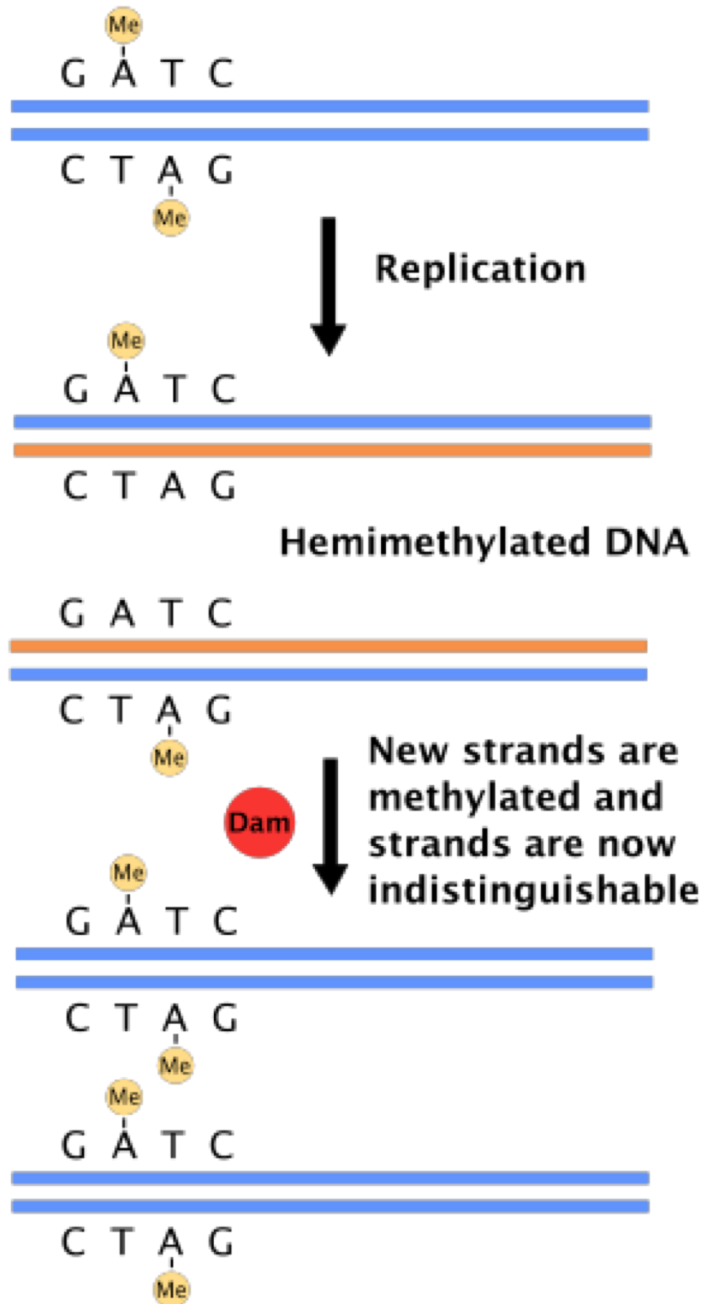
Tipos de endonucleasas de restricción.

| Endonucleasas de restricción | Tipo I | Tipo II | Tipo III |
|--------------------------------|---|--|---|
| Actividad enzimática | Endonucleasa y metilasa en una misma proteína (en distintas subunidades) | Endonucleasa (metilasa en una proteína independiente) | Endonucleasa y metilasa en una misma proteína (en distintas subunidades) |
| Coenzimas o cosustratos | ATP, Mg ²⁺ , SAM (*) | Mg ²⁺ | ATP, Mg ²⁺ , SAM (*) |
| Estructura proteica | 3 subunidades: S reconocimiento, R restricción, M metilación | 1 subunidad, aunque actúa como homodímero | 2 subunidades: MS reconocimiento y metilación, R restricción |
| Sitio de reconocimiento | No palindrómico, dos partes separadas (ej.: TGA(N) ₈ TGCT) | Palindrómico (4-8 pb) | No palindrómico |
| Punto de corte | Corta las 2 hebras en puntos cercanos entre sí, poco específicos, a unos 1.000 pb del sitio de reconocimiento | Corta las 2 hebras en puntos equivalentes, muy específicos, dentro de la secuencia de reconocimiento | Corta las dos hebras en puntos distantes entre sí 2 ó 3 nt, situados a 24-26 pb del sitio de reconocimiento |
| Punto de metilación | Dentro de la secuencia de reconocimiento. En ambas hebras | Adenina o citosina muy específicas dentro de la secuencia de reconocimiento. En ambas hebras | Adenina dentro de la secuencia de reconocimiento. En una sola hebra |
| Interés en ingeniería genética | No | Sí | No |

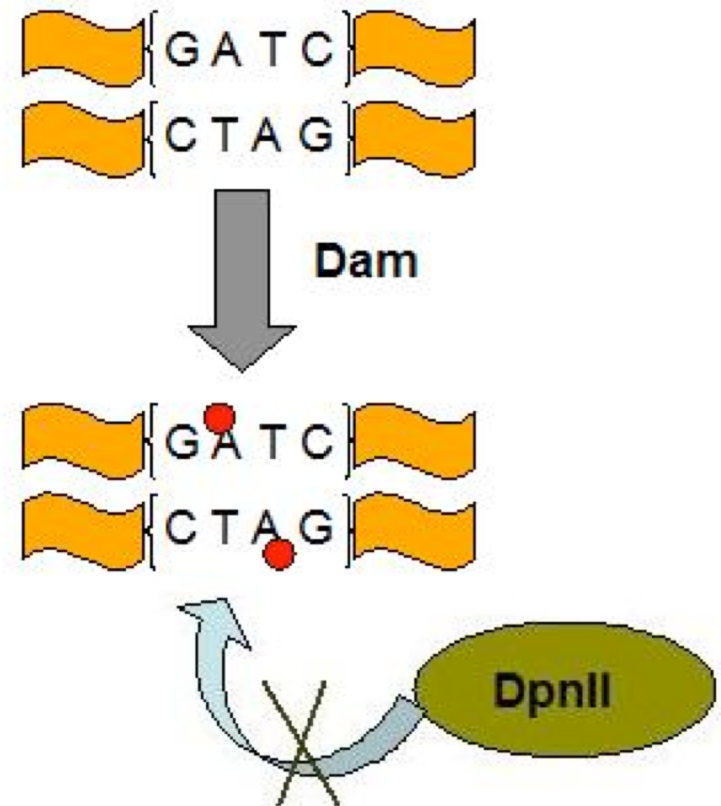
Papel Biológico Sistema R-M



Metilación



Restricción



Nomenclatura ER:

Eco RI

E = género *Escherichia*.

co = especie: coli

R = estirpe, cepa RV 13.

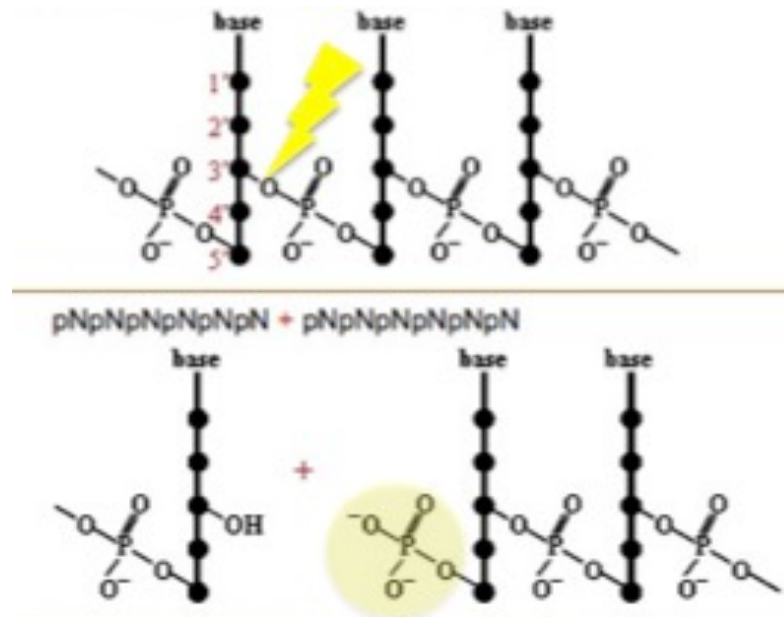
I = primera endonucleasa aislada de esta cepa.

