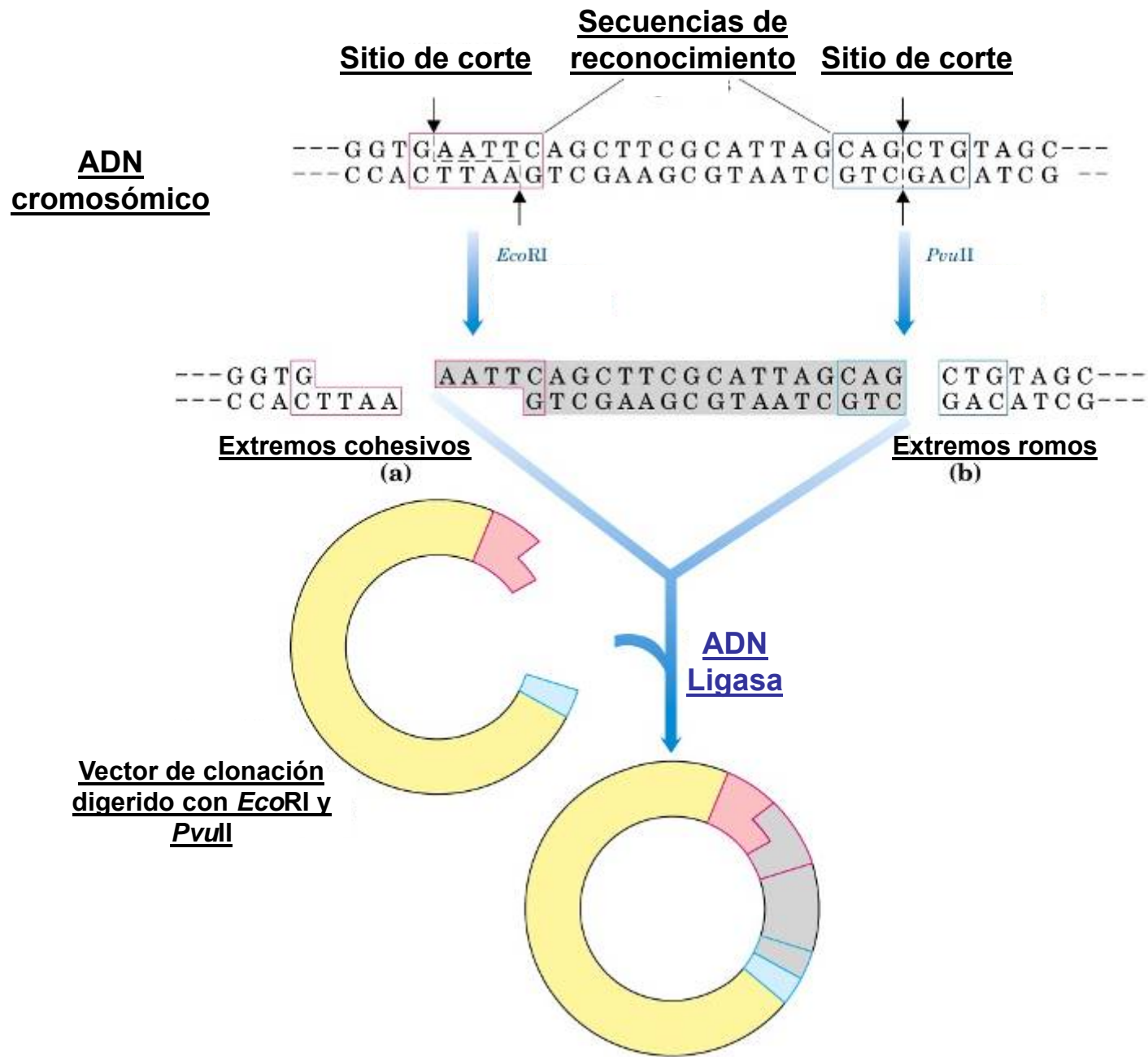


# ENZIMAS DE RESTRICCIÓN



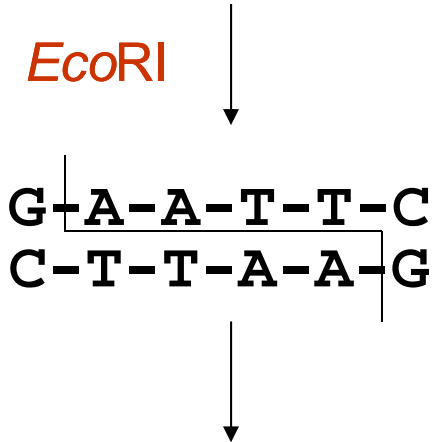
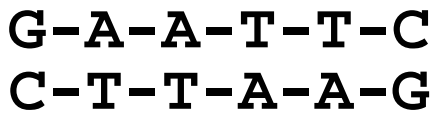
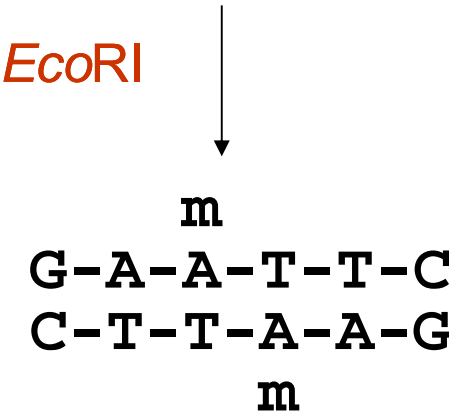
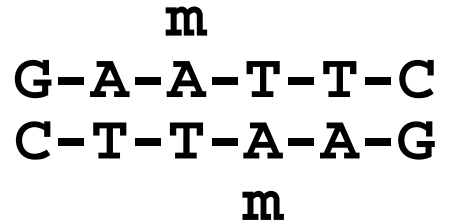
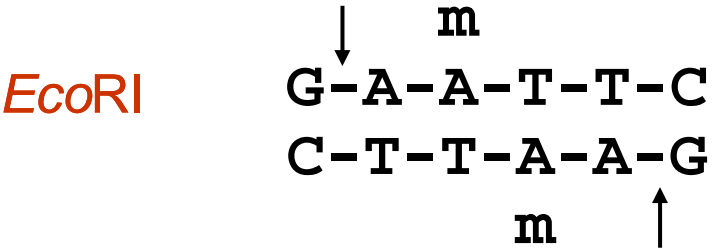
# Tipos de enzimas de restricción

Characteristic	Type I	Type II	Type III
Restriction and modification activities	Single multifunctional enzyme	Separate endonuclease and methylase	Separate enzymes with a subunit in common
Protein structure of restriction endonuclease	Three different subunits	Simple	Two different subunits
Requirements for restriction	ATP, Mg <sup>2+</sup> S-adenosylmethionine	Mg <sup>2+</sup>	ATP, Mg <sup>2+</sup> (S-adenosylmethionine)
Sequence of host specificity sites	<i>EcoB</i> : TGAN <sub>8</sub> TGCT <i>EcoK</i> : AACN <sub>8</sub> GTGC	Rotational symmetry (not in type IIs)	<i>EcoP1</i> : AGACC <i>EcoP15</i> : CAGCAG
Cleavage sites	Possibly random, at least 1000 bp from host specificity site	At or near host specificity site	24–26 bp to 3' of host specificity site
Enzymatic turnover	No	Yes	Yes
DNA translocation	Yes	No	No
Site of methylation	Host specificity site	Host specificity site	Host specificity site

N = any nucleotide.

**Tipo IIs:** Reconocen secuencias no palindrómicas, 4-7 pb. Sitio de corte en la secuencia y hasta 20 pb de distancia

# Restricción-modificación



La **metilación del ADN** en eucariotas superiores está relacionada con la regulación de la transcripción. El uso de algunas enzimas de restricción específicas permite distinguir entre ADN metilado y no metilado, obteniéndose de esta manera información sobre la posible regulación de la expresión de un gen por metilación del ADN

**Vertebrados**: metilación de la C en secuencias CG en el C<sup>5</sup>, generando 5-metilcitosina: m<sup>5</sup>CG. Secuencias (islas) CpG, implicadas en regulación de la transcripción.

