



UNIVERSIDAD DE SONORA



POSGRADO EN BIOCIENCIAS

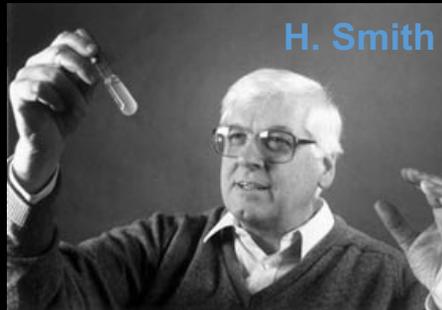
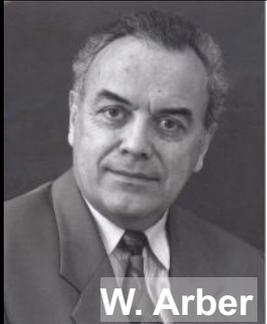
MICROBIOLOGÍA MOLECULAR (2442)

UNIDAD 3: Endonucleasas o Enzimas de Restricción

Elaboró: Dra. Kadiya del C. Calderón Alvarado

Introducción:

Endonucleasas de restricción (restrictasas)



Descubiertas simultáneamente entre 1968 y 1970 por **Werner Arber** y **Hamilton Smith**.

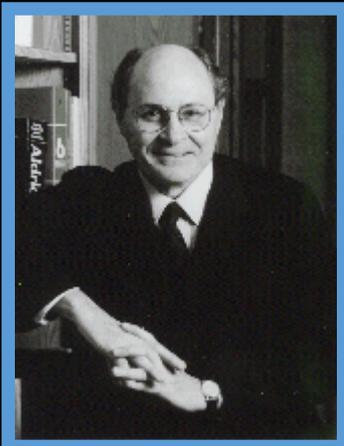
Las endonucleasas de restricción son un mecanismo de defensa de las bacterias frente a la entrada de ADN foráneo.

- Degradan el ADN extraño
- No degradan el ADN propio de la bacteria

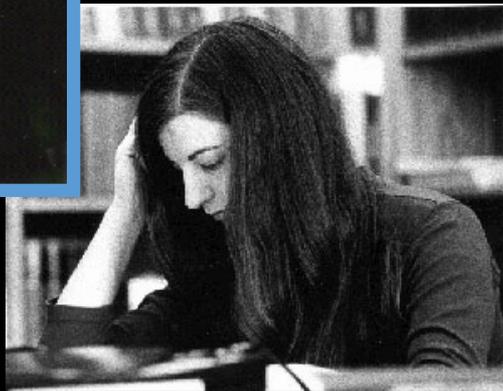
Arber & Linn, 1969

Tipo I: Cortan en sitios cercanos al de reconocimiento.

Tipo II: Cortan justo en el sitio de reconocimiento.



D. Nathans



K. Danna

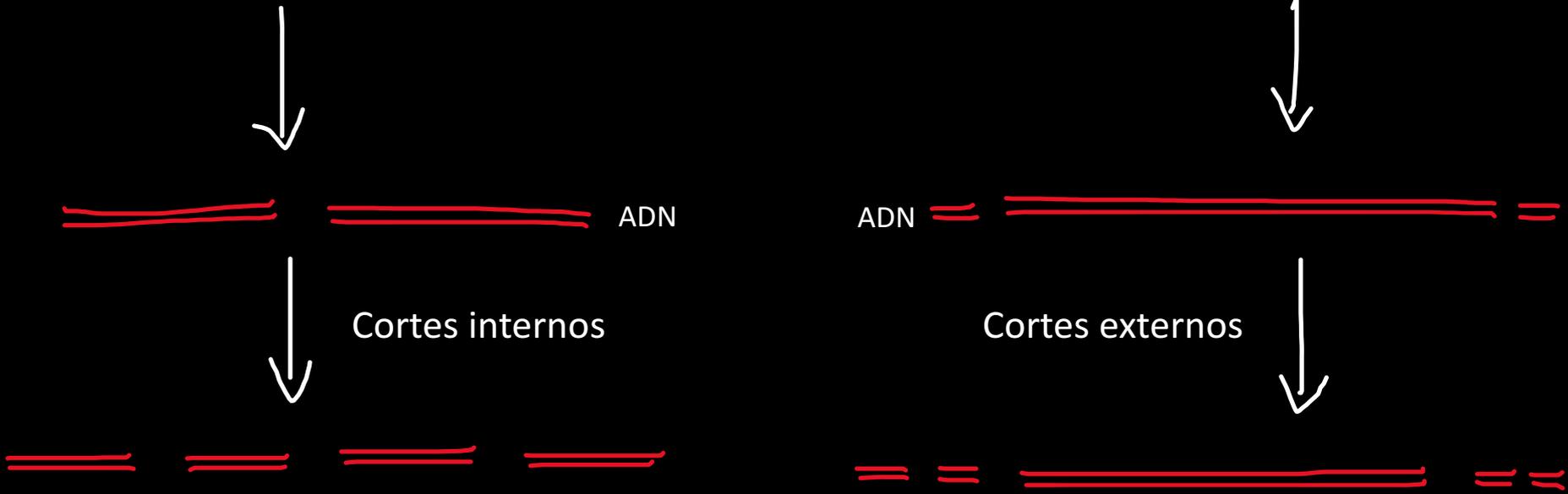
Las endonucleasas de restricción supusieron un enorme avance en el campo de la ingeniería genética.

El uso de las enzimas restrictasas con estos fines fue propuesto y desarrollado por **Nathans y Danna** en 1971.

