

Restrikční endonukleázy

METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

Enzymy v molekulární biologii

Polymerázy – syntéza nového polynukleotidového řetězce dle matrice

Nukleázy – štěpení polynukleotidového řetězce

Kinázy – fosforylace substrátu – připojení fosfátové skupiny na 5' konec

Fosfatázy – defosforylace substrátu – odštěpení fosfátové skupiny z 5' konce

Ligázy – spojení dvou konců polynukleotidového řetězce

Transferázy – připojení funkční skupiny nebo nukleotidu (bez matrice)

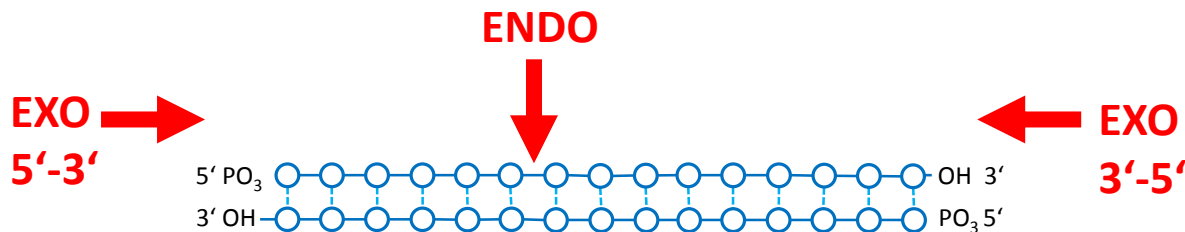
Nukleázy

katabolické enzymy, štěpení polynukleotidového řetězce DNA (RNA) od konců (**exonukleázy**) nebo uvnitř řetězce (**endonukleázy**)

DNA nukleázy (DNázy): Bal31, Exonukleáza fága lambda (λ), Nukleáza ExoIII, DNáza I, Nukleáza S1, **Restrikční endonukleázy**

RNA nukleázy (RNázy): RNáza A, RNáza H, RNáza T1

Nukleázy využívané pro editaci genomu: Cas9 – CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN

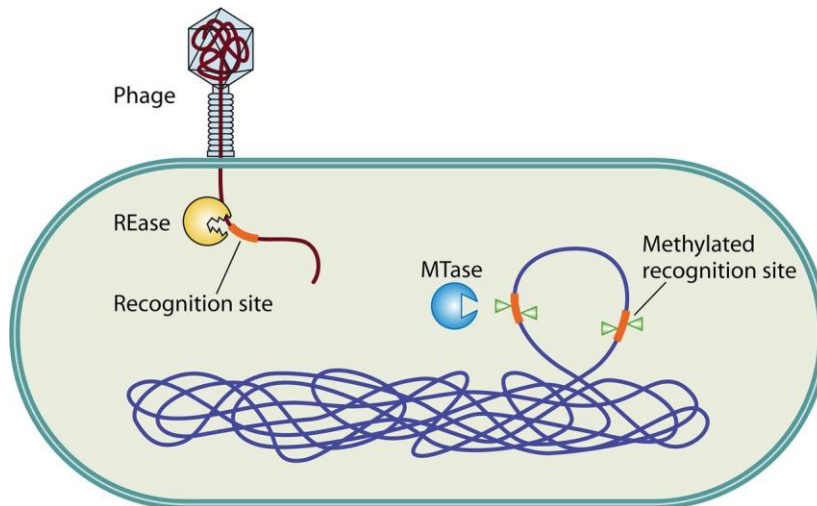


Restrikční endonukleázy

1970: objev první RE – *HindII* (bakterie *Haemophilus influenzae*)

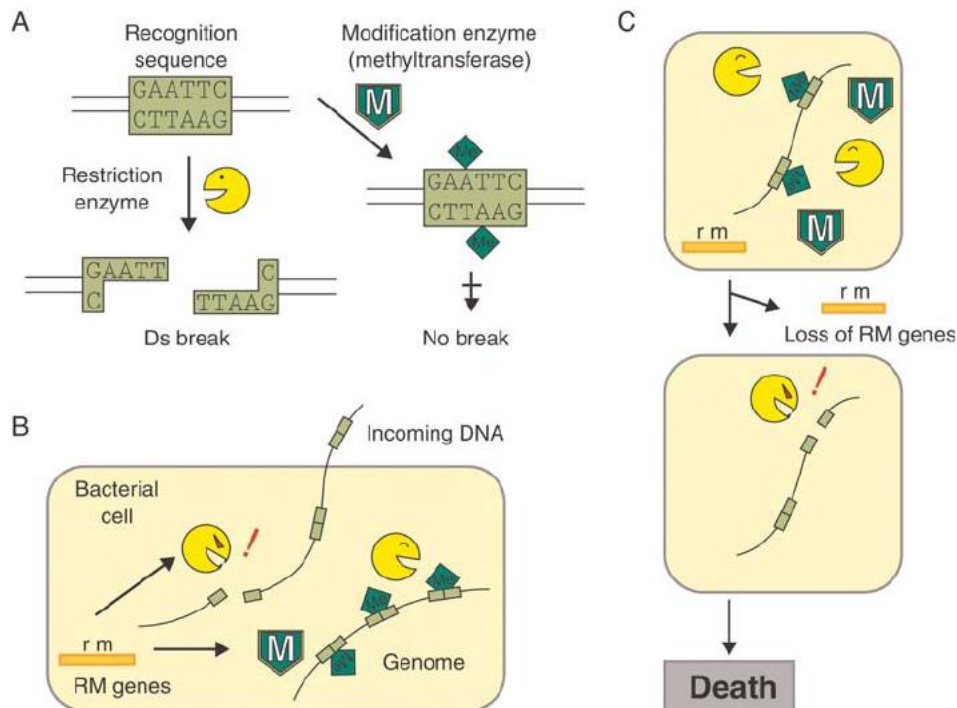
bakteriální enzymy, spolu s metylázami součásti **restrikčně-modifikačních systémů**: ochrana bakteriálních buněk před cizorodými molekulami DNA

