

Manipulace s nukleovými kyselinami

podmiňují

1. **enzymy** - zásahy do struktury DNA a RNA
2. **vektory** - klonování fragmentů DNA a RNA
3. **hybridizace** - identifikace specifických sekvencí

Výhody enzymů:

- vysoká specifčnost reakcí
- možnost pracovat s malým množstvím substrátu

Klasifikace enzymů, jejichž substrátem jsou nukleové kyseliny

Podle typu substrátu:

- DNA enzymy
- RNA enzymy

Podle typu reakce:

- enzymy anabolické = *polymerázy*
- enzymy katabolické = *nukleázy*
- enzymy spojující řetězce nuk. kyselin = *ligázy*
- enzymy modifikující nukleové kyseliny

Anabolické enzymy

Syntetizovaná molekula	Matrice	Enzymová třída	Příklad	Zdrojový organismus
DNA	DNA	DNA-polymerázy	DNA-polymeráza I	<i>E.coli</i>
	RNA	Zpětné transkriptázy	Zpětná transkriptáza AMV	AMV (virus ptačí myeloblastózy)
	Žádná	Terminální transferázy	Terminální transferáza	Telecí brzlík

Anabolické enzymy

Syntetizovaná molekula	Matrice	Enzymová třída	Příklad	Zdroj
RNA	DNA	RNA-polymerázy	RNA-polymeráza T3, T7, SP6	<i>E.coli</i> inf. fágem T3, T7, SP6
	Žádná	Poly (A) polymerázy	Poly (A) polymeráza	<i>E.coli</i>

Katabolické enzymy

Rozkládaná molekula	Typ degradace	Enzymová třída	Specifita	Příklad	Zdroj
DNA	<u>od konců</u>	<u>exonukleázy</u>	SS	Exonukleáza III	<i>E.coli</i>
			DS	Bal 31	<i>Alteromonas espejiani</i>
	<u>uvnitř molekuly</u>	<u>endonukleázy</u>	SS	S1 nukleáza	<i>Aspergillus oryzae</i>
			DS	EcoRI (RE)	<i>E.coli</i>
				DNáza I	hovězí pankreas

Katabolické enzymy

Rozkládaná molekula	Typ degradace	Enzymová třída	Příklad	Zdroj
RNA	<u>od konců</u>	<u>exonukleázy</u>	fosfodiesteráza	hadí jed
	<u>uvnitř</u> molekuly	<u>endonukleázy</u>	ribonukleáza A	hovězí pankreas

Enzymy modifikující DNA

Typ enzymu	Příklad	Zdroj
Metylázy	<i>Dam</i> -methyláza	<i>E.coli</i>
	<i>Dcm</i> -methyláza	
	<i>EcoRI</i> -methyláza	
Kinázy	T4-polynukleotid kináza	<i>E.coli</i> inf. fágem T4
Fosfatázy	BAP-fosfatáza	bakterie
	CIP-fosfatáza	hovězí střevo

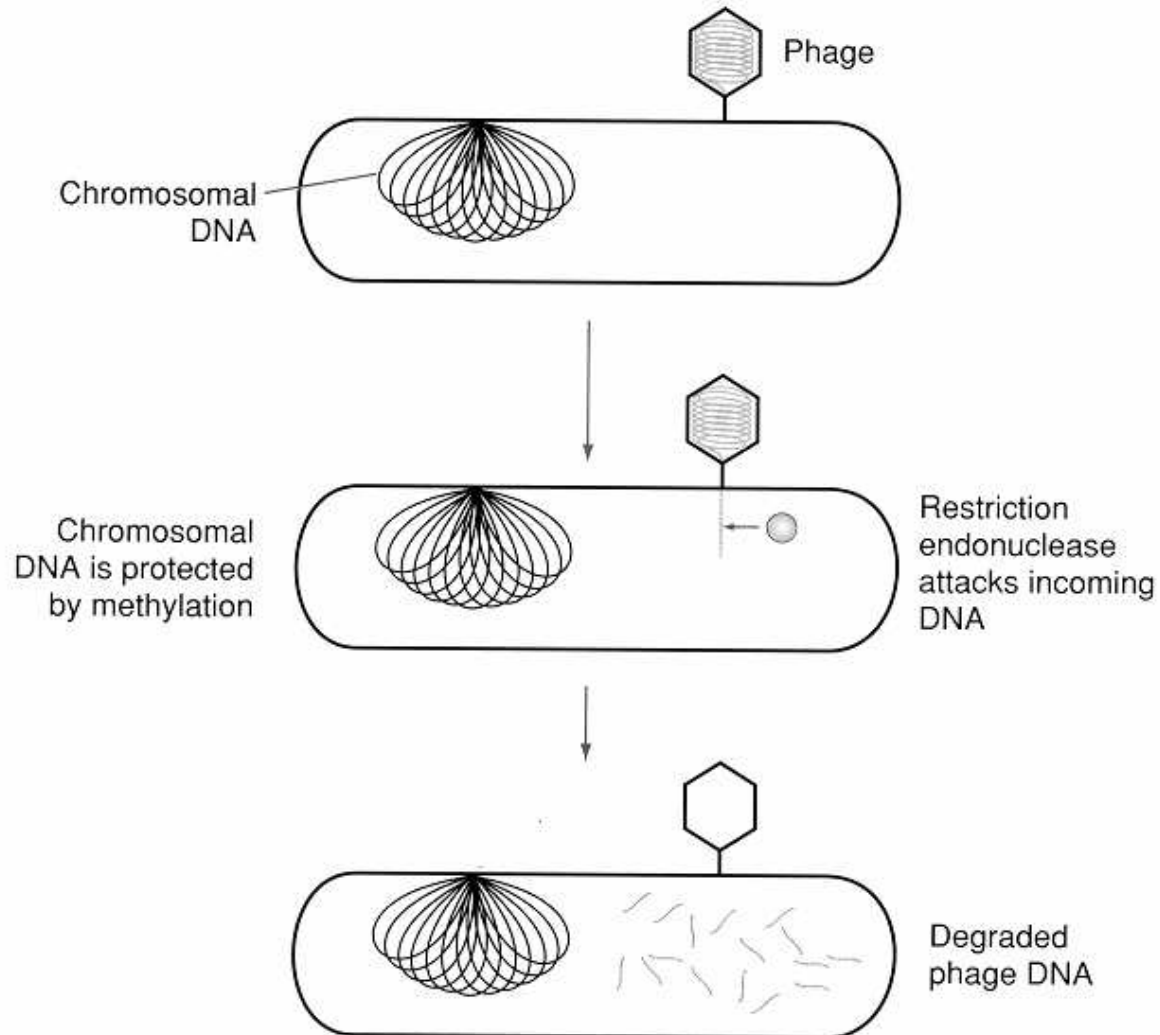
Enzymy spojující molekuly DNA

Typ enzymu	Příklad	Zdroj
DNA ligáza	T4-DNA-ligáza	<i>E.coli</i> inf. fágem T4

Restrikční endonukleázy (RE)

- endonukleázy izolované z bakterií
- spolu s metylázami představují jednoduché varianty imunitního systému: jejich úkolem je ochrana bakteriálních buněk před cizorodými molekulami DNA
- součást **restrikčně modifikačních systémů**
- omezují propagaci bakteriofágů (např. fág namnožený v kmeni *C. coli* nemůže účinně infikovat *E. coli* kmen K, protože fágová DNA je v kmeni K účinně **degradována**)
- DNA hostitelské buňky je před účinkem vlastní endonukleázy chráněna metylací
- objevitelé : H.O. Smith, K.W. Wilcox, and T.J. Kelley, (Johns Hopkins University, 1968)

Restrikce bakteriofága

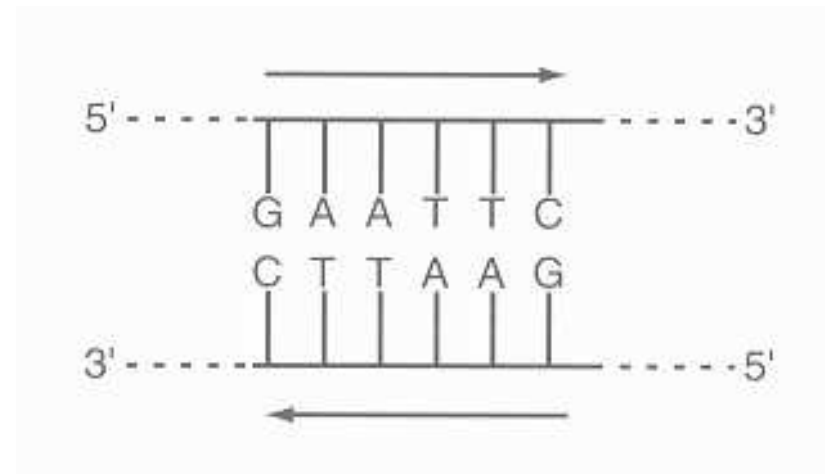


Význam restričních endonukleáz

- nástroj pro přípravu rekombinantních molekul DNA
- prostředek pro studium struktury, organizace, exprese a evoluce genomu
- základ pro genové inženýrství

Vlastnosti restričních endonukleáz

- sekvenčně specifické endonukleázy
- producenty jsou bakterie
- štěpí dvouřetězcové molekuly DNA většina RE rozeznává palindromy („radar“)
- štěpí oba řetězce DNA
- rozdělují se do tříd



Tři třídy RE

- rozdělení založeno na způsobu štěpení DNA, molekulové hmotnosti a požadavcích na kofaktory
- RE třídy I a III nesou v jediném proteinu aktivitu modifikační a restriční
- v genovém inženýrství se téměř výhradně používají RE třídy II, které mají pouze aktivitu restriční

Restrikční endonukleázy třídy I (*EcoK*, *EcoB*)

- vážou se na specifické nukleotidové sekvence
- štěpí **náhodně** v místech vzdálených až několik 1000 pb od místa vazby
- molekulová hmotnost dosahuje cca 300.000
- zajišťují modifikaci (metylaci) i restrikci DNA
- vyžadují kofaktory ATP, Mg^{2+} a S-adenosylmetionin
- nevhodné pro analýzu sekvencí DNA nebo genové inženýrství

Restrikční endonukleázy třídy II

- vážou se na specifické (4-8 pb) dlouhé rozpoznávací (cílové) místo (často palindrom)
- katalyzují štěpení dvouřetězcových molekul DNA hydrolyzou fosfodiesterových vazeb obou řetězců v **restrikčním místě**, které je uvnitř vazebního místa nebo v jeho bezprostředním sousedství
- produktem jsou definované **restrikční fragmenty DNA**
- štěpení se podrobují všechna cílová místa v dané molekule DNA
- molekulová hmotnost: 20.000 - 100.000
- kofaktor: pouze ATP
- v současné době známo více než 3500 restrikčních endonukleáz II

Restrikční endonukleázy třídy III

- vážou se na specifická místa DNA, ale štěpení není sekvenčně specifické
- kofaktorem je ATP

Charakter cílových míst RE třídy II

5'... GAATTC...3'
3'... CTTAAG...5'

=

5'... GAA TTC...3'
3'... CTT AAG...5'

≠

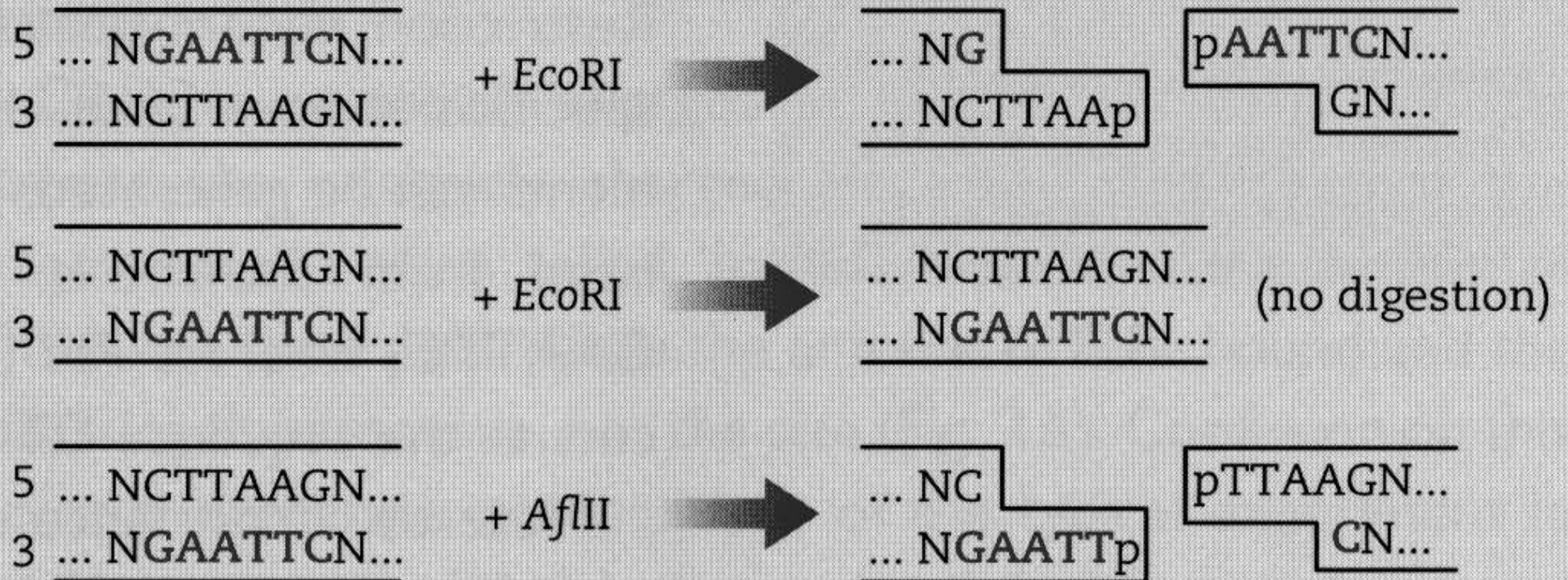
5'... GAA | AAG...3'
3'... CTT | TTC...5'

Restriction enzyme recognition sequences...

are rotationally symmetric...

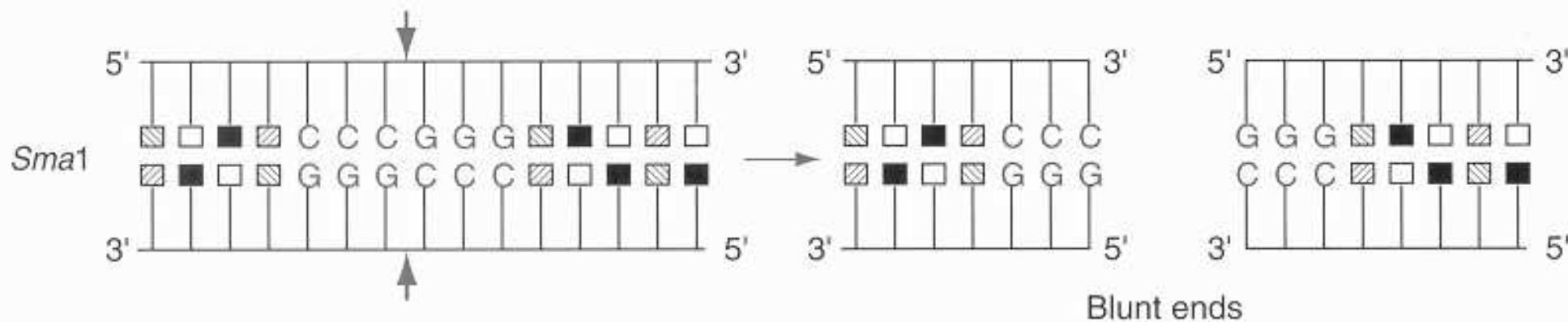
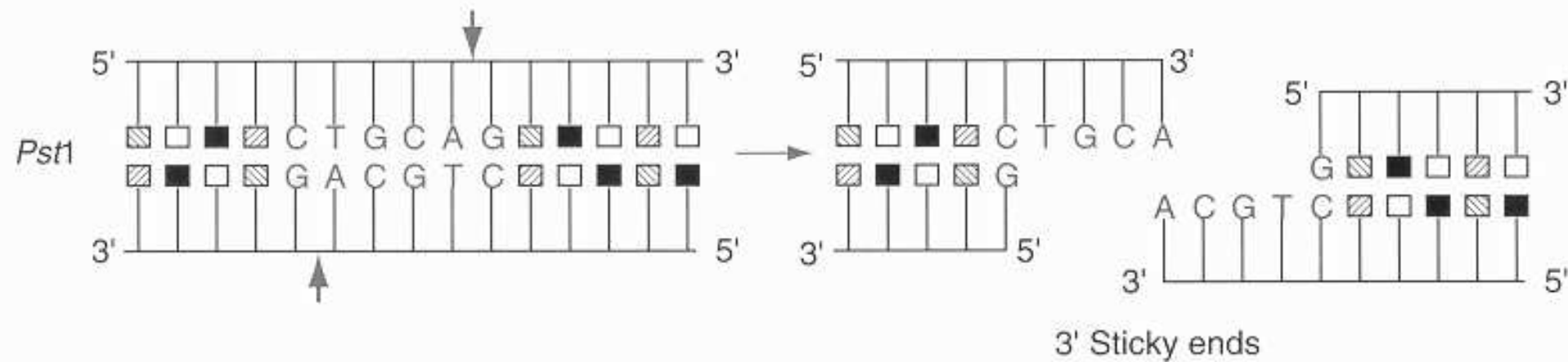
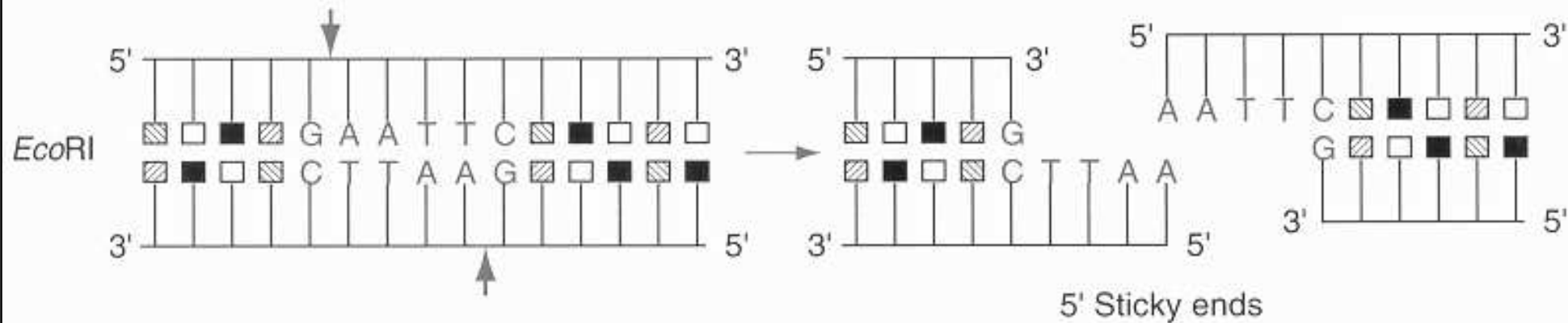
not mirror symmetric