Nucleasas

Endonucleasas

Exonucleasas



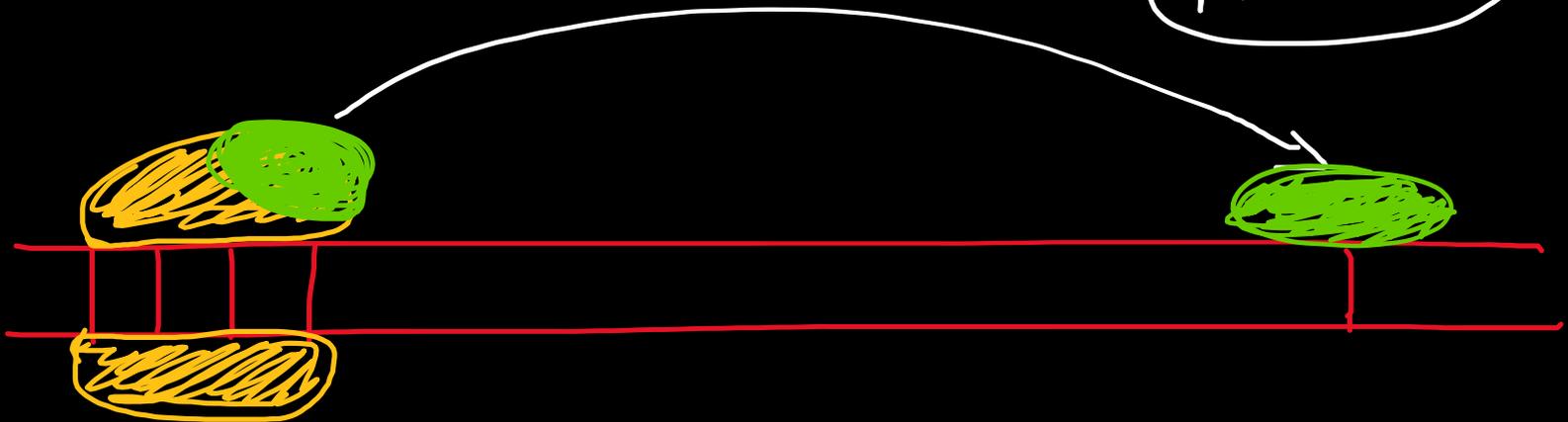
Modificado de Roberts, 1976

Tipo I

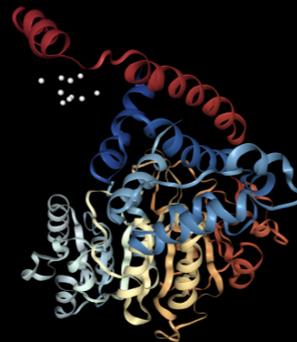
cofactor
 Mg^{2+}

ATP

Metilasa



1,000 bp

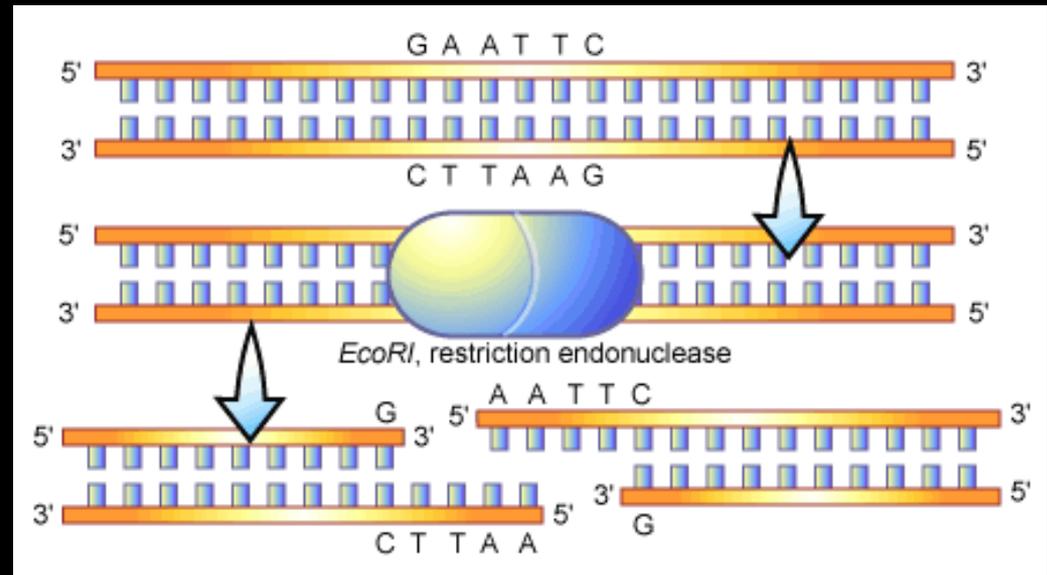


EcoKI

Sitio de
reconocimiento,
diferente al sitio
de corte

Endonucleasas de tipo II: Son enzimas endonucleasas, que cortan **internamente** el ADN de doble cadena, en sitios de reconocimiento **específico** (dianas de restricción).

La mayoría de las secuencias diana son **simétricas en ambas hebras del ADN** (dianas **palindrómicas**)

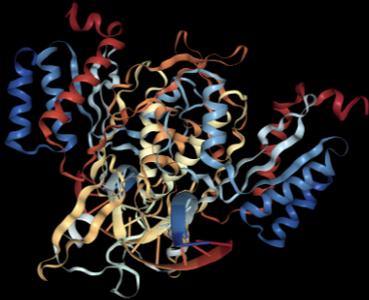
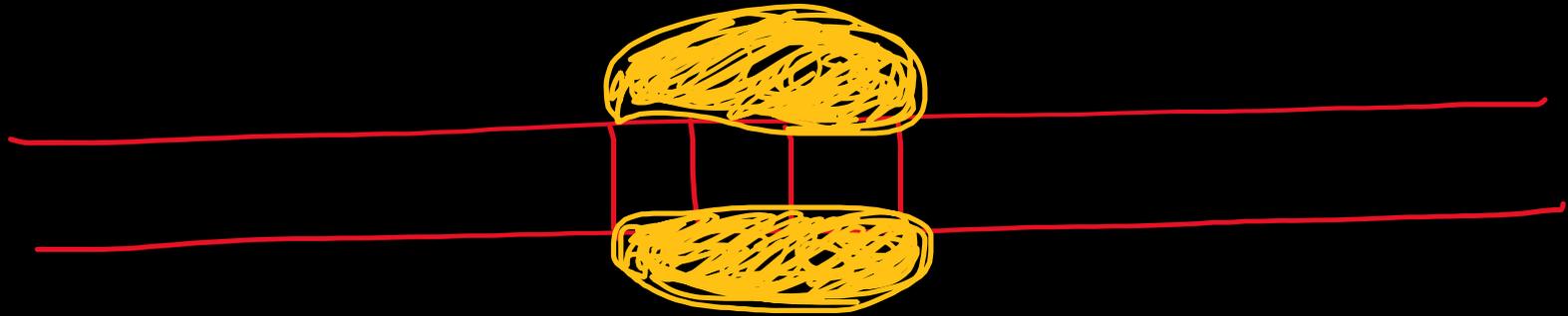


Tipo II

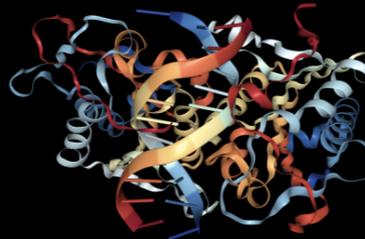
Sitio de reconocimiento,
en el mismo sitio
de corte

