

# Restrikční mapování

Daniela Bartková

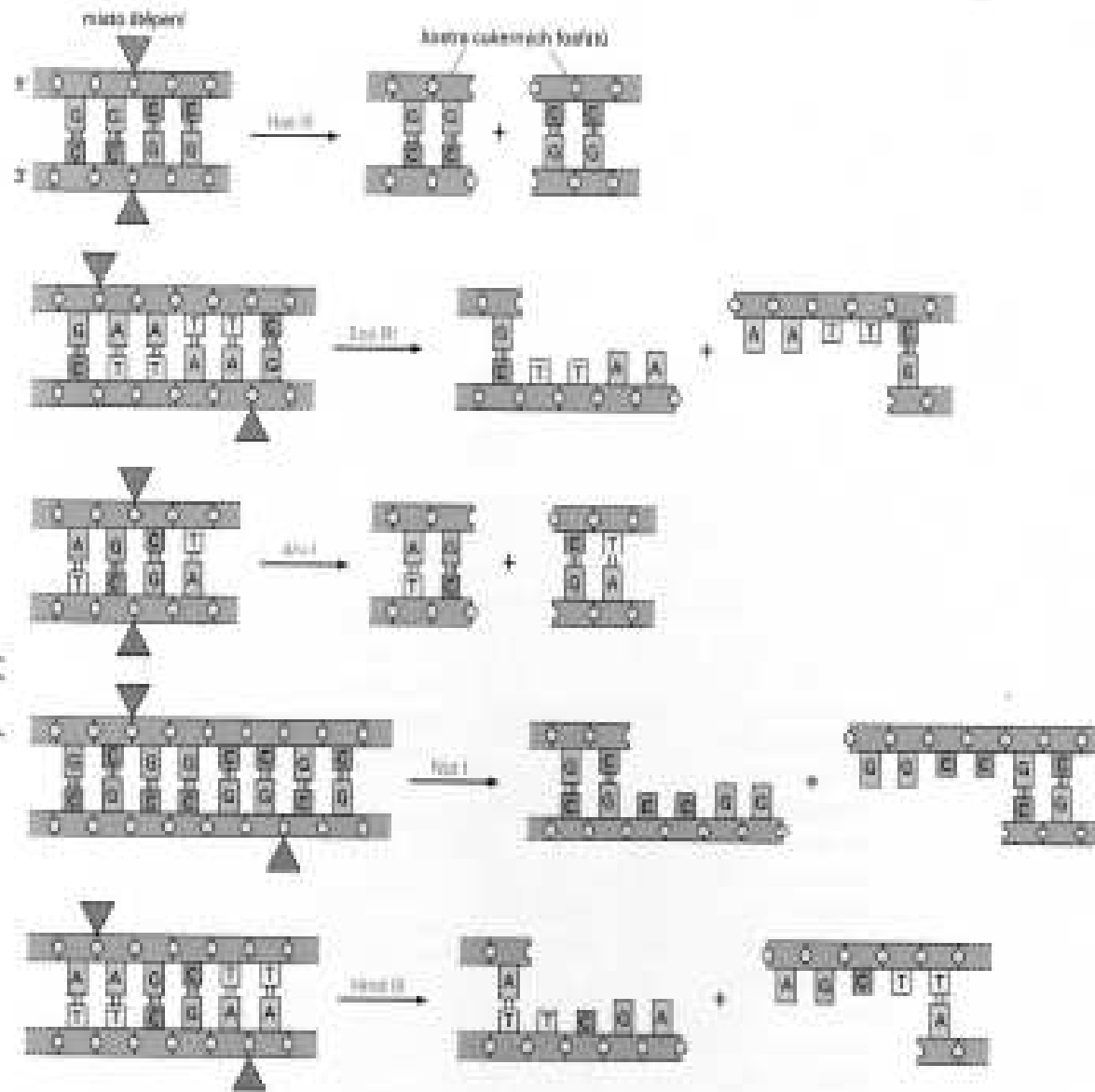
Tatiana Adámusová

Viktória Betinová

**Principem této techniky je specifické rozštěpení frakce DNA v místech zcela určitých sekvencí nukleotidů pomocí restriktáz.**

# Restrikční endonukleázy = restriktázy

- enzymy bakteriálního původu
- štěpí komplementární vlákna DNA v určitých místech ⇒ katalyzují hydrolýzu fosfodiesterové vazby v nukleové kyselině
- rozpoznávají krátká místa na DNA (4-8 nukleotid.párů)
- umožňují získat vždy stejnou sadu fragmentů
- Nejpoužívanější jsou RE 2.typu-nejzn. je EcoRI (Escherichia coli restriktasa)



