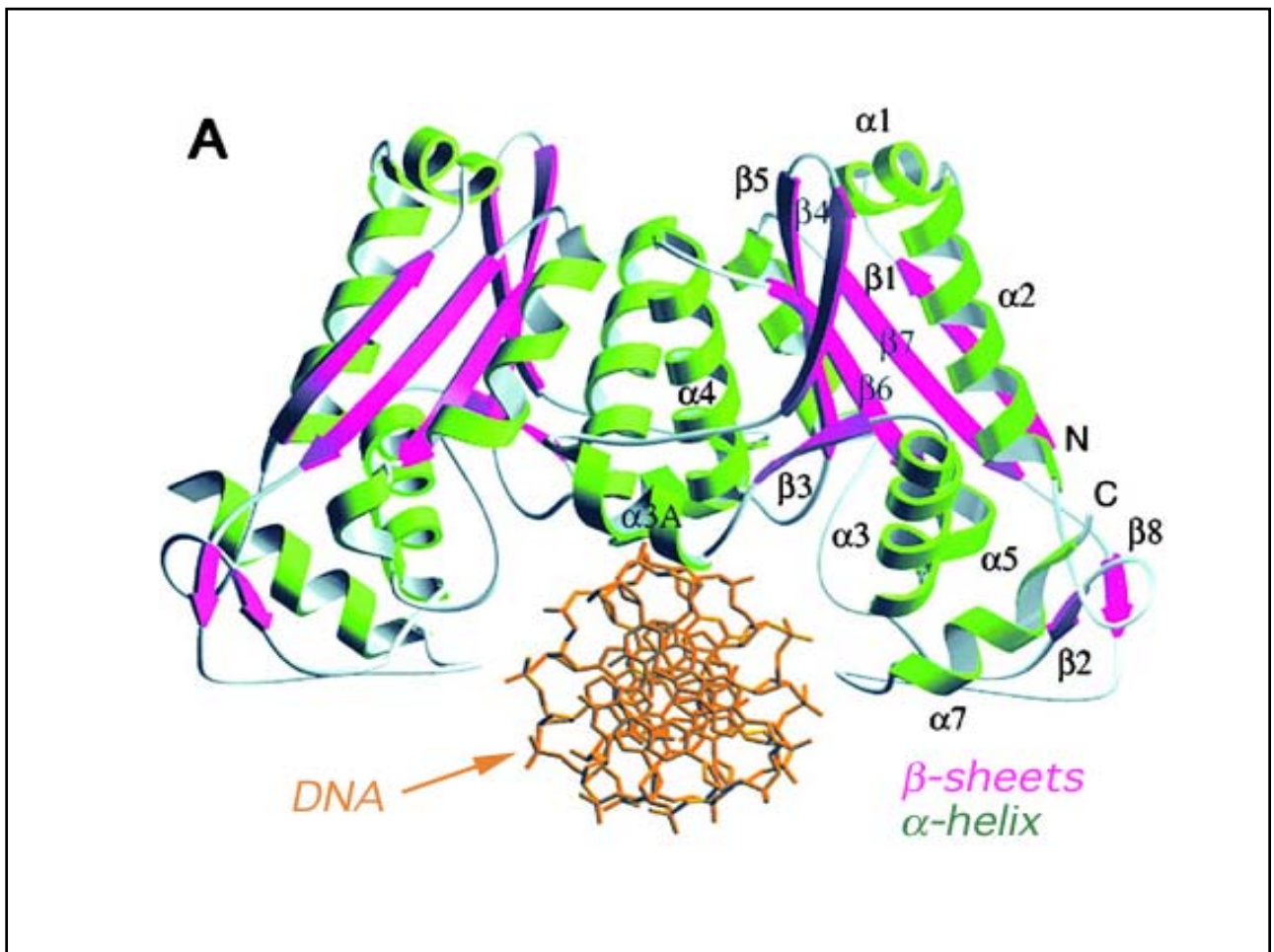
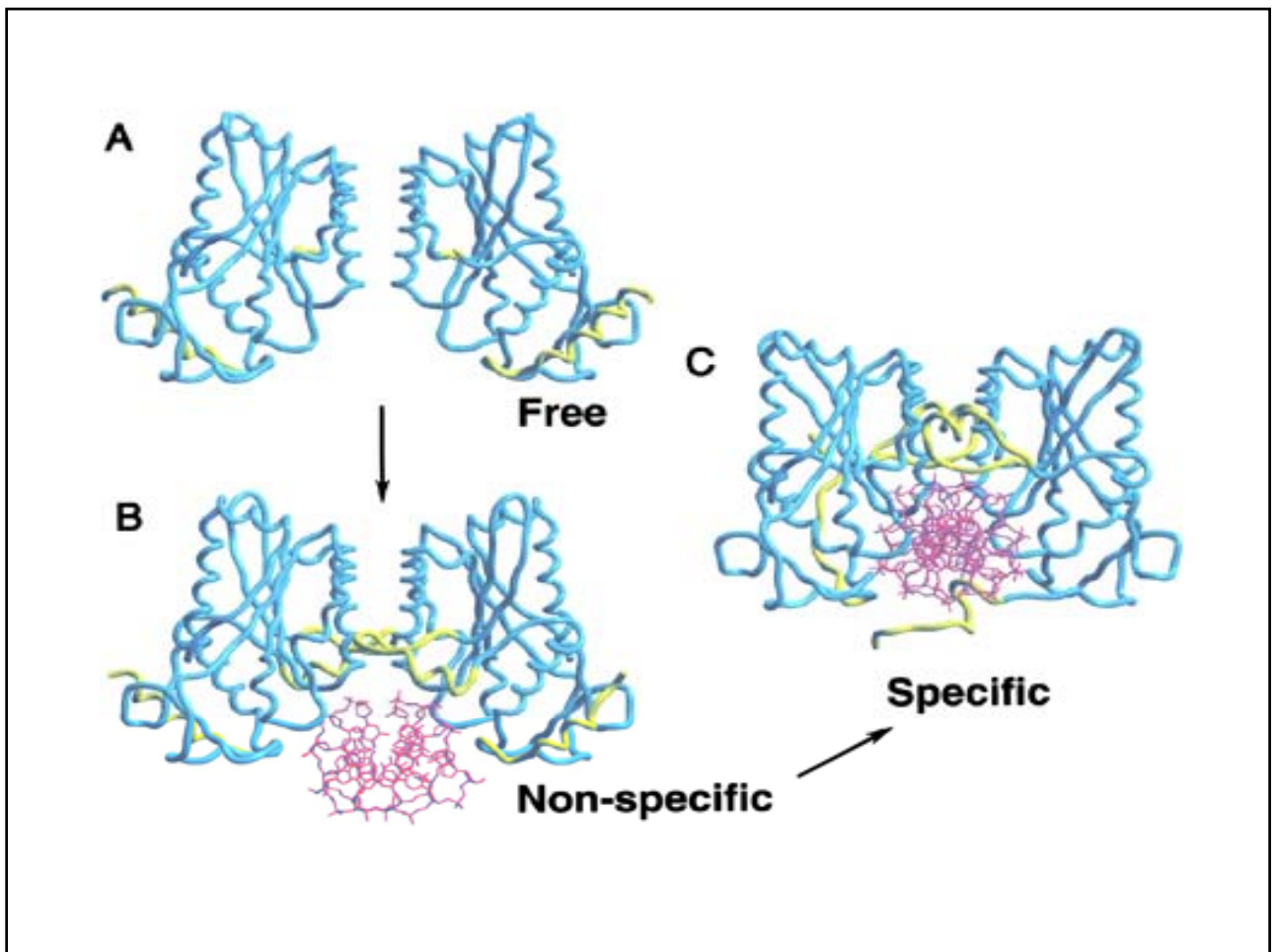