***HpaII***, ***MspI***: isosquizómeros, reconocen C/CGG

**Plantas**: metilación m<sup>5</sup>CG y m<sup>5</sup>CNG.

Uso de endonucleasas con diferente sensibilidad a metilación:

McClelland M. 1983. The frequency and distribution of methylatable DNA sequences in leguminous plant protein coding genes. **J. Mol. Biol. 19: 346-354**

# Metilación del ADN y digestión con enzimas de restricción

**Sistema dam:** metila la A de la secuencia GATC en el N<sup>6</sup>, generando 6-metiladenina: G<sup>m6</sup>ATC.

*PvuI*, *BamHI*, *BclI*, *BglII*, *XhoI*, *MboI* y *Sau3AI* (/GATC)

**Clal:** AT/CG\*AT

**XbaI:** T/CTAG\*A

**Sistema dcm:** metila la C interna de la secuencia CC(AT)GG en el C<sup>5</sup>, generando 5-metilcitosina: C<sup>m5</sup>CWGG

**EcoRII:** /CCWGG, *BstNI:* CC/WGG

**StuI:** AGG/C\*CT

**DpnI:** Es una enzima de restricción que corta en la secuencia GATC sólo si está metilada por dam (G<sup>m6</sup>ATC). Utilizada en algunos protocolos de PCR para eliminar ADN plasmídico proveniente de la bacteria sin afectar al sintetizado *in vitro*.

# ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

- Reconocen secuencias concretas
- Simetría (palíndromes)

# Ejemplos de palíndromes

- Dabale arroz a la zorra el abad
- La ruta natural
- A man, a plan, a canal: Panama



# Enzimas de restricción

- Reconocen secuencias concretas
- Simetría (palíndromes)
- Número de nucleótidos en la secuencia

N<sub>1</sub>N<sub>2</sub>N<sub>3</sub>N<sub>4</sub>

4<sup>4</sup>

256

N<sub>1</sub>N<sub>2</sub>N<sub>3</sub>N<sub>4</sub>N<sub>5</sub>N<sub>6</sub>

4<sup>6</sup>

4096

N<sub>1</sub>N<sub>2</sub>N<sub>3</sub>N<sub>4</sub>N<sub>5</sub>N<sub>6</sub>N<sub>7</sub>N<sub>8</sub>

4<sup>8</sup>

65536

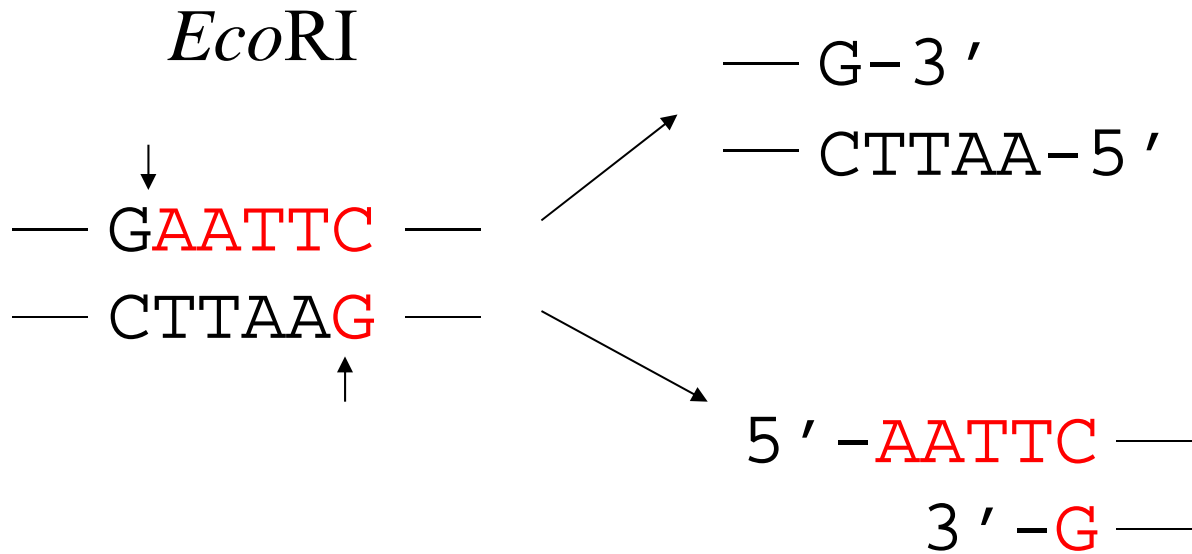
# Sitios de corte de las endonucleasas de restricción del tipo II