**Obrázek 19-7 Rozpoznávání a řezání nukleotidové sekvence při častě používaných restrikčních endonukleáz.** Jak je zde ukázáno, číselná místa, která jsou číselně enzymy řezána, se liší nukleotidovou sekvencí (její délka podle druhu enzymu). Číselné sekvence jsou často palindromické (symetrické podle vzájemného bodu). V nakreslených příkladech jsou oba řezací místa ve specifických místech usněř rozpoznávané sekvence. Některé enzymy, jako jsou NotII a AclI, usněř oba řezací DNA proti sobě, takže obě výsledné molekuly mají zarovnané sobě sobě konce; řezání ostatními restrikčními endonukleázami, jako například EcoIII, NotI a AclIII, vznikají na jednom z konců přesahující jednotvárné úseky. Restrikční endonukleázy jsou obvykle získávány z bakterií a v jejich názvech se odráží jejich původ; například enzym NotII pochází z *Neisseria meningitidis*.

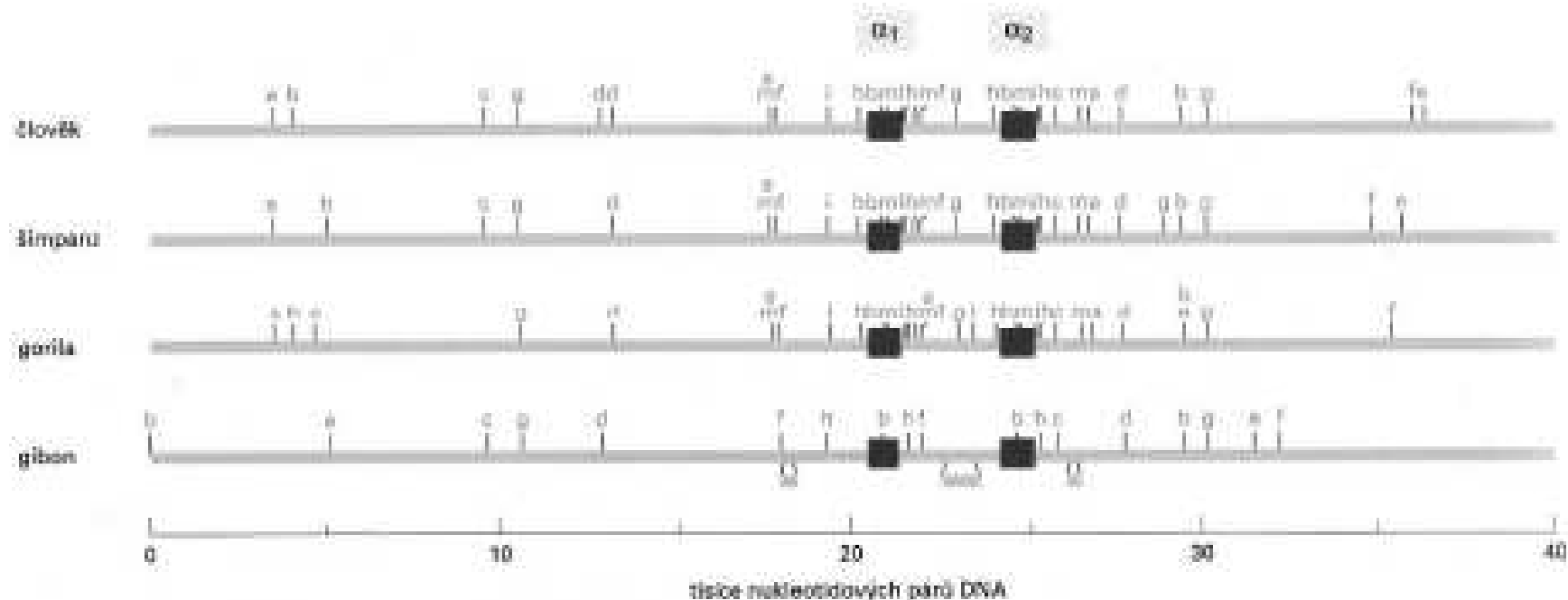
# Fyzická a restriční mapa

## Fyzická mapa

- Charakterizuje daný úsek DNA pozicemi různých značek ⇨ místa štěpená pomocí RE
- Vzniká: - rozštěpením DNA pomocí RE  
- porovnáním velikosti fragmentů

## Restriční mapa

- Fyzická mapa štěpených míst
- Vzniká: - porovnáním velikostí fragmentů vzniklých po štěpení několika kombinacemi RE
- Schematické znázornění poloh a vzdáleností restričních míst na molekule
- S jejich pomocí můžeme od sebe odlišit blízce příbuzné DNA



**Obrázek 10-4** Porovnání restrikčních map oblasti DNA obsahující  $\alpha$ -globinový gen u člověka a dalších primátů. Sítel zelené barvy představují úseky chromosomální DNA se dvěma  $\alpha$ -globinovými geny (červená čára) tak, jak se vyskytují v genomu primátů ( $\alpha$ -globin je podjednotkou hemoglobinu, který je tvořen dvěma  $\alpha$ - a dvěma  $\beta$ -globinovými polypeptidovými řetězci). Místi párování označují místa křížení různými restrikčními endonukleázami. Šimpánci, primát nejvíce příbuzný člověku, má také člověku nejbližší restrikční mapu, zatímco restrikční mapa gibona, našeho nejvzdálenějšího příbuzného z uvedených primátů, je lidské podobně nejmenší. Místi zelené barvy pod hlavní čarou u gibona zobrazují pozice, kde se vyskytuje DNA, kterou u ostatních primátů nenajdeme.