Acción de la enzima de restricción EcoRI





Nucleic Acids Res. 2001 September 15; 29(18): 3705–3727.
Structure and function of type II restriction endonucleases

Table 1. Nomenclature of type II restriction endonucleases

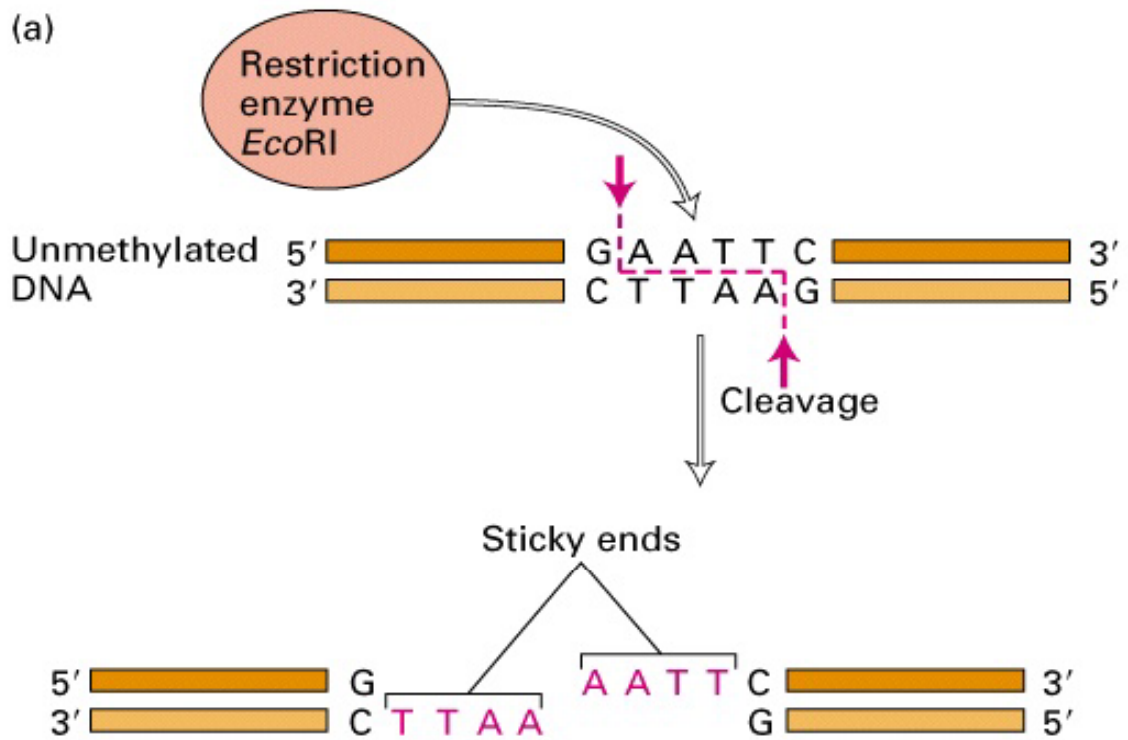
Subtype	Characteristic feature	Example ^a	Recognition sequence ^b
Orthodox	Palindromic recognition site, which is recognized by a homodimeric enzyme, cleavage occurs within or adjacent to the recognition site	<i>EcoRI</i>	G↓ A A T T C C T T A A↑ G
		<i>EcoRV</i>	G A T↓ A T C C T A↑ T A G
		<i>BglI</i>	G C C N N N N↓ N G G C C G G N↑ N N N N C C G
Type IIS	Asymmetric recognition site with cleavage occurring at a defined distance	<i>FokI</i>	G G A T G N ₉ ↓ N N N N C C T A C N ₉ N N N N↑
Type IIE	Two sites required for cleavage, one serving as allosteric effector	<i>NaeI</i>	G C G↓ C G C C G C↑ G C G
Type IIF	Two sites required for cleavage, both sites are cleaved in a concerted reaction by a homotetrameric enzyme	<i>NgoMIV</i>	G↓ C C G G C C G G C C↑ G
Type IIT	Different subunits with restriction and modification activity	<i>Bpu10I</i>	C C↓ T N A G C G G A N T↑ C G
		<i>BsII</i>	C C N N N N N↓ N N G G G G N N↑ N N N N C C
Type IIG	One polypeptide chain with restriction and modification activity	<i>Eco57I</i>	C T G A A G N ₁₄ N N↓ G A C T T C N ₁₄ ↑ N N
Type IIB	Cleavage on both sides of the recognition site	<i>BcgI</i>	N N↓ N ₁₀ C G A N ₆ T G C N ₁₀ N N↓ ↑N N N ₁₀ G C T N ₆ A C G N ₁₀ ↑ N N
		<i>BpII</i>	N N ₄ ↓ N ₈ G A G N ₅ C T C N ₈ N ₄ N↓ ↑N N ₄ N ₈ C T C N ₅ G A G N ₈ ↑ N ₄ N
Type IIM	Methylated recognition site	<i>DpnI</i>	G ^m A↓ T C C T↑ ^m A G