Haemophilus aegyptius
Hae III

Escherichia coli,
Eco RI
cepa RY13

Bacillus amyloliquefaciens,
Bam HI
cepa H

- Las enzimas de restricción son nucleasas de tipo “a”, por lo que dejan siempre los P unidos al extremo 5’ y sus extremos pueden ser unidos mediante las ligasas.



Diana:

- Longitud nucleótidos variable dependiendo del enzima concreto que se estudie.
- Cuanto más pequeña, más probable es que aparezca.
- La probabilidad de que en una secuencia de ADN generada **al azar** se encuentre una determina secuencia de 6 pares de bases es de $(1/4)^6 = 1/4096$
8 pares de bases es de $(1/4)^8 = 1/65536$
(en realidad, las secuencias no son al azar, y difieren de estos valores, pero pueden tomarse como referencia).
- Por lo general se tratan de estructuras palindrómicas (simetría rotacional) pero existen excepciones.

Secuencia palindrómica

EcoRI

Lectura (5'-3')



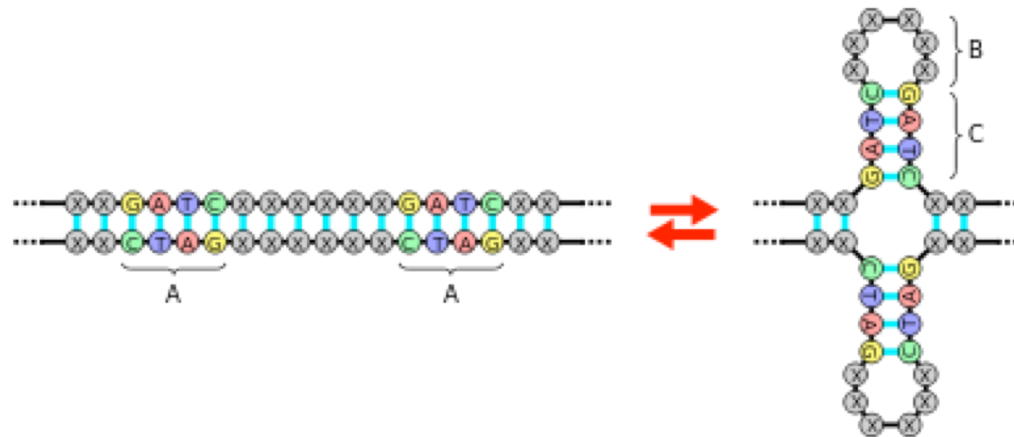
5'GAATTC 3'

3'CTTAAG 5'



Lectura (5'-3') (en la hebra antiparalela)

OJO: no es que se lean igual en la misma hebra, si no en la hebra reverso complementaria



La secuencia palindrómica permite la creación de estructuras en forma de bucle en el ADN, mediante asociaciones intracatenarias.

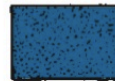
Puntos de Rotura de la diana:

- Los puntos de rotura son dos enlaces fosfodiester localizados uno en cada hebra.
- Según donde se produzcan estos dos cortes las enzimas pueden generar extremos:

- 3' protuberantes
- 5' protuberantes
- Romos

HaeIII

5'-GGCC-3'



Blunt

PstI

5'-CTGCAG-3'



3'-protruding

EcoRI

5'-GAATTC-3'



5'-protruding

- Los cortes en cada una de las hebras se disponen simétricamente según el eje de corte, por lo que su nomenclatura puede simplificarse.

Nomenclatura diana:

| <i>Microorganisms</i> | <i>Restriction enzymes</i> | <i>Cleavage sites</i> | <i>Cleavage products</i> |
|--------------------------------------|----------------------------|---|--|
| <i>Bacillus amy-loliquefaciens H</i> | <i>Bam</i> HI | $\begin{array}{c} \downarrow \\ 5\text{-GGATCC-3} \\ 3\text{-CCTAGG-5} \\ \uparrow \end{array}$ | $\begin{array}{cc} 5\text{-G} & \text{GATCC-3} \\ 3\text{-CCTAG} & \text{G-5} \end{array}$ |
| <i>B. globigii</i> | <i>Bgl</i> II | $\begin{array}{c} \downarrow \quad \uparrow \\ 5\text{-AGATCT-3} \\ 3\text{-TCTAGA-5} \\ \uparrow \end{array}$ | $\begin{array}{cc} 5\text{-A} & \text{GATCT-3} \\ 3\text{-TCTAG} & \text{A-5} \end{array}$ |
| <i>Escherchia coli RY13</i> | <i>Eco</i> RI | $\begin{array}{c} \downarrow \quad \uparrow \\ 5\text{-GAATTC-3} \\ 3\text{-CTTAAG-5} \\ \uparrow \end{array}$ | $\begin{array}{cc} 5\text{-G} & \text{AATTC-3} \\ 3\text{-CTTAA} & \text{G-5} \end{array}$ |
| <i>Haemophilus influenzae Rd</i> | <i>Hin</i> dIII | $\begin{array}{c} \downarrow \quad \uparrow \\ 5\text{-AAGCTT-3} \\ 3\text{-TTCGAA-5} \\ \uparrow \end{array}$ | $\begin{array}{cc} 5\text{-A} & \text{AGCTT-3} \\ 3\text{-TTCGA} & \text{A-5} \end{array}$ |
| <i>H. parainfluenzae</i> | <i>Hpa</i> I | $\begin{array}{c} \downarrow \quad \uparrow \\ 5\text{-GTTAAC-3} \\ 3\text{-CAATTG-5} \\ \uparrow \downarrow \end{array}$ | $\begin{array}{cc} 5\text{-GTT} & \text{AAC-3} \\ 3\text{-CAA} & \text{TTG-5} \end{array}$ |
| <i>Klebsiella pneumoniae OK 8</i> | <i>Kpn</i> I | $\begin{array}{c} \downarrow \quad \uparrow \\ 5\text{-GGTACC-5} \\ 3\text{-CCATGG-3} \\ \uparrow \end{array}$ | $\begin{array}{cc} 5\text{-GGTAC} & \text{C-3} \\ 3\text{-C} & \text{CATGG-5} \end{array}$ |
| <i>Streptomyces albus G</i> | <i>Sal</i> I | $\begin{array}{c} \downarrow \quad \uparrow \\ 5\text{-GTCGAC-3} \\ 3\text{-CAGCTG-5} \\ \uparrow \end{array}$ | $\begin{array}{cc} 5\text{-G} & \text{TCGAC-3} \\ 3\text{-CAGCT} & \text{G-5} \end{array}$ |
| <i>Staphylococcus aureus 3AI</i> | <i>Sau</i> 3AI | $\begin{array}{c} \downarrow \quad \uparrow \\ 5\text{-GATC-3} \\ 3\text{-CTAG-5} \\ \uparrow \end{array}$ | $\begin{array}{cc} 5\text{-} & \text{GATC-3} \\ 3\text{-CTAG} & \text{5} \end{array}$ |

Nomenclatura Simplificada (simetría)

G'GATCC

A'GATCT

Romos

3' protuberantes

5' protuberantes



Especificidad relajada

La especificidad relajada implica que en alguna posición de la diana el enzima de restricción puede aceptar más de un nucleótido diferente:

AvaI C'YCGRG
SecI CC'NNGG
StyI C'CWGG

Algunas dianas con especificidad relajada pueden reconocer a secuencias que no sean perfectamente palindrómicas.