omezují propagaci bakteriofágů

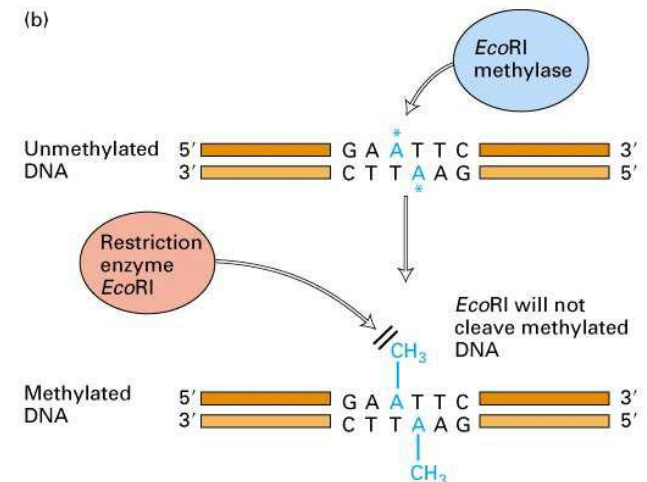


Vasu and Nagaraja [Microbiol Mol Biol Rev.](#) 2013 77(1):53-72.
doi: 10.1128/MMBR.00044-12.

Restrikčně-modifikační systém



Action of a Type II restriction–modification system. (A) Restriction enzyme and modification enzyme. The modification enzyme protects the restriction enzyme targets through DNA methylation. (B) Attack on incoming DNA lacking proper methylation. (C) Enforcement of an epigenetic state. After loss of the restriction–modification gene complex or imbalance between restriction and modification, DNA methylation decreases. The restriction enzyme will attack exposed sites, killing the cell. Chromosome breakage may be repaired or may generate a variety of mutated and rearranged genomes, some of which might survive. Ds, double strand; rm, restriction–modification gene complex; RM, restriction modification.

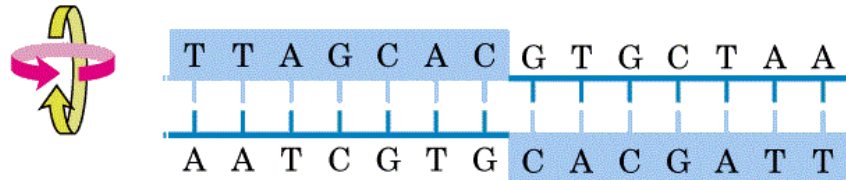


Restrikční endonukleázy

sekvenčně specifické nukleázy produkované bakteriemi

štěpí obě vlákna dvouřetězcové DNA

většinou rozeznávají palindromy



využití:

příprava rekombinantních molekul DNA

studium struktury, organizace, exprese a evoluce genomu

základ genového inženýrství

Klasifikace RE

založena na struktuře enzymu, kofaktorech a charakteru štěpené sekvence

Typ I: vyžadují kofaktory ATP, Mg^{2+} a S-adenosyl-L-methionin, mají restriční i metylázovou aktivitu

Typ II: vyžadují Mg^{2+} , pouze restriční aktivita, rozpoznávají většinou palindrom dlouhý 4-8 bp – **využití v genovém inženýrství**