^aRestriction endonucleases whose crystal structure is known are depicted in bold letters.

^bThe site of cleavage is indicated by ↓.

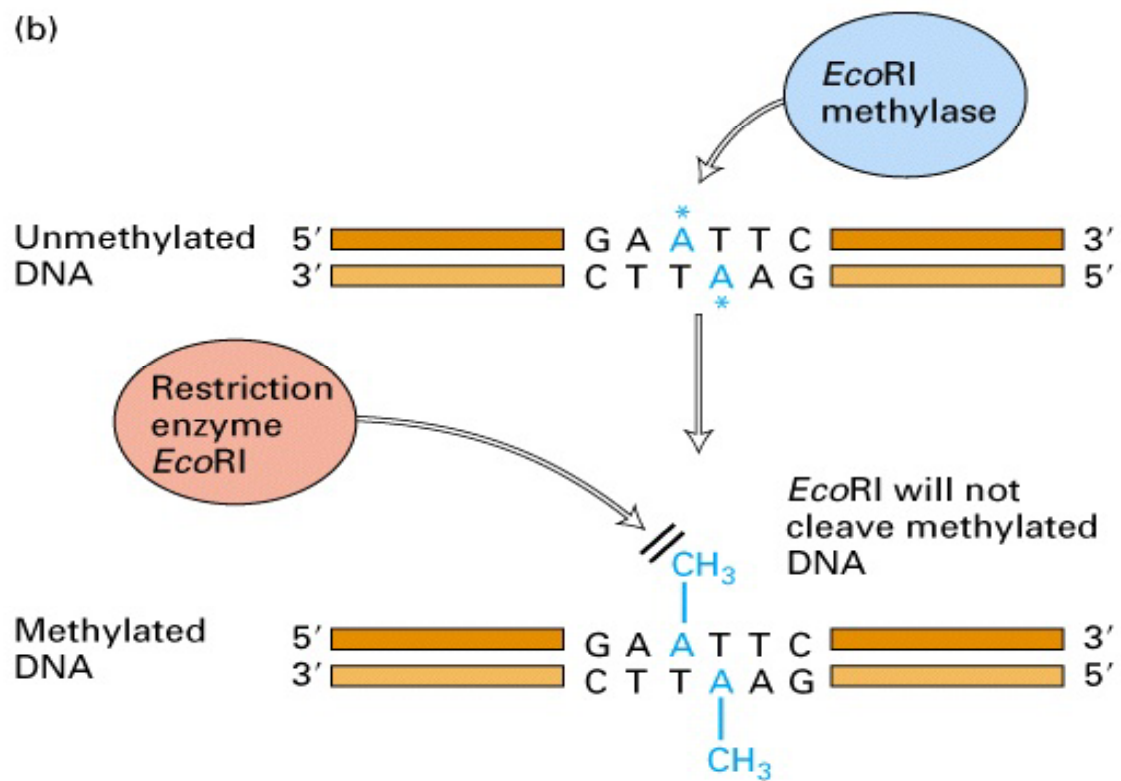
Endonucleasas de restricción Tipo II

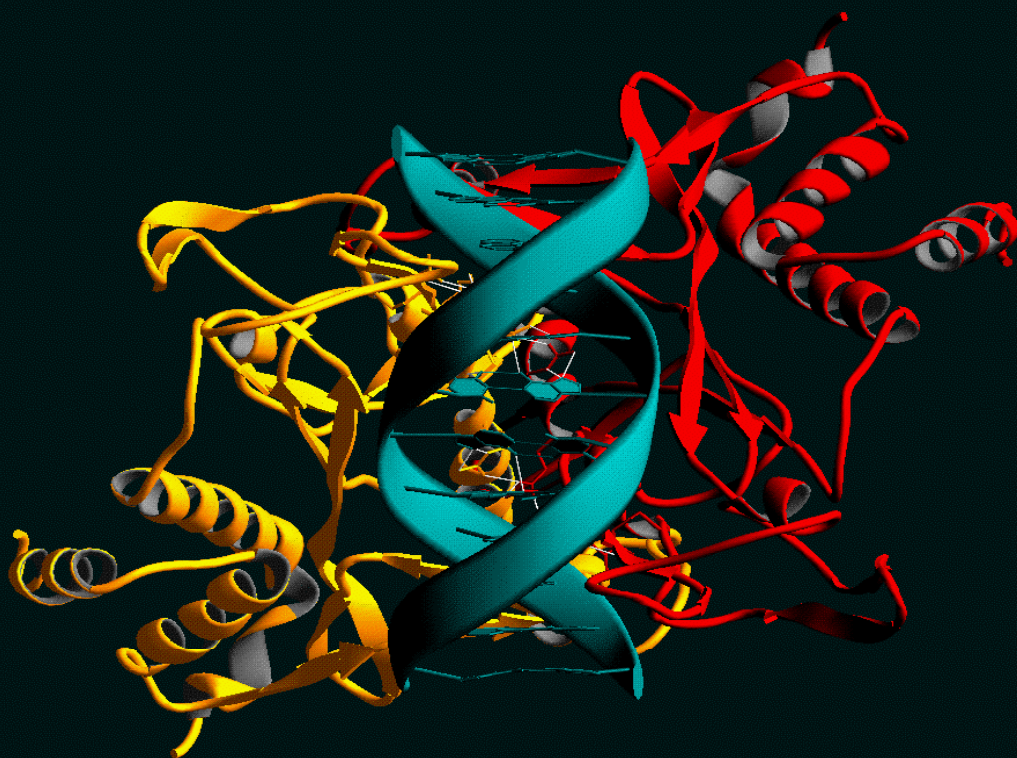
(a)



Endonucleasas de restricción Tipo II

(b)





Eco RI: Model image of the restriction enzyme ECO RI (red and yellow) binding to DNA (blue). The enzyme is made up of two symmetrical units that correspond to the double helix structure of DNA.

Frecuencias de corte por ER (en un DNA 50 %GC)

- La mayoría de las ER reconocen secuencias de entre 4 y 6 pb.
- La probabilidad que se encuentre una secuencia de 4 nt en el DNA es:
 $([1/4]^4) = 1$ en 256 pb.
- Una secuencia de 6 nt = $([1/4]^6) = 1$ en 4.096 pb.
- Otras ER reconocen secuencias más largas (hasta 8 pb). Un sitio de reconocimiento de 8 pb ocurrirá con una frecuencia de aproximadamente 1 en 65.536 bases $([1/4]^8)$. Ej. NotI