Orientace cílových míst je důležitá

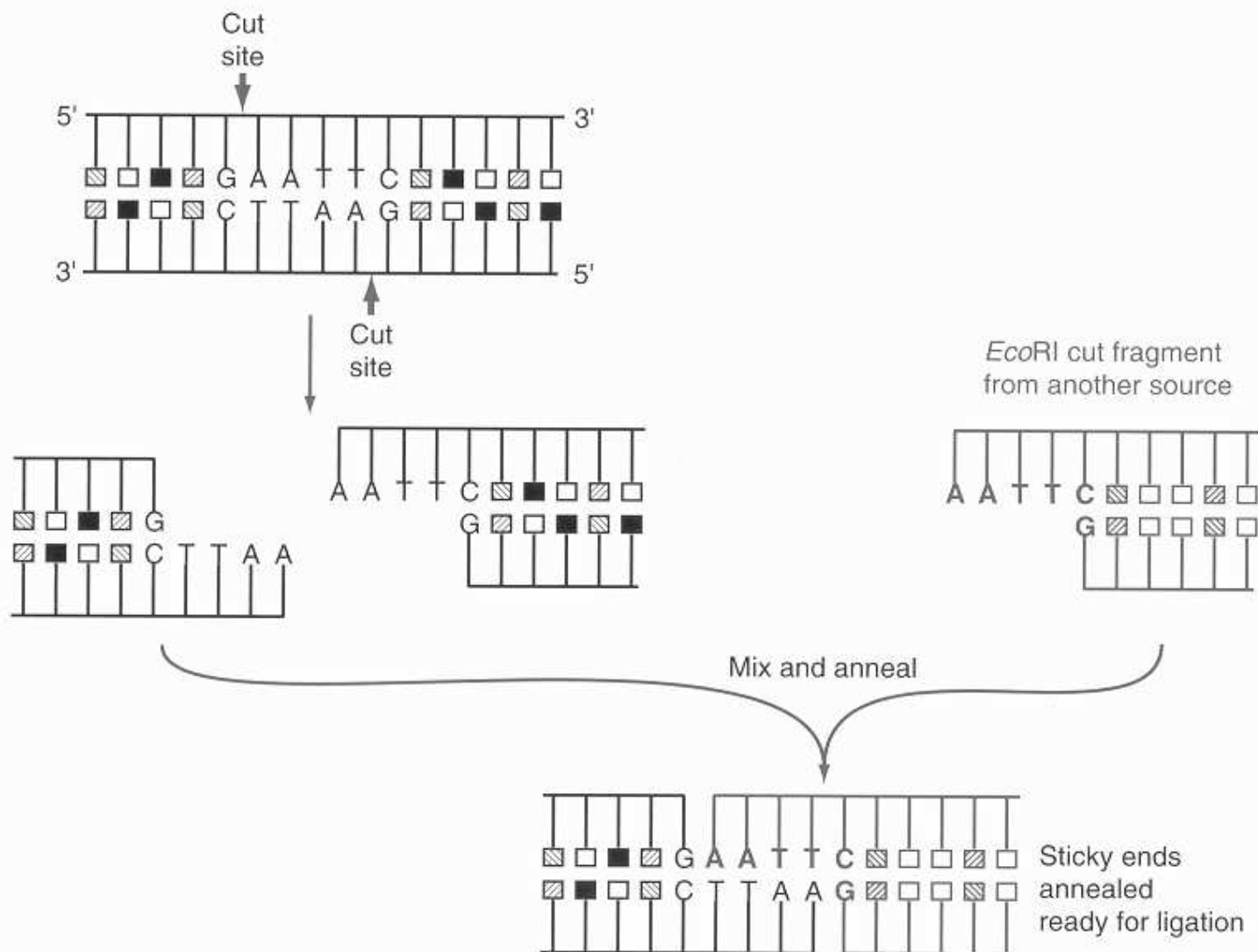


Produkty štěpení restričních endonukleáz

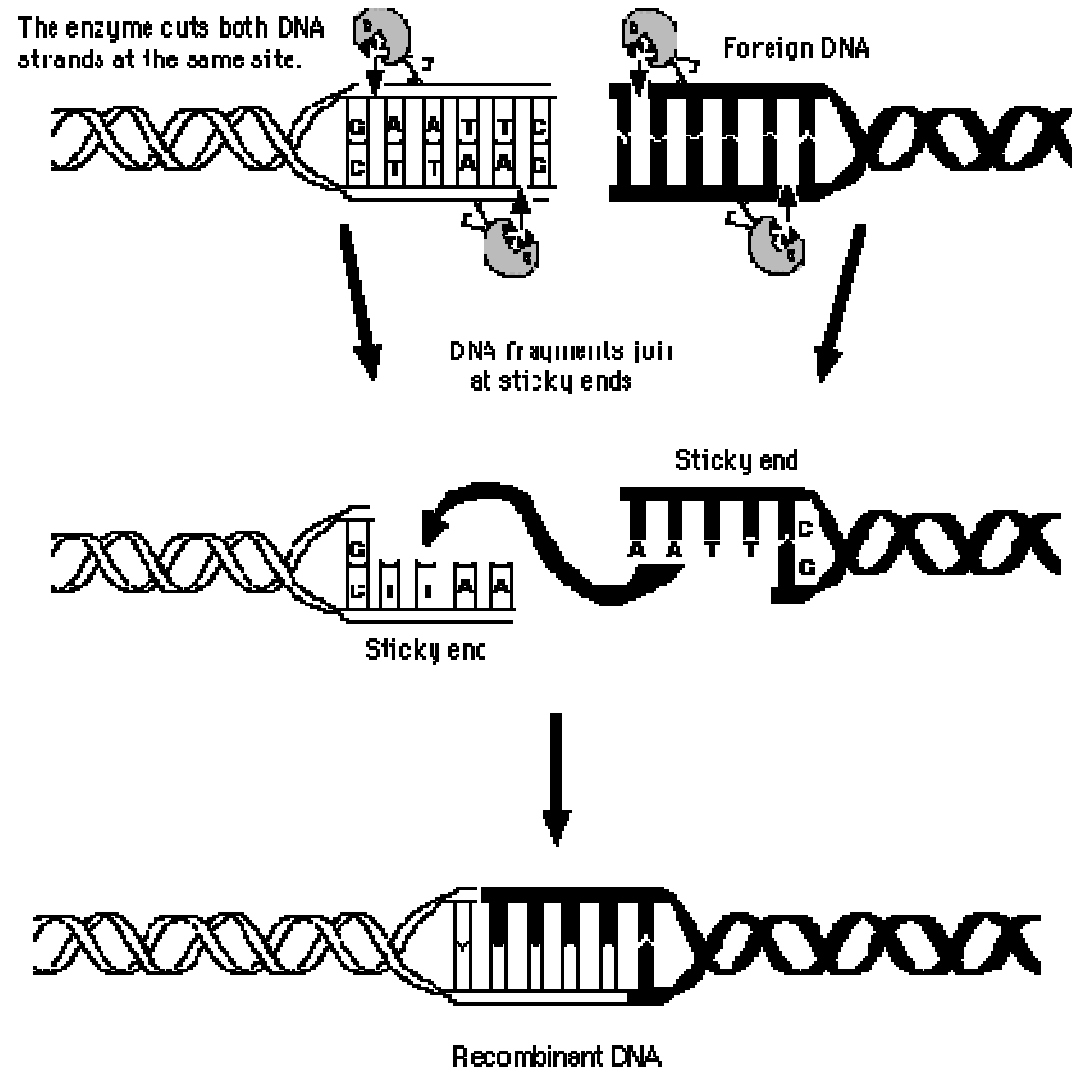
- **tupé („blunt“)** konce (po štěpení obou řetězců ve stejném místě)
- **ostré („sticky“)** konce (po štěpení řetězců v různých místech, která jsou obvykle vzdálena 1-4 nukleotidy)
 - 5' přečnívající („overhang“)
 - 3' přečnívající



Přečnávající kompatibilní konce usnadňují spojení fragmentů DNA pocházejících z různých zdrojů



Restriction Enzyme Action of EcoRI



Využití restričních enzymů

- fyzikální mapování DNA
- analýza populačních polymorfizmů
- změny v uspořádání molekul DNA
- příprava molekulárních sond
- příprava mutantů
- analýza modifikací DNA

Názvosloví restričních endonukleáz

např. *EcoRI*

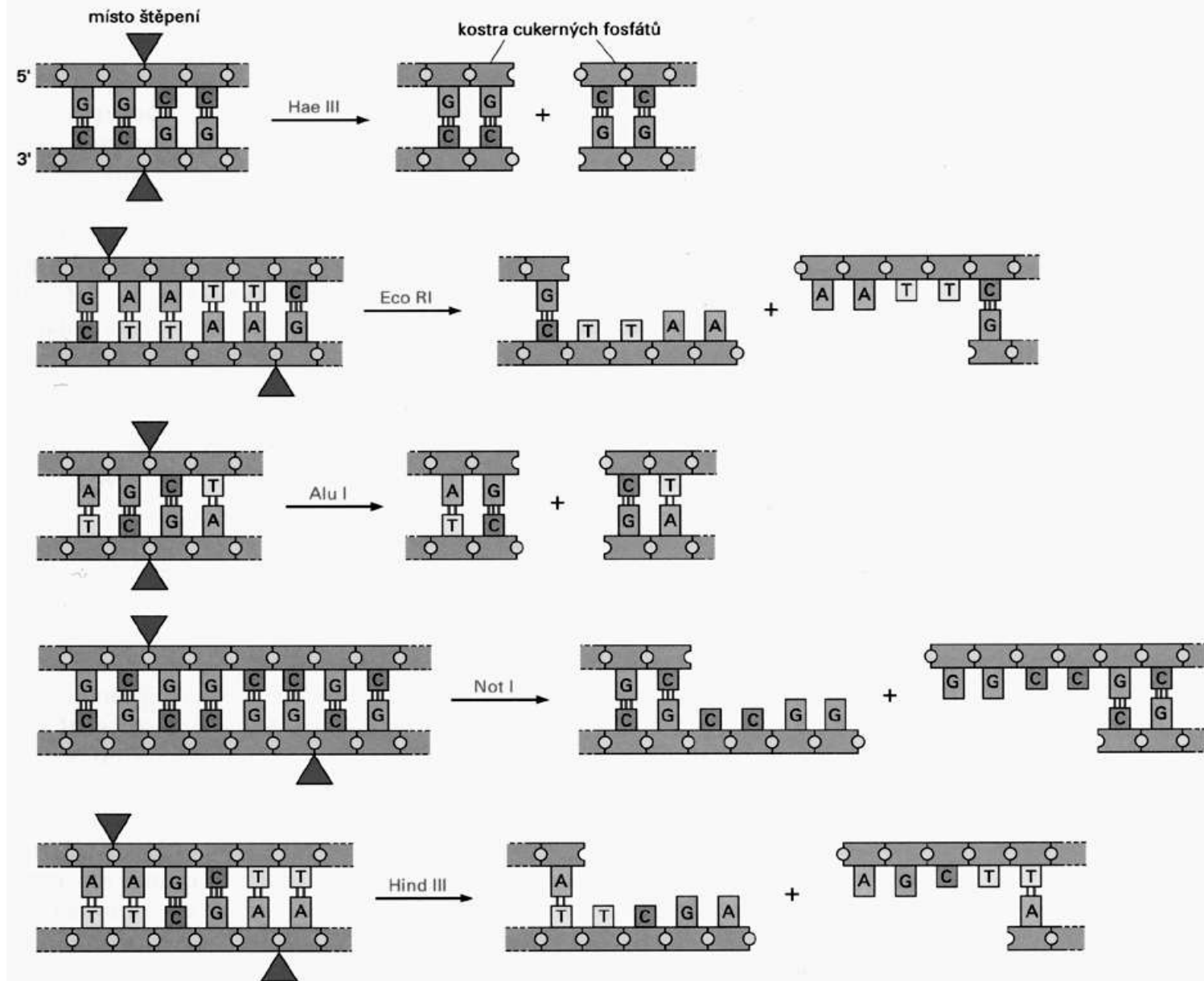
- **1. písmeno:** počáteční písmeno rodu produkční bakterie
- **2. a 3. písmeno:** první dvě písmena druhu produkční bakterie
- **označení kmene (serotypu)** produkční bakterie (ne vždy)
- **římská číslice** vyjadřuje pořadové číslo endonukleázy izolované z dané bakterie

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>

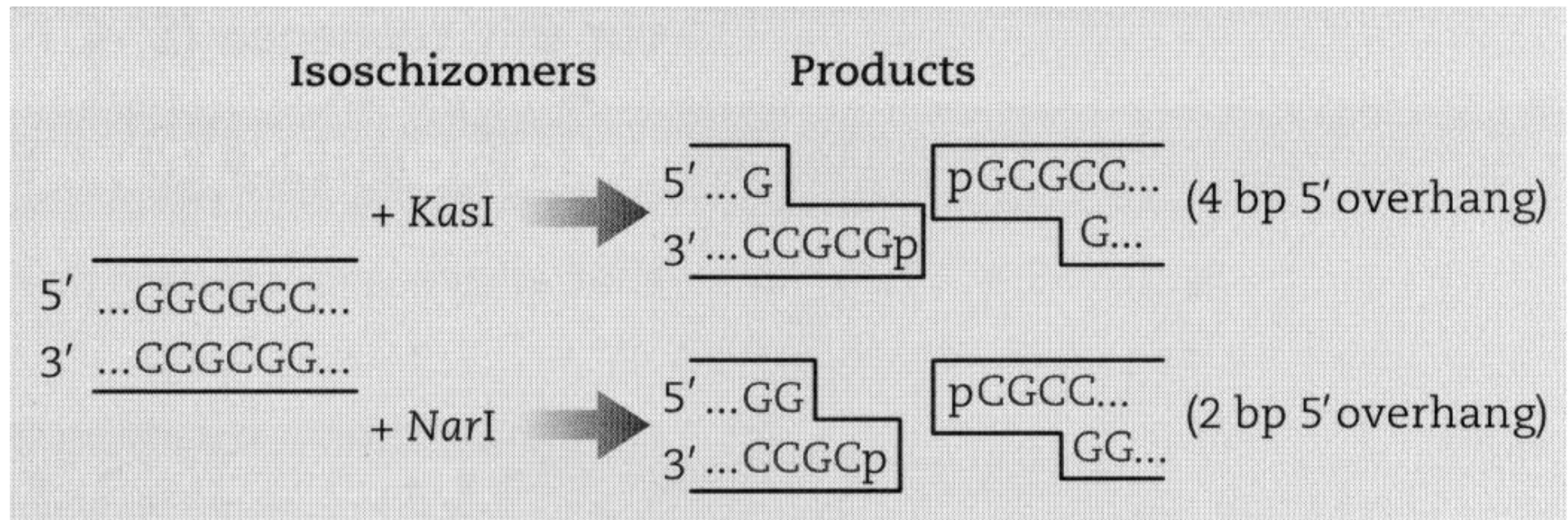
Only one strand of the recognition site is shown, with a slash (/) showing the position of the cleavage site. All the examples shown are palindromic, so the sequence of the second strand, read as the reverse complement, and the position of the cleavage site, will be the same as that shown. Thus the reverse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

Příklady cílových míst některých RE



Izoschizomery

- různé RE, které se stejným rozpoznávacím místem (odlišní producenti, reakce může být odlišná)
- izoschizomery mohou mít odlišnou citlivost k metylovaným bazím v cílové sekvenci