Bacterial source	Enzyme abbreviation	Sequence 5' → 3' 3' ← 5'	Note
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeIII</i>	GG CC CC GG	1
<i>Staphylococcus aureus</i> 3A	<i>Sau3AI</i>	GATC CTAG	2
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	<i>BamHI</i>	G GATC C C CTAG G	2
<i>Escherichia coli</i> RY13	<i>EcoRI</i>	G AATT C C TTAA G	2, 6, 7
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	<i>HindII</i>	GTPy PuAC CTPu PyTG	1, 5
	<i>HindIII</i>	A AGCT T T TCGA A	2
<i>Providencia stuartii</i>	<i>PstI</i>	C TGCA G G ACGT C	3
<i>Serratia marcescens</i>	<i>SmaI</i>	CCC GGG GGG CCC	1
<i>Xanthomonas malvacearum</i>	<i>XmaI</i>	C CCGG G G GGCC C	2
<i>Moraxella bovis</i>	<i>MboII</i>	GAAGAN <sub>8</sub>   CTTCTN <sub>7</sub>	4

**Tipo IIs: *MboII***

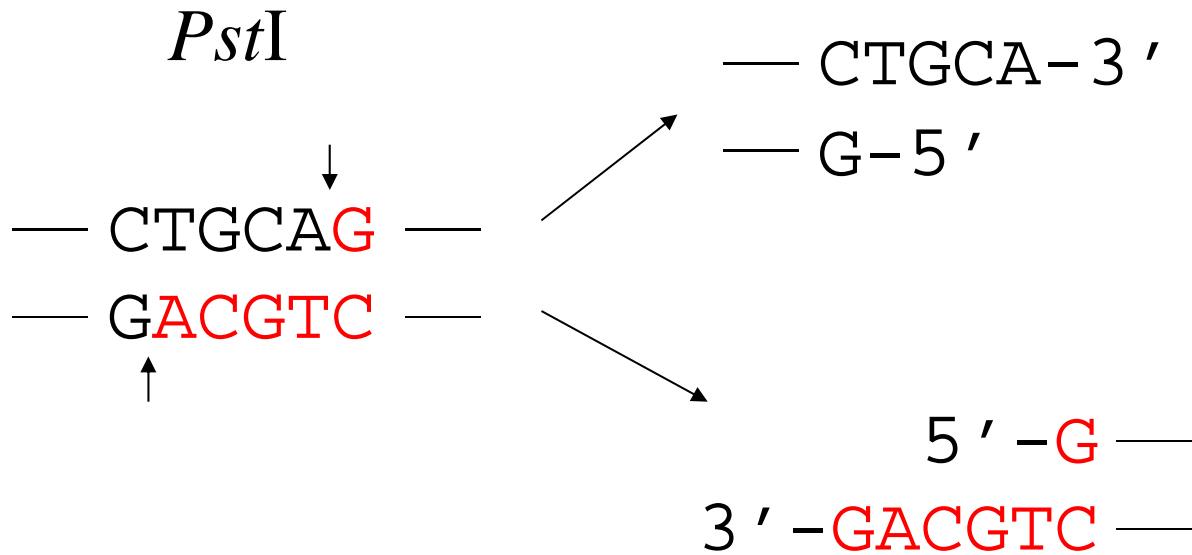
# Extremos protuberantes

## 5' protuberantes

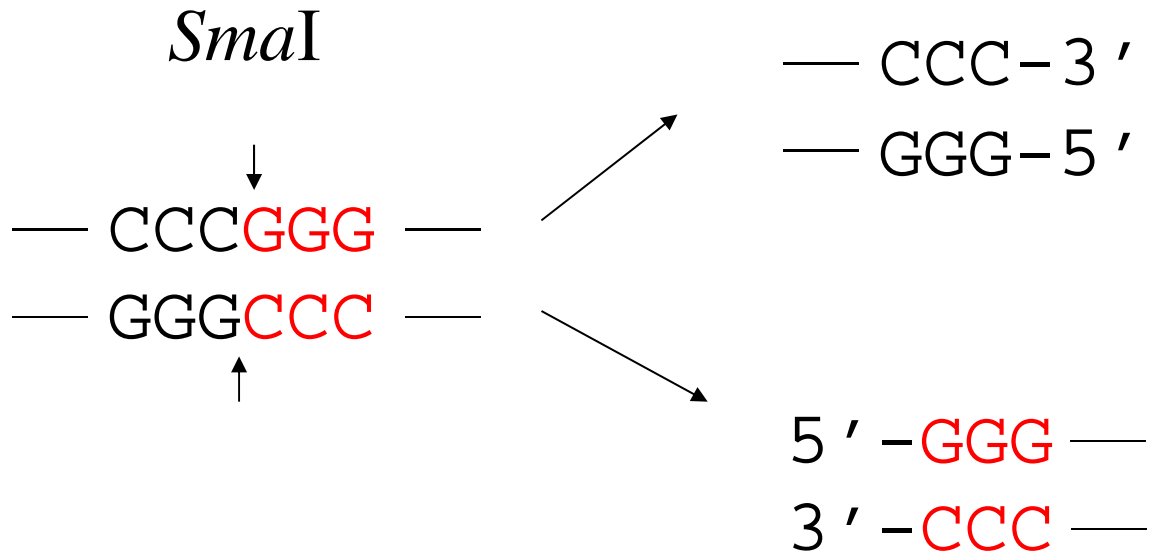


# Extremos protuberantes

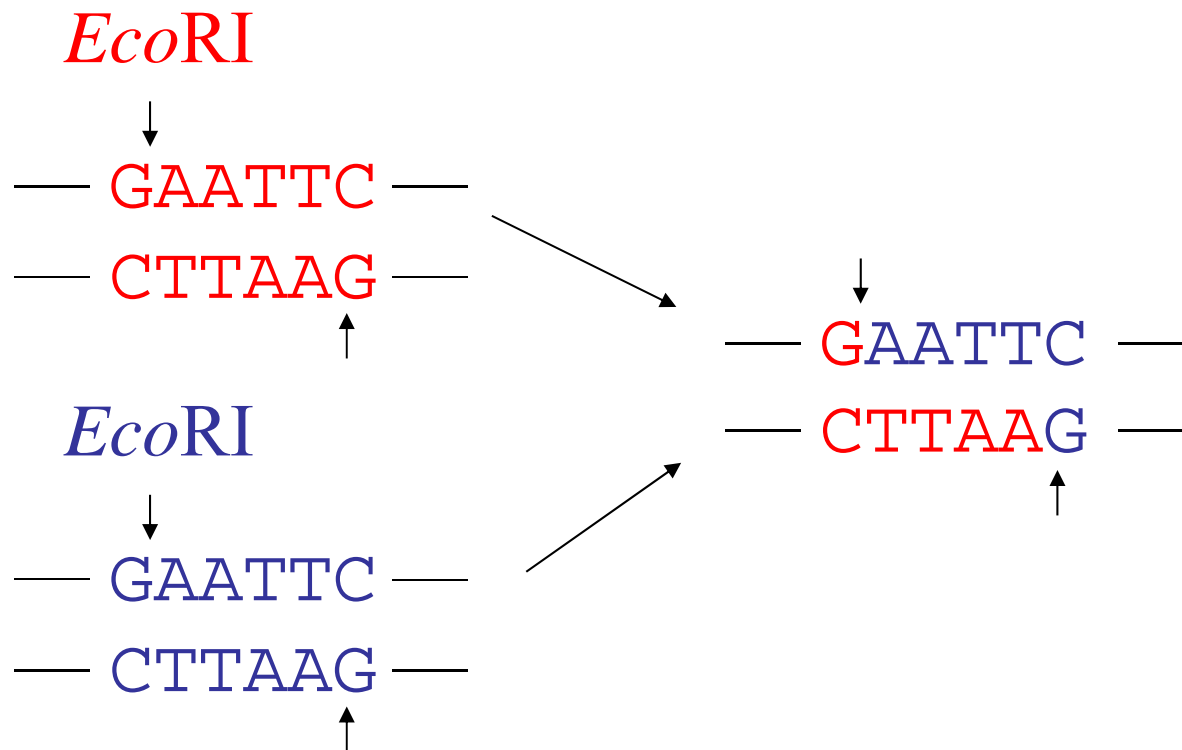
## 3' protuberantes



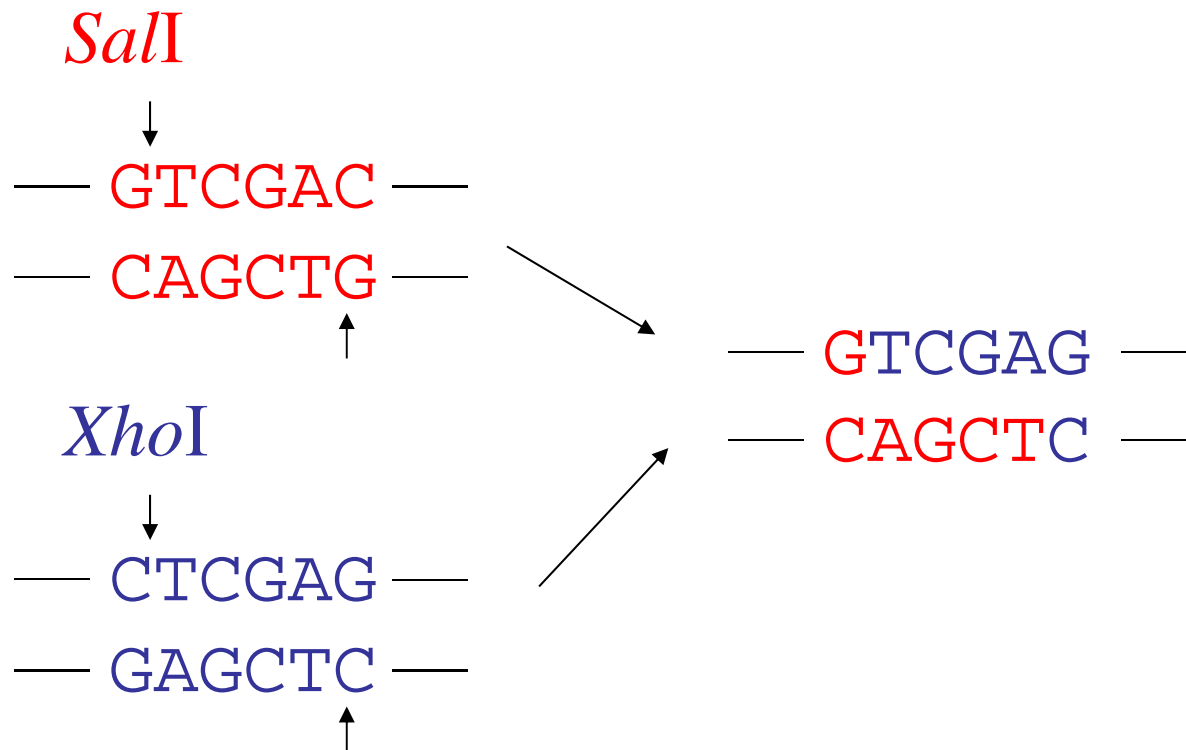
# Extremos romos



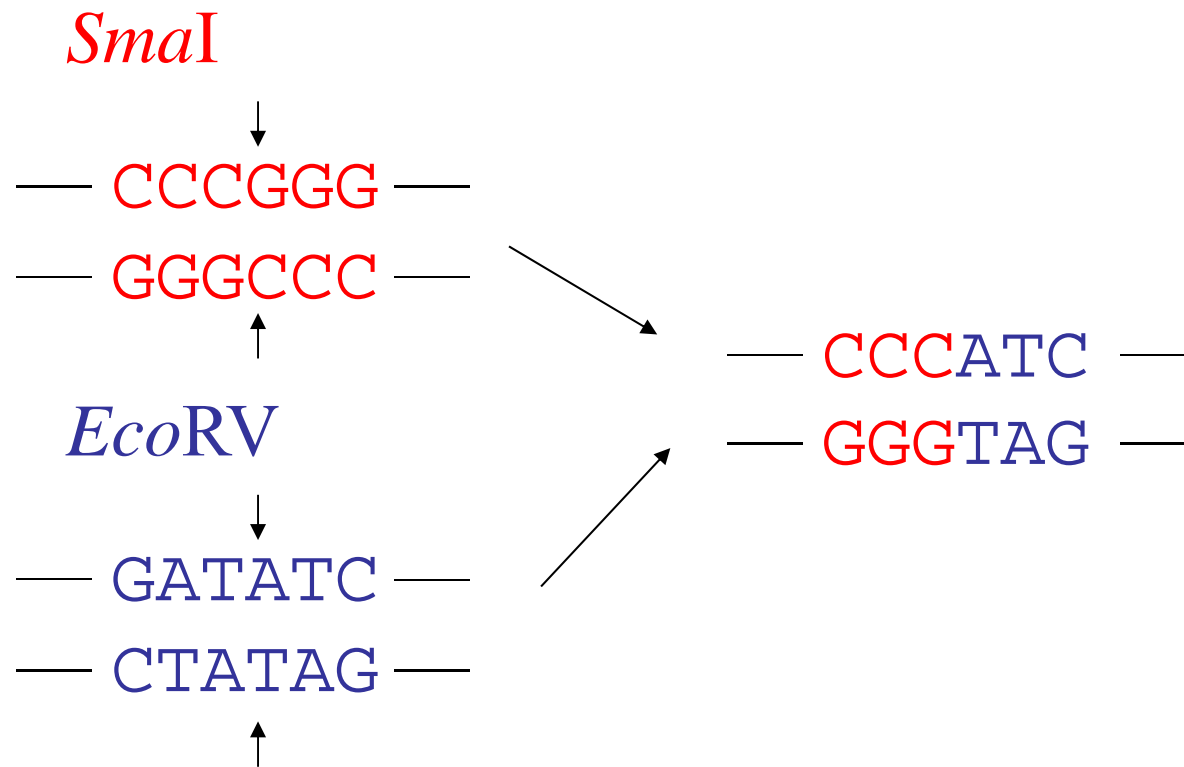
# Extremos compatibles (I)