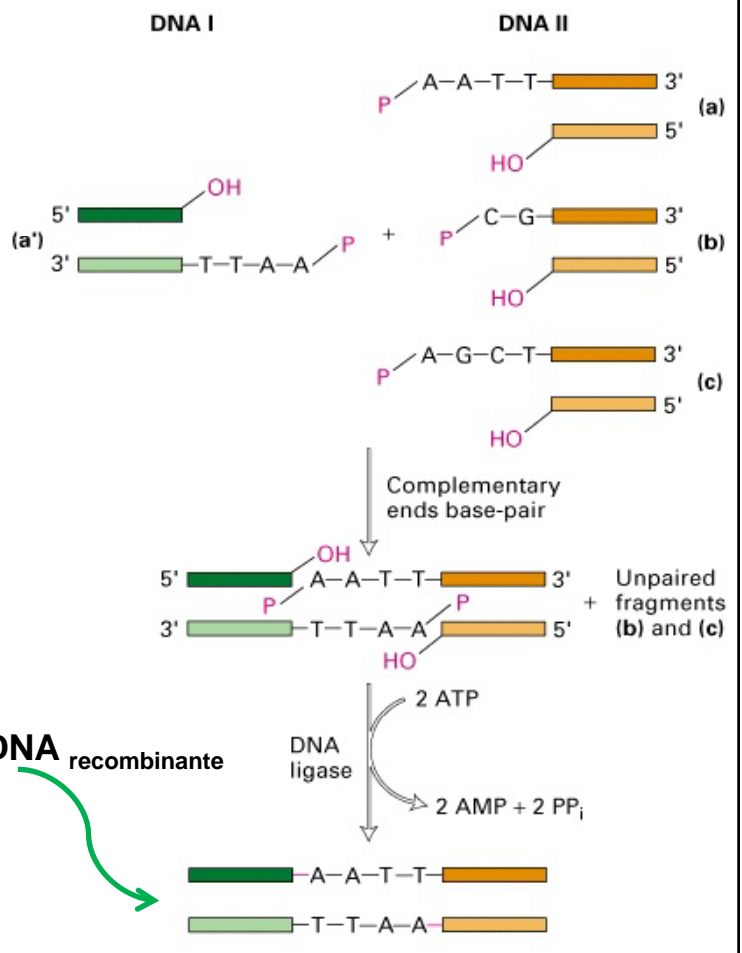
Frecuencias de corte en ER's

Corte Frecuente	Sitio	Corte Infrecuente	Sitio
Sau3AI	GATC\	EcoRI	G^AATTC
TaqI	T\CGA	NotI	GC\GGCCGC
HaeIII	GG\CC	BamHI	G\GATCC
Nt.CviPII	\CCD	BcgI	CGANNNNNN\TGC

Ligación de fragmentos de restricción con extremos cohesivos

v/s

Ligación de extremos romos





NEBcutter V2.0

[Program Guide](#)[Help](#)[Comments](#)

This tool will take a DNA sequence and find the large, non-overlapping open reading frames using the E. coli genetic code and the sites for all Type II and commercially available Type III restriction enzymes that cut the sequence just once. By default, only enzymes available from NEB are used, but other sets may be chosen. Just enter your sequence and 'submit'. Further options will appear with the output. The maximum size of the input file is 1 MByte, and the maximum sequence length is 500 KBases.