Izokaudamery

- různé RE, které mají odlišné cílové sekvence, ale vytvářejí stejné lepicí konce
- výhodné pro cílené spojování různých molekul DNA

Relaxovaná (uvolněná) specifita (hvězdičková aktivita)

- schopnost RE štěpit kromě cílového místa také jiné - příbuzné sekvence
- většinou za neoptimálních reakčních podmínek
- Např. *EcoRI* může vedle sekvence GAATTC štěpit i sekvence GGATTC, GGATTT, AGATTT

Citlivost RE k metylaci bází v rozpoznávací sekvenci

⁺⁺
AC - štěpení je inhibováno přítomností
N⁶-metyladeninu nebo 5-metylcytosinu

^{0 0}
AC - štěpení není přítomností N⁶-metyladeninu
nebo 5-metylcytosinu ovlivněno

Jednotka RE

množství RE, které zcela rozštěpí 1 μg
DNA fága Lambda za 1 hodinu při optimální
teplotě a v optimálním prostředí

Počet restričních míst pro daný enzym v molekule DNA klesá s jejich velikostí

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)

Nukleázy

- Jejich aktivity jsou obvykle nežádoucí - narušují integritu vzorků DNA a RNA
- Existuje řada různých nukleáz, které se liší substrátovou specifitou, požadavky na přítomnost kofaktorů nebo způsobem degradace substrátu (exonukleázy, endonukleázy, příp. obě aktivity současně)
- Substrátová specifita často závisí na koncentraci enzymu (vysoké koncentrace - nižší specifita)

Deoxyribonukleáza I (DNáza I)

Aktivita:

- nespecifická endonukleáza
- v DNA vytváří jednořetězcové zlomy, od kterých se DNA dále degraduje na mono- a oligonukleotidy

Substrát:

dvouřetězcová i jednořetězcová DNA

Hlavní produkty:

Dinukleotidy, trinukleotidy, tetranukleotidy
fosforylované na 5' konci

Zdroj:

hovězí pankreas

Deoxyribonukleáza I (DNáza I)

Vliv kofaktorů:

- za přítomnosti Mg^{2+} jsou místa štěpení rozmístěna statisticky na obou řetězcích: náhodné zlomy
- za přítomnosti Mn^{2+} jsou přednostně štěpena místa ležící ve ds DNA proti sobě: tupé konce nebo přesahy 1 - 2 nukleotidů

Využití:

- nízké koncentrace: vytváření jednořetězcových zlomů v ds DNA před značením „nick translací“
- vyšší koncentrace: odbourání DNA z roztoků RNA
- Analýza interakcí protein-DNA („DNase footprinting“)

„Mung bean nuclease“

Aktivita:

- štěpí jednořetězcovou DNA na mononukleotidy nebo oligonukleotidy
- vysoké koncentrace rovněž degradují dvouřetězcovou DNA

Využití:

- odstranění jednořetězcových přesahů z konců fragmentů DNA: vznik tupých konců

Nukleáza Bal31

- štěpí lineární dvouřetězcovou DNA od obou konců bez tvorby intramolekulárních zlomů, vznikají zkrácené fragmenty DNA se zarovnanými konci

Aktivita:

- endonukleázová specifická pro jednořetězcovou DNA
- exonukleázová 5' → 3'
- exonukleázová 3' → 5'

Podmínka aktivity:

- přítomnost iontů Ca^{2+} (možnost inaktivace chelatačními činidly)

Nukleáza Bal31

Zdroj:

- bakterie *Alteromonas espejiana*

Využití:

- cílené zkracování dvouřetězcové DNA z obou konců
- odstranění restričních míst
- zavádění delecí (odstraňuje jednořetězcové oblasti v duplexu DNA a RNA)
- mapování restričních míst

Vytváření delecí nukleázou Bal31

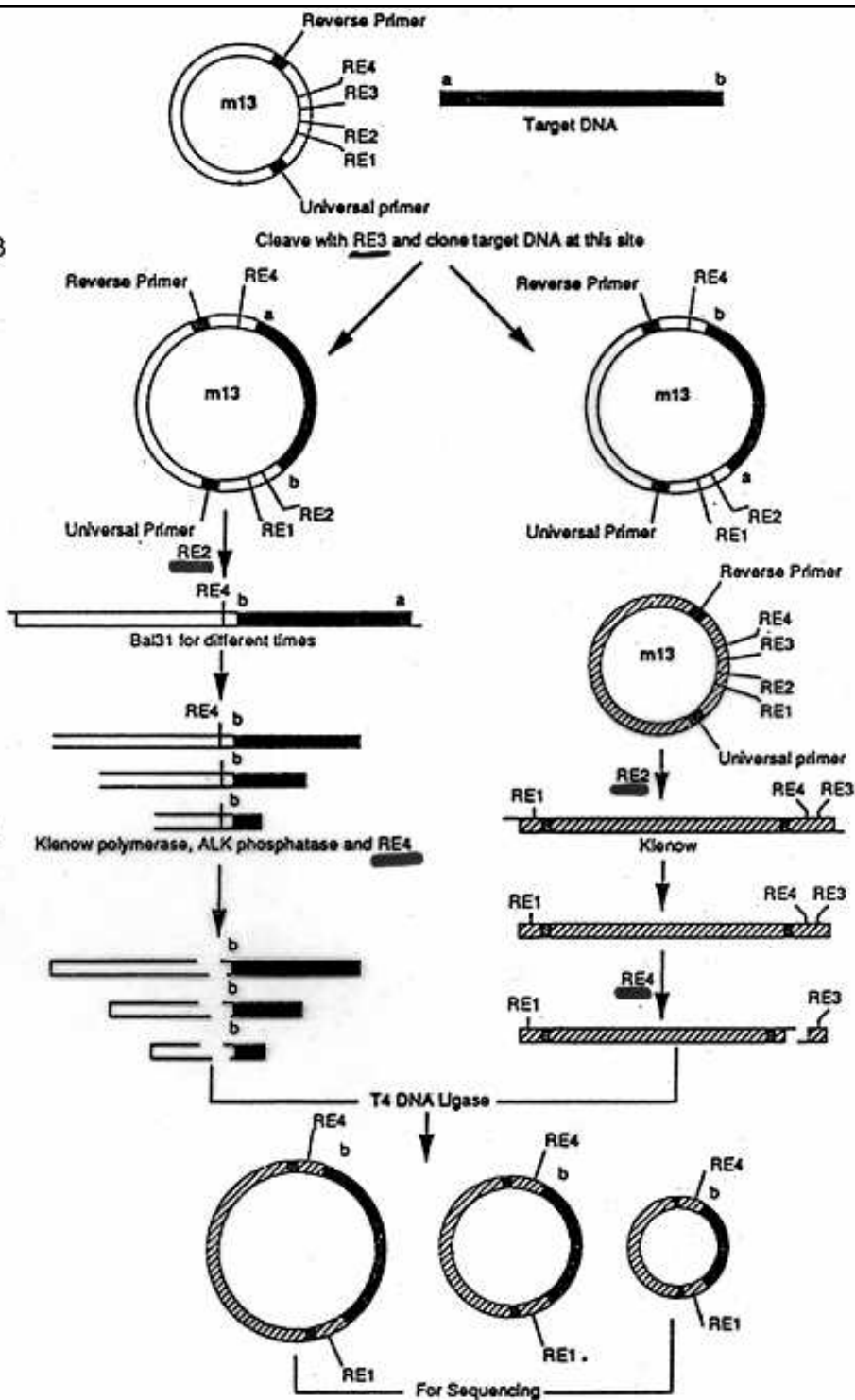
klonování DNA do místa RE3
v obou orientacích

linearizace RE2

štěpení Bal31
po různou dobu

Klenow, alk. fosfatáza, RE4

ligace do vektoru
(tupý konec + RE4)



For Sequencing

Nukleáza S1

Endonukleáza specifická pro jednořetězcovou DNA

Zdroj: *Aspergillus oryzae*

Využití:

- odstranění jednovláknových struktur z dvojitěvláknové DNA a RNA (odstranění nespárovaných smyček)
- mapování intronů analýzou hybridních molekul DNA-mRNA
- odstranění jednořetězcových konců DNA: tupé konce

Nukleáza ExoIII

Aktivita:

- katalyzuje postupné odstraňování 5' mononukleotidů z 3' OH konců dvouřetězcové DNA (na dvouřetězcové DNA postupně odstraňuje jedno vlákno od 3' konce)

Substrát:

- preferovaná je dvouřetězcová DNA s tupými nebo 5' přečnívajícími konci
- nízká účinnost na dvouřetězcové DNA s 3' přečnívajícími konci
- inaktivní na jednořetězcové DNA

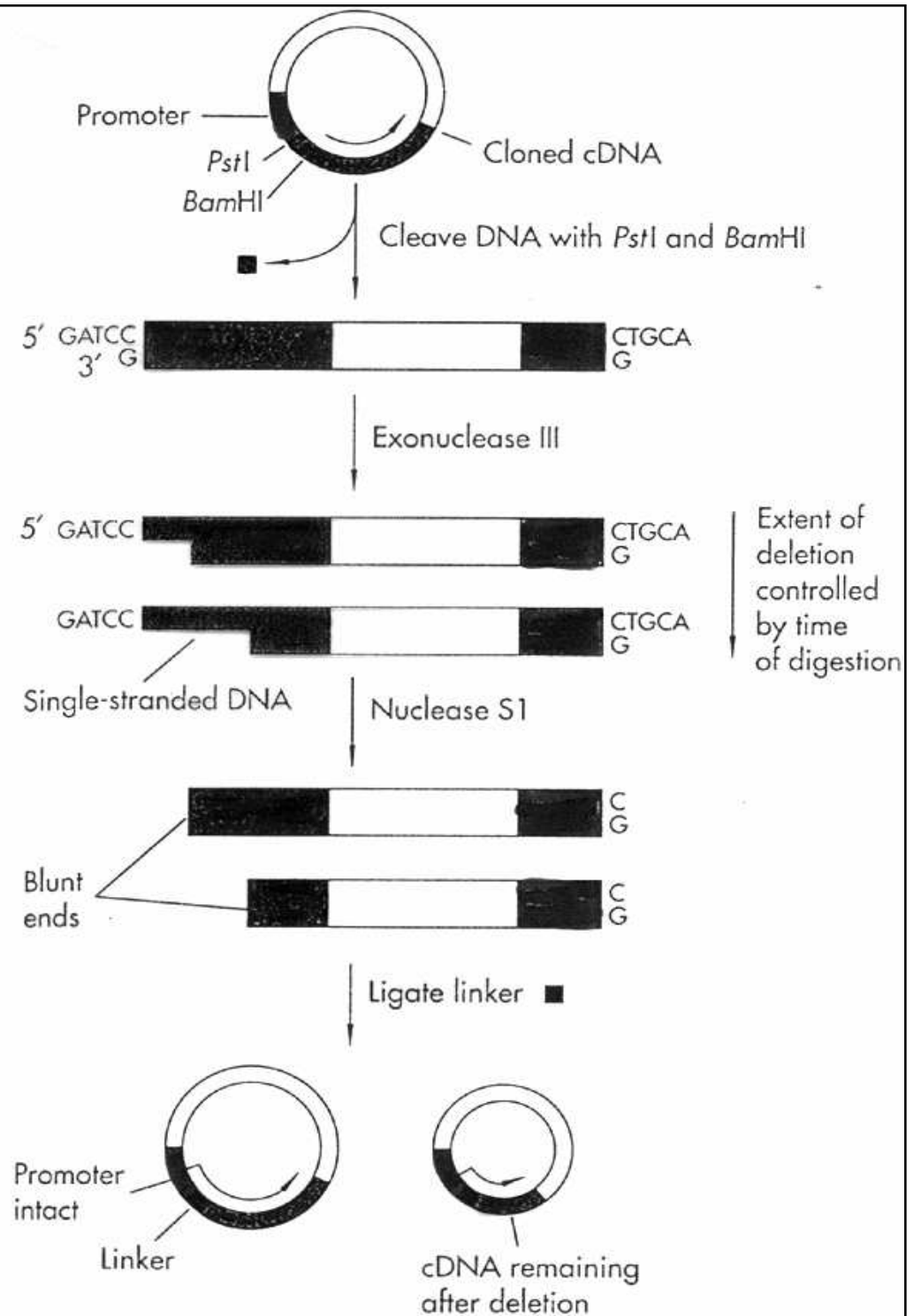
Zdroj: *E.coli*

Nukleáza ExoIII

Využití:

- vytváření jednosměrných delecí od konců lineárních fragmentů DNA
- příprava jednořetězcových substrátů pro sekvenování DNA dideoxy terminační metodou

Příprava jednosměrných delecí ExoIII



Nukleáza fága Lambda (Lambda Exonuclease)

Aktivita:

exonukleázová, odstraňuje 5' mononukleotidy z dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3'

- produktem jsou 5' nukleosid - monofosfáty

Substrát:

- preferovaná je dvouřetězcová DNA fosforylovaná na 5' konci

Zdroj:

bakterie *E.coli* infikované fágem Lambda

Využití:

- vytváření jednosměrných delecí

Ribonukleázy

Ribonukleáza T1

- sekvenčně specifická ribonukleáza
- degraduje specificky RNA v místech G

Zdroj: *Aspergillus oryzae* (dnes příslušný gen klonován v *E. coli*)

Ribonukleáza T1

Substrát a aktivita:

- štěpí RNA v poloze 3' fosfátů guaninových zbytků: vznikají oligonukleotidy s koncovými guanosinovými 3' fosfáty

Využití

- odstranění nespárovaných oblastí RNA z hybridů DNA:RNA
- sekvenování RNA
- mapování RNA
- studium struktury RNA

Ribonukleázy

Ribonukleáza A

Endoribonukleáza, která specificky degraduje jednořetězcovou RNA v místech C a U.

Zdroj: hovězí pankreas

Ribonukleáza A

Substrát a aktivita

Endoribonukleáza, štěpí jednořetězcovou RNA na 3' koncích pyrimidinových zbytků: degradace RNA do 3'-fosforylovaných oligonukleotidů.

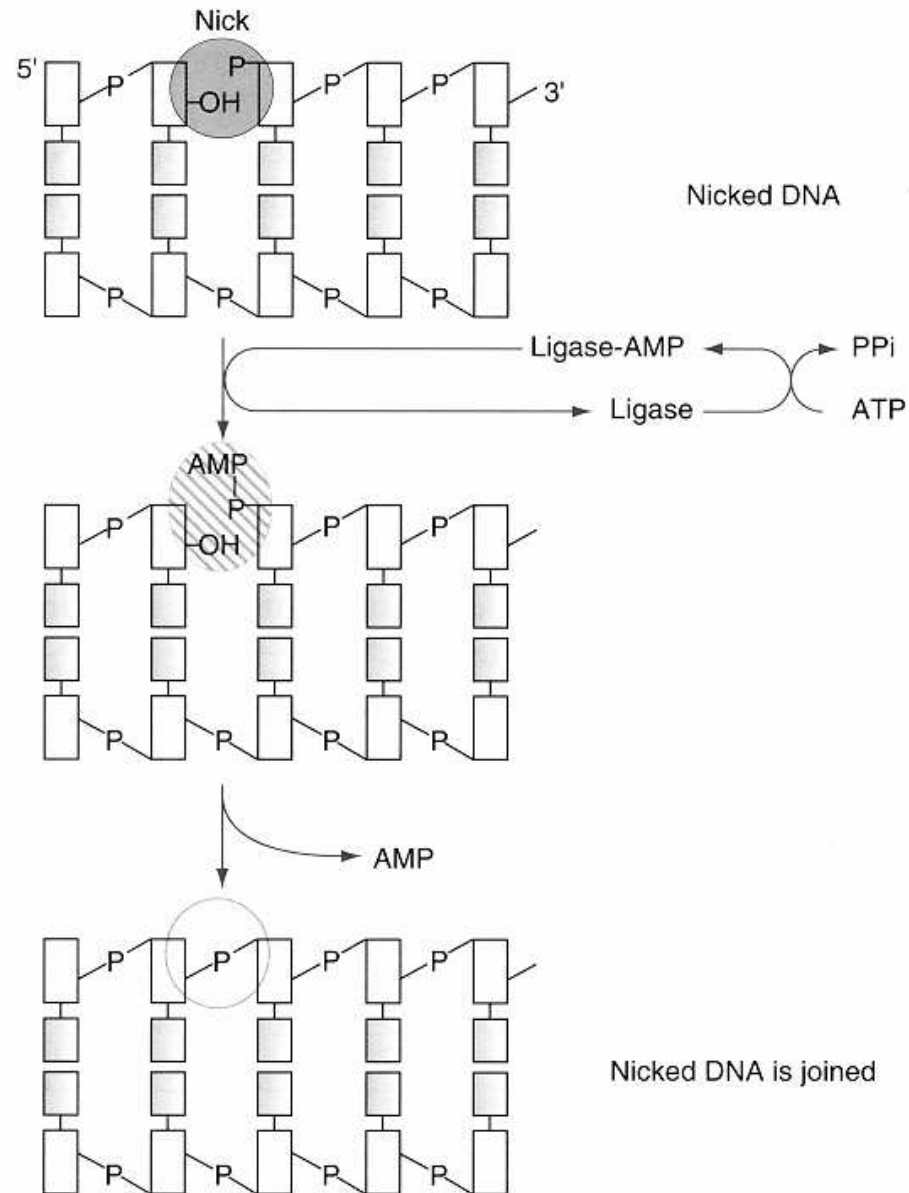
Využití:

- eliminace nebo snížení kontaminující RNA v izolátech plazmidové DNA
- mapování mutací v DNA nebo RNA štěpením nespárovaných oblastí: RNáza štěpí RNA v hybridech RNA:DNA v místech nespárovaných oblastí, produkty štěpení jsou následně analyzovány
- test ochrany před ribonukleázou (RNase protection assay)

DNA ligázy

- enzymy, které obnovují cukr-fosfátovou kostru DNA tvorbou kovalentní fosfodiesterové vazby za spotřeby ATP nebo NAD
- fyziologický význam při replikaci, rekombinaci a reparaci DNA
- analogické RNA ligázy katalyzují *in vitro* podobné reakce při ligaci ssRNA

Reakce katalyzované DNA ligázami



Použití DNA ligáz

- příprava rekombinantních molekul DNA
- spojování fragmentů DNA různého původu (restrikční fragmenty DNA, uměle syntetizované molekuly DNA, produkty zpětné transkripce, atd.) s komplementárními konci, k připojení spojek a adaptorů, cirkularizaci lineárních molekul DNA

Běžné typy DNA ligáz

T4-DNA-ligáza

- izolována z buněk *E. coli* infikovaných fágem T4
- spojuje lepivé i tupé konce DNA
- opravuje jednořetězcové zlomy („nicks“) v dvouřetězcové DNA, RNA a u hybridů DNA/RNA
- vyžaduje přítomnost fosfátové skupiny na 5' konci a OH skupiny na 3' konci molekuly

Bakteriální DNA ligáza

- izolována z buněk *E. coli*
- spojuje jen DNA s lepivými konci

Metody spojování molekul DNA

A. s lepivými konci:

za vhodných podmínek dochází k párování komplementárních úseků, kovalentní spojení zajistí DNA ligáza

B. s tupými konci:

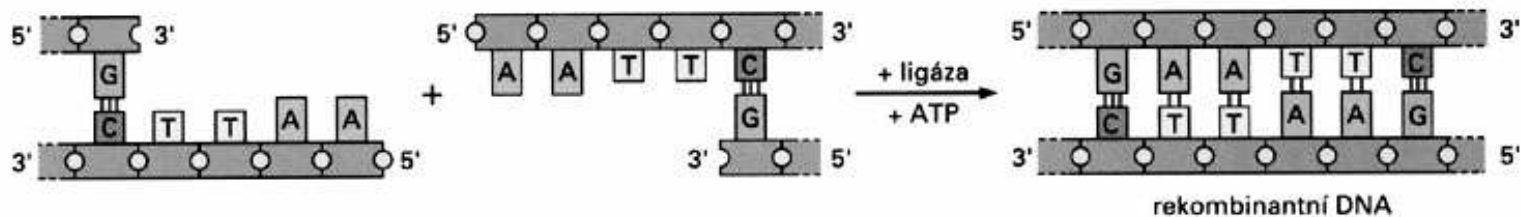
- vysokými koncentracemi T4 DNA ligázy
- přeměnou tupých konců na lepivé prostřednictvím tzv. linkerů, dále viz A

C. s přečnívajícími konci, které nejsou kompatibilní:

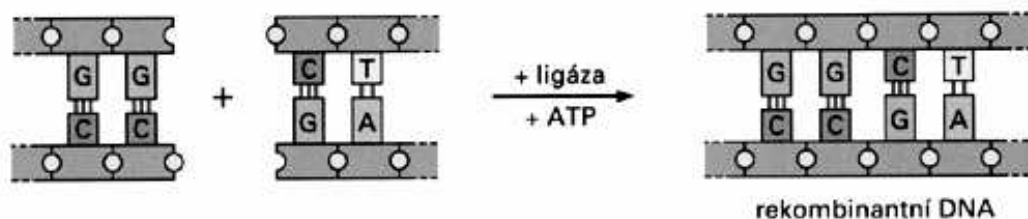
- terminální transferázou přidat k 3' koncům jednoho fragmentu homopolymerní extenze (např. poly-dA) a k 3' koncům druhého fragmentu komplementární homopolymerní extenze (poly-dT)
- „zatupení“ konců (polymerace, degradace)

Vytváření rekombinantních molekul DNA *in vitro*

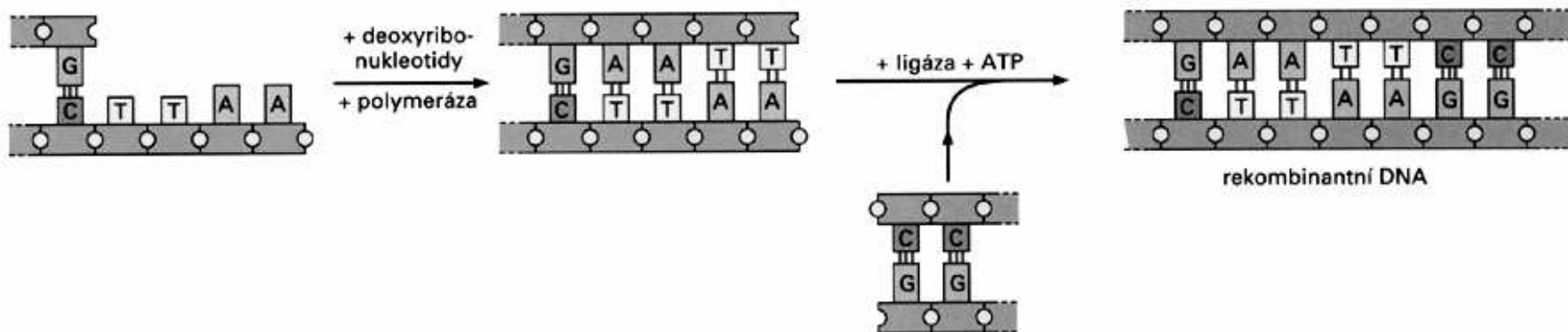
(A) SPOJENÍ DVOU KOMPLEMENTÁRNÍCH NEROVNÝCH KONCŮ



(B) SPOJENÍ DVOU TUPÝCH KONCŮ

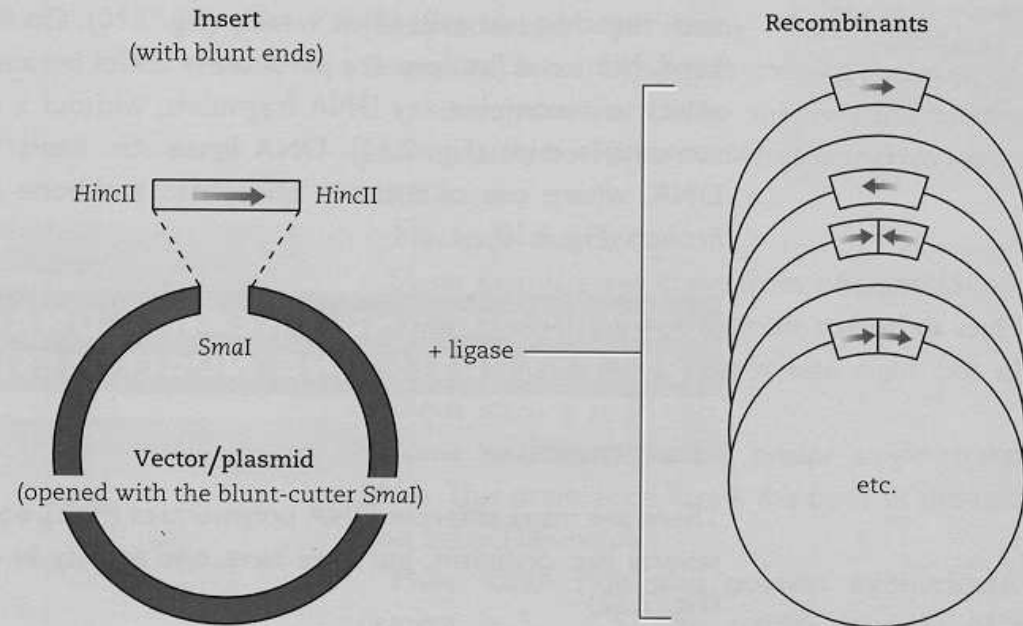


(C) SPOJENÍ TUPÉHO KONCE S NEROVNÝM KONCEM



Orientace ligovaných fragmentů DNA

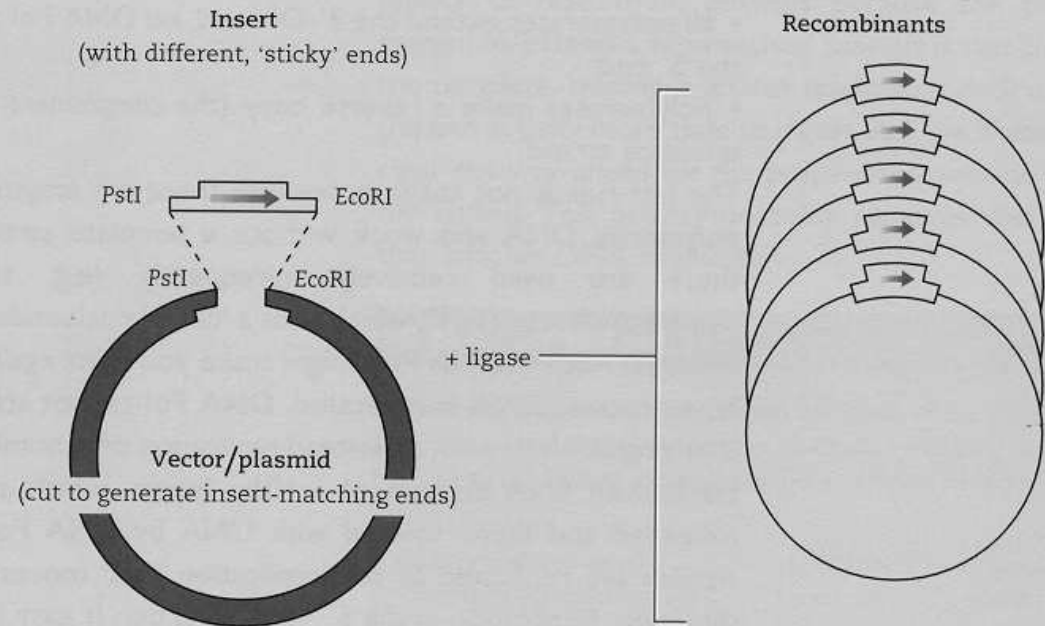
Blunt end ligation can combine fragments from different restriction enzyme digestions...



(a)

...but the products are heterogeneous

'Sticky end' ligations combine only fragments with matching restriction enzyme digestion-produced overhangs.



(b)

...but the products are more uniform

Úpravy konců fragmentů DNA vzniklých RE pro účely ligace

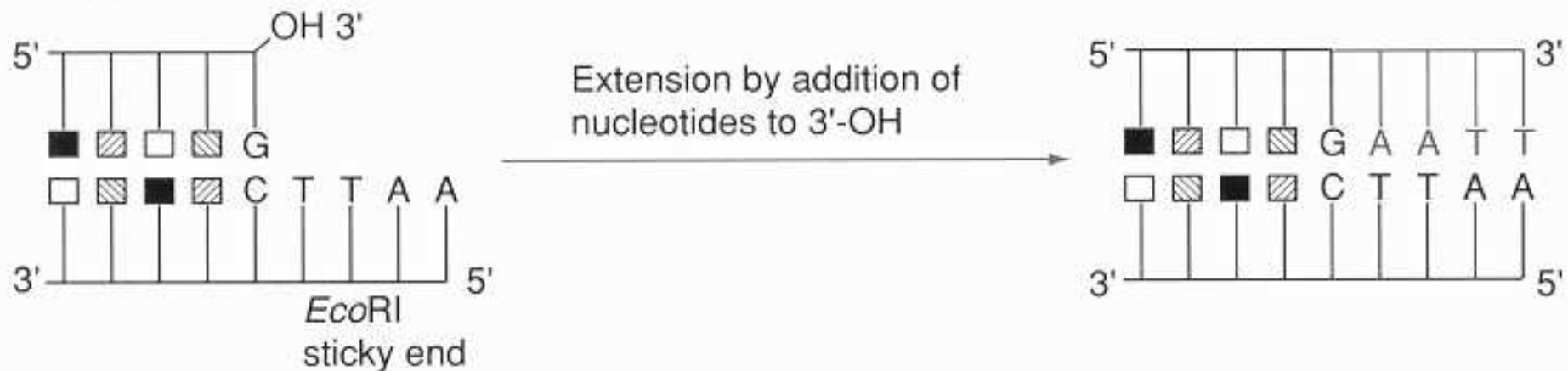
Přeměna lepivých konců na tupé:

- doplněním chybějících nukleotidů polymerací („filling in“)
- odstraněním přečnávající sekvence („trimming back“)

Doplnění 5' přečnívajících konců DNA polymerací

- umožněny přítomností 3' OH skupiny, která se uplatní jako primer (nutná podmínka pro funkci DNA polymerázy)
- chybějící sekvence je doplněna polymerací

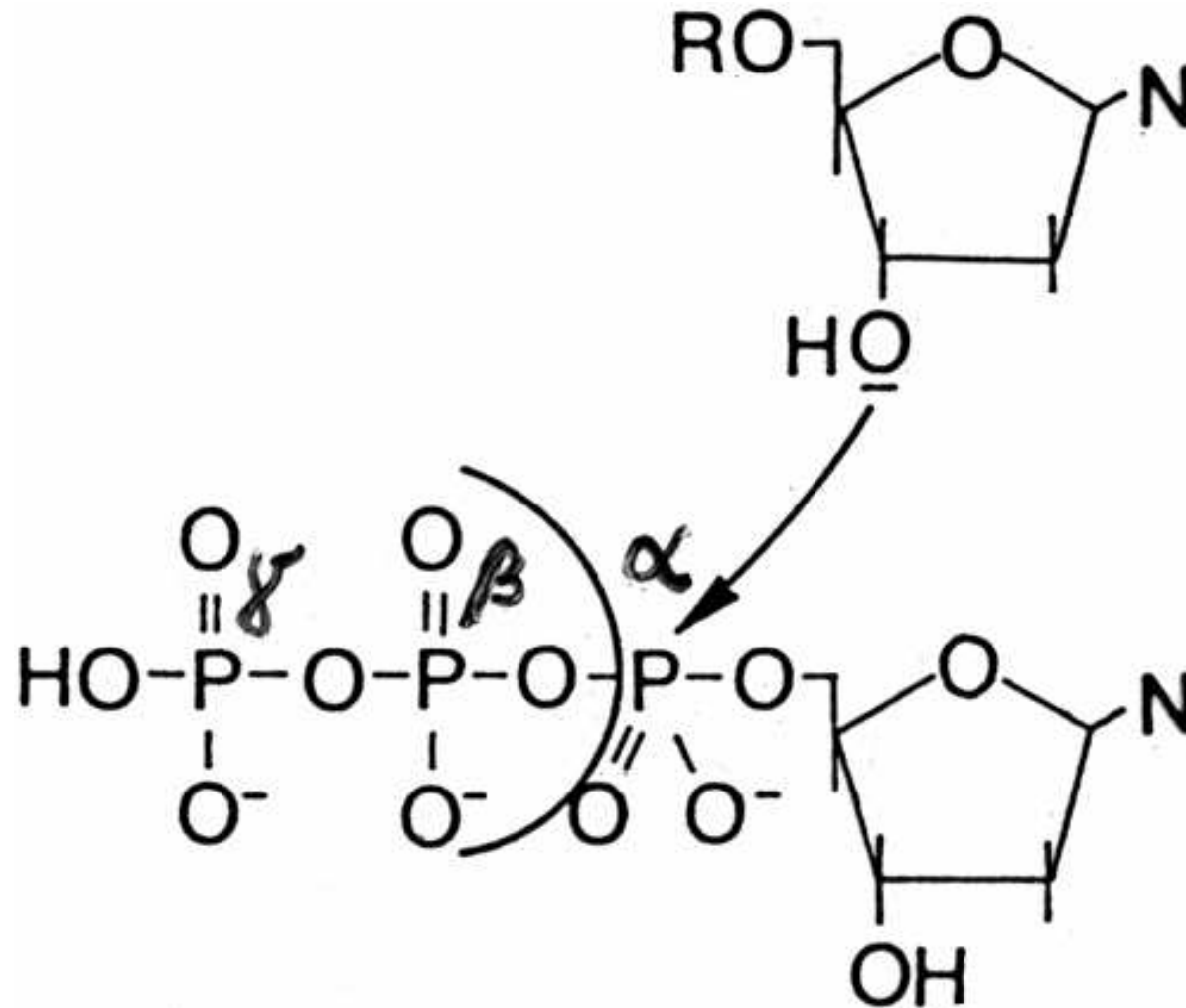
a) Filling in



Polymerázy

- syntetizují nukleové kyseliny postupným doplňováním nukleotidů k 3' OH konci stávající molekuly nukleové kyseliny
- není známa žádná polymeráza prodlužující 5' konec DNA
- matricí (templátem) je jednořetězcová DNA nebo RNA
- polymerázy vytvářejí komplementární kopii templátového řetězce