Mg²⁺

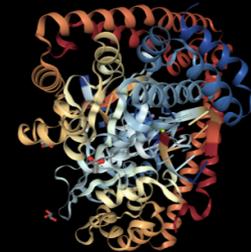
93% de
todas las
enzimas
conocidas



EcoRI

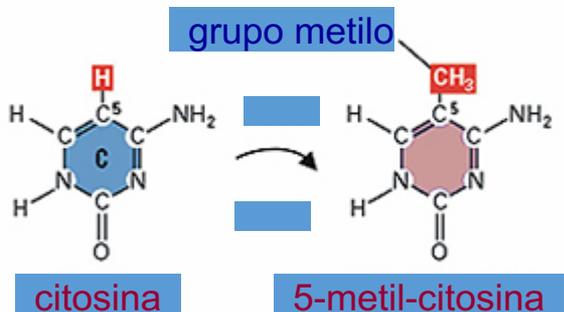


BamHI



HindIII

Metilasas

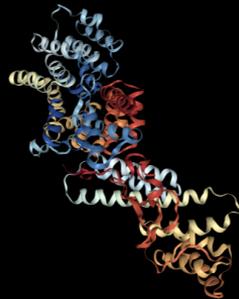
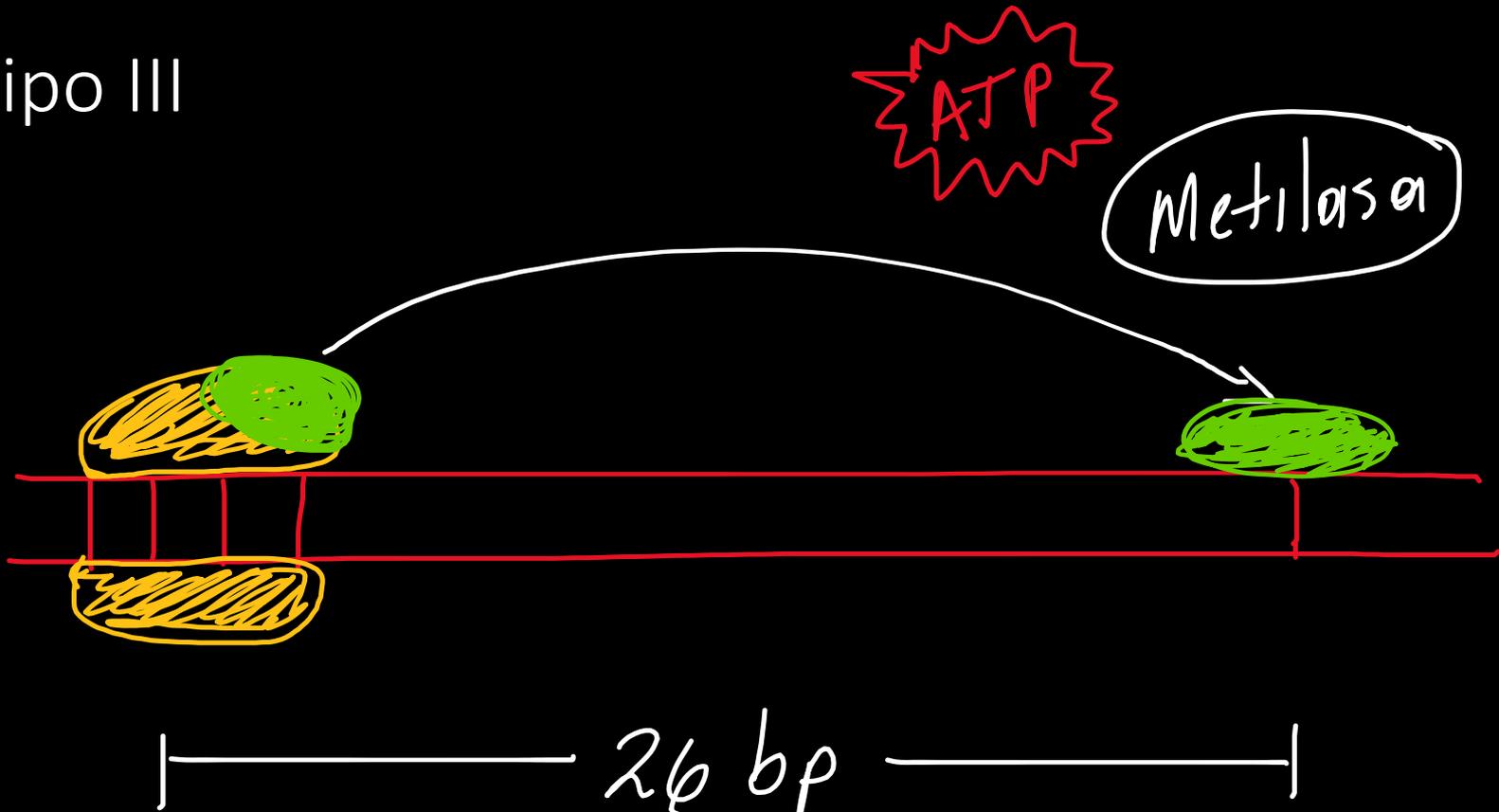


Las metilasas (o metil-transferasas) modifican el ADN bacteriano, añadiendo un grupo metilo a las bases A ó C del ADN recién sintetizado

La metilación en los sitios diana de las enzimas endonucleasas de restricción bloquean la acción de las mismas sobre el ADN propio

Permite a las bacterias defenderse contra el ataque de los bacteriófagos y hacen de barrera frente al ADN foráneo.

Tipo III



EcoPI

Sitio de reconocimiento, diferente al sitio de corte

- Isoesquizomeros: tienen la misma secuencia de reconocimiento y el mismo sitio de corte.

SphI -> CGTA/C

BbuI -> CGTA/C

- Neoesquizomeros: tienen el mismo sitio de reconocimiento, pero cortan el ADN en diferente lugar.