AvaI C'TCGAG C'TCGGG C'CCGAG C'CCGGG

No palíndromos

N= A,T,C,G W= A o T Y= T o C R= A o G

Isosquizómeros

- Enzimas que reconocen **la misma secuencia diana.**
- Algunos *Clal* y *BanIII* **cortan en sitios idénticos.**

Clal y *BanIII* 5' AT'CGAT 3'

- Algunos como *SmaI* y *XmaI* sitios **diferentes de corte:**

SmaI 5' CCC'GGG 3'

XmaI 5' C'CCGGG 3'

Extremos compatibles

Los extremos **romos** son siempre **compatibles** para volver a pegarse.
Los **extremos protuberantes** son por lo general **incompatibles**, salvo excepciones:

*Xba*I



*Nhe*I



Frecuentemente al ligar extremos compatibles provenientes de enzimas diferentes se pierden las dianas



Tras ligar extremos *Xba*I, *Nhe*I se pierden ambas dianas

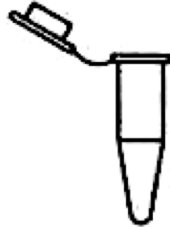
Actividad Estrella

En ciertas condiciones **alejadas de las óptimas**, algunas endonucleasas de restricción pueden cortar un DNA por sitios algo distintos a sus dianas específicas, y pierde especificidad.

| | | |
|--------------|--------------------|---------|
| <i>EcoRI</i> | Actividad normal | G'ATTTC |
| <i>EcoRI</i> | Actividad estrella | N'AATTN |

Protocolo digestión enzimática

a) Preparación de la mezcla de digestión: se añade a un tubo eppendorf:



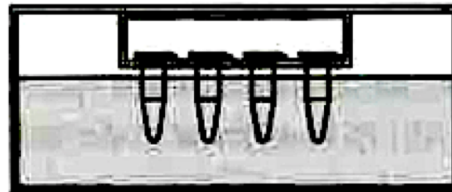
- 2 μ l de una disolución 10 x del medio de digestión.
- 1-2 μ g de DNA sustrato disuelto un máximo de 16 μ l de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7'5).
- 2-5 unidades de enzima disueltas en su medio de conservación (2 μ l de volumen máximo).
- Agua destilada, hasta un volumen final de 20 μ l.

Medio de digestión: condiciones finales (1 x):

- Disolución tampón, Tris-HCl o Tris-acetato, de 10 mM a 50 mM, pH de 7'5 a 8'0.
- Cationes Mg^{2+} , normalmente acetato o cloruro, de 5 a 10 mM.
- Fuerza iónica, como NaCl o acetato potásico, entre 50 y 100 mM.
- Reductor: ditioneitol (DTT), ditioneitol (DTE) o 2-mercaptoetanol (2ME), 0'5-1 mM.
- Albúmina de suero bovino (BSA), optativo, a 200 μ g/ml.

b) Incubación de la mezcla:

en un baño de agua, a la temperatura óptima de la enzima (normalmente 37 °C; en casos particulares desde 25 hasta 65 °C).



c) Detención de la digestión mediante:

- Incubación de la mezcla a alta temperatura, con el fin de desnaturalizar irreversiblemente la enzima.
- Adición de EDTA 0'5 M, pH 8'0, hasta una concentración final de 10 mM, para secuestrar los iones Mg^{2+} .
- Extracción de la mezcla con fenol/cloroformo, para eliminar la enzima.
- Precipitación posterior del DNA con etanol.



Comercialización de enzimas

- Existen un cientos de enzimas disponibles comercialmente (NEB, Promega, Fermentas, etc).
- Aunque se aislaron de bacterias diferentes, para su generación se han clonado y producen en *E. coli*, esto ha conseguido disminuir el precio de las enzimas.

La actividad de las enzimas de restricción se mide en **unidades**:

1 Unidad: La cantidad de enzima necesaria para digerir totalmente 1 μg de ADN del fago λ en 1 hora a 37°C en un volumen total de 50 μl .



| Description | Price | Quantity | Subtotal |
|--------------------------------|----------|----------|------------|
| Xbal 15,000 units R0145L | \$260.00 | 1 | \$260.00 X |
| Xmal 2,500 units R0180M | \$252.00 | 1 | \$252.00 X |
| Zral 1,000 units R0659L | \$240.00 | 1 | \$240.00 X |
| Tsel 375 units R0591L | \$240.00 | 1 | \$240.00 X |
| Subtotal: | | | \$992.00 |



x1

El precio de las enzimas es muy variable

x40

Es habitual que dos enzimas funcionen con diferente eficacia en un mismo tampón. Para realizar digestiones dobles se utilizan tampones universales a fin de acomodar actividades aceptables.



| Enzyme | Cat # | Temp | Supplied NEBuffer | Supplements | % Activity in NEBuffer | | | |
|---|-------|------|-------------------|-------------|------------------------|------|-----|----------|
| | | | | SAM | 1.1 | 2.1 | 3.1 | CutSmart |
| BamHI  | R0136 | 37°C | NEBuffer 3.1 | no | 75* | 100* | 100 | 100* |
| HindIII  | R0104 | 37°C | NEBuffer 2.1 | no | 25 | 100 | 50 | 50 |

- Algunas enzimas de restricción pueden **inactivarse** mediante calor, otras se deben eliminar mediante purificación.
- Algunas enzimas son más **rápido** que otras: *BamHI* es capaz de digerir 1ug de ADN en 10 minutos.

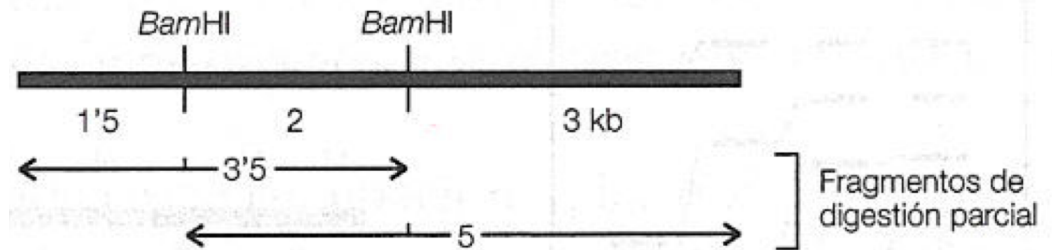


Digestión Parcial

Si el ADN no corta el 100% de las moléculas (no hay suficiente enzima, se incuba poco tiempo, o las condiciones son subóptimas) se crea una digestión parcial que complica la interpretación de los resultados.



Digestión Parcial y Total



Aplicaciones ER

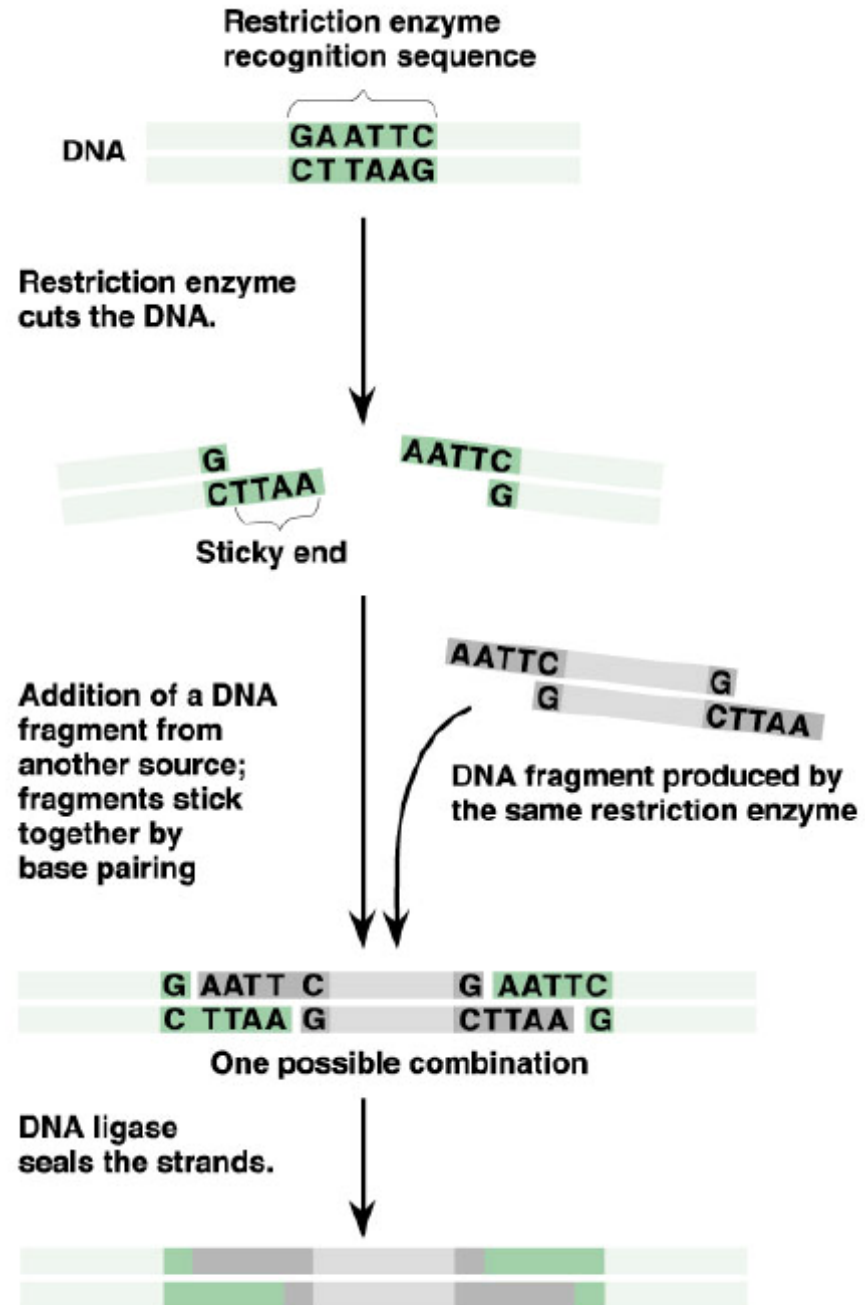
- I) Creación de ADN recombinante y clonación molecular de ADN.