# Výchozí materiál restrikčního mapování

- Neporušená izolovaná genomová DNA
- Fragmenty DNA klonované ve vektorech či získané pomocí metody PCR

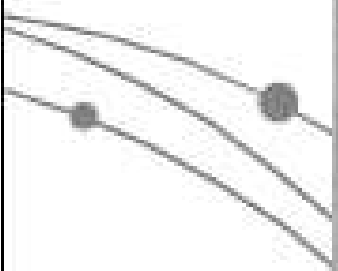
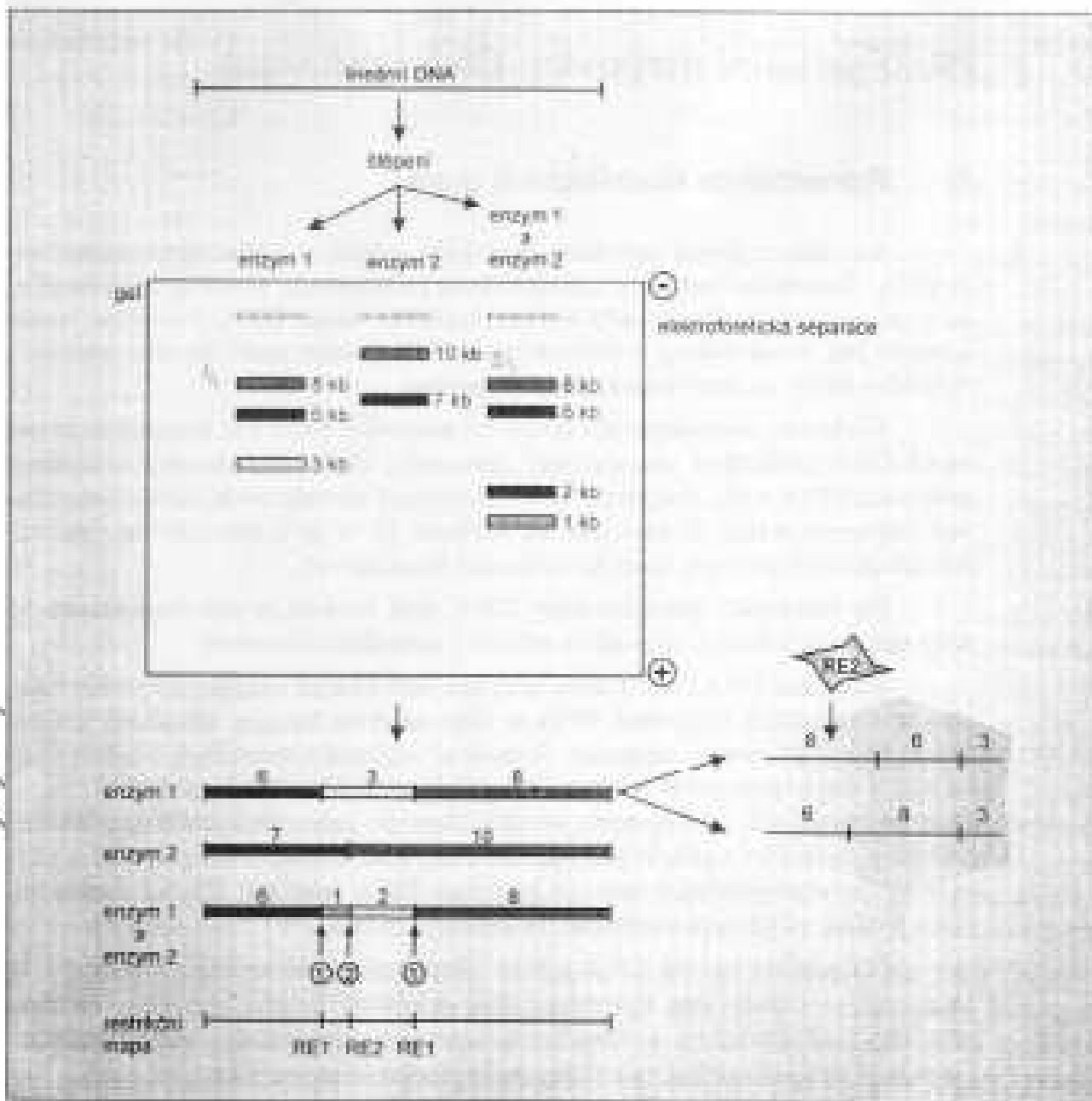
# Metody pro konstrukci restrikční mapy