SmaI -> CCC/GGG

XmaI -> C/CCGGG

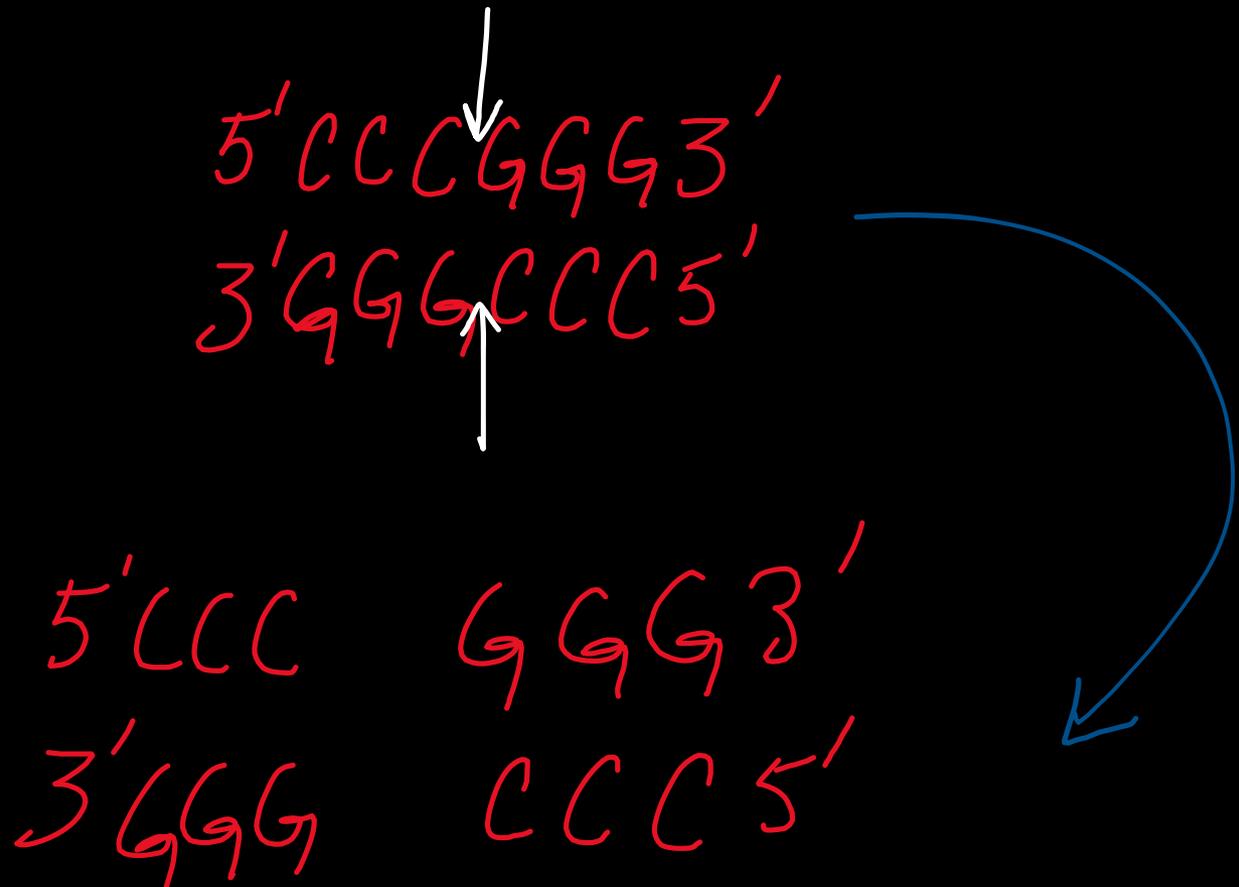
Tipos de cortes

- Cortes “pegajosos”



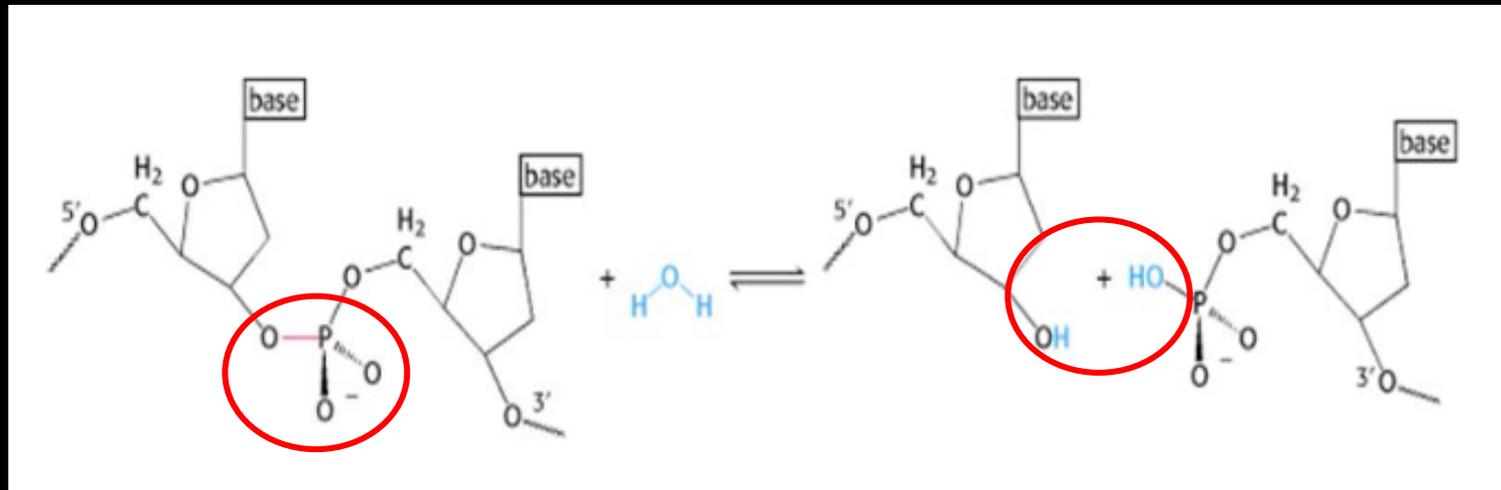
Tipos de cortes

- Cortes “romos”



Mecanismo de acción

- Un solo corte en cada una de las cadenas de azucar-fosfato de la doble helice, hidrolizando el enlace fosfodiester