- II) Identificación de secuencias de ADN:
 - Plásmidos: Mapas de restricción (prácticas).
 - Genotipado:
Determinación de secuencia genómica de polimorfismos.
PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism).

Creación de ADN recombinante y clonación molecular de ADN

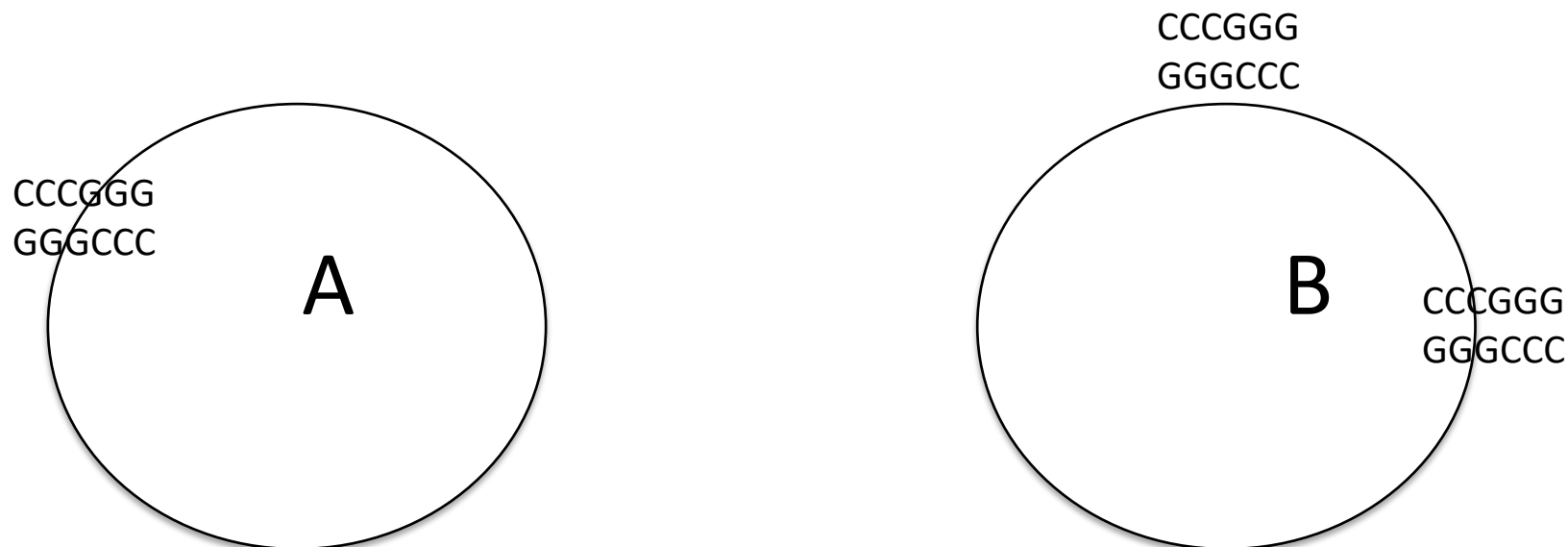
(Estudiado en detalle más adelante)

OJO: ADN recombinante, no debe confundirse con recombinación genética.

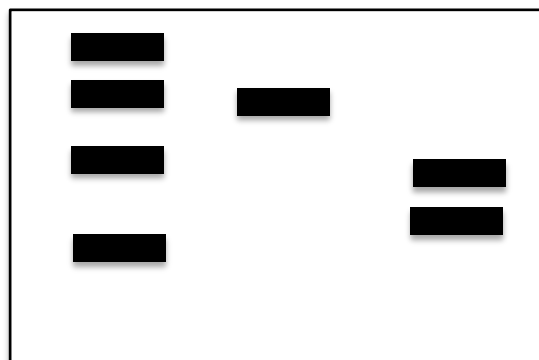


Mapas de restricción.

* Para “mapear” o “comparar” secuencias de ADN en base al patrón de bandas generado cuando la digestión se resuelve en un gel de agarosa.



Marcador Digestión A Digestión B



RFLP = restriction fragment length polymorphism.

- RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) técnica que se utiliza para diferenciar secuencias de ADN en virtud de que tengan cortes diferenciales con enzimas de restricción.
- Suele combinarse con PCR o Southerblot.
- Ha perdido importancia debido a la secuenciación, que es mucho más informativa, pero llegó a ser de los primeros en el genotipado masivo de muestras.

Aplicaciones: ¿Reparan igual las diferentes formas de proteínas reparadoras del ADN? ¿Se asocian algunas de estas variaciones polimórficas con el cáncer?

Screening of Homologous Recombination Gene Polymorphisms in Lung Cancer Patients Reveals an Association of the *NBS1*-185Gln Variant and *p53* Gene Mutations¹

Pedro P. Medina, Steven A. Ahrendt, Marina Pollan, Paloma Fernandez, David Sidransky, and Montserrat Sanchez-Cespedes²

Molecular Pathology Program, Spanish National Cancer Center (CNIO), 28029 Madrid, Spain [P. P. M., P. F., M. S.-C.]; Cancer Epidemiology Unit, National Center for Epidemiology, Carlos III Institute of Health, 28029 Madrid, Spain [M. P.]; Department of Surgery, University of Rochester, New York 14642 [S. A. A.]; and Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland 21205-2196 [D. S.]

and the *NBS1*-185Gln allele remained statistically significant after adjusting for age, smoking, and histological cell-type (odds ratio = 3.42 for heterozygous and odds ratio = 38.3 for *NBS1*-185Gln homozygous). Germ-line variants in the *NBS1* gene may play a role in the lung carcinogenesis in cigarette smokers.

Introduction

The contribution of DNA repair deficiencies to sporadic cancer is not completely elucidated. Interestingly, individuals with

Polimorfismo 243M/M para gen *XRCC3*

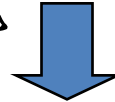
GTGTGTGAATAAGAAGGTC CCGTACTGCTGTCTCGGGG **CATG** GCTCGCCTGGTGGTCATCGACTCGGTGGCAGCCCCATTCCGCTGTGAATTTGAC
AGCCAGGCCTCCGCCCCAGGGCCAGGCATCTGCAGTCCCTGGGGGC **CATG** CTGCGTGAGCTGAGCAGTGCCTTCCAGAGCCCTGTGCTGTG
CATCAACCAG GTGAGCACCA AGGCAGGGTT GCACCCCTGAGCTCGTATTT TTAGCCAGGA TGCG

PCR



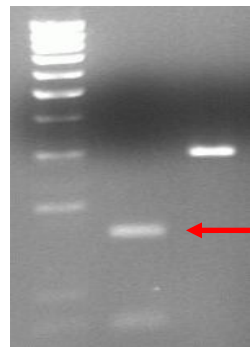
GTGTGTGAATAAGAAGTCCCCGACTGCTGTCTCGGGG **CATG** GCTCGCCTGGTGGTCATCGACTCGGTGGCAGCCCCATTCCGCTGTGAATTTGAC
AGCCAGGCCTCCGCCCCAGGGCCAGGCATCTGCAGTCCCTGGGGGC **CATG** CTGCGTGAGCTGAGCAGTGCCTTCCAGAGCCCTGTGCTGTG
CATCAACCAG GTGAGCACCA AGGCAGGGTT GCACCCCTGAGCTCGTATTT TTAGCCAGGA TGCG