## 1. Štěpení DNA dvěma nebo několika RE a vyhledávání překrývajících se restrikčních fragmentů

- DNA štěpíme nejprve každým enzymem samostatně, poté dvěma enzymy současně
- Stanovíme velikosti vytvořených fragmentů v každém štěpení
- Srovnáme délky fragmentů a určíme polohy restrikčních míst pro každý enzym

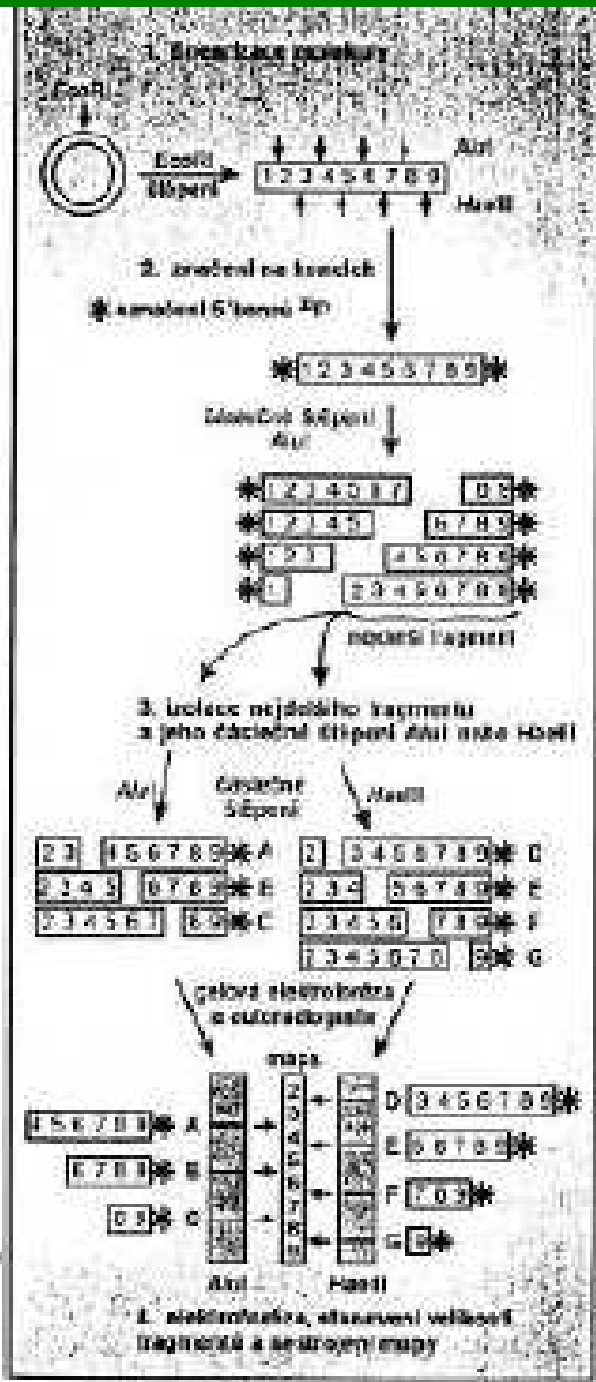
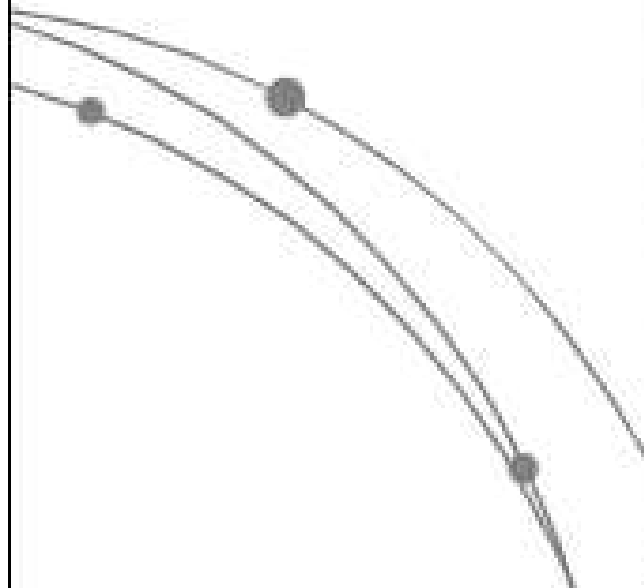