Typ III: vyžadují ATP, tvoří komplex s metyltransferázou

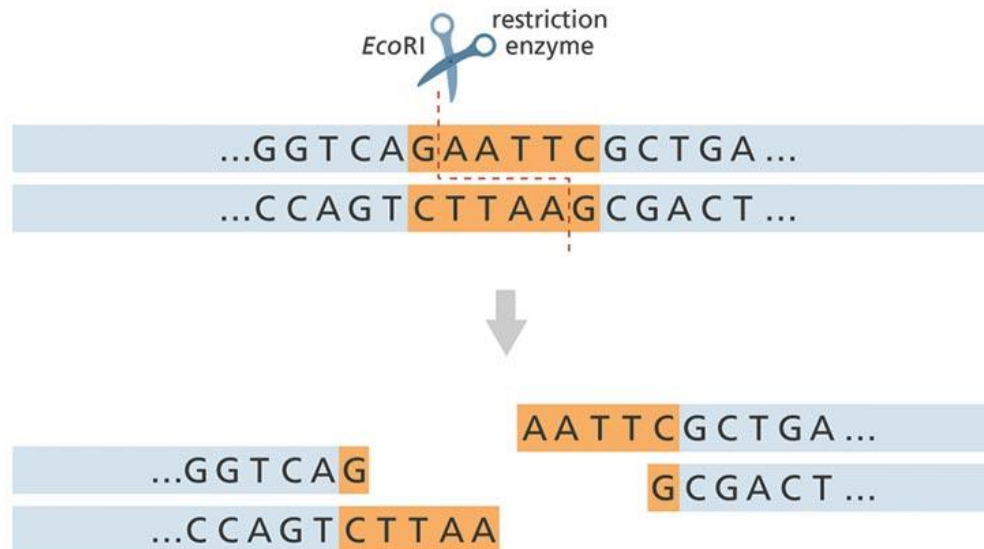
Typ IV: rozpoznávají metylovanou DNA

Typ V: např. cas9-gRNA komplex, využití tzv. guide RNA

Restrikční endonukleázy typu II

vážou se na specifická cílová místa (4-8 bp), která mají často povahu palindromu

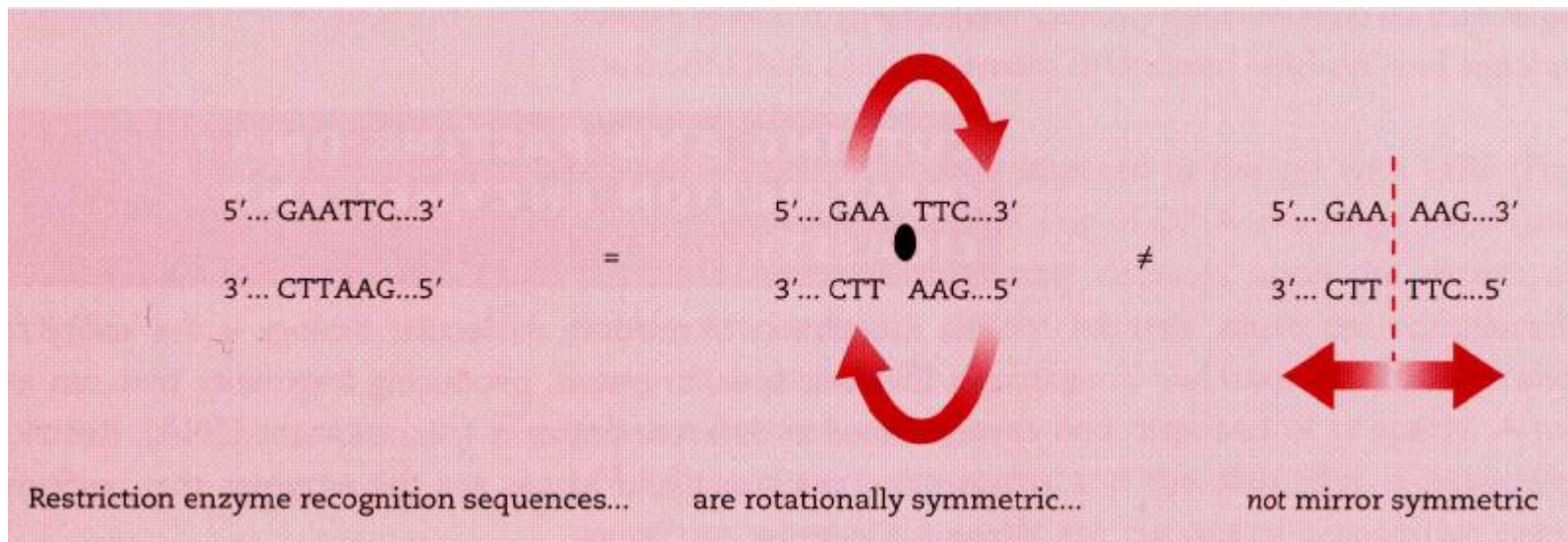
štěpí dvouřetězcové molekuly DNA hydrolýzou fosfodiesterových vazeb obou řetězců v **restrikčním místě**, které je uvnitř cílového místa nebo v jeho bezprostředním sousedství