[What's new in V2.0](#) [About NEBcutter](#)

Local sequence file: <input type="text"/> <input type="button" value="Browse"/>	Standard sequences:
GenBank number: <input type="text"/> <input type="button" value="Browse GenBank"/>	# Plasmid vectors: <input type="text"/>
or paste in your DNA sequence: (plain or FASTA format)	# Yra + traps: <input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="button" value="Submit"/>
<input checked="" type="radio"/> NEB enzymes	
<input type="radio"/> All commercially available specificities	
<input type="radio"/> All specificities	
<input type="radio"/> All + defined oligonucleotide sequences	<input type="button" value="View options"/>
<input type="radio"/> Only defined oligonucleotide sequences	<input type="button" value="Set colors"/>
[define oligo]	
Minimum ORF length to display: <input type="text" value="100"/> b.p.	
Name of sequence: <input type="text"/> (optional)	
Earlier projects:	
no name	
Genet. scaffold 14	
project 1	
<small>Note: Your earlier projects will be deleted 7 days after they were last accessed. You need to have cookies enabled in your browser for this feature to work.</small>	
<input type="button" value="Clear projects"/>	
<small>! Disable NEBcutter cookies</small>	

Otros enzimas

Metilasas

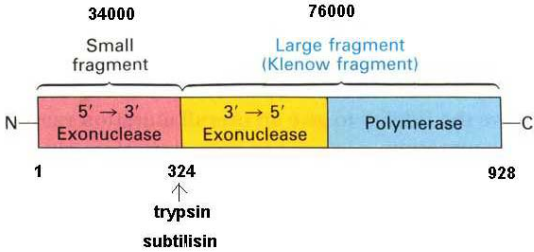
Nucleasas

Fosfatasas

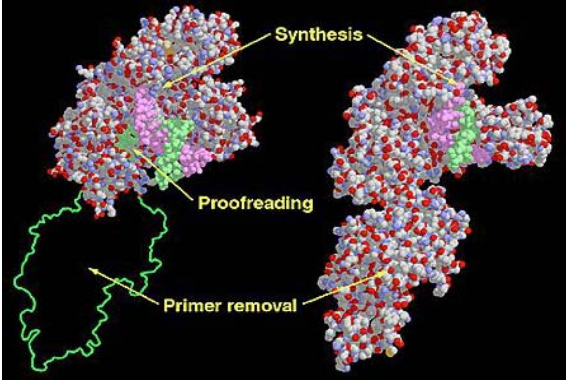
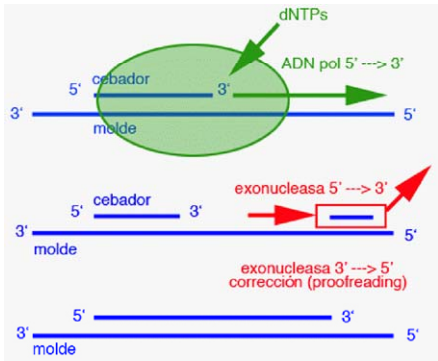
Polimerasas

Transcriptasa inversa

DNA pol I de *E. coli*



Fragmento Klenow



Klenow H and Henningsen I "Selective Elimination of the Exonuclease Activity of the Deoxyribonucleic Acid Polymerase from Escherichia coli B by Limited Proteolysis" Proc Natl Acad Sci vol. 65 pp. 168 (1970).

Usos de DNA polimerasa I de *E. coli*

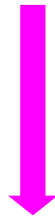
- Síntesis de DNA de doble hebra desde moldes de DNA de hebra simple
- “Rellenado” de extremos 3´recesivos de fragmentos de DNA
- Digestión de extremos 3´ protuberantes
- Preparación de sondas de DNA radiactivas

Usos del fragmento Klenow de la DNA pol I de *E. coli*

A. Relleno de extremos 3' recesivos para generar extremos romos



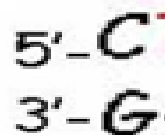
5'-3' DNA polimerasa en presencia de dNTP y F. Klenow



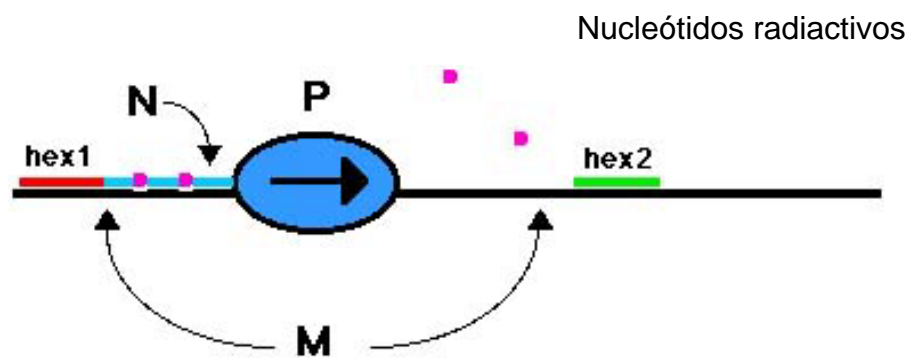
B. Degradación de extremos 3' protuberantes, para generar extremos romos



3'-5' exonucleasa de la DNA pol Klenow



Marcación de DNA por iniciación al azar (*random priming*)



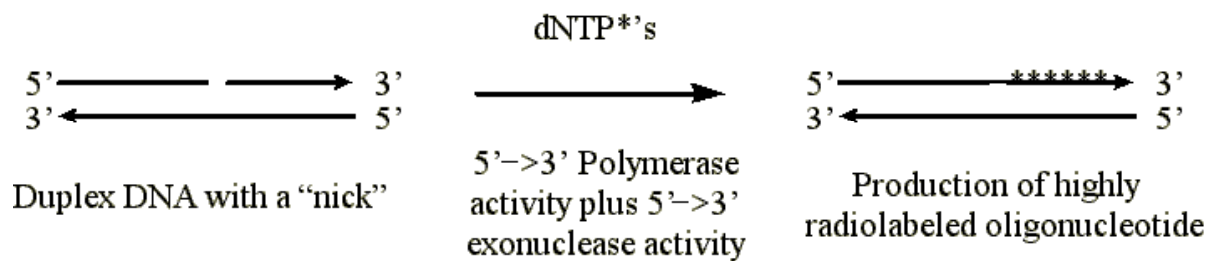
Hexámeros 1 y 2: partidores

M: hebra templado (hebra simple)