Hsp92 II



- 43pb GTGTGTGAATAAGAAGTCCCCGACTGCTGTCTCGGGG **CATG**
- 105pb GCTCGCCTGGTGGTCATCGACTCGGTGGCAGCCCCATTCCGCTGTGAATTTGACAGCCAGGCCTCCGCCCCAGGGCCAGGCATCTGCAGTCCCTGGGGGC **CATG**
- 105pb CTGCGTGAGCTGAGCAGTGCCTTCCAGAGCCCTGTGCTGTG CATCAACCAG GTGAGCACCA AGGCAGGGTT GCACCCCTGAGCTCGTATTT TTAGCCAGGA TGCG

Gel Agarosa 2%



MM

Polimorfismo 243T/T para gen *XRCC3*

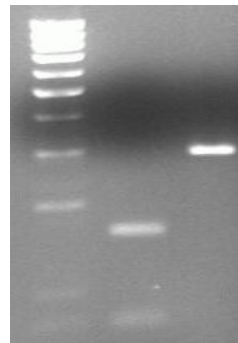
GTGTGTGAATAAGAAGGTCCCCGACTGCTGTCTCGGGG**CATG**GCTCGCCTGGTGGTCATCGACTCGGTGGCAGCCCCATTCCGCTGTGAATTTGAC
AGCCAGGCCTCCGCCCCAGGGCCAGGCATCTGCAGTCCCTGGGGGCCA**C**GCTGCGTGAGCTGAGCAGTGCCTTCCAGAGCCCTGTGCTGTG
CATCAACCAG GTGAGCACCA AGGCAGGGTGCACCCCTGAGCTCGTATTT TTAGCCAGGA TGCG

Hsp92 II



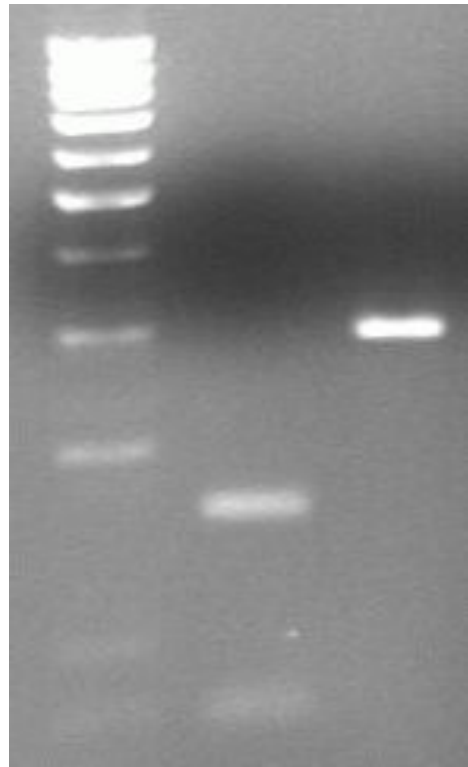
45pb GTGTGTGAATAAGAAGGTCCCCGACTGCTGTCTCGGGG**CATG**

210pb GCTCGCCTGGTGGTCATCGACTCGGTGGCAGCCCCATTCCGCTGTGAATTTGACAGCCAGGCCTCCGCCCCAGGGCCAGGCATCTGCAGTCCCTGGGGG
CCA**C**GCTGCGTGAGCTGAGCAGTGCCTTCCAGAGCCCTGTGCTGTG CATCAACCAG GTGAGCACCA AGGCAGGGTT GCACCCCTGAGCTCGTATTT
TTAGCCAGGA TGCG



← TT

Genotipado de *XRCC3* para la posición 243 de la cadena polipeptídica

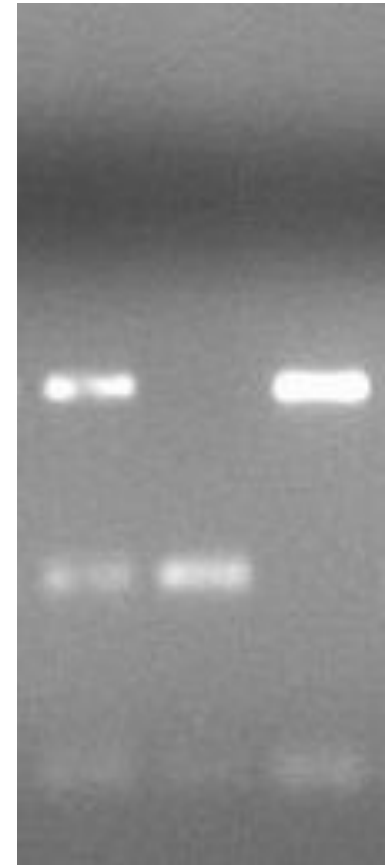


MM TT

← 210bp →

← 105pb + 105pb →

← 43bp →



TM MM TT

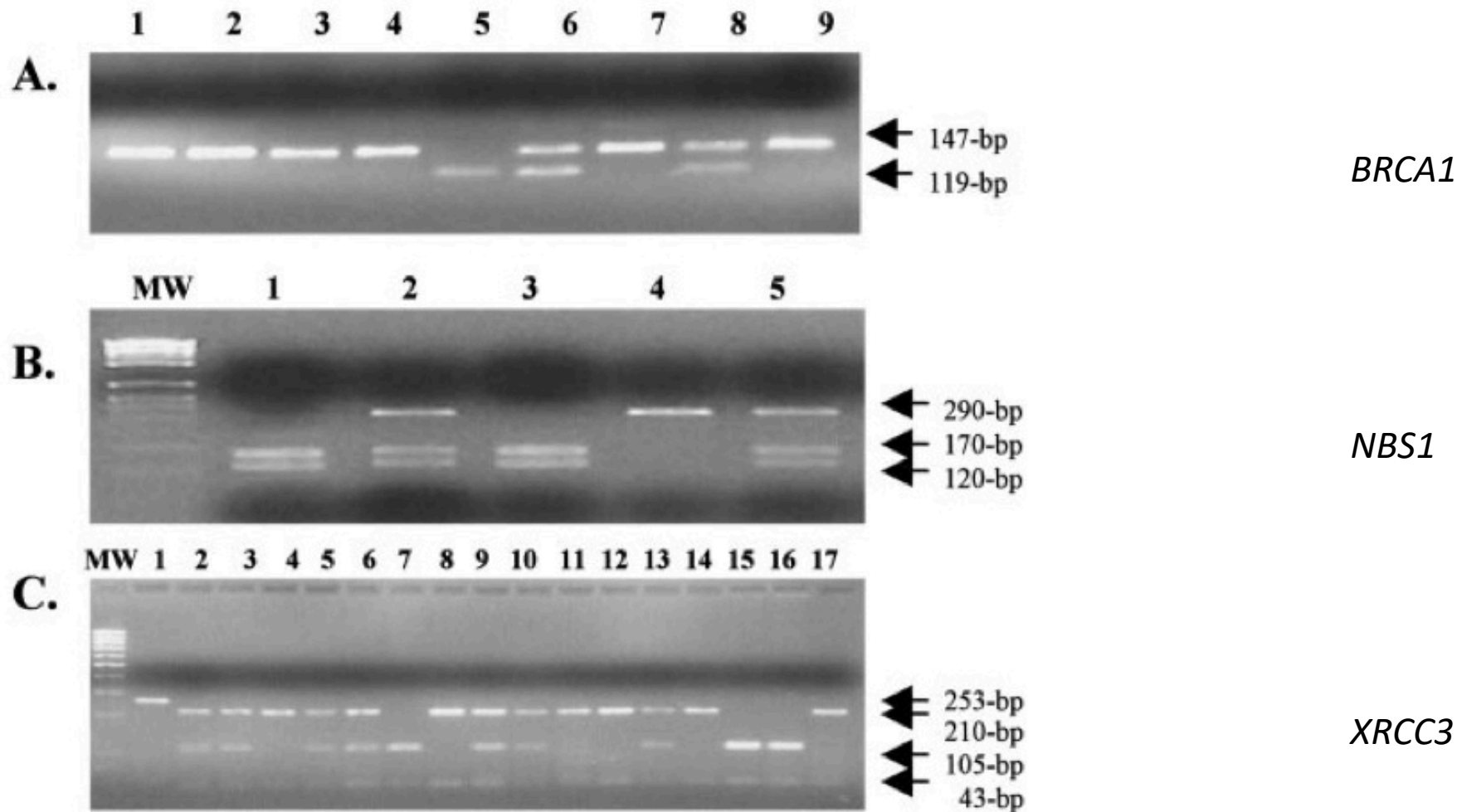


Fig. 1. PCR-RFLP of the different gene polymorphisms. A, BRCA2-Asn372His. Lanes 1–4, 7, and 9 represent Asn/Asn, Lane 5 represents His/His, and Lanes 6 and 8 represent the heterozygous Asn/His; B, NBS1-Glu185Gln. Lanes 1 and 3 represent the homozygous Glu/Glu, Lane 4 represents homozygous Gln/Gln, and Lanes 2 and 5 the heterozygous Glu/Gln and (C) XRCC3-Thr241Met. Lane 1 is an uncut control. Lanes 4, 8, 11, 12, 14, and 17 represent homozygous Thr/Thr, Lanes 2, 3, 5, 6, 9, 10, and 13 are heterozygous Thr/Met and Lanes 7, 15, and 16 are homozygous Met/Met. MW, molecular weight marker.