Polymerace DNA



DNA polymerázy

DNA polymeráza I (DNA-dependentní, Kornbergův enzym)

1. **Polymerace**: prodlužování polynukleotidového řetězce ve směru $5' \rightarrow 3'$
 - matrice čtena ve směru $3' \rightarrow 5'$
 - tvorba fosfodiesterové vazby nukleofilním atakem $3'$ OH skupiny rostoucího řetězce a $5'$ P dNTP za tvorby pyrofosfátu
 - požadavek přítomnosti primeru
2. **Exonukleázová aktivita** $5' \rightarrow 3'$ i $3' \rightarrow 5'$
 - hydrolýza řetězce DNA v obou směrech
3. **Degradace** DNA ve směru $5' \rightarrow 3'$ a **současná syntéza** degradovaného řetězce
 - oprava chybně začleněných nukleotidů *in vivo* („proof-reading“)
 - využití při značení DNA („nick translace“)

DNA polymeráza I (Kornbergův enzym)

Zdroj: *E. coli*

Využití:

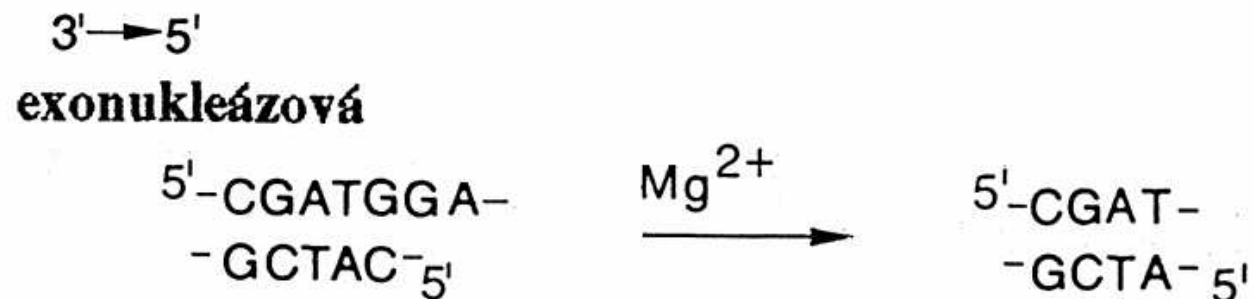
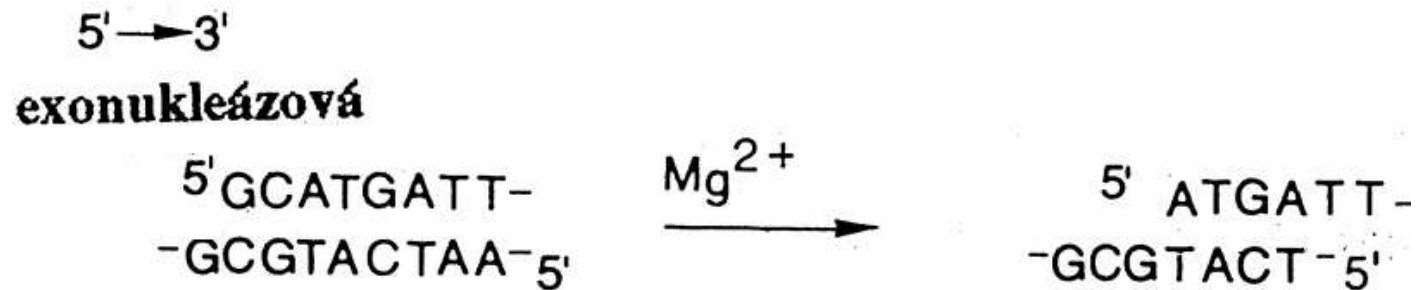
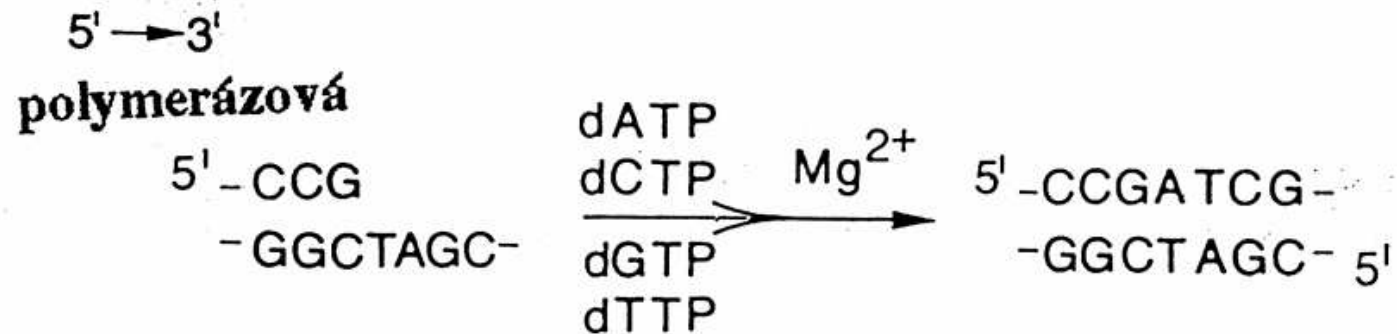
- značení DNA metodou posunu jednořetězcového zlomu („nick translací“)
- syntéza druhého řetězce cDNA

DNA polymeráza I *E. coli*

3 aktivity, jejichž rychlost je ovlivněna stavem DNA a koncentrací dNTP v reakční směsi:

- DNA-dependentní DNA polymeráza
- 3' → 5' a 5' → 3' exonukleázová aktivita
- jeden aminokyselinový řetězec (109 kDa)
- kofaktorem je Mg⁺⁺
- každá ze 3 enzymových aktivit je zajištěna distinktní doménou
- proteolýzou lze vytvořit zkrácené varianty, které postrádají některou z domén
- DNA polymeráza I se v minulosti hojně používala při značení DNA, syntéze cDNA a při prvních pokusech o konstrukci rekombinantních molekul DNA
- nyní jsou k dispozici výkonnější enzymy

Schématické znázornění tří aktivit DNA pol I

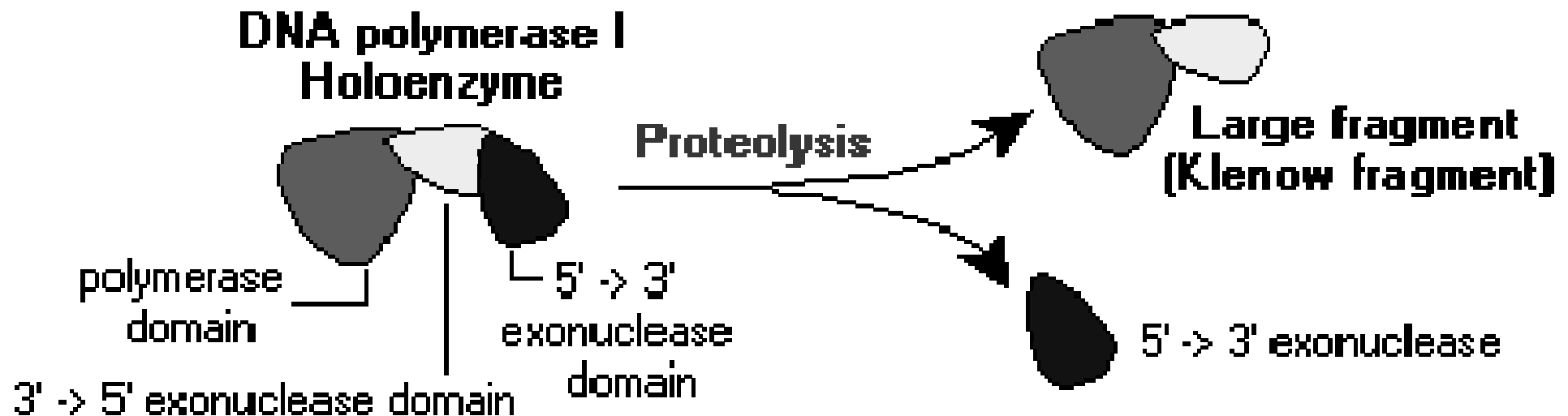


T4 DNA polymeráza

- polymerázová aktivita $5' \rightarrow 3'$
- exonukleázová aktivita $3' \rightarrow 5'$ (200 x vyšší než u Klenowova enzymu)
- využití při značení $3'$ konců DNA nahrazovací reakcí:
- exonukleázová aktivita degraduje dvouřetězcovou DNA za tvorby molekul s překrytými $3'$ konci. Po přidání značených dNTP jsou konce doplněny polymerační aktivitou enzymu.

Klenowův fragment DNA polymerázy I

- přítomnost 5' → 3' exonukleázové aktivity u DNA polymerázy I je nevýhodná (riziko poškození přecházejícího konce)
- Klenowův fragment DNA polymerázy I: produkt proteolýzy *E. coli* DNA polymerázy I **subtilisinem**: odstranění domény zodpovědné za 5' → 3' exonukleázovou aktivitu
- Komerční enzymy: produkty exprese zkráceného genu pro DNA pol I v bakteriích.



Klenowův fragment DNA polymerázy I - využití

- syntéza dvouřetězcové DNA z jednořetězcových templátů



Klenowův fragment DNA polymerázy I - využití

Doplnění zkrácených 3' konců fragmentů DNA („fill-in reaction“): vytváření tupých konců vhodných pro klonování.

5' A-G-G-C-A-G
3' T-C-C-G-T-C-C-T-A-G

Klenow and
nucleotides

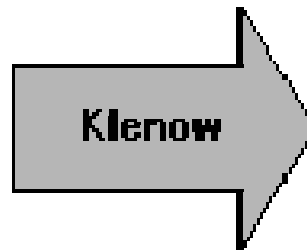
5' A-G-G-C-A-G-G-A-T-C
3' T-C-C-G-T-C-C-T-A-G

Klenowův fragment DNA polymerázy I - využití

Odstranění přečnívajících 3' konců s využitím 3' → 5'
exonukleázové aktivity: vytváření tupých konců vhodných pro klonování

Odstraňování nukleotidů od 3' konců má tendenci pokračovat, ale za přítomnosti nukleotidů je tato aktivita vyrovnána aktivitou polymerační a vede k tvorbě tupých konců

5' G-A-C-G-A-G-C-T
3' C-T-G-C

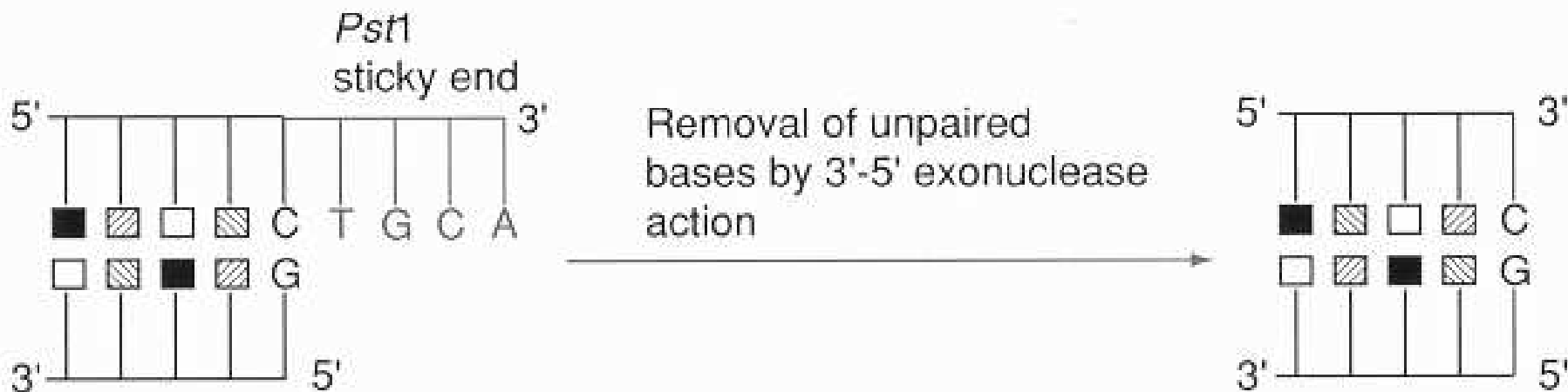


5' G-A-C-G
3' C-T-G-C

Úpravy 3' přečnávajících konců DNA

- doplnění polymerací není možné
- k zatupení je třeba použít enzym, který disponuje 3' → 5' exonukleázovou aktivitou (např. Klenow, T4 DNA polymerázu)

b) Trimming back



Linkery

- krátké synteticky připravené oligonukleotidy (např. **CCGGATCCGG**)
- nesou cílovou sekvenci pro RE (např. *Bam*HI - **GGATCC**)
- v případě, že jsou autokomplementární, postačuje jen jeden řetězec

Použití:

1. linker se připojí k tupým koncům DNA ligací
2. štěpením RE se vytvoří jednovláknové lepivé konce DNA
3. spojení původně nekompatibilních molekul DNA ligací

Význam:

- umožňují opatřit jakoukoliv DNA žádoucími konci

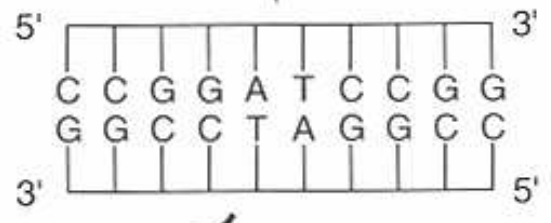
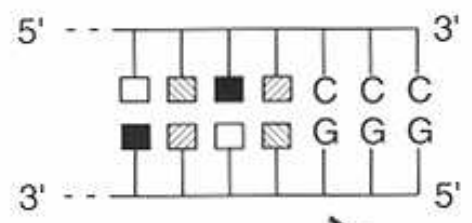


Self-complementary oligonucleotide

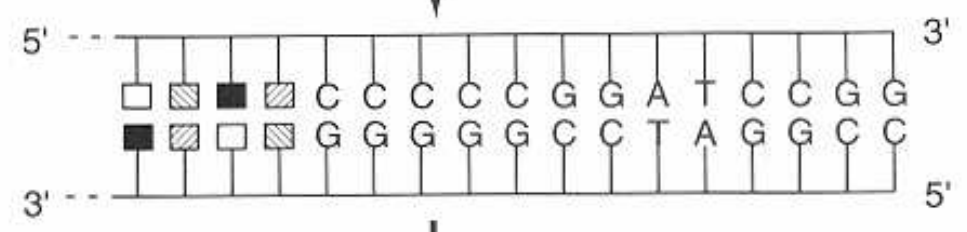


Anneal

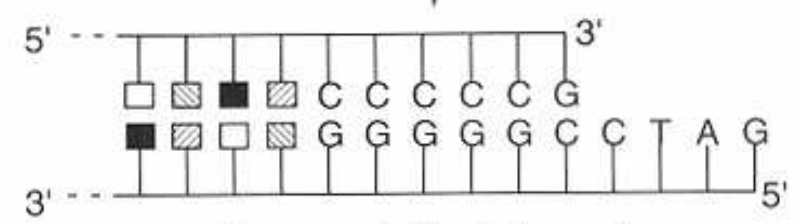
Blunt-ended (*Sma*1) fragment



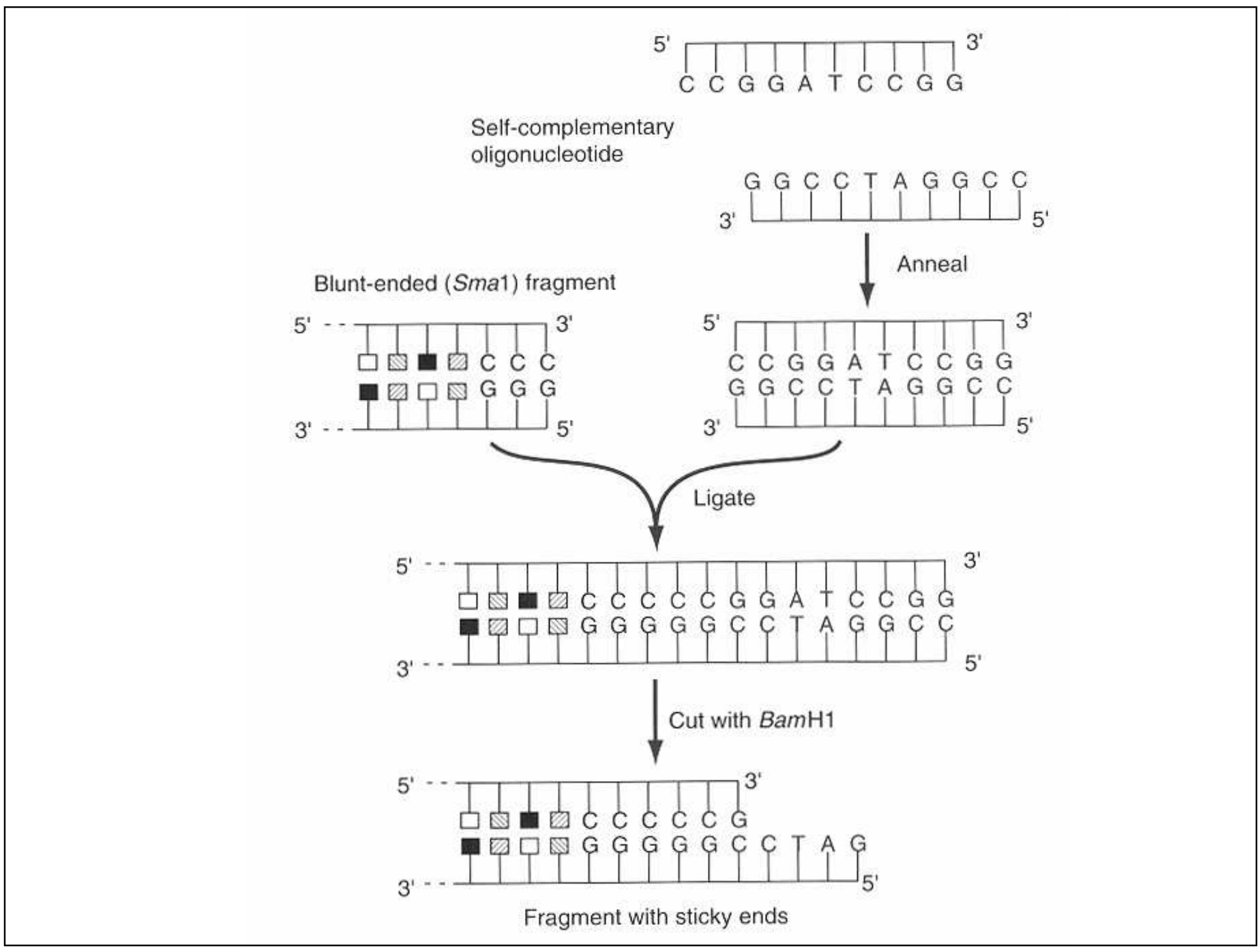
Ligate



Cut with *Bam*H1



Fragment with sticky ends



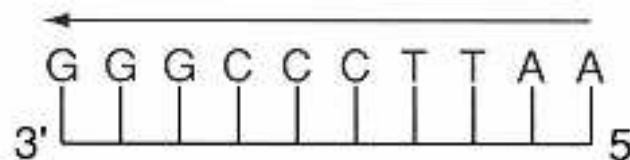
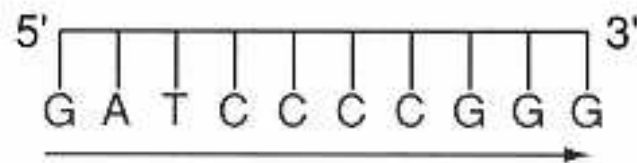
Adaptory