# Extremos compatibles (II)

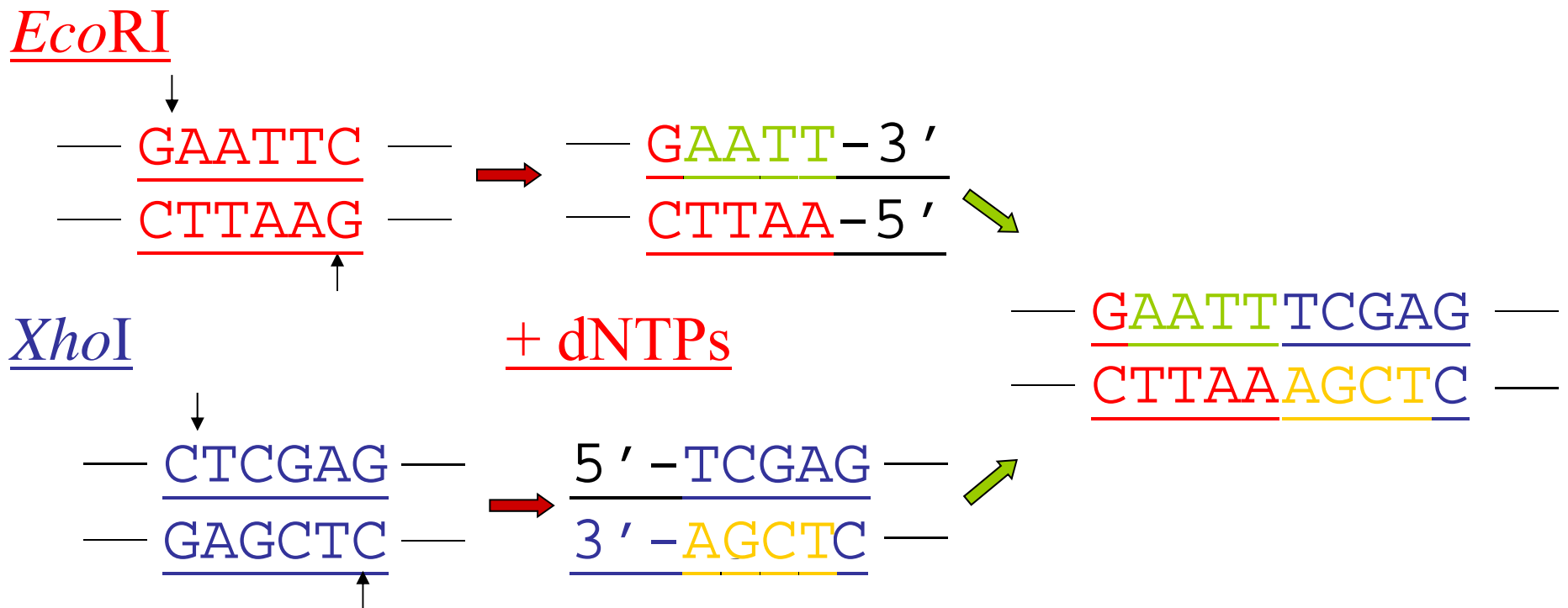


# Extremos romos (siempre compatibles)





# Extremos no compatibles rellenados, transformados en romos (siempre compatibles)

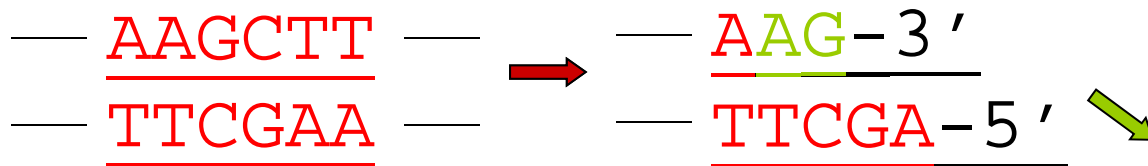


- Degradado de cadena sencilla

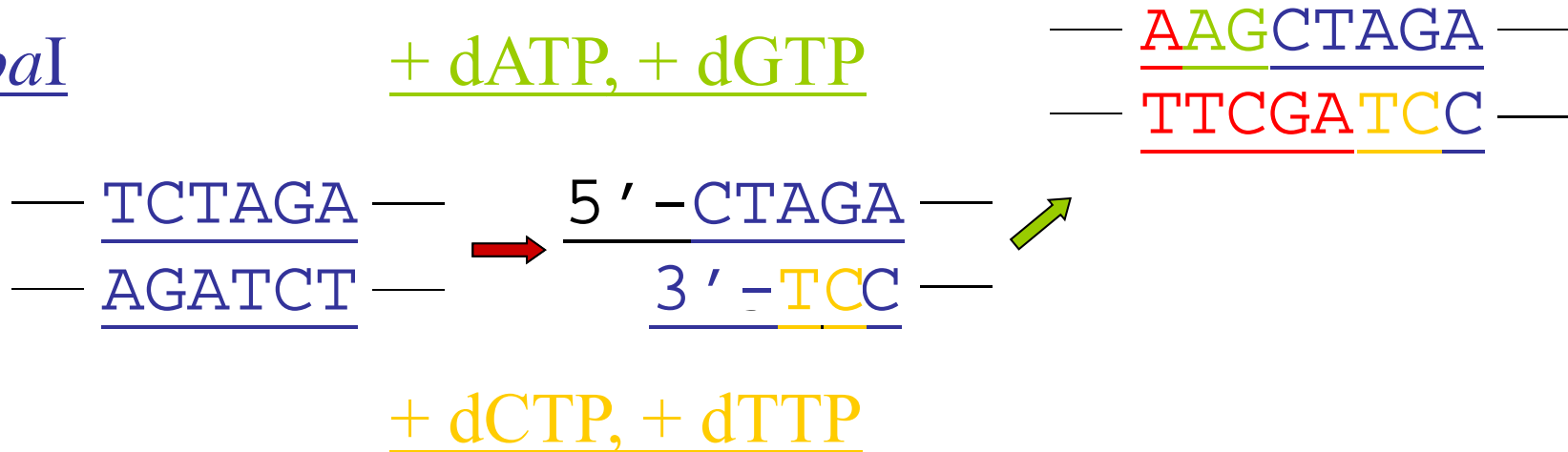
# Extremos no compatibles transformados en compatibles

- Rellenado parcial

## HindIII



## XbaI



# Precauciones

- Actividad “*star*”
- Metilación

## Aspectos prácticos

**Unidad**: Cantidad de enzima que digiere 1  $\mu\text{g}$  de ADN en 1 hora a la temperatura y condiciones óptimas.

**Inhibición**: Adición de 20 mM EDTA.

**Inactivación**: Por calor o tratamiento con fenol-CIA

Dos enzimas de restricción pueden utilizarse simultáneamente siempre que compartan las mismas condiciones de digestión (temperatura, pH, concentración de sales)