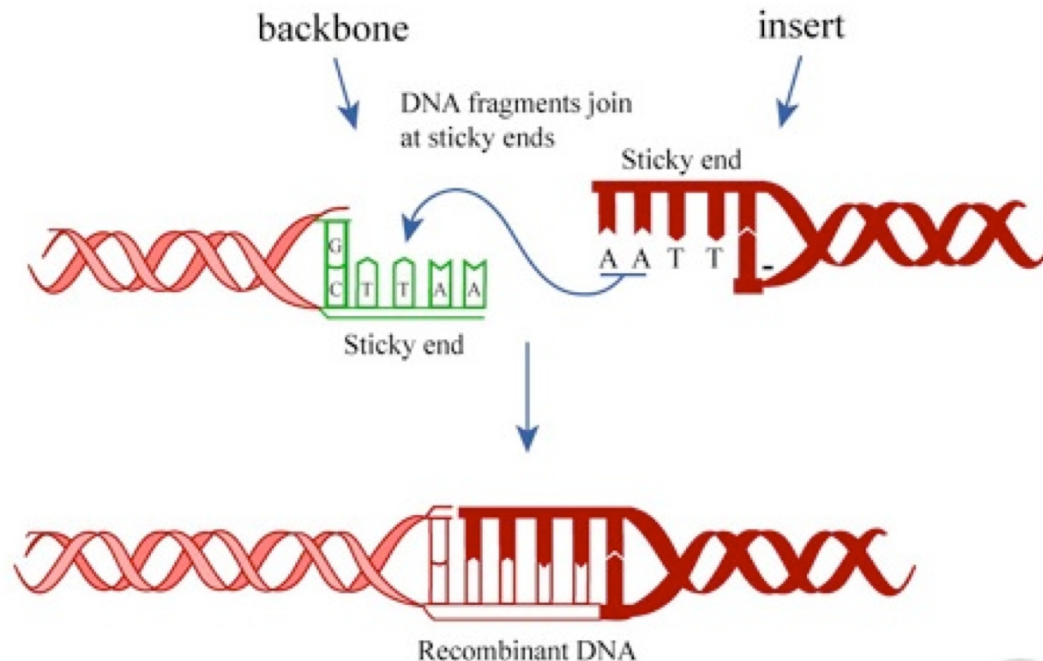
Enzimas básicas en la tecnología del ADN recombinante:

- Nucleasas
- **Ligasas**
- Polimerasas
- Otras enzimas



Ligasas

- Enzima que se utiliza para ligar covalentemente fragmentos de ADN.
- Catalizan la formación de un enlace fosfodiéster entre el **5' fosfato** de una hebra de ADN y el **3' hidroxilo** de otra hebra.



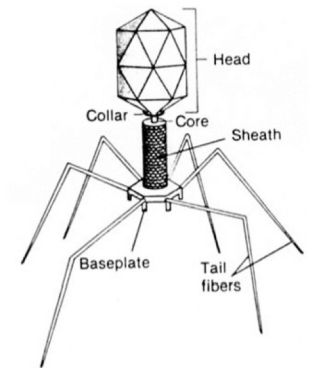
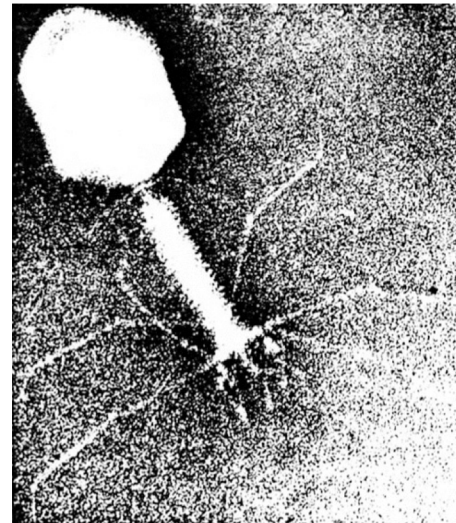
ADN Ligasas

Humanas:

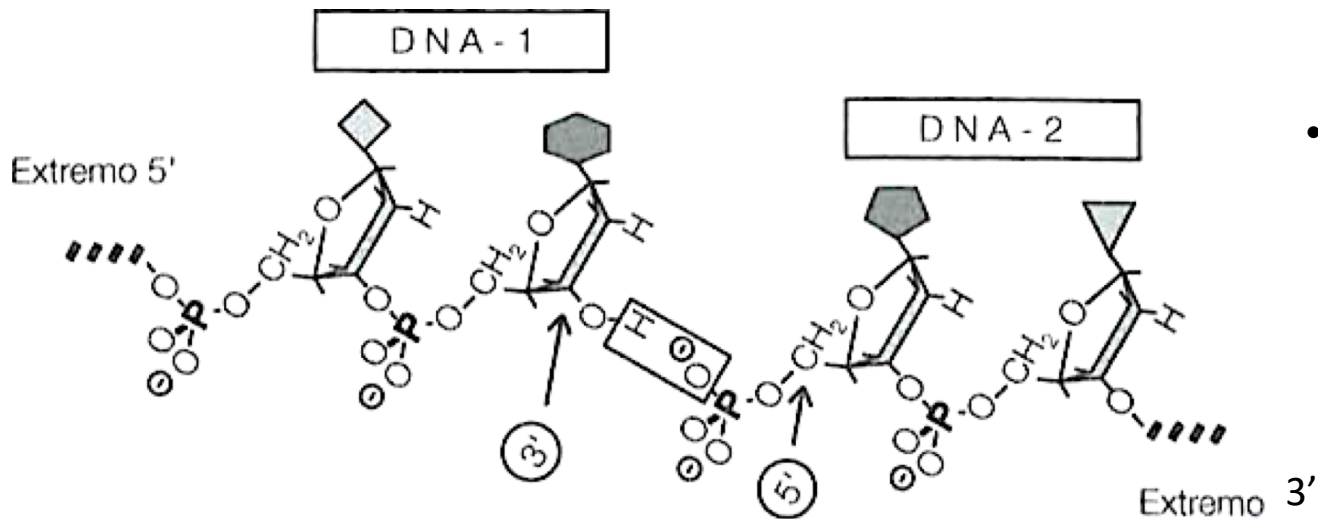
- ADN Ligasa I: Liga los fragmentos de okazaki de la hebra retrasada.
- ADN Ligasa II: forma alternativa de la ADN Ligasa III encontrada en células que no se dividen.
- ADN Ligasa III: participa en los procesos de reparación por escisión de nucleótidos
- ADN Ligasa IV: participa en los procesos de reparación de doble de ADN cadena por unión de extremos sin homología.