- dvojice krátkých synteticky připravených oligonukleotidů, které se spolu částečně párují a přitom vytvoří krátký fragment dvouřetězcové DNA zakončený jedním tupým a jedním přečnávajícím koncem nebo dvěma přečnávajícími konci

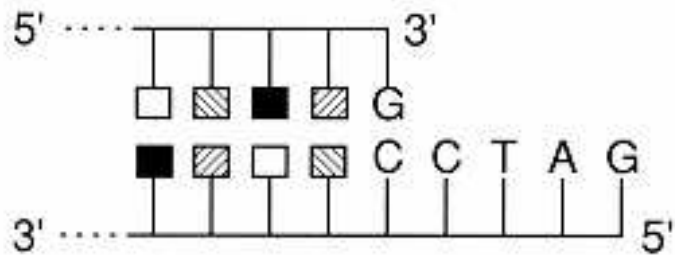
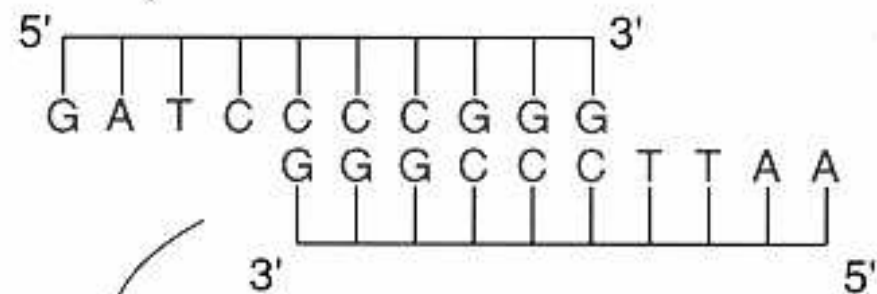
Použití:

1. přeměna tupých konců na ostré
2. přeměna jedné přečnávající sekvence na jinou

Two synthetic, partly complementary, oligonucleotides

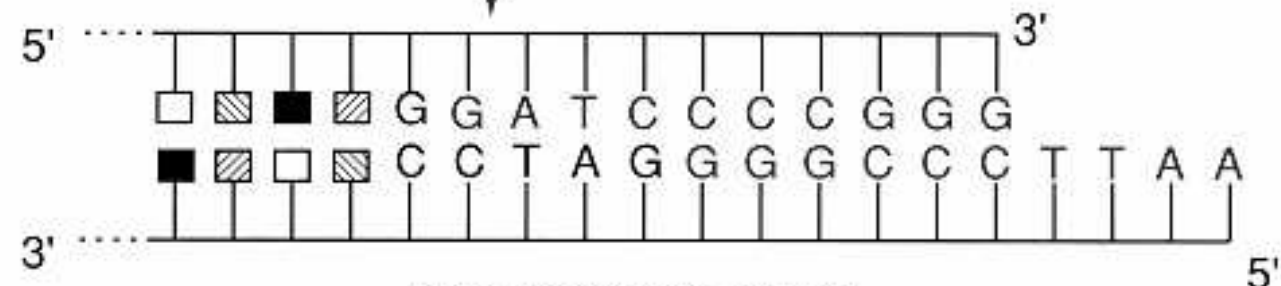


Anneal



Fragment with *Bam*H1 sticky ends

Ligate

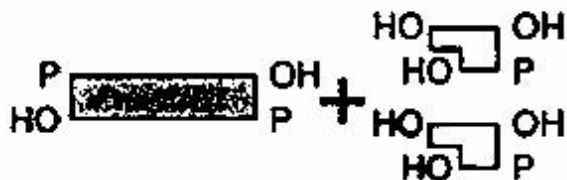


Fragment with *Eco*R1 compatible ends

Použití adaptorů

5'-HO-GATCCCCGGG-OH
3'- HO-GGGCCC-P

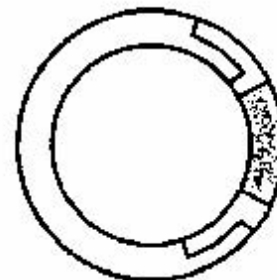
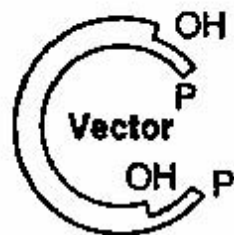
Adaptor molecule



T4 DNA
ligase,
ATP



Polynucleotide
kinase, ATP



T7 DNA polymeráza

DNA polymeráza bakteriofága T7

Aktivity:

DNA polymerázová $5' \rightarrow 3'$

$3' \rightarrow 5'$ exonukleázová

($5' \rightarrow 3'$ exonukleázová doména chybí)

Velmi podobná Klenowovu fragmentu a T4
DNA polymeráze

T7 DNA polymeráza - výhody

Vysoká procesivita:

Průměrná délka syntetizované DNA před tím než enzym disociuje od templátu je podstatně vyšší než u jiných enzymů.

Využití při sekvenování DNA

Sekvenáza a **Sekvenáza 2.0** jsou chemicky ošetřené nebo genetickými manipulacemi vytvořené deriváty T7 DNA polymerázy, které postrádají 3' → 5' exonukleázovou aktivitu - široce používány při sekvenování.

Termostabilní DNA polymerázy



Taq DNA polymeráza byla purifikována z bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v horkých pramenech v roce 1976. Zhruba o 10 let později byla objevena polymerázová řetězová reakce.

Termostabilní DNA polymerázy

- Katalyzují syntézu DNA z nukleosid trifosfátů na templátu (jako jiné DNA polymerázy)
- Požadavky pro iniciaci polymerace:
 - volná 3' OH skupina
 - přítomnost hořčnatých iontů

Termostabilní DNA polymerázy

Katalytická aktivita je maximální mezi 75 a 80°C a klesá při nižších teplotách.

Při 37°C, má *Taq* polymeráza pouze asi 10% své maximální aktivity.

Kromě *Taq* DNA polymerázy bylo izolováno několik dalších termostabilních DNA polymeráz, např. *Pfu* a *Vent* polymeráza

Taq z *Thermus aquaticus*, poločas života je 1,6 hod v 95°C

Pfu z *Pyrococcus furiosus*, která má nejvyšší přesnost

Vent z *Thermococcus litoralis*, poločas života je 7 hod v 95°C

Polymerázy syntetizující jednořetězce

Poly(A) polymeráza

- katalyzuje přidání cca 200 A na 3' konec mRNA při sestřihu eukaryotické mRNA
- požadavky: přítomnost substrátu (ATP) a kofaktorů (ionty Mg a Mn) (není potřeba matrice)

Využití:

- Syntéza cDNA: prostřednictvím primerů oligo (dT) lze sekvenci mRNA zpětnou transkriptázou převést do cDNA

Terminální transferáza

- katalyzuje přidání deoxynukleotidů k 3' konci DNA

Substrát:

- přečnívající, zkrácené i tupé konce **dvouřetězcové molekuly DNA** (preferované jsou přečnívající 3' konce) nebo **jednořetězcová DNA**
- nevyžaduje matrici ani primer

Kofaktor: kobalt

Zdroj: telecí brzlík (jedná se o savčí enzym exprimovaný v lymfocytech, komerčně dostupné varianty jsou produktem exprese hovězího genu v *E. coli*)

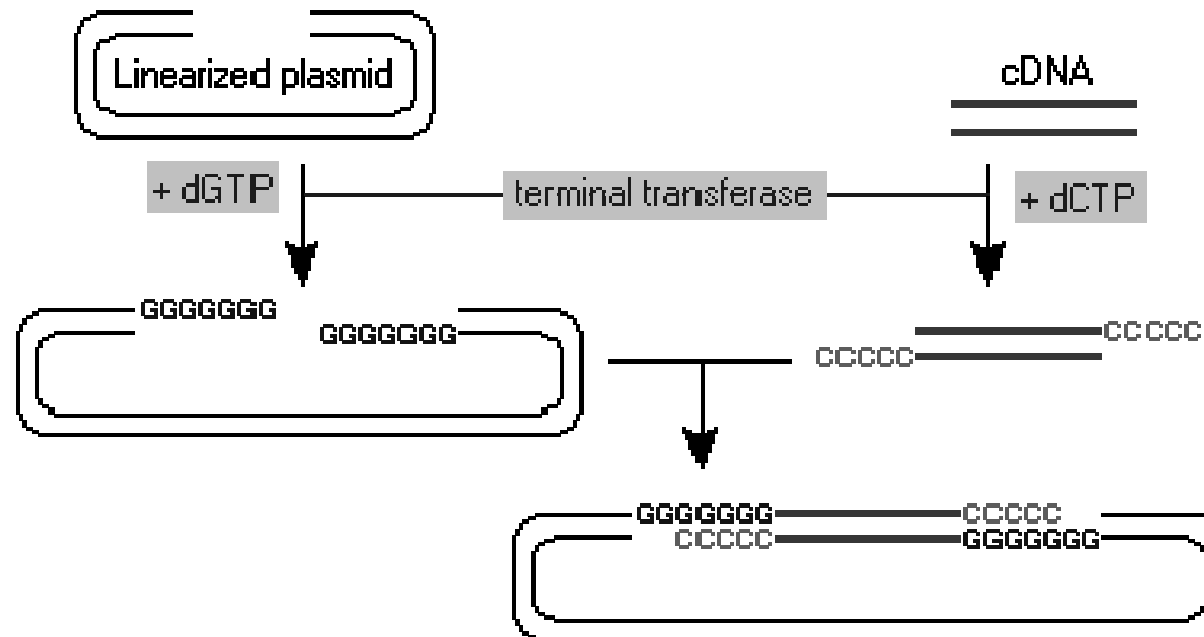
Využití:

- přidání homopolymerních konců k 3' koncům DNA
- značení 3' konců DNA

Přidání homopolymerních konců terminální transferázou

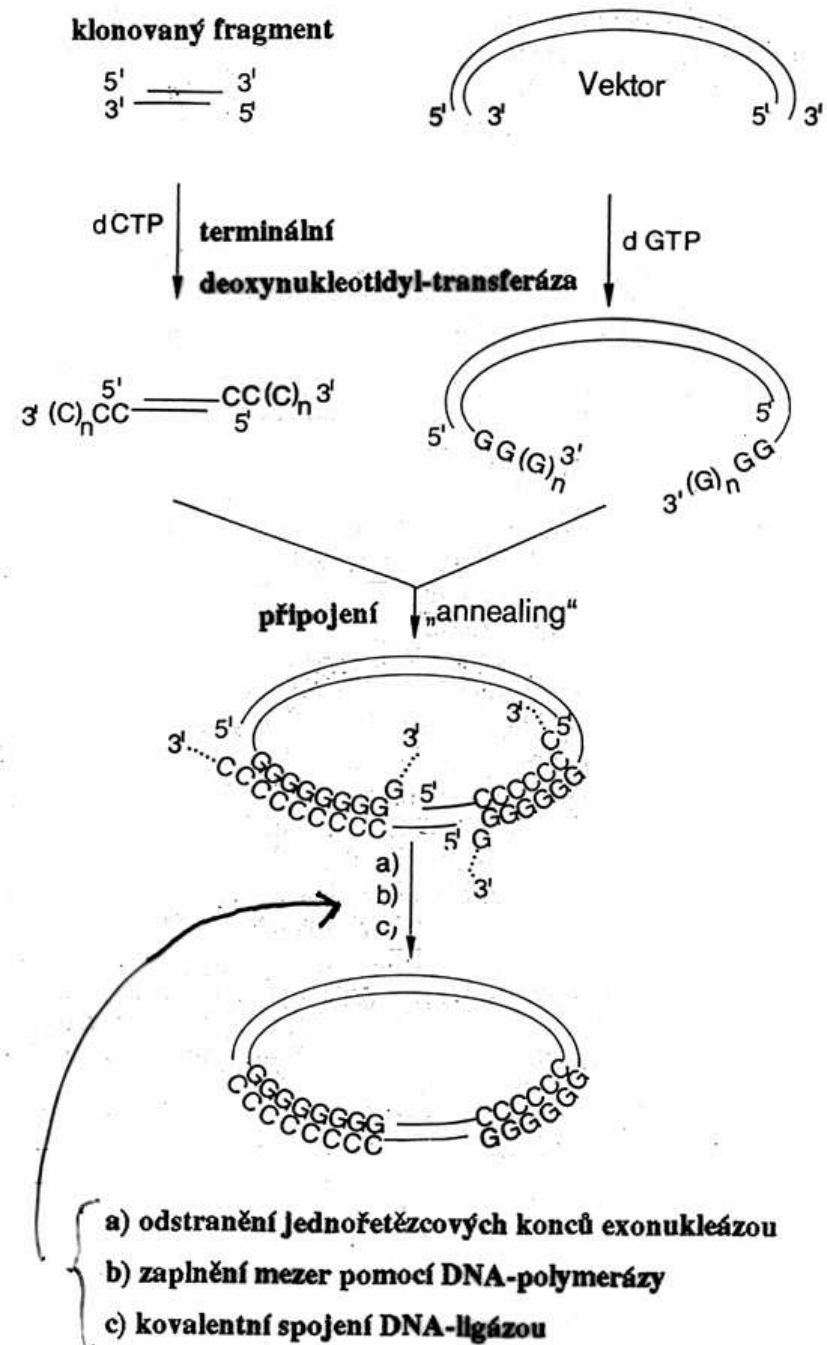
V minulosti obvyklý postup při klonování cDNA do plazmidových vektorů.

Princip: terminální transferáza se využije k přidání úseku GGG... k linearizovanému plazmidovému vektoru a k přidání úseku CCC... k cDNA. Po smísení a inkubaci obou molekul dojde k vazbě komplementárních úseků a tím k včlenění cDNA do vektoru, který se pak použije k transformaci *E. coli*.