<https://microbenotes.com/restriction-enzyme-restriction-endonuclease/>

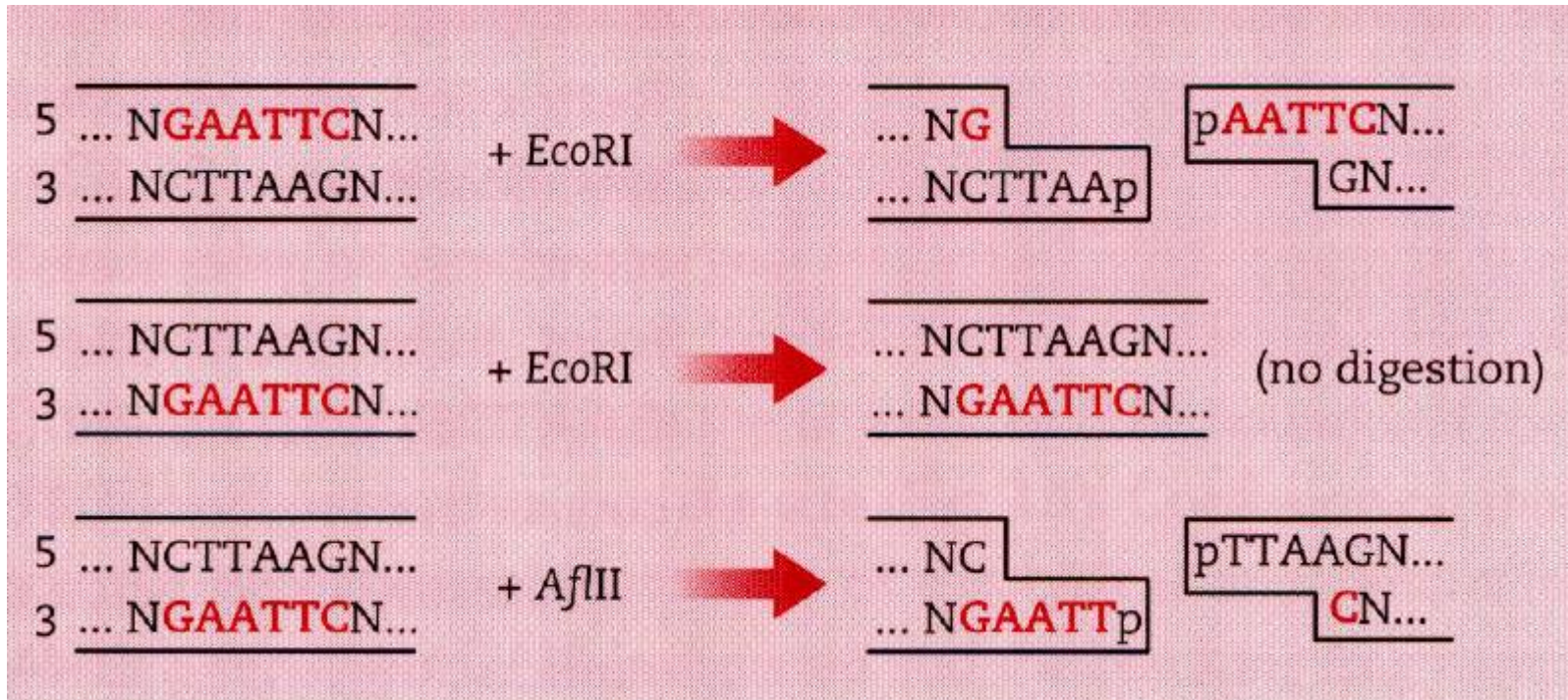
Cílová místa RE typu II

rotační symetrie - palindromy



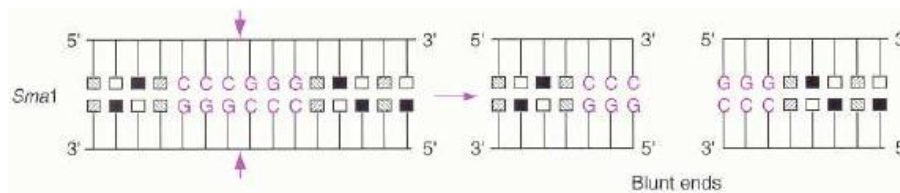
Orientace cílových míst

záleží na směru řetězce DNA (5'-3' nebo 3'-5')



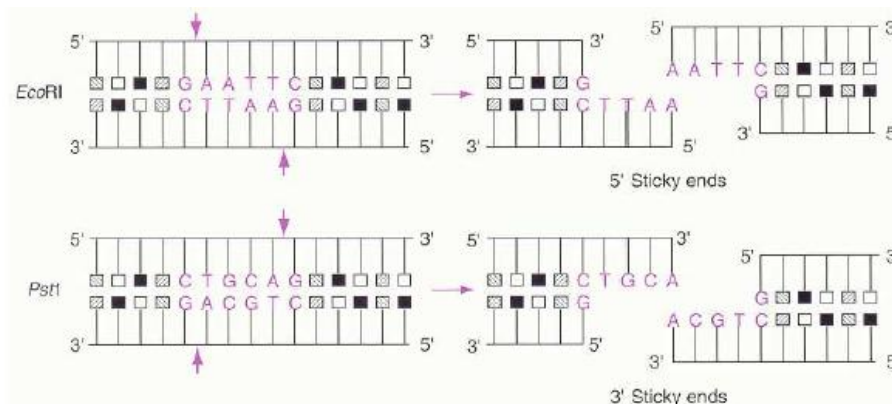
Produkty štěpení RE

tupé („blunt“) konce (po štěpení obou řetězců ve stejném místě)