P: polimerasa

N: hebra recién sintetizada

Marcación por traslado del nick (*Nick translation*)

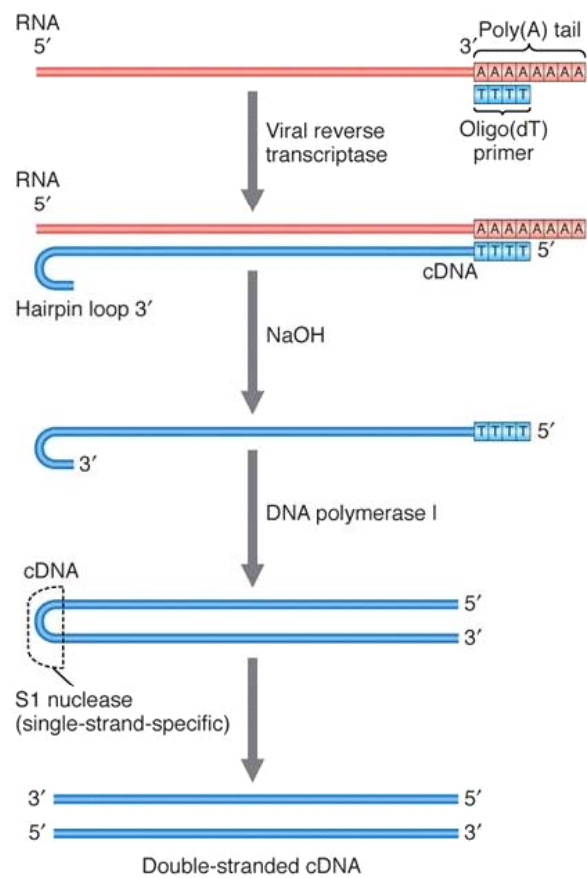


DNA polimerasa Taq

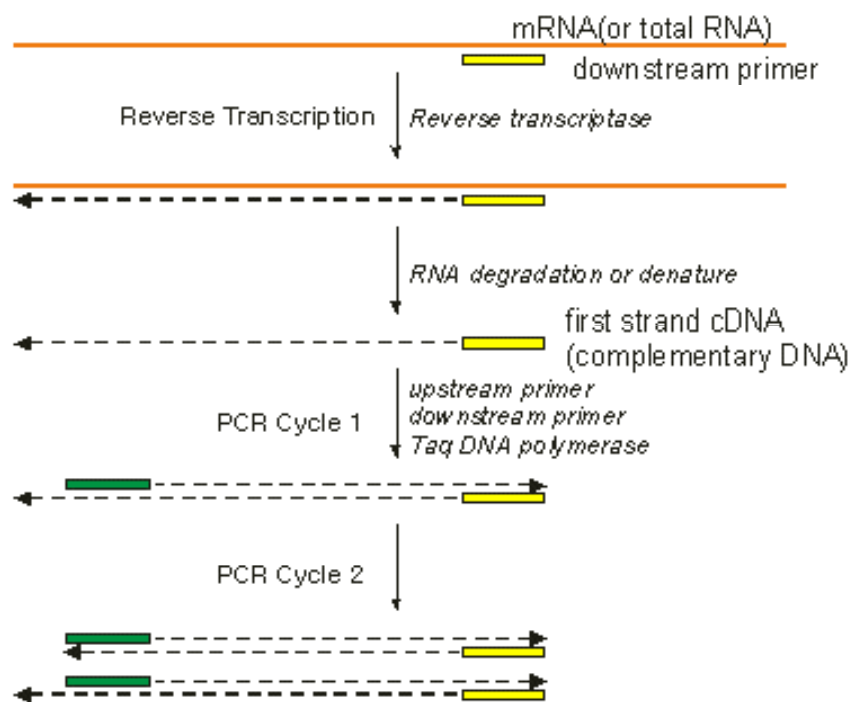


- Uso en PCR
- Original de bacteria termófila *Thermus aquaticus*
- Termo-resistente, activa a altas temperaturas
- Carece de actividad 3'-5' exonucleasa (mayor frecuencia de errores en la polimerización: 1 en 1000 a 1 en 10.000 pb)
- Otras termoestables con actividad 3'-5' exo se usan para amplificación de secuencias que se requiere preservar de mutaciones (Pfu, Vent DNA pol, Tli, etc)