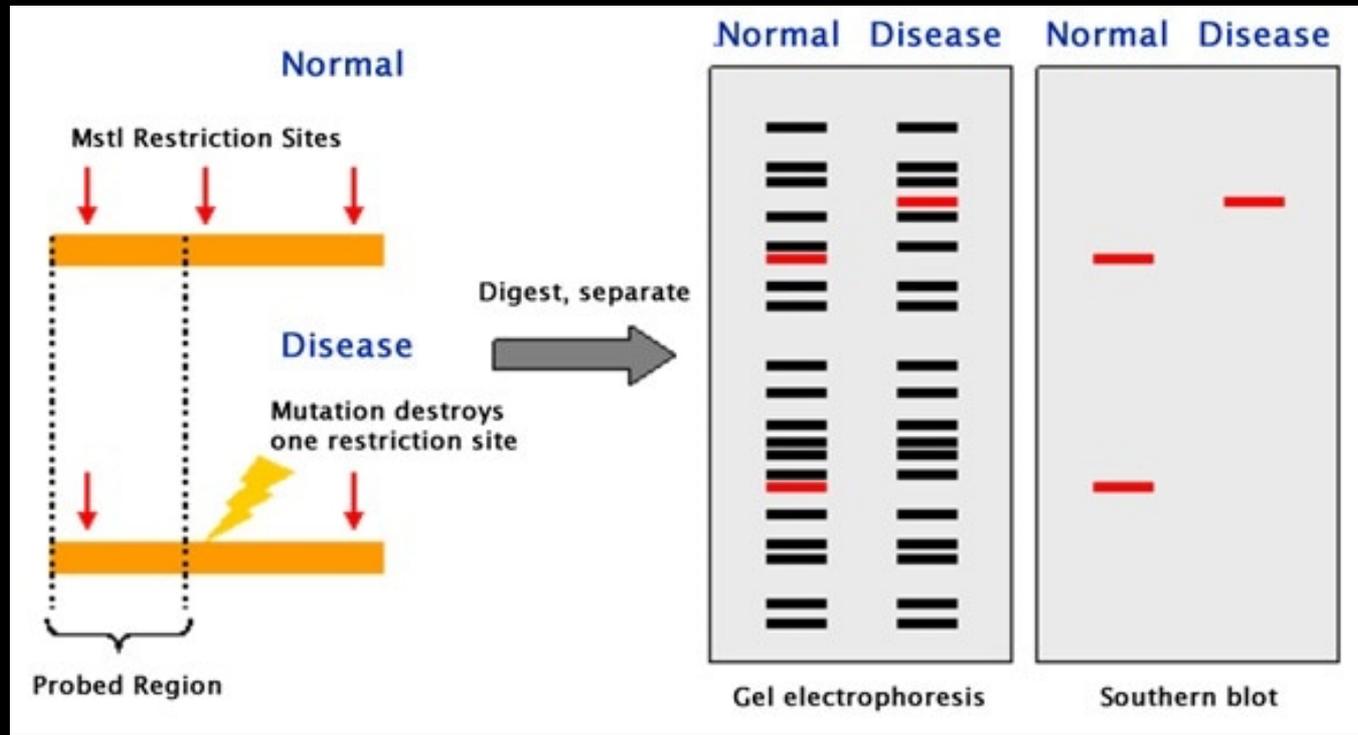


Uso en el laboratorio

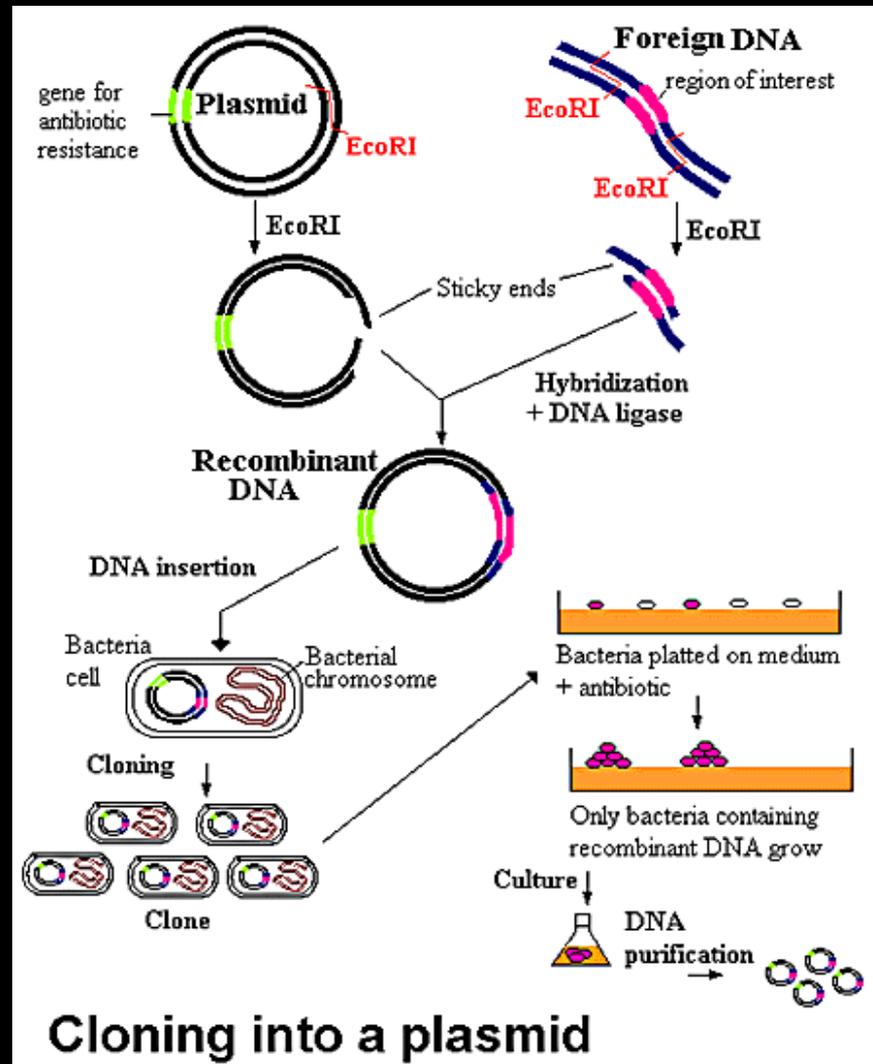
- Estudiar las diferencias entre la longitud de los fragmentos de diferentes individuos (RFLP)
- Clonación de genes
- Construcción de librerías de ADNc
- Secuenciación

RFLP

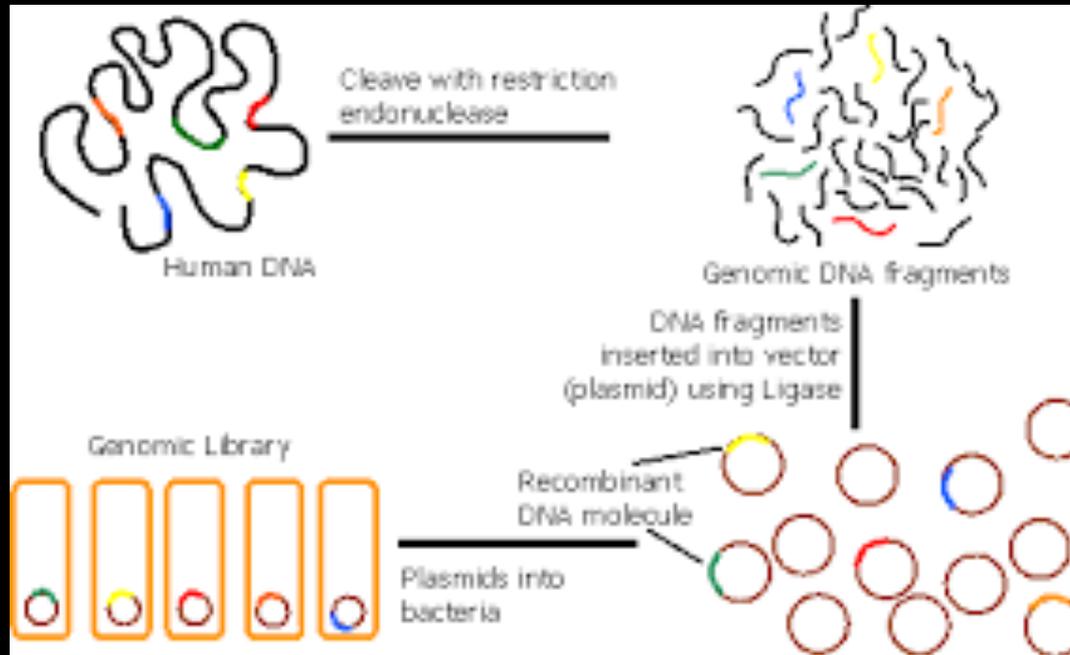
- Distinguir individuos homocigotos y heterocigotos
- Detección de enfermedades
- Estudios de diversidad