Utilizadas en Biología Molecular:

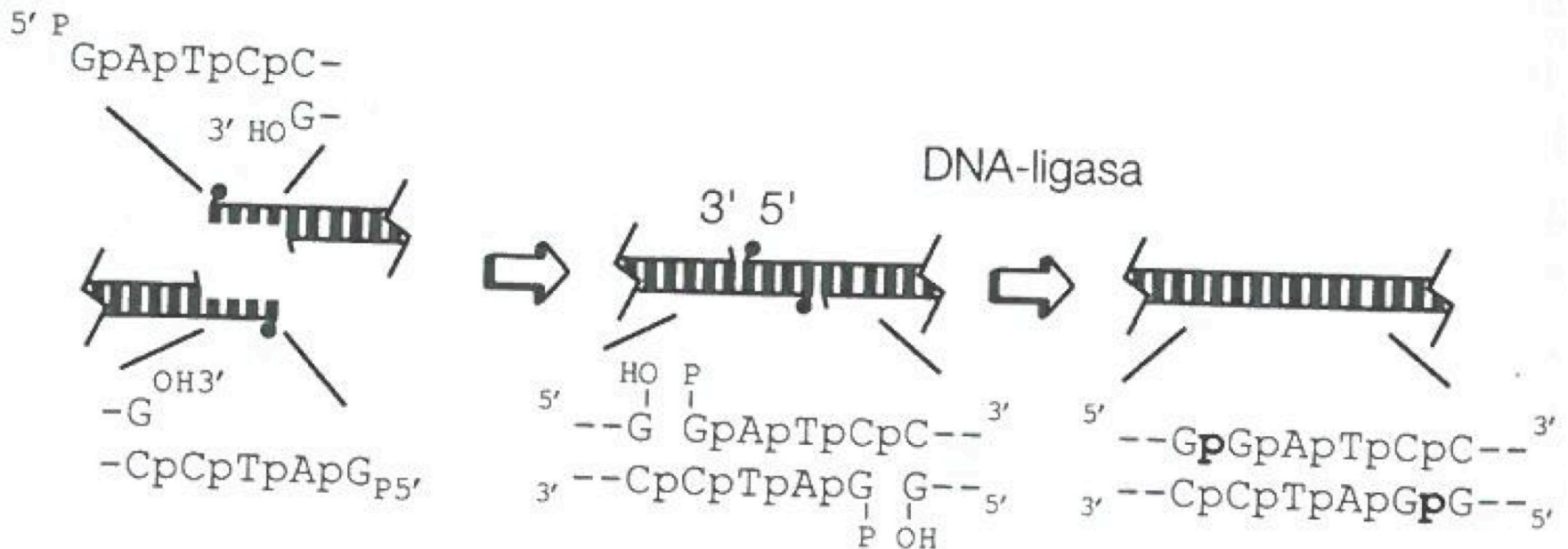
- ADN Ligasa del fago T4.
- ADN Ligasa del fago T7.
- ADN Ligasa del *E.coli*.

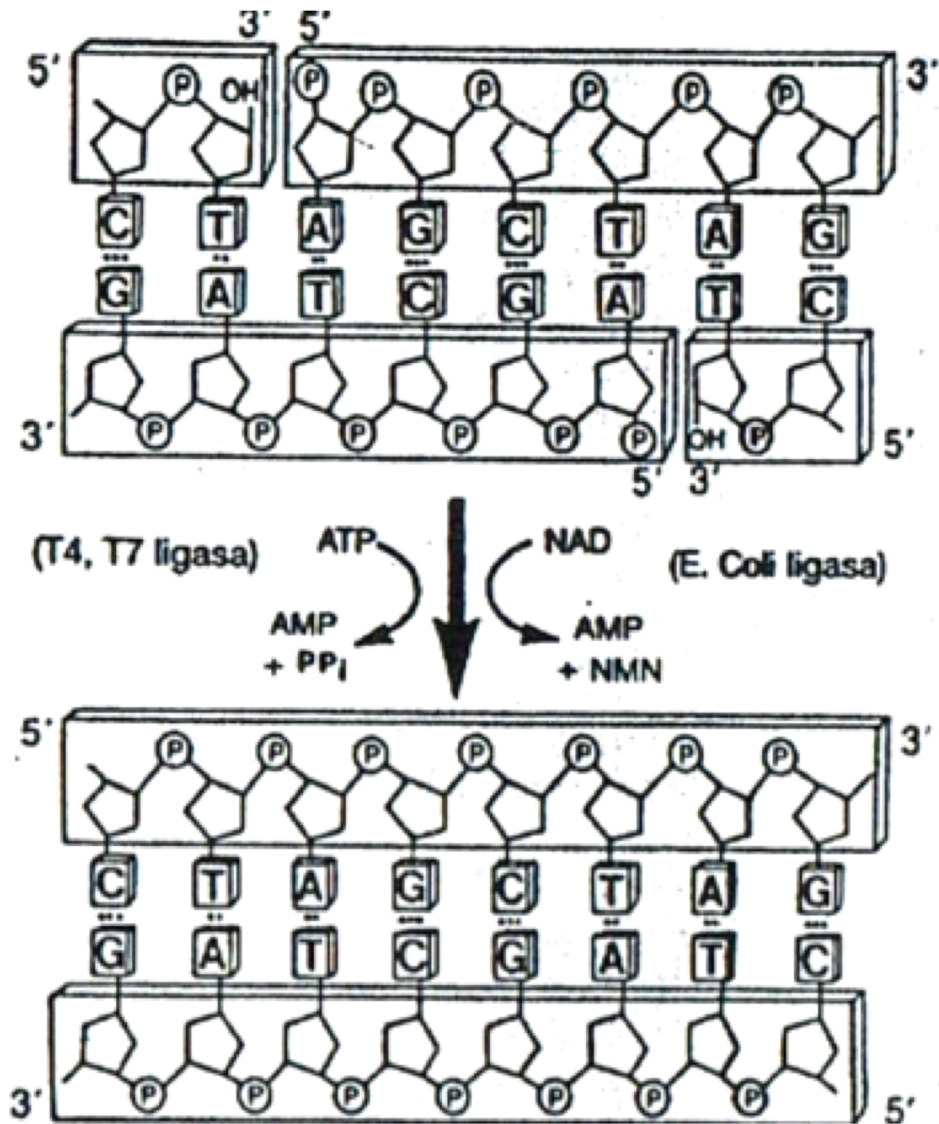
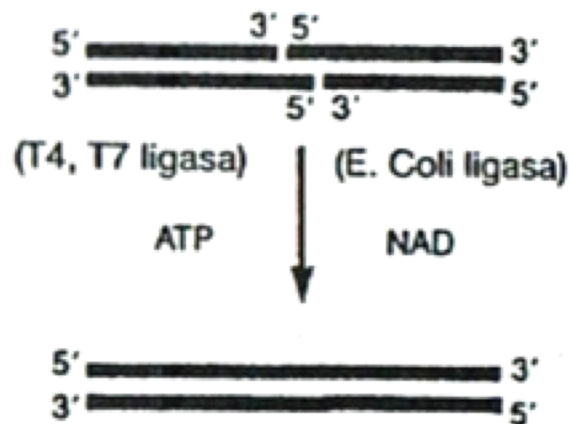


Ligación



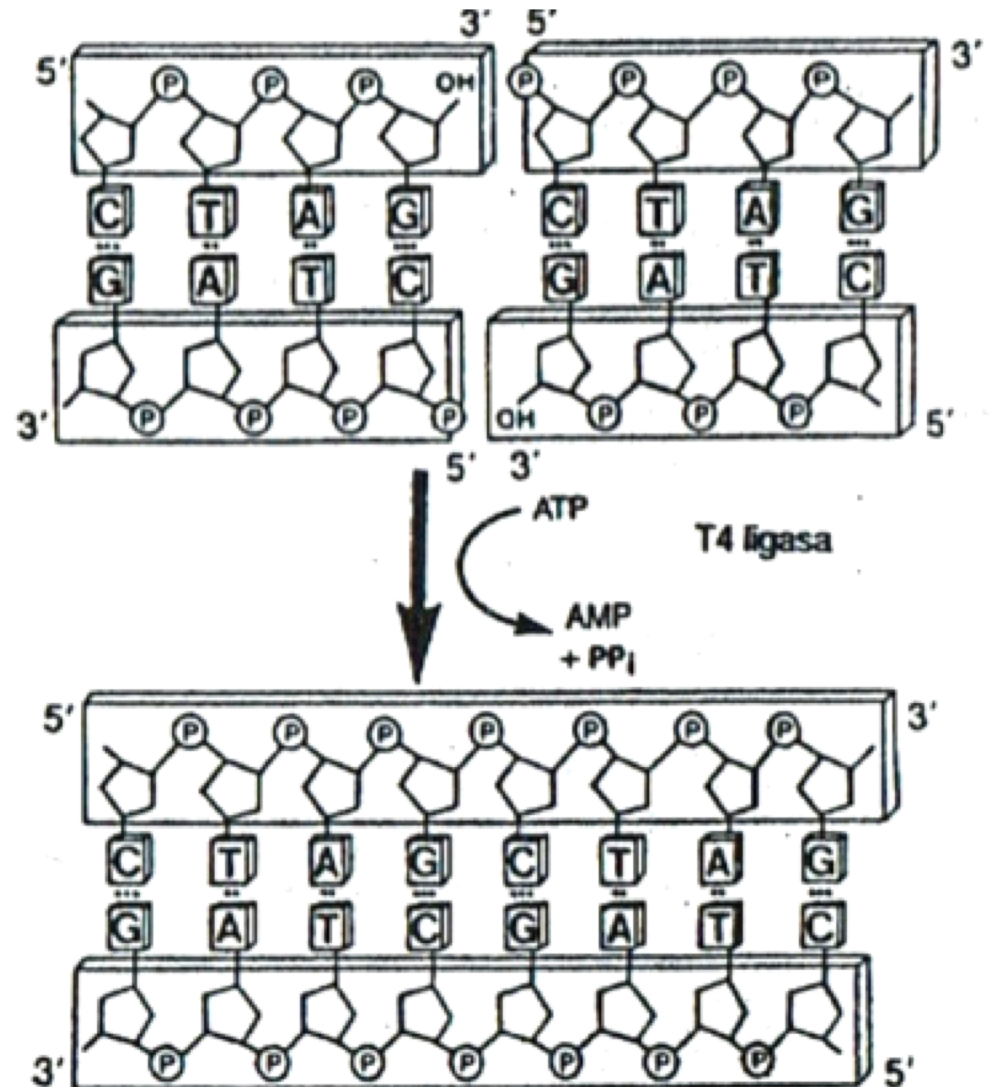
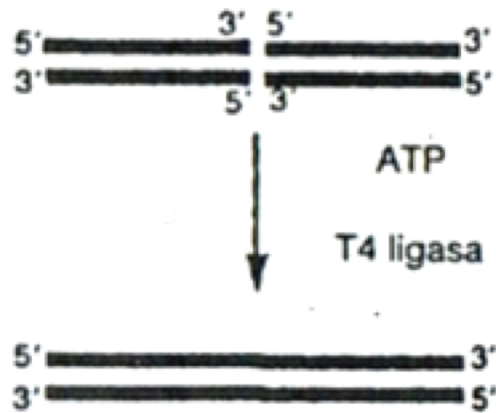
- Los fragmentos cortados por las ER y demás nucleasas tipo "a", que dejan extremos 5' P pueden ser sustrato directo de la Ligasa.





