



# Introducción a la biología molecular. Uso de enzimas.

<b>Apellidos, nombre</b>	Cardona Serrate, Fernando (fcardona@btc.upv.es)
<b>Departamento</b>	Departamento de Biotecnología. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural.
<b>Centro</b>	Universitat Politècnica de València



## 1 Resumen de las ideas clave

En este artículo vamos a estudiar los enzimas más importantes utilizados en biología molecular. Comenzaremos con los enzimas de restricción en las técnicas de ADN recombinante y otros usos, para continuar con la ADN ligas. Por último veremos otros enzimas muy utilizados como son las quinasa, las fosfatasa, y los que tienen actividad ADN polimerasa.

## 2 Objetivos

Una vez que el estudiante lea con detenimiento este documento, será capaz de:

- Comprender las técnicas de ADN recombinante e ingeniería genética
- Estudiar los enzimas de restricción y sus usos más comunes
- Estudiar el mecanismo de acción de las ADN ligasas
- Conocer qué son las actividades quinasa y fosfatasa
- Conocer la actividad ADN polimerasa y sus usos
- Comprender las reacciones de *A tailing* y *end repair*

## 3 Introducción

La **biología molecular** tiene multitud de aplicaciones a la biomedicina y la biotecnología. Un claro ejemplo de ello es la tecnología del **ADN recombinante**, que permite combinar artificialmente fragmentos de ADN de diferente origen, cortando y uniendo las moléculas de ADN de interés (imagen 1). El objetivo de estas construcciones de ADN puede ser diverso, pero como ejemplos puede servir para expresar un gen de un organismo en otro, secuenciar el fragmento de ADN o realizar screenings (rastros) genéticos.

La **ingeniería genética** es la manipulación y modificación de los genes de un organismo alterando el material genético en su genoma por medio de las diferentes tecnologías de edición genética, incluyendo la del ADN recombinante. Las técnicas de ingeniería genética suelen implicar el aislamiento, la manipulación y la introducción de ADN en un ser vivo, normalmente para expresar un gen que codifica para alguna proteína o enzima de interés. El objetivo es eliminar o introducir nuevas características en un ser vivo para aumentar su utilidad biotecnológica o con fines de investigación.

Además, los enzimas se utilizan en otras aplicaciones de la **genética** y la **genómica**, con el objetivo de modificar el ADN para amplificar la cantidad de ADN disponible, transformar el ARN en ADN, conocer su secuencia, conocer la función de los genes, o estudiar las variantes genéticas relacionadas con enfermedades o el riesgo de padecerlas.

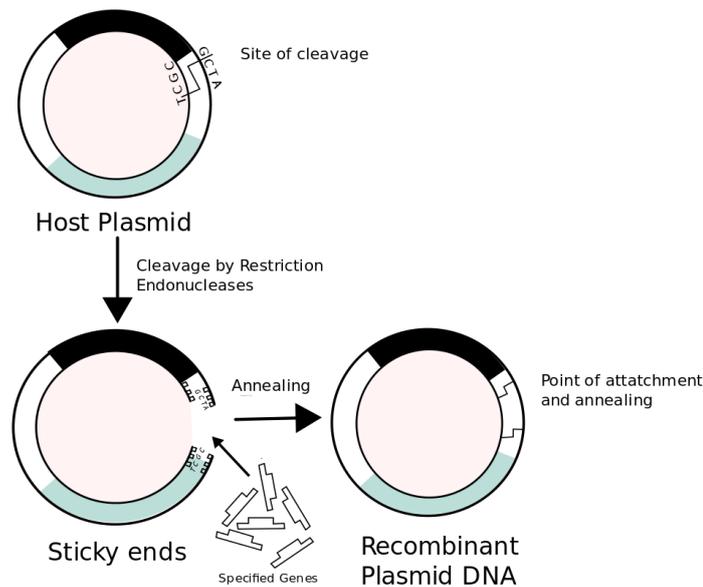


Imagen 1. Tecnología del ADN recombinante. Fuente: Wikimedia Commons

## 4 Desarrollo

En biología molecular, concretamente para las utilidades anteriormente mencionadas, se utilizan multitud de enzimas. A continuación estudiaremos los más importantes para usos biomédicos y biotecnológicos.