Clonación



Librerías genómicas



Actividad de las enzimas de restricción

- Se expresa en términos de unidades
- Unidad: cantidad de enzima que se unirá a todos sitios específicos en 1 micrograms de ADN muestra en 1 h a 37 °C

$$\text{ADN} = 275 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{HindIII} = 2500 \text{ unidades/ml}$$

Objetivo: cortar 5 μg de ADN con 10 unidades de enzima

$$\frac{275 \mu\text{g DNA}}{\text{mL}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{l}} \times X \mu\text{l} = 5 \mu\text{g DNA}$$

$$X = \frac{500 \mu\text{g DNA}}{275 \mu\text{g DNA}} = \underline{18.2 \mu\text{l DNA}}$$

contienen 5 μg

Cantidad de HindIII

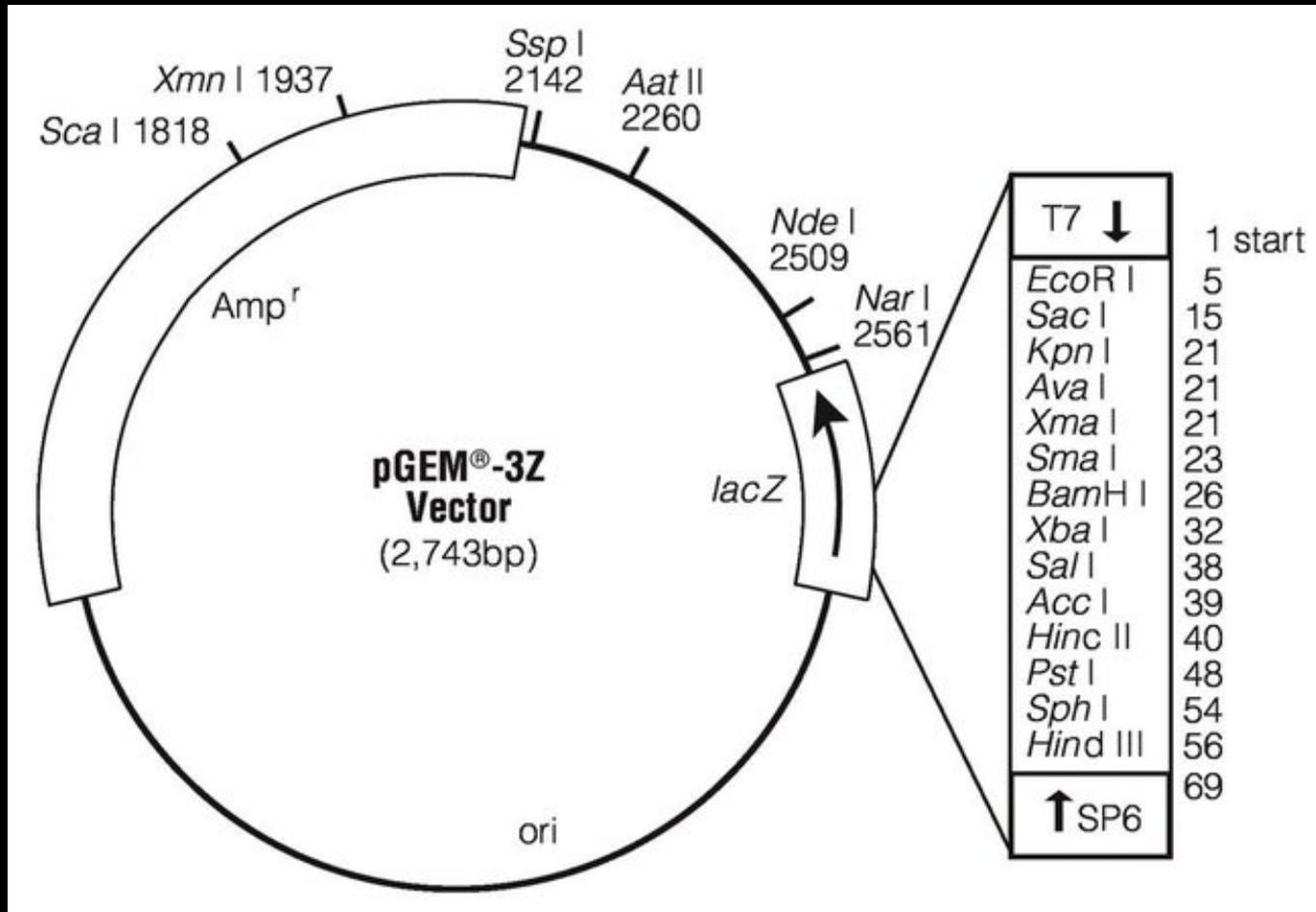
$$\frac{2500 \text{ unidades}}{\text{mL}} = \frac{1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{l}} \times X \mu\text{l} = 10 \text{ unidades}$$

$$X = \frac{10,000 \text{ unidades}}{2,500 \text{ unidades}} = 4 \mu\text{l de enzima}$$

contiene 10 unidades

Digestion *in silico*

Se pretende digerir
virtualmente el plasmido
pGEM – 3Z



Se puede buscar el vector en NEBcutter, con el código de GenBank



NEBcutter V2.0



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 300 KBases.**

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

Local sequence file: no file selected

GenBank number: [\[Browse GenBank\]](#)

or paste in your DNA sequence: (plain or FASTA format)

Standard sequences:
Plasmid vectors
Viral + phage

The sequence is: Linear Circular

Enzymes to use:
 NEB enzymes
 All commercially available specificities
 All specificities
 All + defined oligonucleotide sequences
 Only defined oligonucleotide sequences
[\[define oligos\]](#)

Minimum ORF length to display: a.a.

Name of sequence: (optional)

Earlier projects:

Note: Your earlier projects will be deleted 2 days after they were last accessed. You need to have cookies enabled in your browser for this feature to work.