- Las de Fagos (T4 y T7) requieren como cofactor ATP.
- Las de *E. coli* y la mayoría de las bacterianas utilizan como cofactor NAD (nicotinamide adenine dinucleotide)

La ligasa T4 es la más polivalente ya que es capaz de unir **extremos romos** (ni la T7 ni la de *E. coli* pueden hacerlo.)



- Los extremos romos se ligan mucho menos eficientemente, requieren más enzima y sustrato y se suele añadir polietilien glicol (PEG) que secuestra molecular de agua concentrando los sustratos.

Enzimas básicas en la tecnología del ADN recombinante:

- Nucleasas
- Ligasas
- Polimerasas
- Otras enzimas



Polimerasas

Las más utilizadas en biotecnología son las ADN polimerasas, de las que hablaremos a continuación:

Existen diferentes tipos atendiendo a la plantilla que utilicen como molde:

- **Polimerización de ADN utilizando ADN como plantilla.**
- **Polimerización de ADN utilizando ARN como plantilla.**
- **Polimerización de ADN sin plantilla.**

DNA-Polimerasas

- **Polimerización de ADN utilizando ADN como plantilla.**

Clasificadas según características:

- **Termoestable:** *Taq, Pfu, Tth*

No termostable: DNA pol I de *E. coli*.

- **Sin corrección de errores:** *Taq*

Con corrección de errores: *Pfu*

Las enzimas con correcciones de errores suelen ser menos procesivas que las enzimas sin corrección errores, por lo que habitualmente se usan más estas últimas en el día a día, salvo para tareas que necesiten un alta fidelidad.

Su principal aplicación es la generación de grandes cantidades de fragmentos de ADN idénticos mediante PCR.

Historia de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)



- Kary Mullis la concibe en 1983 cuando trabajaba como biotecnólogo en Cetus (primer Nobel a un investigador que trabajaba en una empresa).
- Cetus otorga un bono de 10,000\$ a Mullis por su descubrimiento.
- En 1991 Cetus vende los derechos de la patente a Roche por 330 millones de USD.
- Se calcula que Roche ha recibido más de 2000 millones de USD de regalías por posesión de tales patentes.

UNA PATENTE PARA AMPLIFICAR ADN

UN MILLÓN AL AÑO En 1989, Luis Blanco, Antonio Bernad, José María Lázaro y Margarita Salas patentan la ADN polimerasa de Phi-29 y el CSIC concede a la empresa Amersham Biosciences la licencia de explotación. En 2001 –la ciencia requiere sus tiempos para poder aplicarse y ser lucrativa–, se desarrolla un kit para amplificar ADN circular y después para amplificar ADN genómico lineal basado en la ADN polimerasa de Phi-29. Al CSIC, su propietario, esta patente le ha dado impresionantes regalías. Mientras está activa la patente y se comercializan estos kits (2001-2009), se calcula que en torno al 50% de las regalías que recibe el CSIC proceden de la patente de la ADN polimerasa de Phi-29: más de un millón de euros al año en concepto de derechos.



Templi Phi, uno de los kits del virus Phi-29.

Esta patente expira en 2009, pero su grupo ha producido mediante ingeniería genética una versión mejorada de la polimerasa de Phi-29, explotada comercialmente por la multinacional Quiagen con el nombre de Quali Phi, cuyas propiedades bioquímicas la hacen especialmente óptima para la amplificación isotérmica (nuevo método de amplificar ADN más rápido, fácil y eficiente especialmente útil para el diagnóstico de patógenos), sustituyendo a la tradicional amplificación de ADN por PCR.

El grupo de Margarita Salas ha desarrollado otras patentes, todas con claras aplicaciones biotecnológicas. Destaca una basada en un nuevo sistema de amplificación de ADN utilizando la proteína terminal, y otra centrada en la señal de localización nuclear de la proteína terminal de Phi-29.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- Proceso de síntesis *in vitro* y en mediante una reacción en cadena de grandes cantidades de fragmentos específicos de ADN delimitados por dos cebadores de secuencia conocida.
- Llevado a cabo por DNA-polimerasas utilizando ciclos de cambios de temperatura:
 - Fusión DNA (94°C).
 - Anillamiento de cebadores (55-65°C).
 - Elongación (72°C).

DNA-Polimerasas

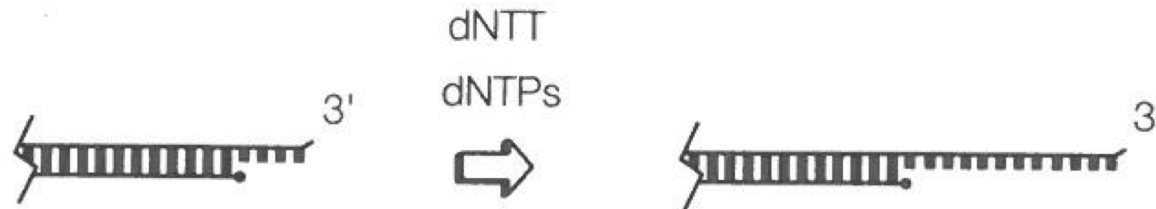
- **Polimerización de ADN utilizando ARN como plantilla:**
- **Retrotranscriptasa: ADN polimerasa dependiente de ARN.**
Las más utilizadas, aisladas de virus:
 - Avian Myeloblastosis Virus (AMV) Reverse Transcriptase
 - Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT).

DNA-Polimerasas

➤ Polimerización de ADN sin plantilla.

- Dextrinucleotidil transferasa terminal (dNTT).

Cataliza la unión de dNTPs al 3'OH de un extremo de ADN (preferentemente protuberante, pero también retraído y romo).



Aplicaciones DNA-Polimerasas

- Creación de elementos de ADN para elaboración de plásmidos.
 - Modificación de secuencias de ADN:
 - Mutagénesis dirigida de secuencias de ADN.
 - Ingeniería de extremos:
 - DNA Polimerasa klenow
 - DNA Polimerasa T4
 - Dexoxinucleotidil transferasa terminal (dNTT).
 - Determinación de expresión génica (retrotranscriptasas).
 - Secuenciación de ADN.
- etc, etc.

Enzimas básicas en la tecnología del ADN recombinante:

- Nucleasas
- Ligasas
- Polimerasas
- Otras enzimas



Otras enzimas

Fosforilasas que añaden fosfatos a extremos de ADN.

- Polinucleótido-kinasa (PNK).

Fosfatasas que eliminan fosfatos a extremos de ADN.

- Fosfatasas alcalinas