### 4.1 Los enzimas de restricción

Las nucleasas o enzimas de restricción cortan ADN de doble cadena en motivos de secuencia específicos, de forma que dan fragmentos con extremos de secuencia conocida. Cada enzima reconoce una o un número pequeño de secuencias blanco y corta el ADN en o cerca de esas secuencias. Son herramientas imprescindibles en biología molecular, ingeniería genética y biotecnología.

Se aíslan a partir de bacterias, y se nombran con tres letras del género y especie de la bacteria de la que se aislaron originalmente, seguidas a veces otra letra que identifica el serotipo y, finalmente, por un número romano que las identifica dentro de los de esa especie y serotipo (por ejemplo EcoRI de *Escherichia coli*). Se descubrieron en los años 60 y su uso en biología molecular empezó en los 70 permitiendo el desarrollo de las tecnologías de ADN recombinante. Cada enzima se caracteriza por su secuencia diana.

Las enzimas de restricción tienen actividad endonucleasa y cortan un enlace fosfodiéster en cada hebra del ADN bicatenario. Su importancia radica en su gran especificidad para reconocer una secuencia corta de ADN y cortarla siempre en la misma posición. Los fragmentos de DNA resultantes son útiles para aplicaciones posteriores en biología molecular, como por ejemplo clonación, elaboración de mapas de restricción o detección de polimorfismos.

Los enzimas de restricción se agrupan en tres familias, de acuerdo con sus propiedades: Tipos I, II y III. Las más utilizadas como herramientas en biología molecular son las Tipo II, ya que cortan en un punto muy definido dentro de su secuencia diana. Las enzimas de restricción de Tipo I y III reconocen una secuencia específica, pero cortan a una distancia variable del sitio de restricción. Las enzimas de restricción de Tipo II reconocen una secuencia específica, pero además siempre cortan entre los mismos nucleótidos de esta secuencia, generando siempre los mismos fragmentos de restricción. La secuencia diana es de tamaño variable, la mayoría de 4 y 6 nucleótidos, con frecuencia palindrómica. Algunas enzimas de restricción cortan generando extremos llamados romos mientras que otras cortan generando extremos protuberantes llamados cohesivos (imagen 2). Los extremos cohesivos pueden utilizarse para ligaciones direccionales (imagen 3) con otros extremos cohesivos compatibles (secuencias complementarias), mientras que para los extremos romos la ligación no es direccional, pudiendo ligarse extremos 5' con extremos 3'.

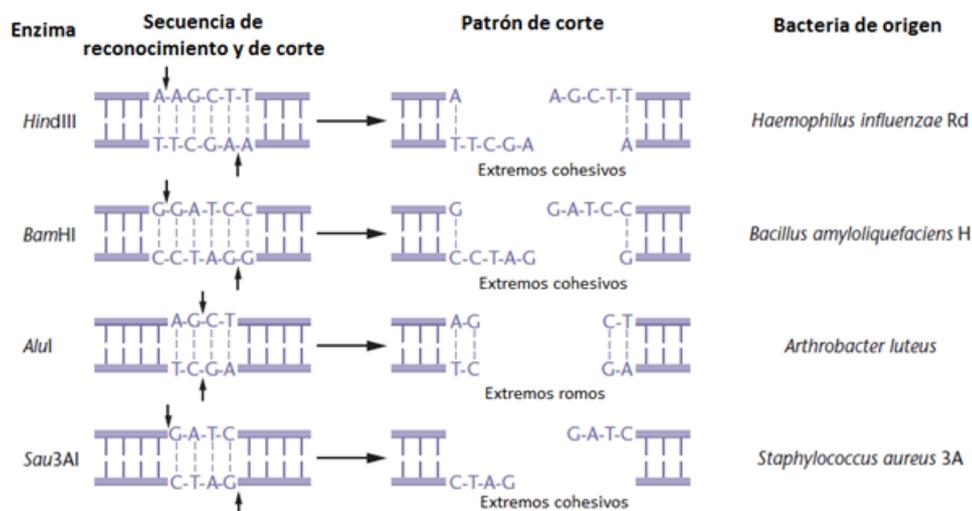


Imagen 2. Algunas enzimas de restricción tipo II comunes, con sus secuencias de reconocimiento, los patrones de corte y su origen. Fuente: Biol. Iván León, Allscience. Adaptado de Klug y col. (2006).

