

DNA polimerasa de phi29 (ϕ 29 DNApol)

Descripción

La DNA polimerasa de ϕ 29 es una enzima monomérica (66 kDa) responsable de la replicación del DNA del bacteriófago ϕ 29. Entre sus principales características destacan su capacidad para acoplar el desplazamiento de banda a la síntesis de DNA y su elevada procesividad (Figura). Estas propiedades, junto con su alta fidelidad, debida a la combinación de su capacidad para discriminar el nucleótido correcto y su actividad exonucleasa correctora de errores, la han convertido en una herramienta biotecnológica muy valiosa empleada en procesos de amplificación de DNA. Su uso ha permitido solventar dos de los problemas que habitualmente limitan los procedimientos existentes de amplificación, la fidelidad de la síntesis y la longitud de los productos obtenidos.

Por otra parte, la capacidad de la DNA polimerasa de ϕ 29 para utilizar como molde moléculas circulares de DNA de cadena sencilla le permite llevar a cabo la amplificación a través del mecanismo de *Rolling-Circle Amplification* (RCA), sintetizando más de 10 copias del DNA molde original en forma de largas moléculas concatémicas de DNA de cadena sencilla. Además, como se ha demostrado, la DNA polimerasa de ϕ 29 puede ser combinada con primers para llevar a cabo, de manera muy eficiente y fiel, la amplificación isotérmica de DNA de cadena doble acoplada al desplazamiento de banda tanto de genomas circulares como lineales, amplificándose hasta 10^6 veces la muestra original. Los productos de amplificación que se originan pueden ser digeridos o secuenciados directamente sin necesidad de ningún paso previo de purificación.

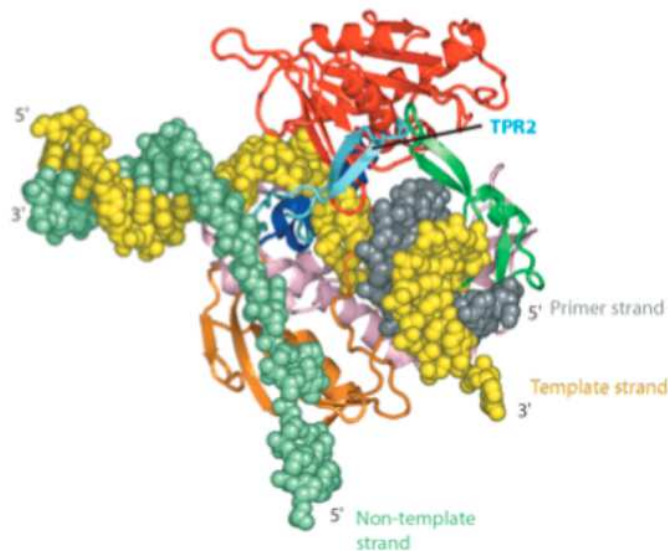


Figura Copyright (2005) National Academy of Sciences, U.S.A. - PNAS, May 3, 2005, vol. 102, no. 18 pp. 6407-6412

Aplicaciones †

- Generación de sondas multicopia de DNA de cadena sencilla a partir de moldes circulares y un único oligonucleótido iniciador.
- Amplificación de DNA plasmídico mediante síntesis por desplazamiento de banda con iniciadores de secuencia al azar (RCA).
- Amplificación de DNA genómico lineal mediante síntesis por desplazamiento de banda con iniciadores de secuencia al azar (MDA).
- Marcaje de extremos de DNA 3'-recesivos con nucleótidos naturales o modificados (e.g., ddNTP, DIG-dUTP).
- Obtención de extremos romos a partir de extremos de DNA 3'-recesivos.

Referencias seleccionadas

Blanco L. and Salas M. (1984). Characterization and purification of a phage ϕ 29 coded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5325-5329.

Blanco, L. and Salas, M. (1985) Characterization of a 3'-5' exonuclease activity in the phage ϕ 29-encoded DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 1239-1249.

Bernad, A., Blanco, L., Lázaro, J.M., Martín, G. and Salas, M. (1989) A conserved 3'-5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell*, **59**, 219-228.

Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J.M., Martín, G., Garmendia, C. and Salas, M. (1989) Highly efficient DNA synthesis by the phage ϕ 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J. Biol. Chem.*, **264**, 8935-8940.

Garmendia, C., Bernad, A., Esteban, J.A., Blanco, L. and Salas, M. (1992) The bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase, a proofreading enzyme. *J. Biol. Chem.*, **267**, 2594-2599.

Esteban, J.A., Salas, M. and Blanco, L. (1993) Fidelity of ϕ 29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization. *J. Biol. Chem.*, **268**, 2719-2726.

Blanco, L., Lázaro, J.M., de Vega, M., Bonnin, A. and Salas, M. (1994) Terminal protein-primed DNA amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12198-12202.

Blanco, L. and Salas, M. (1996) Relating structure to function in ϕ 29 DNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8509-8512.

Dean, F.B., Nelson, J.R., Giesler, T.L. and Lasken, R.S. (2001) Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res.*, **11**, 1095-1099.

Dean, F.B., Hosono, S., Fang, L., Wu, X., Faruqi, A.F., Bray-Ward, P., Sun, Z., Zong, Q., Du, Y., Du, J. *et al.* (2002) Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5261-5266.

Kamtekar, S., Berman, A.J., Wang, J., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M. and Steitz, T.A. (2004) Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage ϕ 29. *Mol. Cell*, **16**, 609-618.

Salas, M., de Vega, M., Lázaro, J.M. and Blanco, L. (2004) ϕ 29 DNA polymerase, a potent amplification enzyme. In *DNA amplification. Current technologies and applications*. Demidov, V. V. a. B., N.E. (ed.), pp. 21-34. Horizon Bioscience, UK.

Rodríguez, I., Lázaro, J.M., Blanco, L., Kamtekar, S., Berman, A.J., Wang, J., Steitz, T.A., Salas, M. and de Vega, M. (2005) A specific subdomain in ϕ 29 DNA polymerase confers both processivity and strand-displacement capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 6407-6412.

Notas legales

† Algunas aplicaciones, en las que esta enzima sería utilizable, podrían requerir la concesión de una licencia. Para más información visite www.xpolbiotech.com