# FYZIKALNI MAPOVANI DNA (GENOMU)



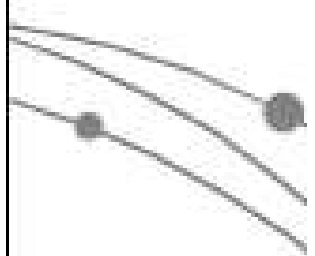
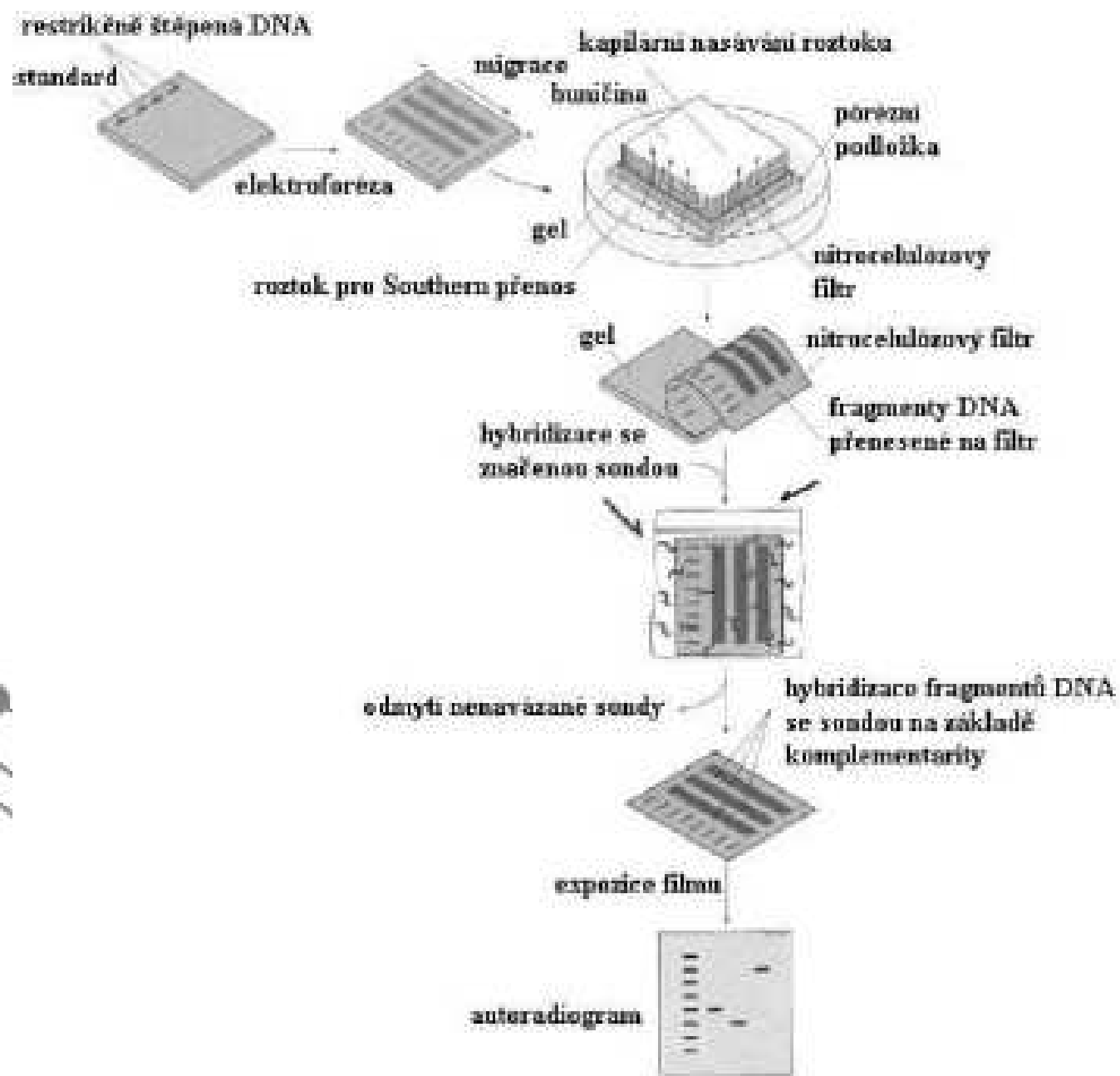
## **2. Částečné štěpení DNA** **jednou RE a separace** **vytvořených fragmentů** **elektroforézou**