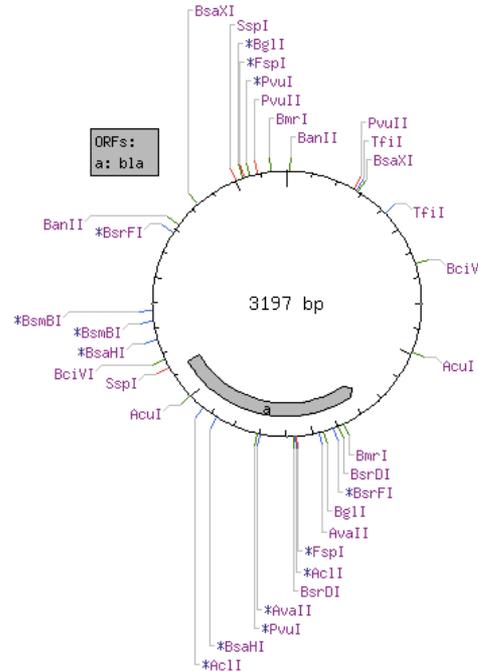
Disable NEBcutter cookies

[Back to main display](#)

Display: - NEB double cutter restriction enzymes
- Main non-overlapping, min. 100 aa ORFs

GC=50%, AT=50%

Cleavage code	Enzyme name code
⌵ blunt end cut	Available from NEB
⌵ 5' extension	Has other supplier
⌵ 3' extension	Not commercially available
⌵ cuts 1 strand	*: cleavage affected by CpG meth.
	#: cleavage affected by other meth.
	(enz.name): ambiguous site



Obtenemos un mapa de las enzimas con las que podemos abrir el vector

Main options

- New DNA
- Custom digest
- View sequence
- ORF summary
- Translate GB file
- Save project
- Print

Availability

- All commercial
- All

Display

- 1 cutters
- 3 cutters
- Linear

List

- 0 cutters
- 2 cutters
- All sites
- Save all sites

Minimum ORF length to display: aa.

Enzymes for Custom Digest

X65307

[\[Back to main display\]](#)

Pick your enzyme or enter a name in the box. Only the enzymes that cut the sequence and match your selection of availability (NEB enzymes) are shown. Non-NEB neoschizomers are not listed, but you can enter any enzyme name in the "Pick this enzyme" box and its prototype will be selected.

[\[All enzymes\]](#) - [\[Enzymes with compatible buffers\]](#) - [\[Enzymes producing blunt ends\]](#) - [\[Enzymes producing 5' overhangs\]](#) - [\[Enzymes producing 3' overhangs\]](#) - [\[Enzymes with a particular site length\]](#) - [\[Enzymes cutting N times\]](#) - [\[Non-palindromic enzymes\]](#)

Pick all	Enzyme	Specificity	Cuts	% activity in			
				1.1	2.1	3.1	CS
<input type="checkbox"/>	AatII	G ₁ ACGT [*] C	1	10	50*	50	100
<input type="checkbox"/>	Acc65I	G [*] GTAC ₁ C	1	10	75*	100	25
<input type="checkbox"/>	AccI	GT [*] MK ₁ AC	1	50	50	10	100
<input type="checkbox"/>	AciI	C [*] CG ₁ C	39	10	25	100	100
<input type="checkbox"/>	AclI	AA [*] CG ₁ TT	2	10	10	10	100
<input type="checkbox"/>	AcuI	CTGAAG(N) ₁₄ AN [*]	2	50	100	50	100
<input type="checkbox"/>	AflIII	A [*] CRYG ₁ T	1	10	50	100	50
<input type="checkbox"/>	AhdI	GACNN ₁ N [*] NGTC	1	25	25	10	100
<input type="checkbox"/>	AluI	AG [*] CT	19	25	100	50	100
<input type="checkbox"/>	AlwI	GGATC ₁ NNN [*] N ₁	10	50	50	10	100
<input type="checkbox"/>	AlwNI	CAG ₁ NNN [*] CTG	1	10	100	50	100
<input type="checkbox"/>	ApaLI	G [*] TGCA ₁ C	3	100	100	10	100
<input type="checkbox"/>	ApeKI	G [*] CWG ₁ C	13	25	50	100	10
<input type="checkbox"/>	ApoI	R [*] AATT ₁ Y	3	10	75	100	75
<input type="checkbox"/>	AseI	AT [*] TA ₁ AT	3	10	50*	100	10
<input type="checkbox"/>	AvaI	C [*] YCGR ₁ G	1	10	100	25	100
<input type="checkbox"/>	AvaII	G [*] GWC ₁ C	2	50	75	10	100
<input type="checkbox"/>	BaeGI	G ₁ RGCM [*] C	3	75	75	100	25
<input type="checkbox"/>	BamHI	G [*] GATC ₁ C	1	75*	100*	100	100*
<input type="checkbox"/>	BanI	G [*] GYRC ₁ C	4	10	25	10	100
<input type="checkbox"/>	BanII	G ₁ RGCY [*] C	2	100	100	50	100

Custom Digest

Circular Sequence: X65307

Sequence digested with: SalI

Cleavage code	Enzyme name code
⌵ blunt end cut	Available from NEB
⌵ 5' extension	Has other supplier
⌴ 3' extension	Not commercially available
⌵ cuts 1 strand	*: cleavage affected by CpG meth.
	#: cleavage affected by other meth.
	(enz.name): ambiguous site



Main options

- [New custom digest](#)
- [View gel](#)
- [Print](#)

Display

- [Circular](#)
- [Linear](#)

Zoom

- [Zoom in](#)
- [More...](#)

List

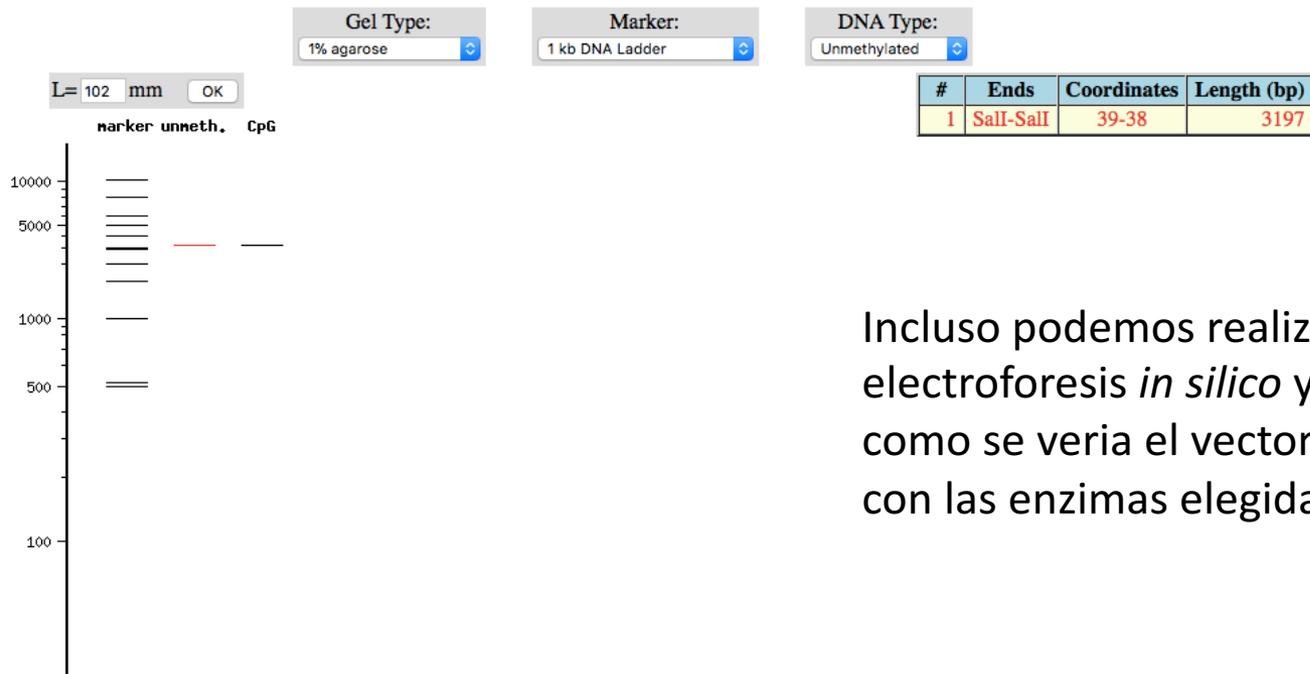
- [Enzymes & sites](#)
- [Fragments](#)