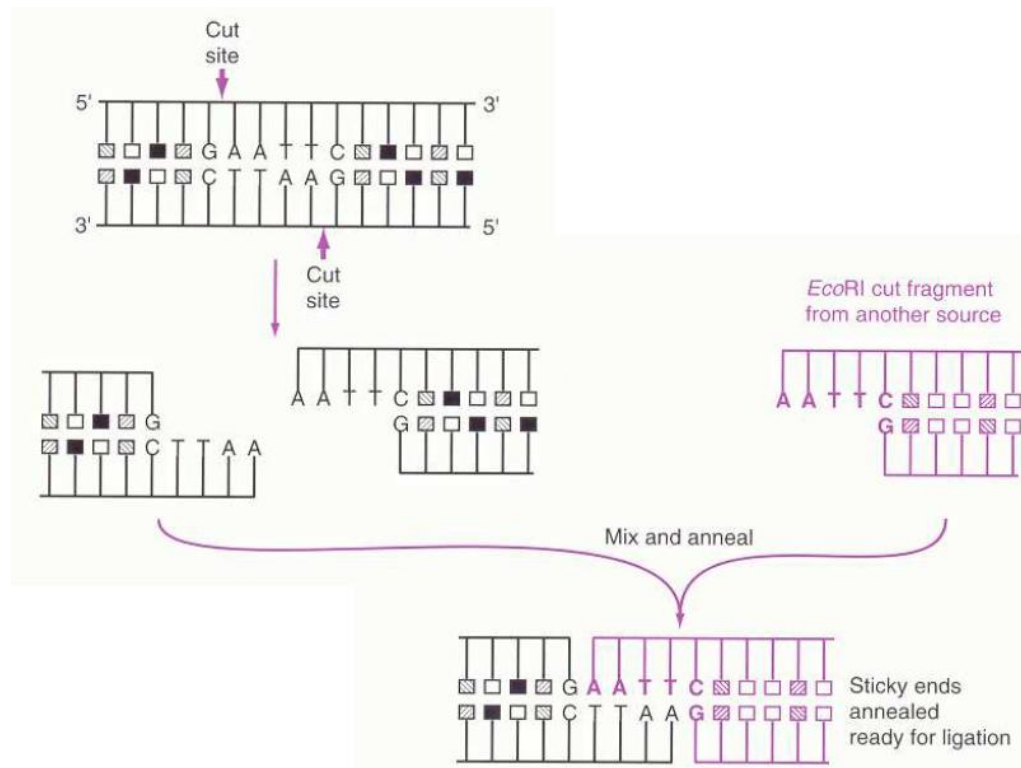
kohezní (lepivé, „sticky“) konce (po štěpení řetězců v místech obvykle vzdálených 1-4 nukleotidy)

5'-kohezní nebo 3'-kohezní („overhang“)



Spojování fragmentů DNA

spojování různých fragmentů s komplementárními kohezními konci – tvorba rekombinantní DNA



Názvosloví RE

např. **EcoRI**

- 1. písmeno:** počáteční písmeno **rodu** produkční bakterie (*Escherichia*)
- 2. a 3. písmeno:** první dvě písmena **druhu** produkční bakterie (*coli*)
- 4. písmeno:** (ne vždy) označení **kmene** produkční bakterie (RY13)
- 5. římská číslice** vyjadřuje **pořadové číslo** endonukleázy izolované z dané bakterie

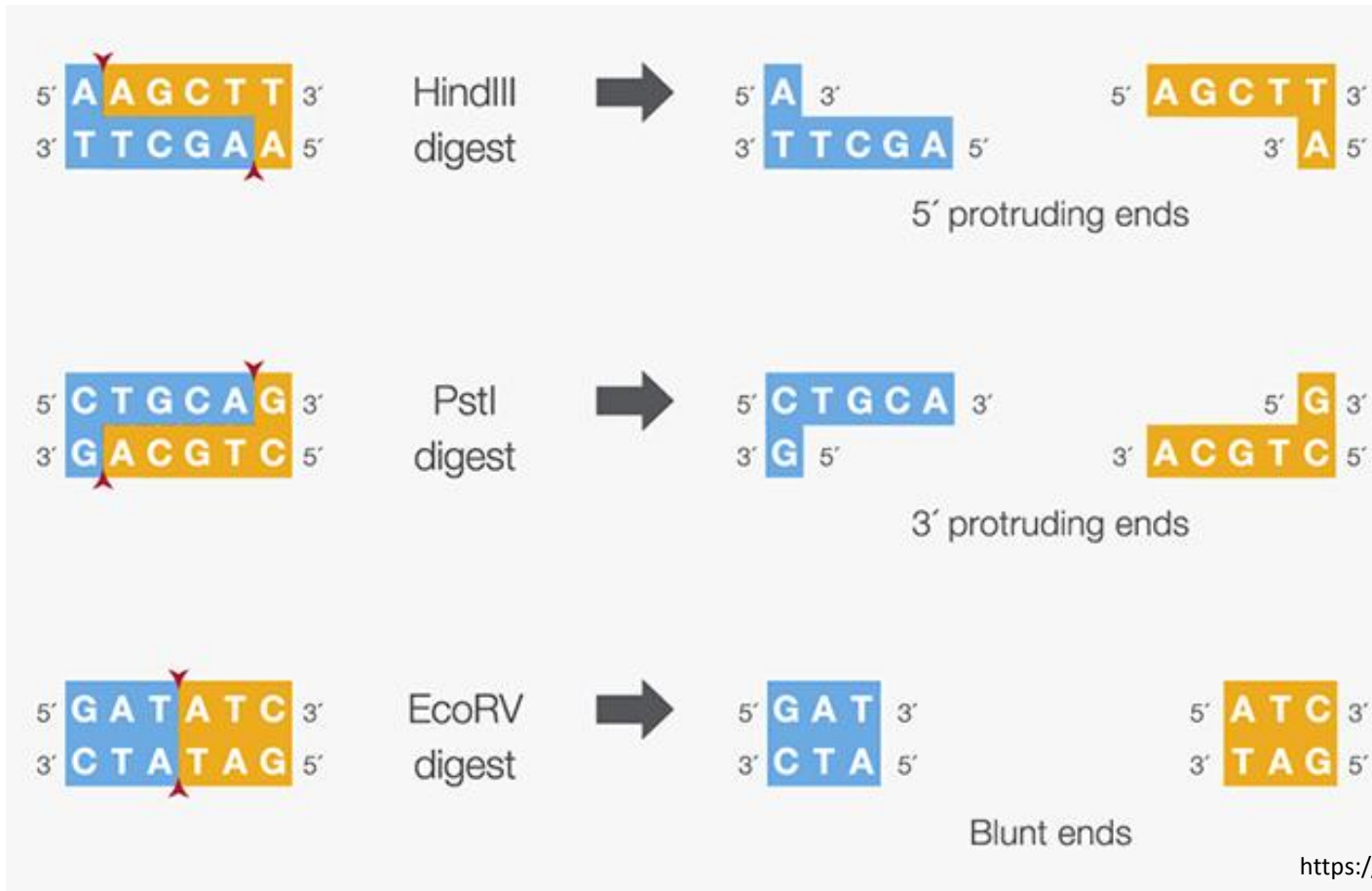
Je známo více než 3500 restrikčních endonukleáz typu II