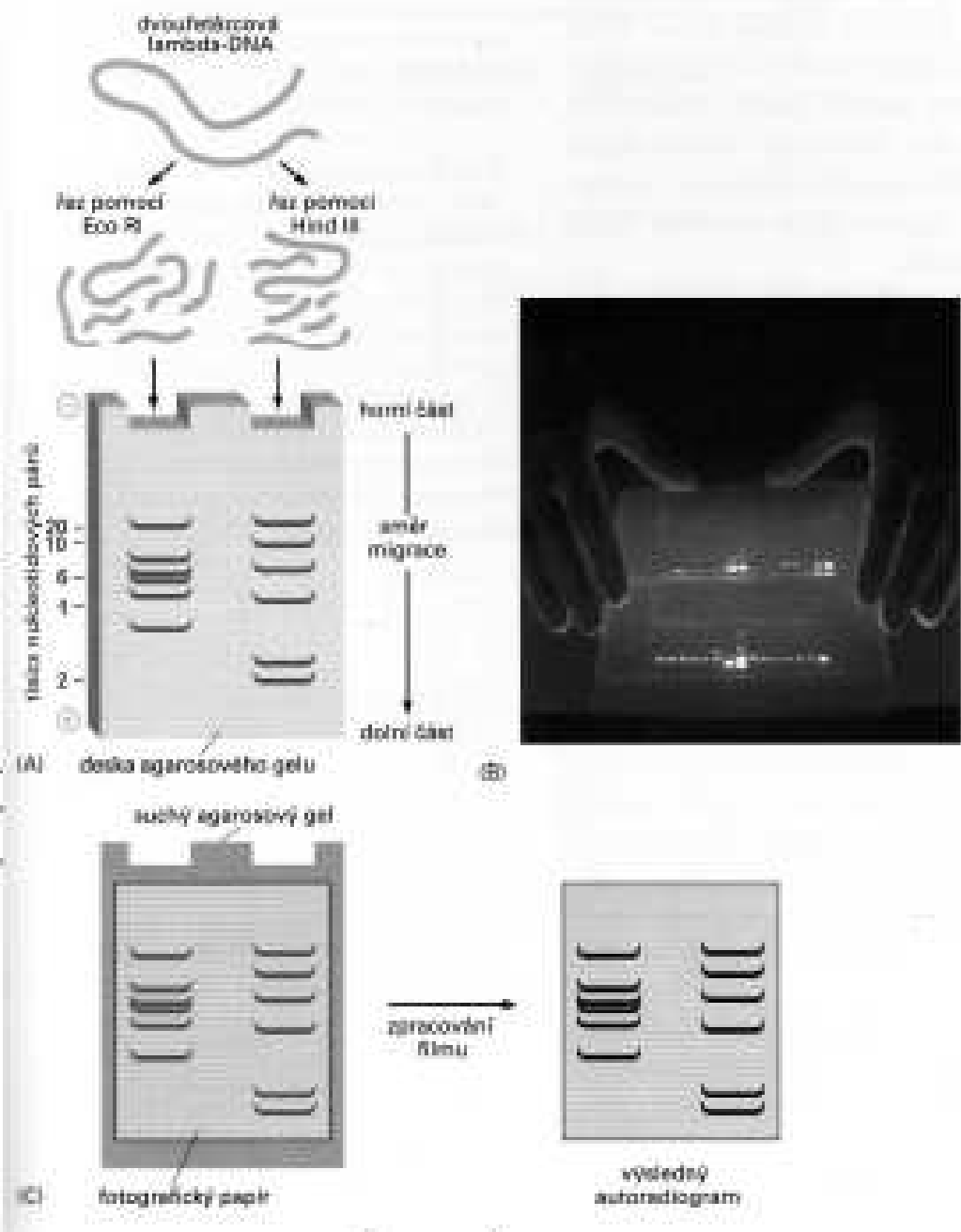
- Fragментy poté izolujeme jednotlivě z gelu
- Odštěpíme je stejnou RE  $\Rightarrow$  vznik subfragmentů
- Subfagментy znovu separujeme elektroforézou
- Soubory vzniklých subfragmentů jsou přiřazeny k prvotním fragmentům



### **3. Částečné štěpení radioaktivně značené na jednom z konců**

- Elektroforézou separujeme vytvořené fragmenty
- Odečteme délky fragmentů z autoradiogramu
- Je vhodné u větších molekul