Síntesis de cDNA por Transcriptasa inversa



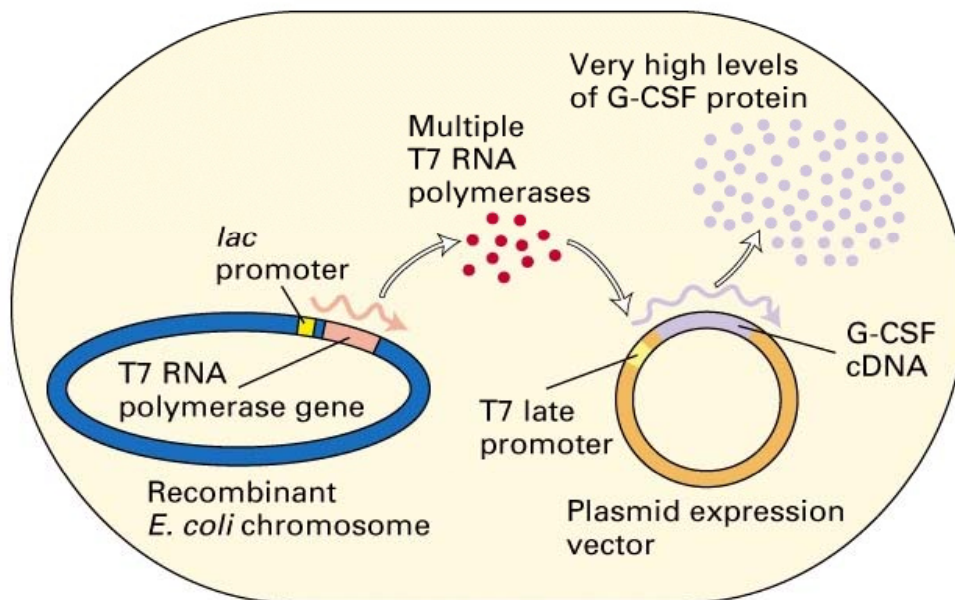
Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)



T7 o T4 RNA polimerasas

- Origen viral: **de fagos** T7 o T4
- Síntesis de RNA usando DNA como templado. Requiere un promotor compatible.
- Uso en la transcripción *in vitro* de genes de interés.
- En construcción de sistemas de expresión recombinante.

Usos de T7 RNA polimerasa



Nucleasas

- **Desoxirribonucleasas** (DNasas), sustrato es DNA
- **Ribonucleasas** (RNasas), sustrato en RNA
- **Endonucleasas y exonucleasas**

•Mas usadas son:

•DNasa I (endonucleasa)

- Eliminar DNA de preparaciones de RNA o de proteínas.
- Estudio de interacción DNA-proteína por DNasa footprinting.

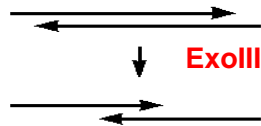
•RNasa A (endo-ribonucleasa)

- Eliminar RNA de preparaciones de DNA.
- Las dos son originales de páncreas de bovino.

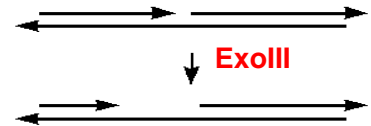
Exonucleasa III

- Remoción de nucleótidos, uno a uno, desde el ext. 3' OH.
- ExoIII ataca el 3' OH en DNA doble hebra con extremo romo o extremo 5' protuberante.

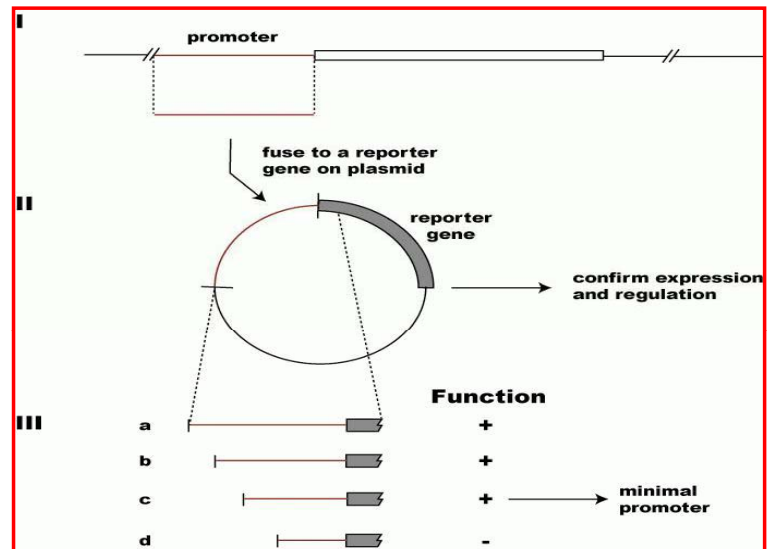
Duplex with blunt or 5' overhang



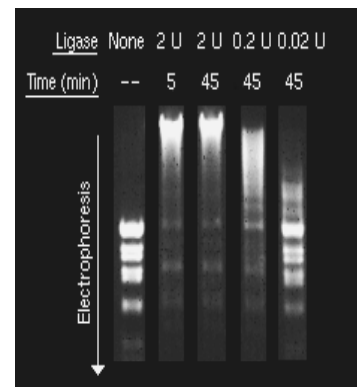
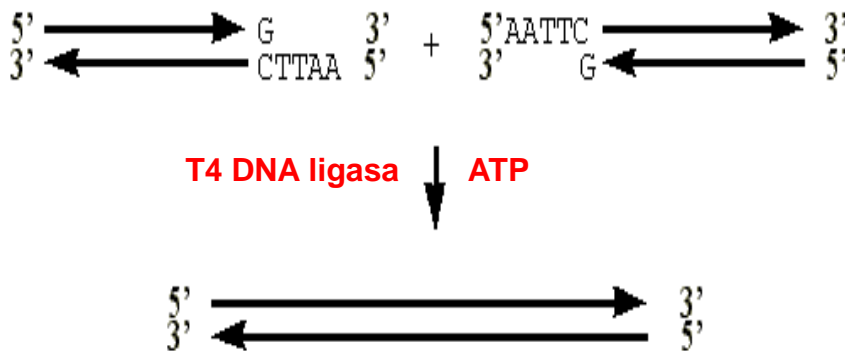
Duplex with 3' overhang and internal "nick"



Ejemplo de aplicación de ExoIII en la generación de mutaciones por deleción en un promotor.