Cílová místa některých RE

Examples of restriction endonucleases				
Enzyme	Recognition site	Number of bases	Ends generated	Original source of enzyme
<i>EcoRI</i>	G/AATTC	6	5' sticky	<i>Escherichia coli</i> RY13
<i>BamHI</i>	G/GATCC	6	5' sticky	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
<i>BglII</i>	A/GATCT	6	5' sticky	<i>Bacillus globigii</i>
<i>PstI</i>	CTGCA/G	6	3' sticky	<i>Providencia stuartii</i>
<i>XmaI</i>	C/CCGGG	6	5' sticky	<i>Xanthomonas malvacearum</i>
<i>SmaI</i>	CCC/GGG	6	blunt	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Sau3A</i>	/GATC	4	5' sticky	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A
<i>AluI</i>	AG/CT	4	blunt	<i>Arthrobacter luteus</i>
<i>NotI</i>	GC/GGCCGC	8	5' sticky	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
<i>PacI</i>	TTAAT/TAA	8	3' sticky	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>

Only one strand of the recognition site is shown, with a slash (/) showing the position of the cleavage site. All the examples shown are palindromic, so the sequence of the second strand, read as the reverse complement, and the position of the cleavage site, will be the same as that shown. Thus the reverse complement of 5'-GAATTC-3' is also 5'-GAATTC-3, and both strands are cut by *EcoRI* between G and A.

Cílová místa některých RE



<https://microbenotes.com/restriction-enzyme-restriction-endonuclease/>

Restrikční místa v genomech

DNA source	Genome size (kb)	Number of restriction sites		
		4bp	6bp	8bp
1 pUC19	3	10	0-1	0-1
2 SV40	5	20	1	0-1
3 Bacteriophage λ	48	190	12	0-1
4 Bacteriophage T4	165	660	40	2-3
5 Bacteria	4700	18400	1100	70
6 Yeast*	16000	62500	3900	250
7 Fruit fly*	120000	470000	30000	1800
8 Mammals*	3000000	11700000	730000	46000

* Haploid values (most somatic cells have twice as much DNA)

Izoschizomery a neoschizomery

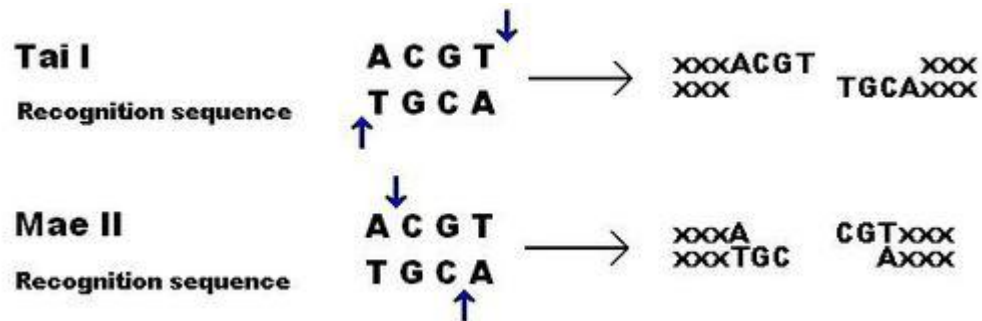
Izoschizomery - RE se stejným cílovým místem a stejným typem štěpení

např. *SphI* (CGTAC/G) and *BbuI* (CGTAC/G) – jiný druh bakterií

mohou se lišit ve schopnosti štěpit nemetylovanou a metylovanou DNA

Neoschizomery - RE se stejným cílovým místem, ale odlišným místem rozštěpení DNA

např. *SmaI* (CCC/GGG) and *XmaI* (C/CCGGG)



