

Restrikční analýza

Petra Linhartová

Restrikční analýza je molekulárně biologická metoda, která je využívána při DNA diagnostice.

Princip: Metoda je založena na principu polymerázové řetězové reakce, kdy je amplifikována cílová sekvence, která je v následné reakci štěpena pomocí bakteriálních endonukleas („restrikta“). Restrikční endonukleasy (RE) jsou enzymy, které se vyvinuly během evoluce u bakterií k štěpení cizí DNA. RE dokáží štěpit DNA, pokud obsahuje určitou přesně definovanou sekvenci nukleotidů. Názvy RE jsou odvozeny od jejich původce - např. EcoRI od *E. coli*, kdy RE rozpoznává specifickou oblast GAATTC (jedná se často o palindromickou sekvenci).



Šipky naznačují místo štěpení DNA. Štěpeny jsou vnitřní fosfodiesterové vazby. Při detekci SNP (Single Nucleotide Polymorphism = jednonukleotidový polymorfismus) je RE enzym volen tak, aby štěpil DNA právě v místě tohoto polymorfismu. RE mají specifickou teplotu, při které štěpení probíhá optimálně. Restrikční fragmenty jsou poté elektroforeticky separovány.

Příklad: Máte vybraný gen, ve kterém se vyskytuje SNP (záměna A a C v pozici 100). Když jste po amplifikaci PCR získal fragment o velikosti 350bp a produkt necháte restrikčně štěpit pomocí EcoRI, tak v případě, že vzorek je:

- homozygot C/C, získáte pouze jeden band na gelu o velikosti 350bp (protože RE nerozpoznal místo štěpení),
- homozygot A/A, získáte dva proužky na gelu o velikosti 100 a 250bp (protože RE rozpoznal místo štěpení),
- heterozygot A/C, získáte 3 proužky na gelu o velikosti 100, 250 a 350bp (protože RE rozpoznal místo štěpení na jedné z alel).