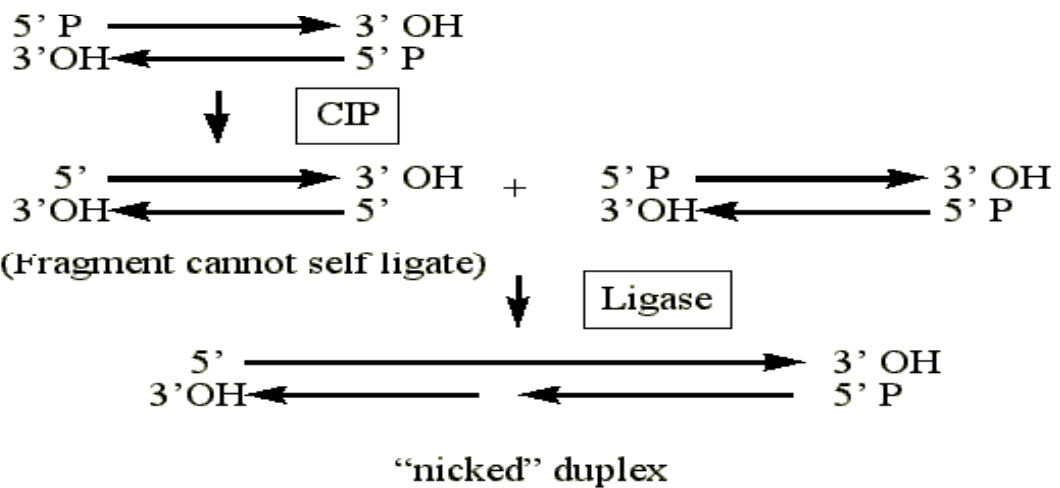


DNA ligasas



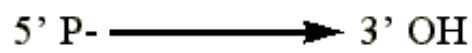
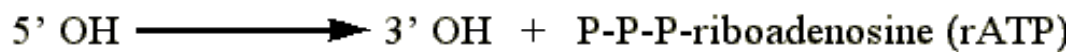
- catalizan la formación de un enlace fosfodiéster entre un extremo 3' OH y un 5' PO₄
- T4 DNA ligasa. Aplicación en la formación de moléculas de DNA recombinante.
- Liga fragmentos cohesivos (complementarios) y romos, aunque éstos últimos son menos favorecidos.
- Extremo fosfato en C 5' es fundamental.
- ATP como cofactor

Fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP)



- Aplicación: desfosforilación de extremos 5'P para evitar autoligación, en clonamiento de DNA.

T4 Polinucleótido quinasa (PNK)



γ -Phosphate group is transferred from rATP

Aplicaciones

1. Marcación de ácidos nucleicos (RNA y DNA) en el extremo 5' por fosforilación con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$
2. Fosforilación de oligonucleótidos sintéticos en el extremo 5'

Electroforesis en gel de DNA

Método analítico de visualización del DNA basado en la migración del DNA a través de un gel

Gel Polímero de agarosa

Polímero de acrilamida o poliacrilamida

$$V = q E / f$$

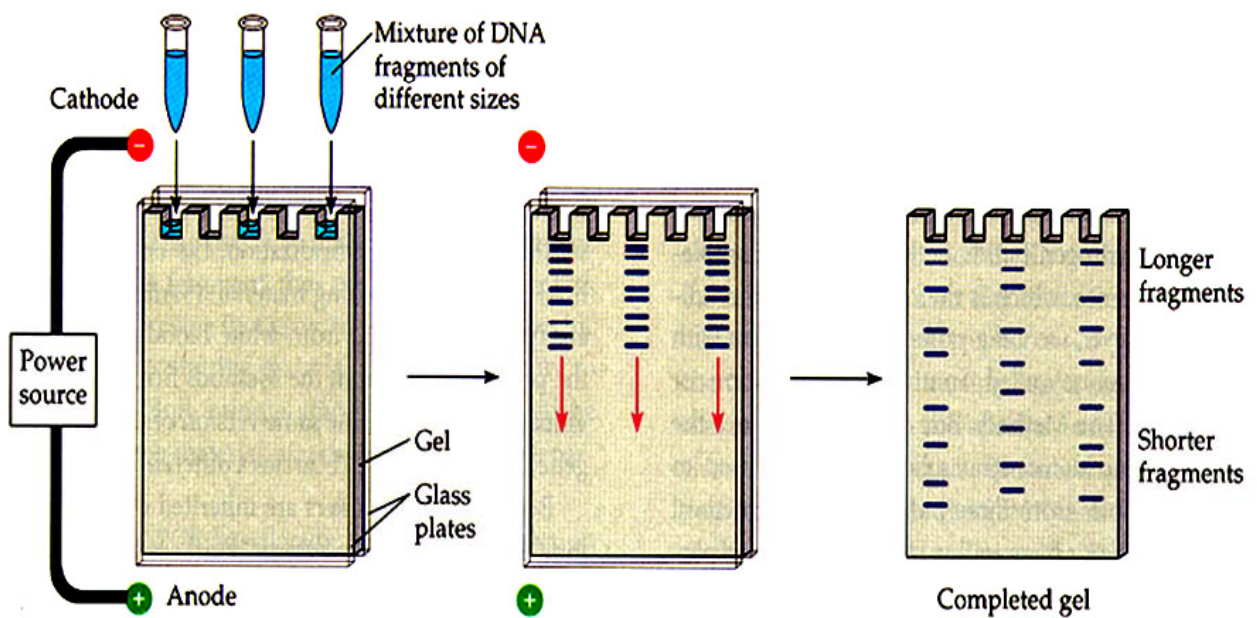
V= velocidad de migración

E= gradiente de potencial eléctrico (Volts/cm)

q= carga eléctrica efectiva de la partícula

f= coeficiente de fricción (tamaño y forma)

Gel electrophoresis of DNA



(a) Gel electrophoresis of DNA