Izokaudamery

různé RE, které mají odlišné cílové sekvence, ale vytvářejí stejné lepivé konce

spojování různých molekul DNA – vytvoření asymetrické sekvence, která už není restrikčními enzymy štěpená

NotI

GC*GGCC GC
CG CCGG*CG

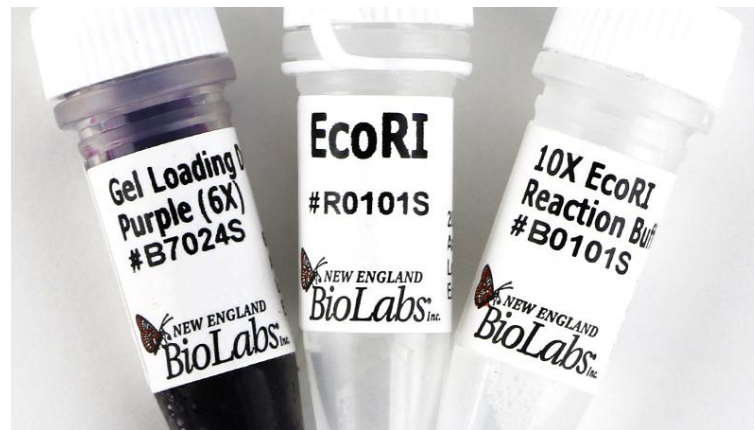
Bsp120I

G*GGCC C
C CCGG*G

GCGGCC
CGCCGG

Jednotka aktivity RE

Množství RE, které zcela rozštěpí 1 μg DNA za 1 hodinu v 50 μl reakci při optimální teplotě a v optimálním prostředí (New England Biolabs)