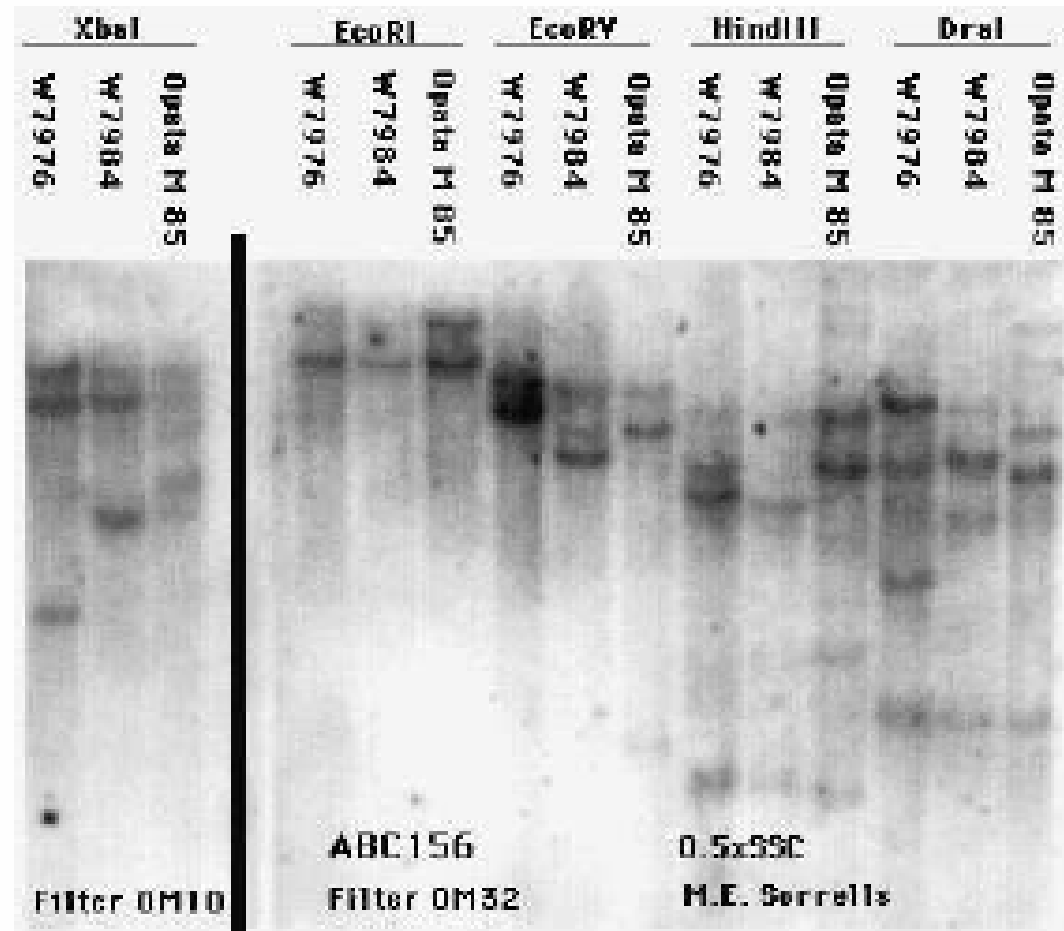
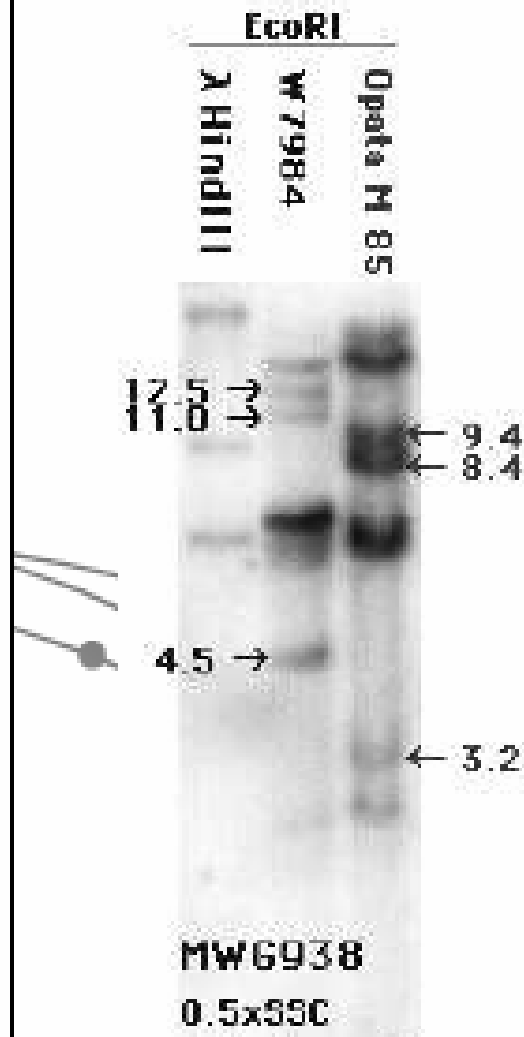


**Úloha 10 - Detekce a separace molekul DNA podle velikosti pomocí gelové elektroforézy.** (A) Schéma ukazuje porovnání výsledků štěpení stejné molekuly (v tomto případě genomu bakteriofága lambda, viz obc. 9-15) dvěma různými restriktivními endonukleázami - EcoRI (vlevo) a HindIII (vpravo). Fragmenty jsou rozdělěny gelovou elektroforézou. Směr fragmentů DNA získaná enzymovým štěpením je nanesena do žlábku v horní části tenkého gelu a v elektrickém poli putují jednotlivé fragmenty směrem ke kladné elektrodě. Větší fragmenty se pohybují pomaleji než menší, a proto dojde k rozdělení fragmentů podle jejich velikosti. Například dva nejspodnější proužky v pravém sloupci představují dva nejmenší fragmenty vzniklé štěpením enzymem HindIII. Abychom mohli rozdělené fragmenty DNA spatřit, je gel ponořen do roztoku s barvivem, které se váže na DNA a při osvětlení ultrafialovým světlem jasně fluoreskuje (B). (C) Alternativní metodou vizualizace DNA je autoradiografie. Před štěpením restriktivním enzymem je DNA označena radioaktivním izotopem fosforu  $^{32}\text{P}$  který nahradí některé neradioaktivní azoty. Radioaktivně lze označit virus například jeho replikací v přítomnosti  $^{32}\text{P}$ . Protonové částice emitované z  $^{32}\text{P}$  způsobují změny na fotografickém filmu, lze tento film přiložit na povrch agarosového gelu a po vyvolání je možno vidět počtu všech fragmentů DNA.