## 4.2 Las ADN ligasas

La ADN ligasa es una enzima que une ADN. Si dos fragmentos de ADN tienen extremos cohesivos o romos, la ligasa puede unirlos para formar una molécula única de ADN. Un ejemplo sería la ligación de los extremos cohesivos del ejemplo anterior (imagen 4). La ADN ligasa utiliza ATP como fuente de energía para catalizar esta reacción. Este enzima cataliza la unión del grupo fosfato del extremo 5' de una cadena de ADN al grupo hidroxilo del extremo 3' de la otra cadena.

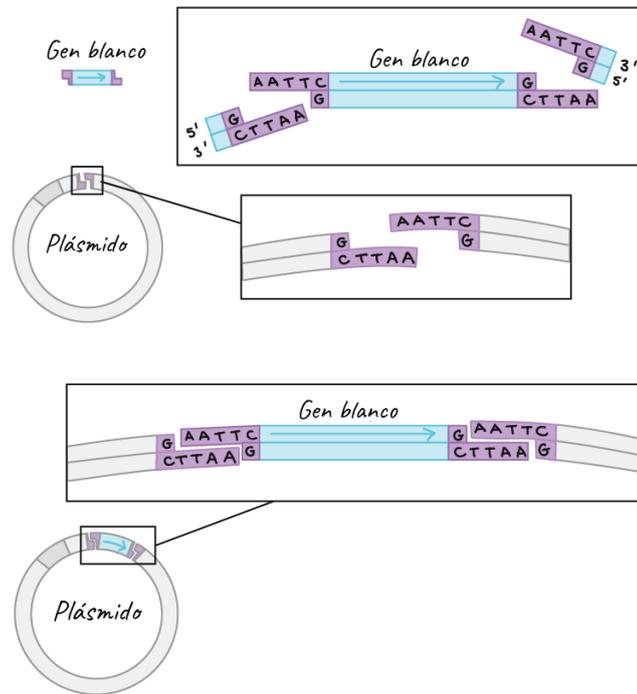


Imagen 3. Ligación direccional utilizando extremos cohesivos compatibles en plásmido e inserto.  
 Fuente: Khan Academy. <https://es.khanacademy.org/>

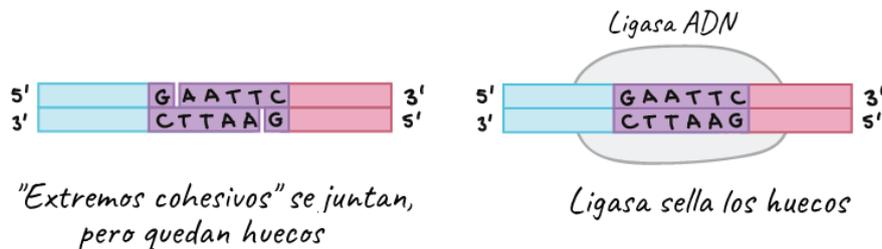


Imagen 4. Ligación de extremos cohesivos por la ADN ligasa.  
 Fuente: Khan Academy. <https://es.khanacademy.org/>

Existe otro tipo de ligación particular, llamado ligación TA, que liga A (introducidas por ADN polimerasas o subunidades de las mismas) con T que contienen los plásmidos o fragmentos de ADN a ligar. Esta técnica se denomina *TA cloning*. Para añadir una secuencia de "A" a un producto de PCR producido por una polimerasa de alta fidelidad (no Taq) para su uso en la clonación de TA, puede incubarse 30' a 72°C. Los productos de amplificación con Taq polimerasa ya tienen una "A" extra que puede usarse con estos fines.