Custom Digest

Print Close

X65307 - digested with: SalI

Help Comments



Incluso podemos realizar una electroforesis *in silico* y ver como se veria el vector digerido con las enzimas elegidas

Digestión *in vitro*

- Leer especificaciones de la enzima

Thermo
SCIENTIFIC

PRODUCT INFORMATION

Sall

#ER0641 1500 U

Lot: _____ Expiry Date: _

5'...G↓T C G A C...3'

3'...C A G C T↑G...5'

Concentration: 10 U/μL
Supplied with: 1 mL of 10X Buffer O
1 mL of 10X Buffer Tango

Store at -20°C



In total 3 vials. BSA included

www.thermoscientific.com/onebio

RECOMMENDATIONS

1X Buffer O (for 100% Sall digestion)

50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1 mg/mL BSA.

Incubation temperature

37°C.

Unit Definition

One unit is defined as the amount of Sall required to digest 1 μg DNA-Eco81I fragments in 1 hour at 37°C in 50 μL of recommended reaction buffer.

Dilution

Dilute with the Dilution Buffer (#B19): 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 25°C), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mg/mL BSA and 50% glycerol.

Double Digests

Thermo Scientific Tango Buffer is provided to simplify buffer selection for double digests. 98% of Thermo Scientific restriction enzymes are active in a 1X or 2X concentration of Tango™ Buffer. Please refer to www.thermoscientific.com/doubledigest to choose the best buffer for your experiments.

1X Tango Buffer: 33 mM Tris-acetate (pH 7.9 at 37°C), 10 mM magnesium acetate, 66 mM potassium acetate, 0.1 mg/mL BSA.

Storage Buffer

Sall is supplied in: 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 25°C), 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.2 mg/mL BSA and 50% glycerol.

Recommended Protocol for Digestion

- Add:

nuclease-free water	16 μL
10X Buffer O	2 μL
DNA (0.5-1 μg/μL)	1 μL
Sall	0.5-2 μ*
- Mix gently and spin down for a few seconds.
- Incubate at 37°C for 1-16 hours*.

The digestion reaction may be scaled either up or down.

Digestión *in vitro*

$$\text{ADN} = 25.8 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Sa/I} = 1,500 \text{ unidades/ml}$$

Objetivo: cortar 1 μg de ADN con 10 unidades
de enzima.

Receta de digestión

Reactivo Cantidad (µL)

H₂O

7.47

10x buffer

2

Incubar: 37°C
x 1-16 horas

ADN

3.87

Salt

6.66

TOTAL

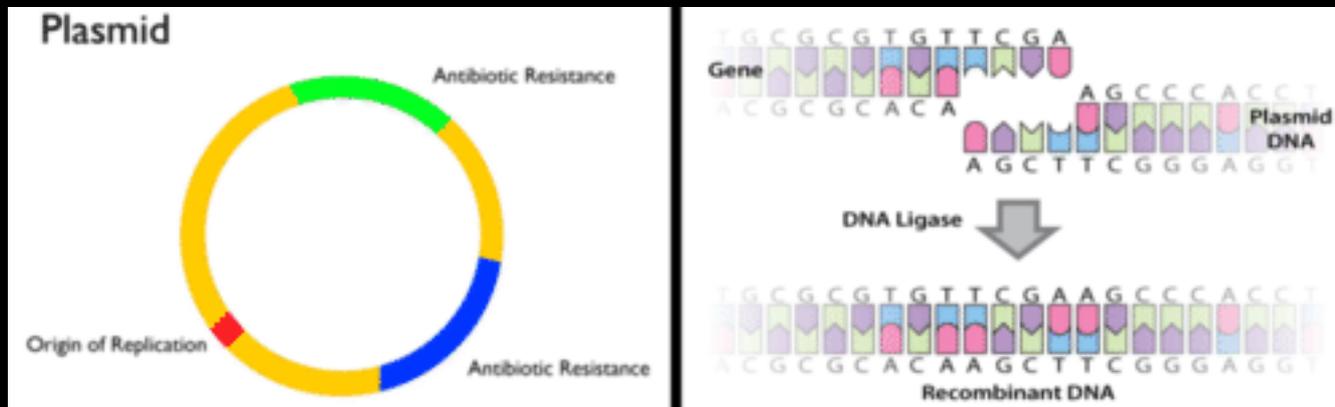
20.00 µL

Actividad "estrella"

- La enzima se une a sitios similares pero no idénticos al sitio de reconocimiento correspondiente.
- Bajo condiciones extremas
 - Temperatura incorrecta
 - pH elevado
 - Baja fuerza iónica
 - Altas concentraciones de glicerol (>5%)

Ligación

- Si el ADN de interés y el vector son cortados con la misma enzima, y esta crea cortes “pegajosos”, se puede incubar con una ADN ligasa.
- Molécula de ADN recombinante.



Resumen

- Conforman un “sistema inmune” primitivo en procariotas
- Clasificación
 - Sitios de anclaje
 - Sitio de corte
 - Tipos de corte
- Importancia biotecnológica
- Es imprescindible conocer las especificaciones de la enzima que se esta utilizando

Bibliografía recomendada

- Arber W, Linn S (1969). "DNA modification and restriction". Annual Review of Biochemistry. **38**: 467–500.
- Roberts RJ (Nov 1976). "Restriction endonucleases". CRC Critical Reviews in Biochemistry. **4(2)**: 123–64.
- Pray, L. (2008) Restriction enzymes. Nature Education
- Chandrasegaran, S. 2001. Restriction Enzymes. eLS. .
- John W. Pelley, 18 - Recombinant DNA and Biotechnology, In Elsevier's Integrated Biochemistry, Mosby, Philadelphia, 2007, Pages 159-167, ISBN 9780323034104
- Frank H. Stephenson, Chapter 10 - Recombinant DNA, In Calculations for Molecular Biology and Biotechnology (Third Edition), Academic Press, Boston, 2016, Pages 321-373, ISBN 9780128022115