# Konstrukce přesné restriční mapy je podmíněna:

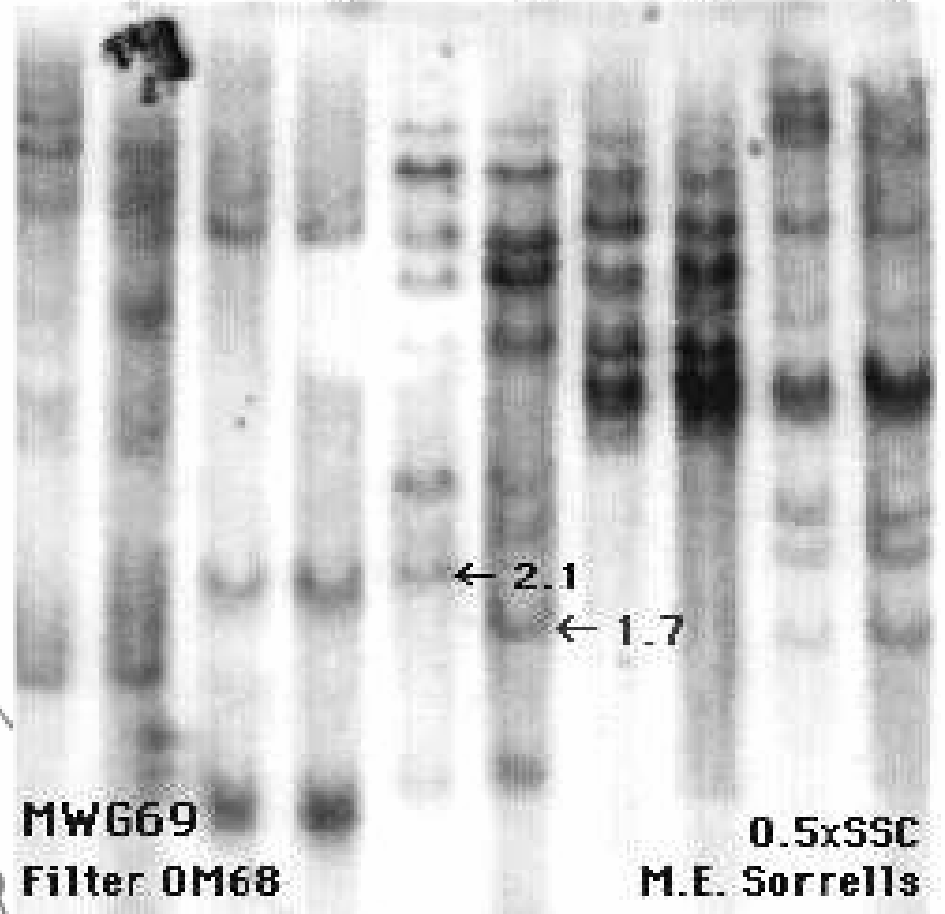
- Identifikací všech vytvořených restričních fragmentů
- Přímým stanovením velikosti fragmentů (určena elektroforézou)

# Příklady autoradiogramů a restrikčních map





<u>EcoRI</u>	<u>EcoRV</u>	<u>HindIII</u>	<u>DraI</u>	<u>XbaI</u>
W7984	Opata M 85	W7984	Opata M 85	W7984
Opata M 85	W7984	Opata M 85	W7984	Opata M 85



# K čemu jsou dobré restrikční mapy?

- Srovnávání DNA různých jedinců či příbuzných organismů bez nutnosti přesného stanovení jejich kompletní nukleotid. sekvence
- Lze pomocí nich snadno zjistit polymorfizmy v sekvencích genomové DNA způsobené mutacemi ⇒ substituce, inserce a delece nukleotidů
- U klonovaných sekvencí DNA umožní lokalizovat geny na specifické restrikční fragmenty DNA ⇒ usnadní izolaci a charakterizaci snadno sestrojitelné u DNA menších velikostí (viry, organely...)

Necítim  
zadek

CO?



# Děkujeme za pozornost.

How Easter Eggs are made.