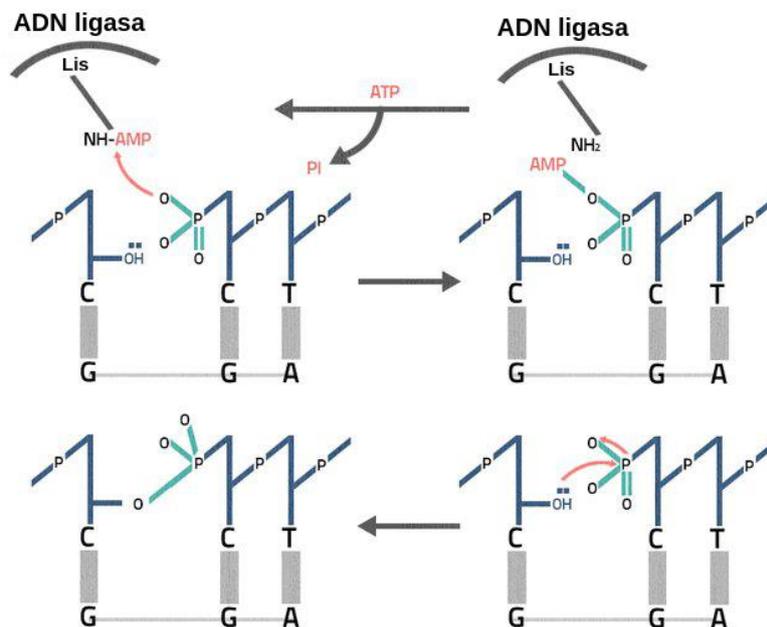


Imagen 5. Detalle de la reacción de ligación por la ADN ligasa.

Fuente: Labster. <https://theory.labster.com/es/dna-ligation/>

### 4.3 Otros enzimas importantes en biología molecular

El ADN fragmentado, ya sea artificialmente, mediante enzimas de restricción que dna extremos protuberantes, o parcialmente degradado, suele tener extremos cohesivos, lo que implica que una de las cadenas es más larga que la otra. El ADN con extremos cohesivos se une espontáneamente a otro ADN que tenga extremos cohesivos complementarios. Para evitar esto, es necesario convertirlo en ADN con extremos romos. Esto puede hacerse rellenando los huecos (protuberancias) con una ADN polimerasa o solo con la subunidad Klenow de la ADN polimerasa (carece de actividad exonucleasa 3'-5', solo actividad 5'-3') (imagen 6).

Otros enzimas importantes en biología molecular son los que añaden o quitan grupos fosfato, es decir, las quinasas y fosfatasa, respectivamente. Por ejemplo, recordad que para poder unir dos fragmento de ADN por la ADN ligasa, esta tiene que estar fosforilada en 5' (imagen 5). Si por ejemplo queremos ligar en romos porque carecemos de complementariedad, y tenemos extremos protuberantes, debemos primero rellenar los huecos con actividad polimerasa y después fosforilar. Esto es lo que se llama "reparación de extremos" (*end repair*). Esto puede ir unido o no al "A" tailing visto anteriormente en el apartado 4.2 (imagen 7).

En general, los enzimas más utilizados en biología molecular, tanto polimerasas como kinasas o fosfatasa, son los derivados del fago T4.





## 5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos aprendido sobre los diferentes enzimas utilizados en biología molecular y sus usos más frecuentes, centrándonos en las aplicaciones biomédicas y biotecnológicas.

## 6 Bibliografía

- 1- Biol. Iván León, Allscience. <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/que-son-las-enzimas-de-restriccion-para-que-se-usan-y-que-funcion-desempenan-en-la-naturaleza>
- 2- Klug, W.S; Cummings, M.R; Spencer, C.A. 2006. Conceptos de Genética. Octava edición. Pearson Educación. Madrid, España.
- 3- Khan Academy. <https://es.khanacademy.org/>
- 4- Labster. <https://theory.labster.com/es/dna-ligation/>