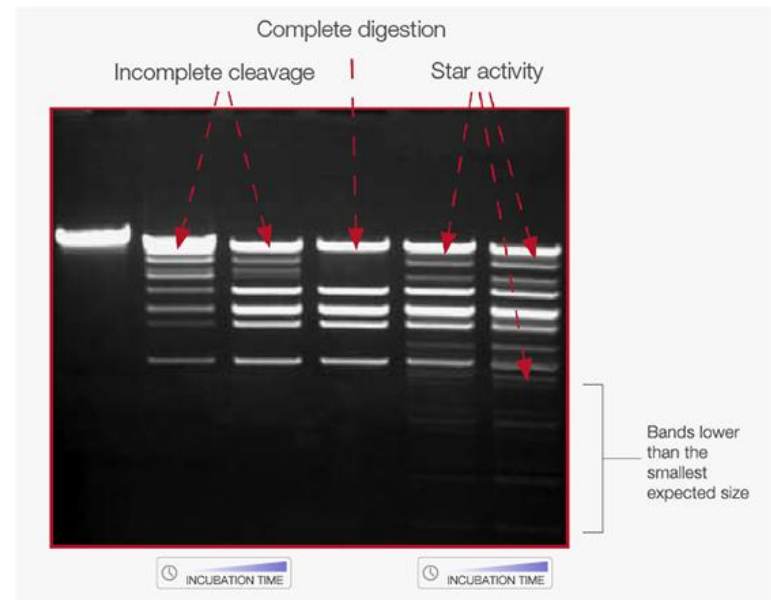


Hvězdičková (star) aktivita

schopnost RE štěpit kromě cílového místa také jiné - příbuzné sekvence

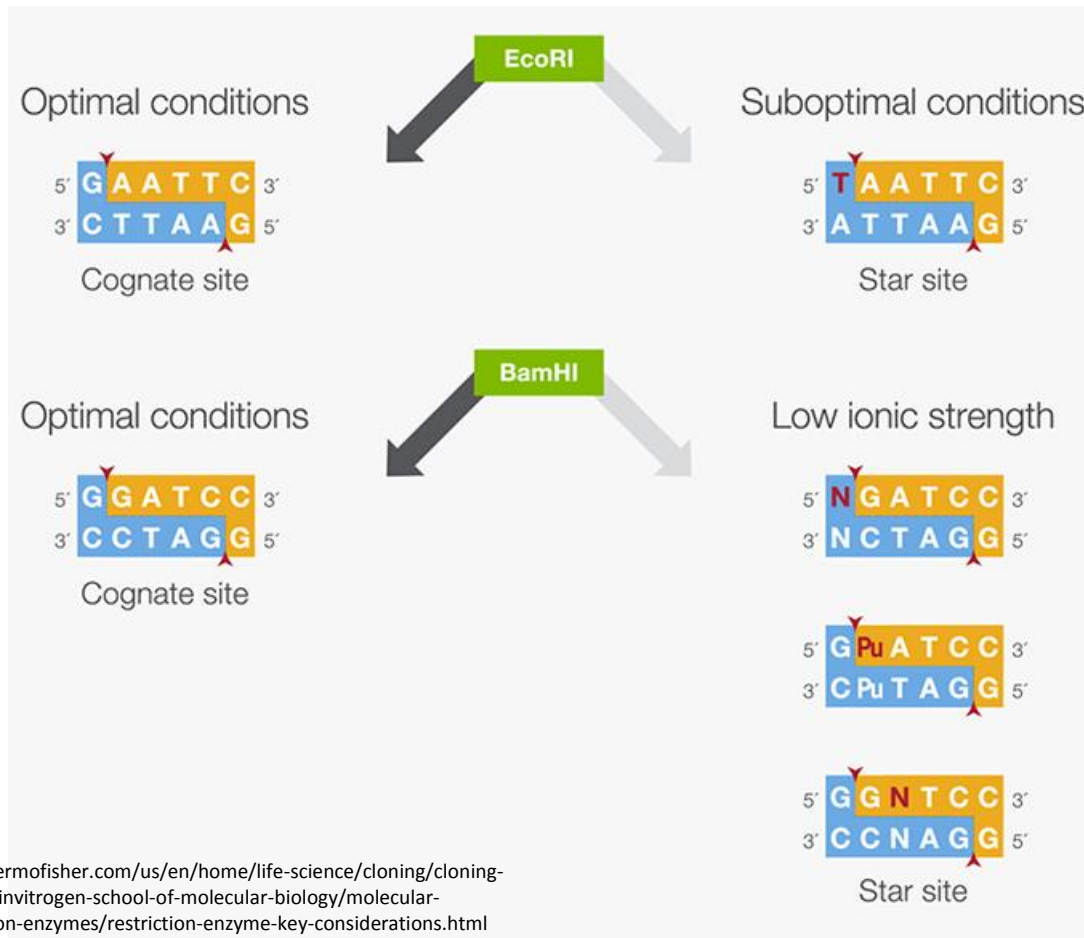
za optimálních podmínek je specificita RE velmi vysoká – např. u *EcoRI* mezi GAATTC a TAATTC je rozdíl 10^5

za neoptimálních reakčních podmínek (pH, iontová síla, koncentrace glycerolu) jsou RE méně specifické



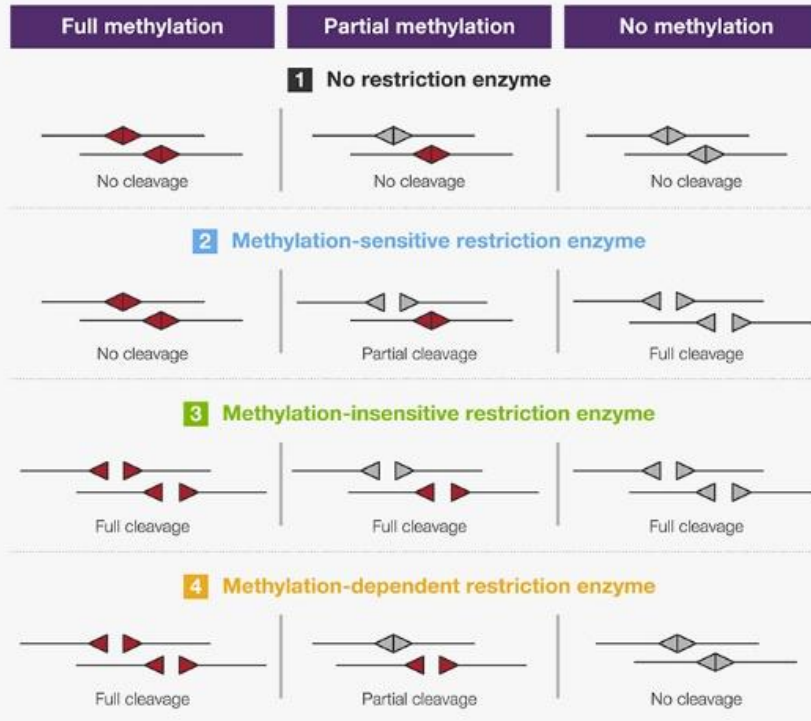
<https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/restriction-enzymes/restriction-enzyme-key-considerations.html>

Hvězdičková aktivita RE



<https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/restriction-enzymes/restriction-enzyme-key-considerations.html>

A Restriction digestion

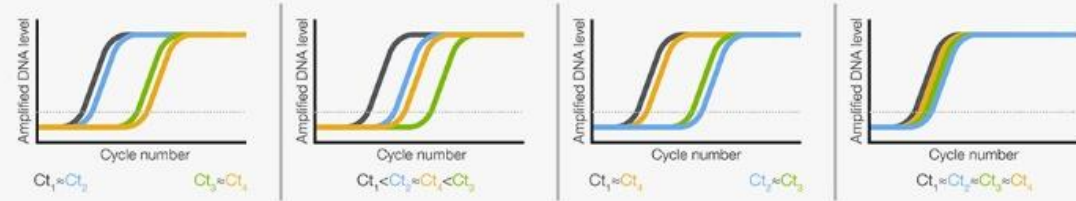


B Gel electrophoresis analysis



Digestion failure

C Real-time PCR analysis



<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/restriction-enzymes/restriction-enzymes-genome-mapping.html>