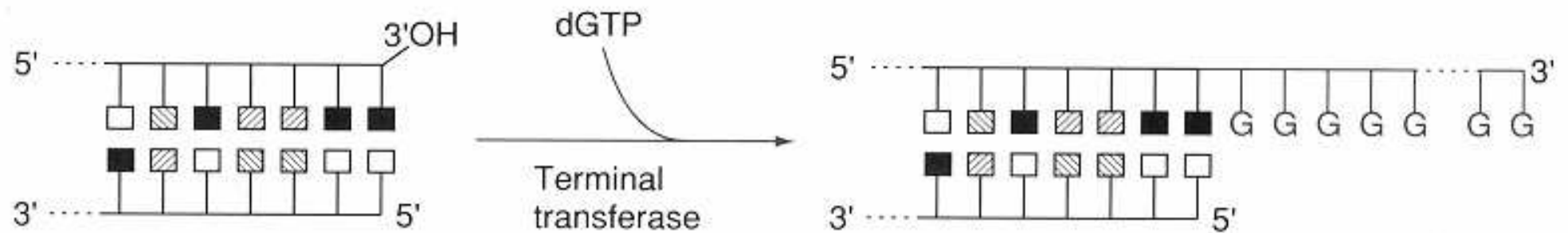


Výhody terminální transferázy

- velikost připojených úseků nemusí být stejná (pokud se jedná o úseky větší než 20 nukleotidů, jejich párování je dostatečně silné, aby zajistilo stabilitu duplexu v pokojové teplotě)
- v transformovaných buňkách se nespárované oblasti opraví reparačními mechanismy



Terminální transferáza upravuje i nepřechánvající 3' konce dvouřetězcové DNA



Zpětná (reverzní) transkriptáza

- RNA-dependentní DNA polymeráza
- přepis genetické informace z RNA do DNA
- požadována přítomnost primeru a matrice
- poskytuje v první fázi hybrid RNA/DNA, po odstranění RNA působením hydroxidů nebo RNázy H lze zpětnou transkriptázou katalyzovat i syntézu druhého vlákna DNA
- syntézu 2. vlákna může zajistit také DNA polymeráza I

Zdroj: retroviry

M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus)

AMV (Avian Myeloblastosis Virus)

RSV (Rous Sarcoma Virus)



Zpětná (reverzní) transkriptáza

Aktivity:

- **Polymerázová:** v životním cyklu retrovirů se uplatňuje pouze při kopírování RNA, v laboratorii lze využít pro transkripci jednořetězcové RNA i jednořetězcové DNA. V obou případech je pro iniciaci syntézy nutná přítomnost primeru.
- 5' → 3' exoribonukleázová
- 3' → 5' exoribonukleázová a endoribonukleázová (RNáza H): zajišťuje degradaci RNA z hybridů RNA-DNA, které vznikají při zpětné transkripci.

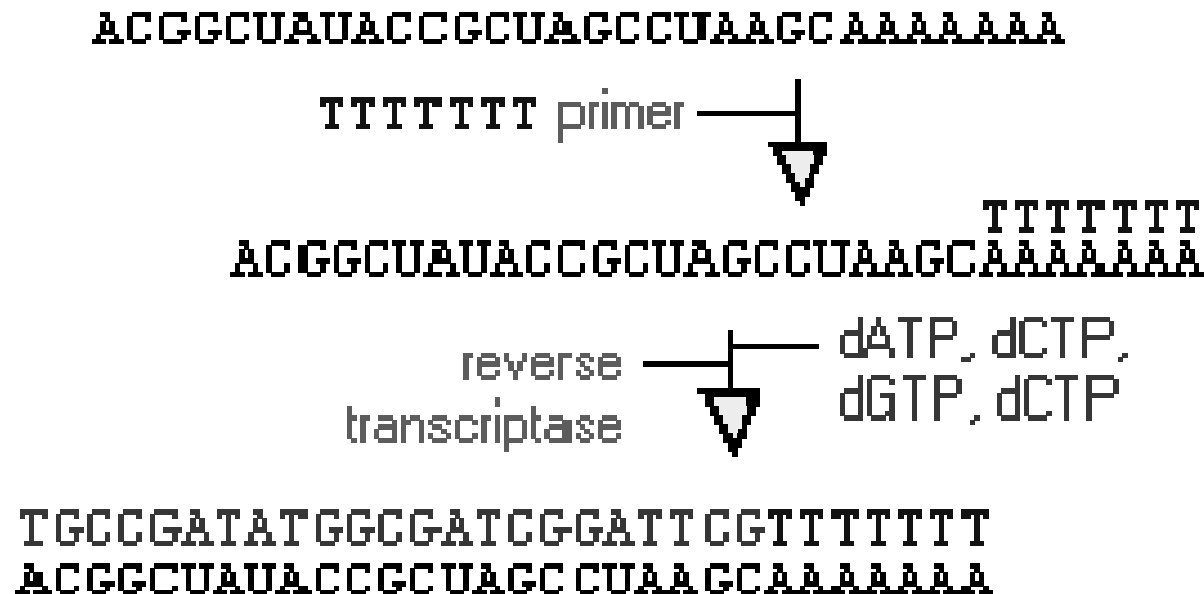
Využití:

tvorba cDNA

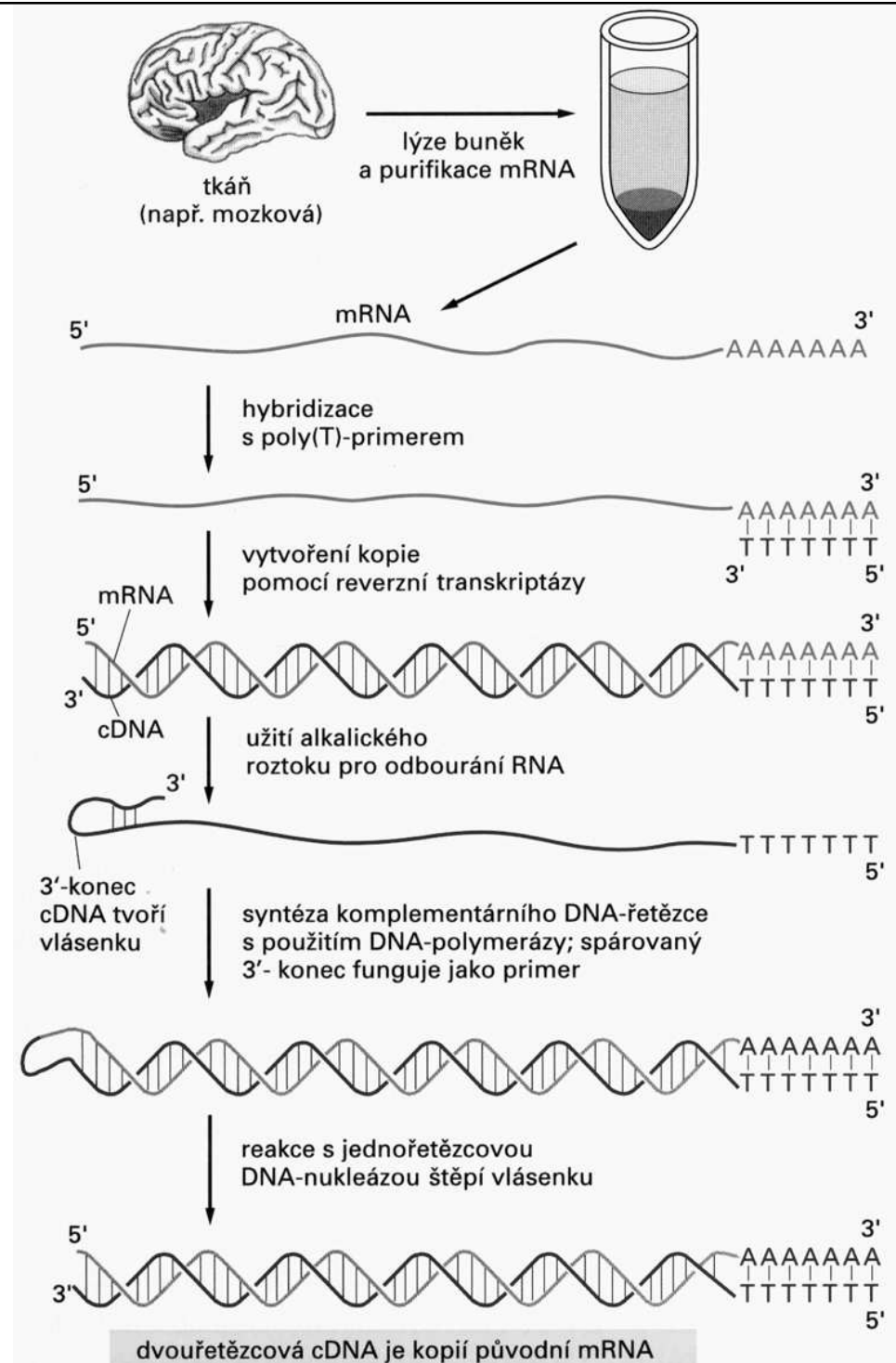
- specifická (primer: oligo dT)
- nespecifická (primer: komplementární k 3' oblasti hledané mRNA)

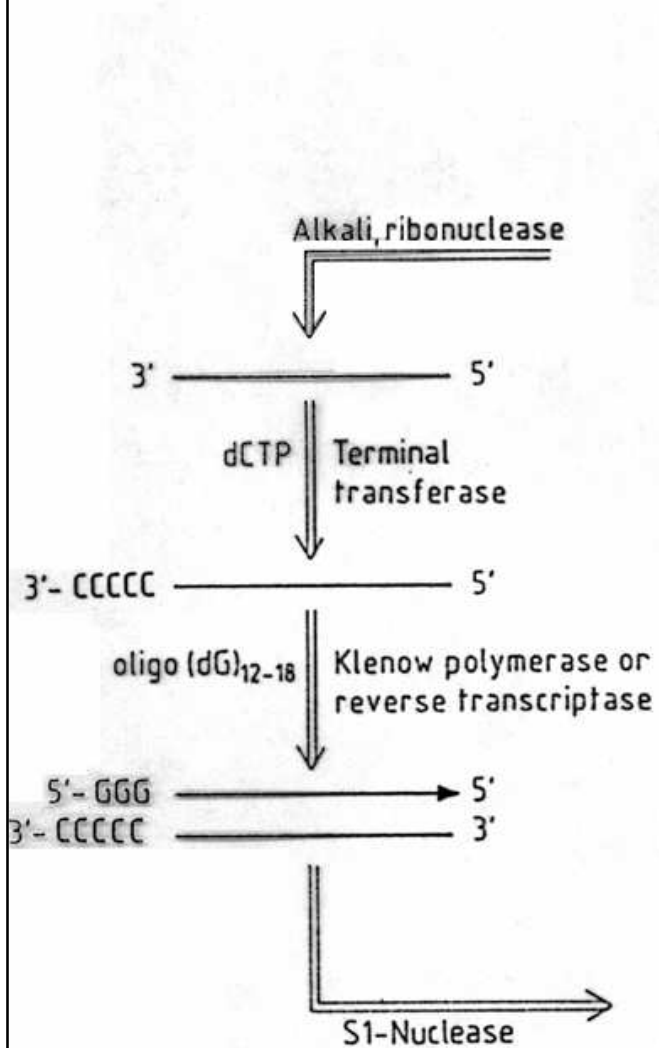
Využití zpětné transkriptázy

Syntéza cDNA: inkubace mRNA s krátkým (12-18 bází) polymerem tymidinu (oligo dT), který se váže na polyA mRNA a zpětná transkriptáza jej využije jako primer pro iniciaci syntézy prvního řetězce.

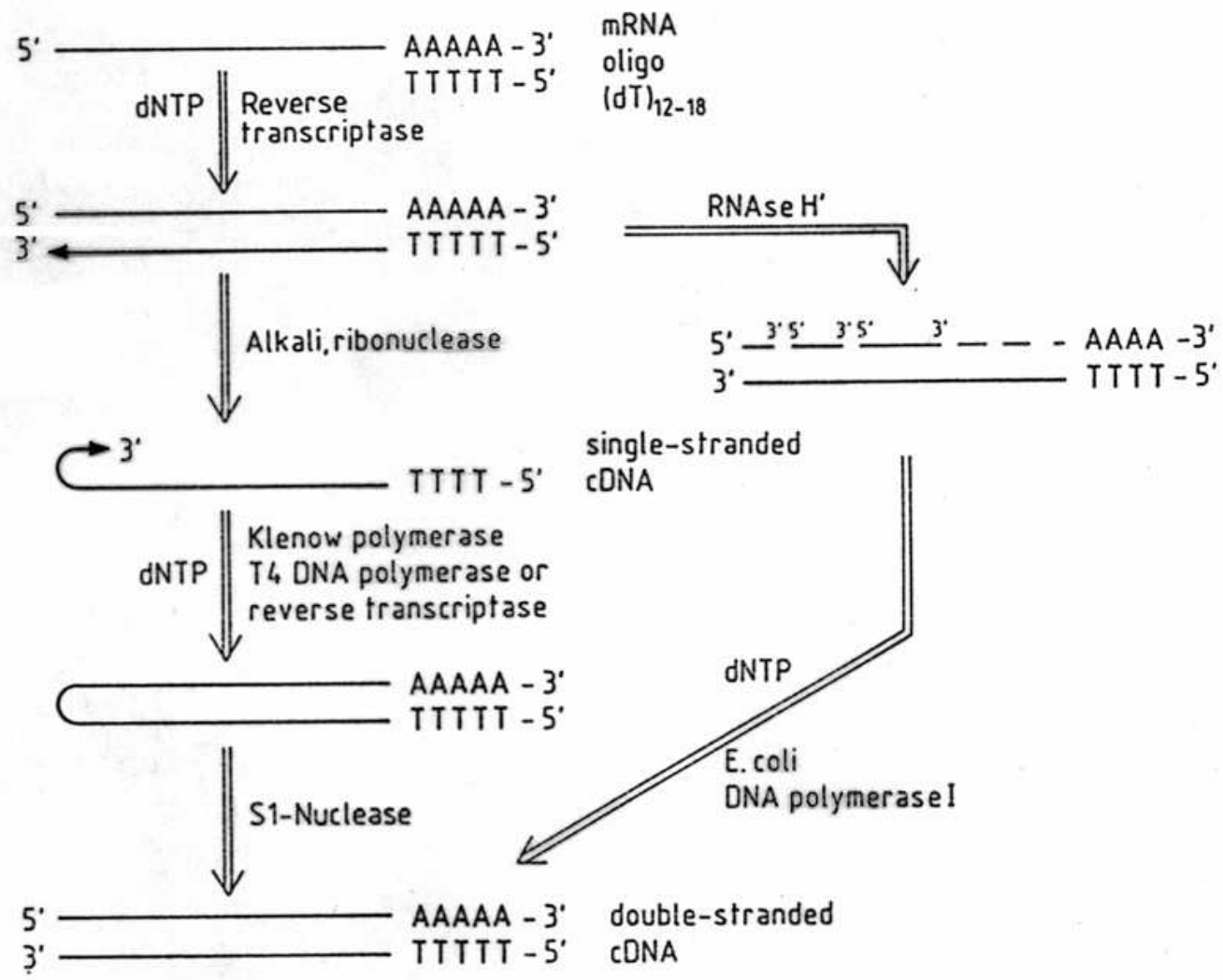


Syntéza cDNA

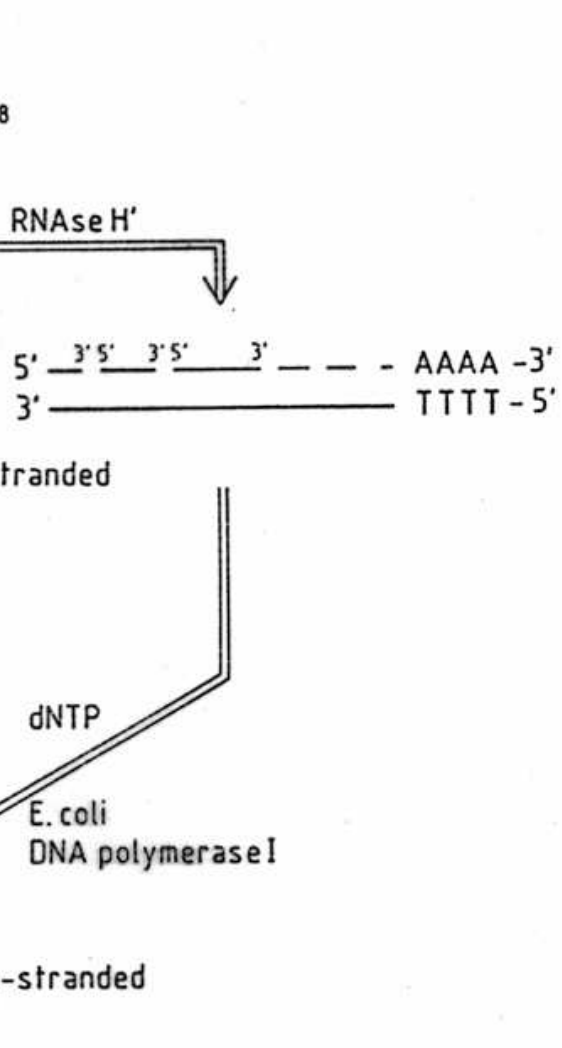




A



B



C

Bakteriofágové RNA polymerázy

RNA polymeráza	Hostitel fága	Promotorová sekvence
T7 RNA polymeráza	<i>E. coli</i>	TAATACGACTCACT ATAGGG
T3 RNA polymeráza	<i>E. coli</i>	AATTAACCCTCACT AAAGGG
SP6 RNA polymeráza	<i>Salmonella typhimurium</i>	AATTTAGGTGACA CTATAGAA

Bakteriofágové DNA-dependentní RNA polymerázy

Obvyklé využití:

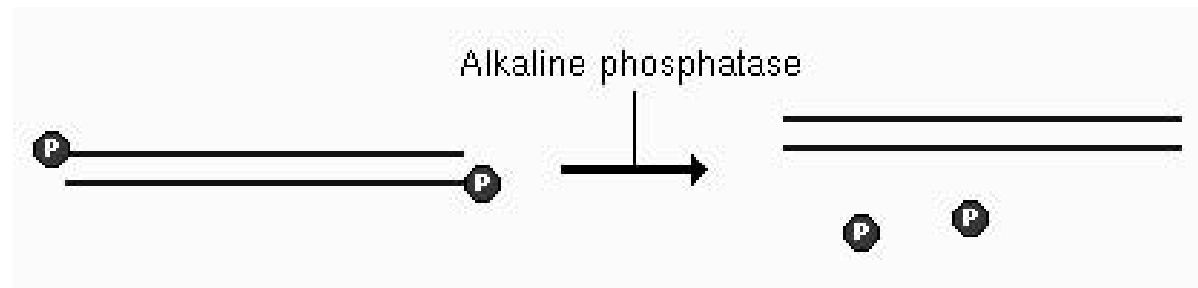
1. transkripce *in vitro* pro tvorbu definovaných RNA
 - značené ribonukleotidy se použijí k tvorbě značené RNA
 - značená RNA se využije jako sonda při hybridizaci
2. Příprava templátu pro translaci *in vitro*
3. Studium struktury a funkce RNA

Enzymy modifikující DNA

Fosfatázy, kinázy, metylázy,

Alkalická fosfatáza

- odstraňuje fosfátové zbytky z 5' konců DNA, RNA a oligonukleotidů (hydrolyza fosfomonoesterových vazeb) při alkalickém pH
- defosforyluje také zbytky serinu, treoninu a tyrosinu v proteinech



Alkalická fosfatáza

Zdroj:

- *E. coli* (**BAP**)
- hovězí střevo (**CIP**)

BAP je velmi aktivní enzym, je obtížné dosáhnout jeho včasné inaktivace

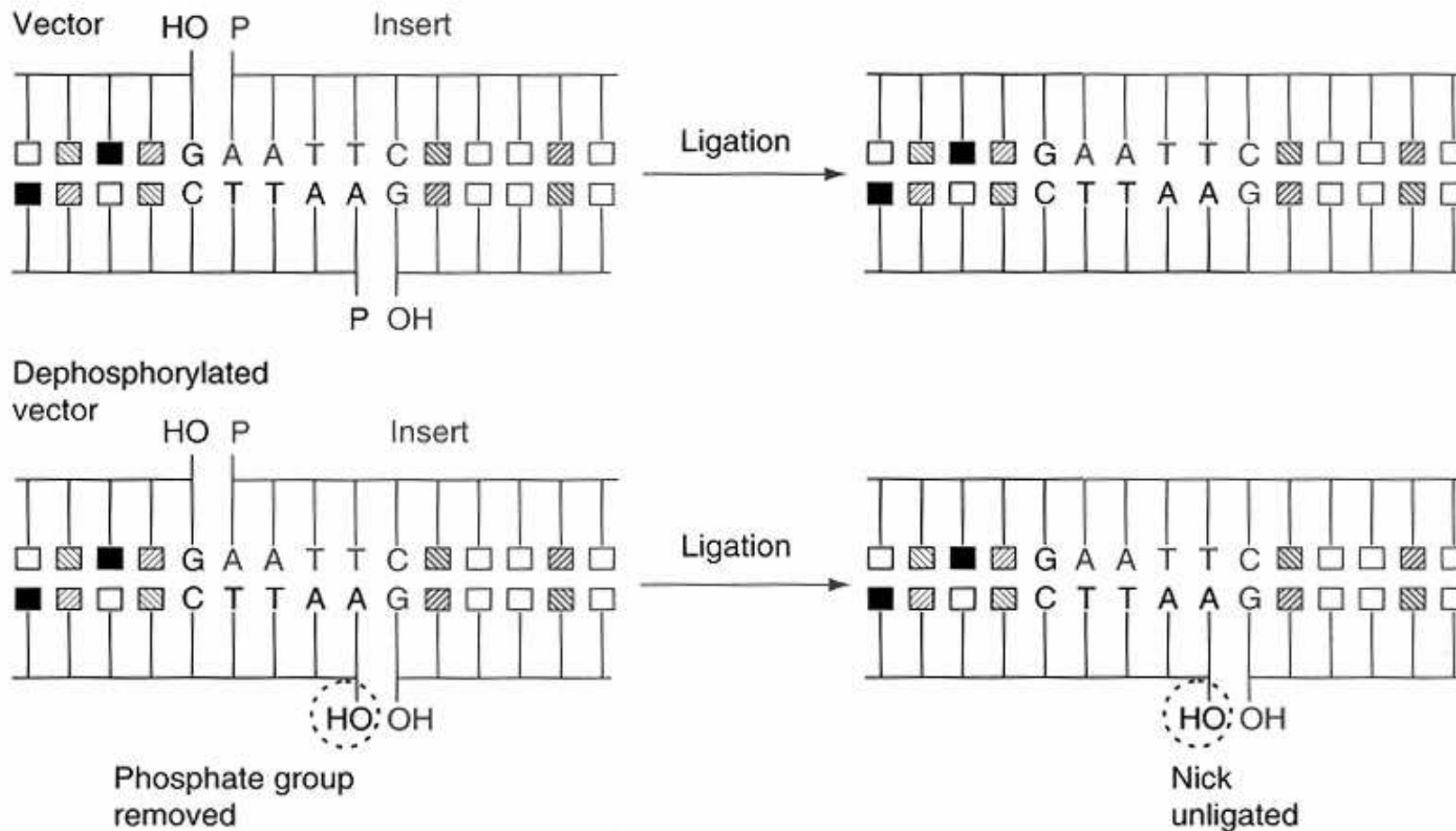
CIP se používá nejčastěji: je sice méně aktivní než **BAP**, ale lze ji účinně inaktivovat proteázovou hydrolýzou nebo zahřátím

Alkalická fosfatáza

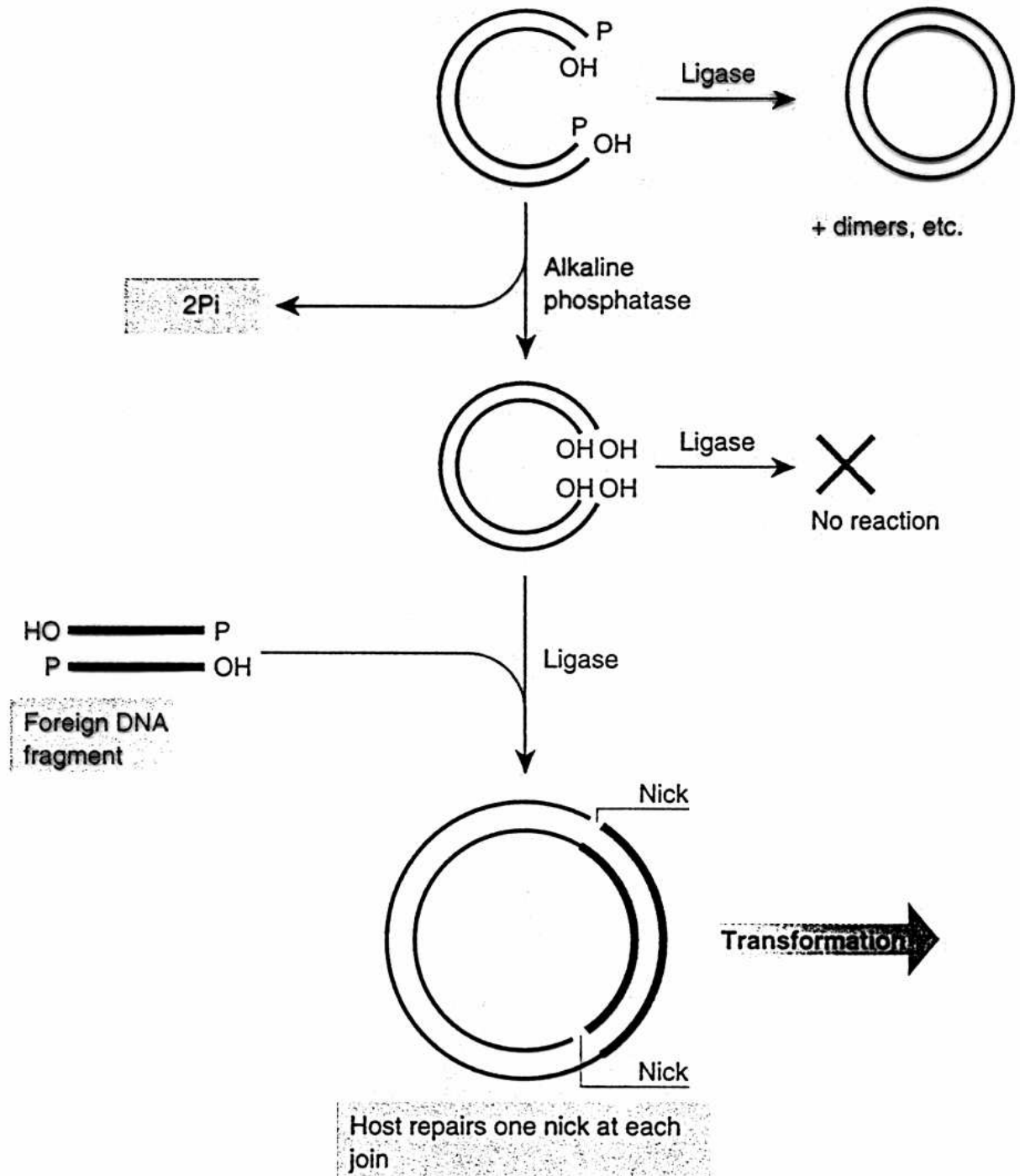
Využití:

- restrikční fragmenty DNA zbavené koncových fosfátů nemohou být spojeny ligací (zabránění recirkularizace prázdných vektorů, **usnadnění klonování**)
- **značení DNA ^{32}P** v kombinaci s kinázou: odstranění 5' fosfátů z fragmentů DNA před značením radioaktivním fosfátem
- **defosforylace proteinů**

Význam defosforylace DNA pro ligaci



Použití alkalické fosfatázy při klonování



Polynukleotid kináza T4

Funkce:

- katalyzuje přenos P z γ ATP na 5' OH skupinu polynukleotidů (dvou- a jedno-řetězcová DNA a RNA) a nukleosid 3' monofosfátů (resyntéza fosfomonoesterových vazeb za spotřeby ATP)
- Má i fosfatázovou aktivitu a proto může katalyzovat výměnu fosfátových skupin na 5' konci (využití pro značení fragmentů nukleových kyselin na 5' koncích pomocí ^{32}P).

Zdroj:

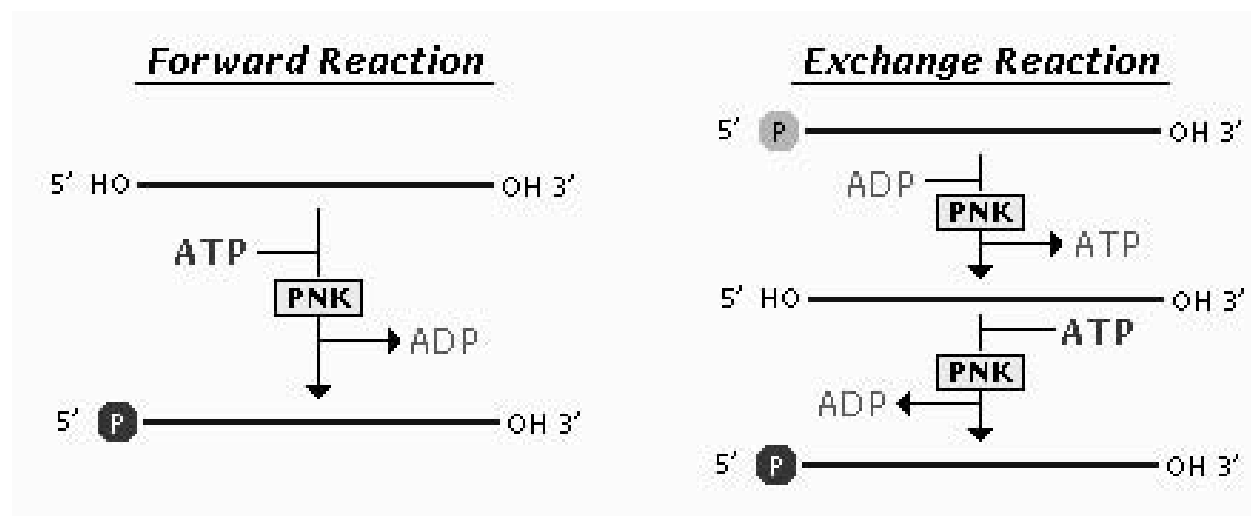
- bakterie *E. coli* infikované fágem T4, komerční preparáty jsou obvykle produkty bakteriální exprese

Polynukleotid kináza T4

Enzymová aktivita se využívá ve dvou typech reakcí:

1. "forward reaction", - přenos fosfátu γ z ATP na 5' konec DNA nebo RNA. Cílový polynukleotid nemá 5' fosfát proto, že byl defosforylován nebo tak byl chemicky syntetizován.

2. "exchange reaction", cílová DNA nebo RNA, která nese 5' fosfát je inkubována v nadbytku ADP. Za těchto podmínek PNK nejprve přenáší fosfát z nukleové kyseliny na ADP za vzniku ATP a defosforylované cílové molekuly. Následně PNK běžnou reakcí „forward“ přenesse fosfát z ATP na cílovou NK.



Polynukleotid kináza T4

Využití:

- značení 5' konců DNA nebo RNA ^{32}P pro přípravu hybridizačních sond a sekvenování DNA
- přidání 5' P k oligonukleotidům (např. linkerům a adaptérům) a fragmentům DNA pro umožnění jejich ligace nebo amplifikace PCR)
- odstranění 3' fosforylových skupin

Další enzymy používané v genovém inženýrství

Proteinázy:

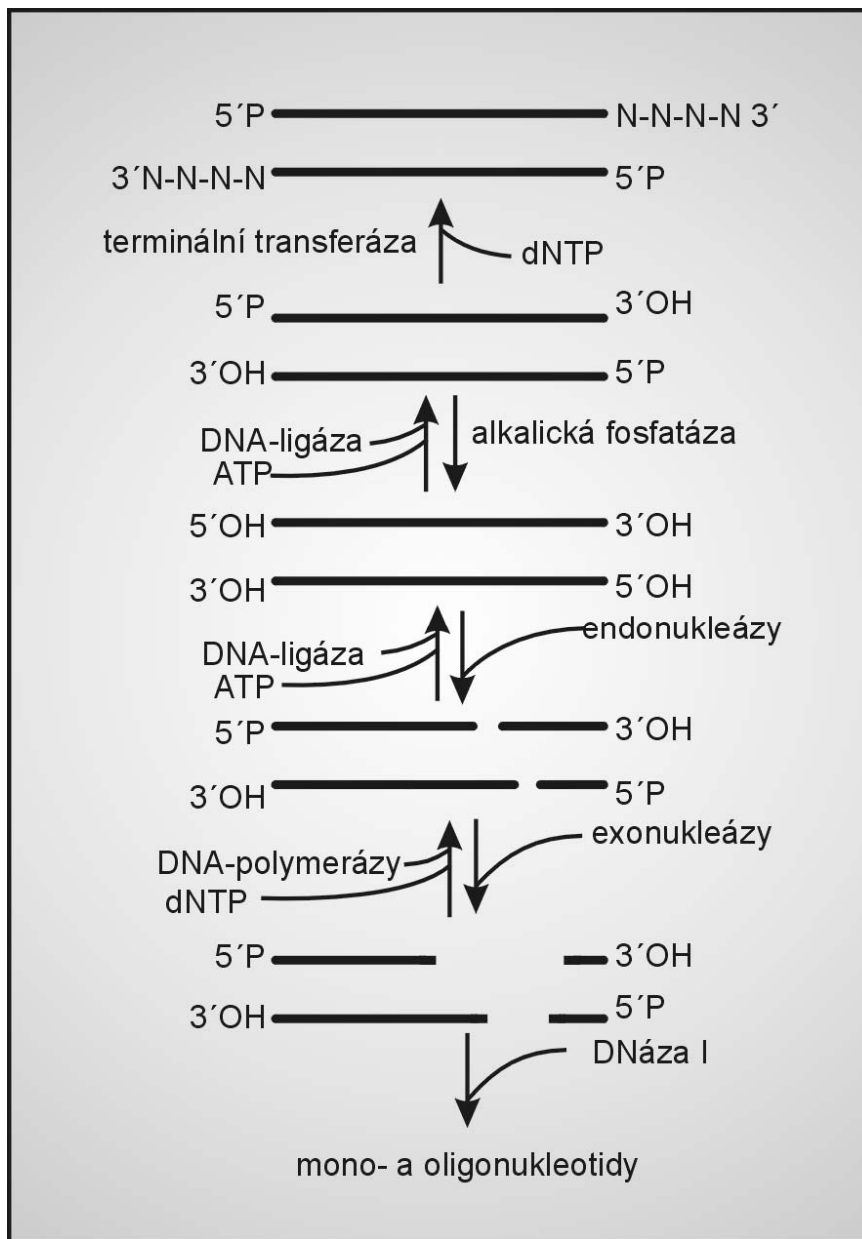
Pronáza

- enzym používaný k rozkladu proteinů při purifikaci nukleových kyselin, k odstranění nukleázových aktivit při izolaci DNA

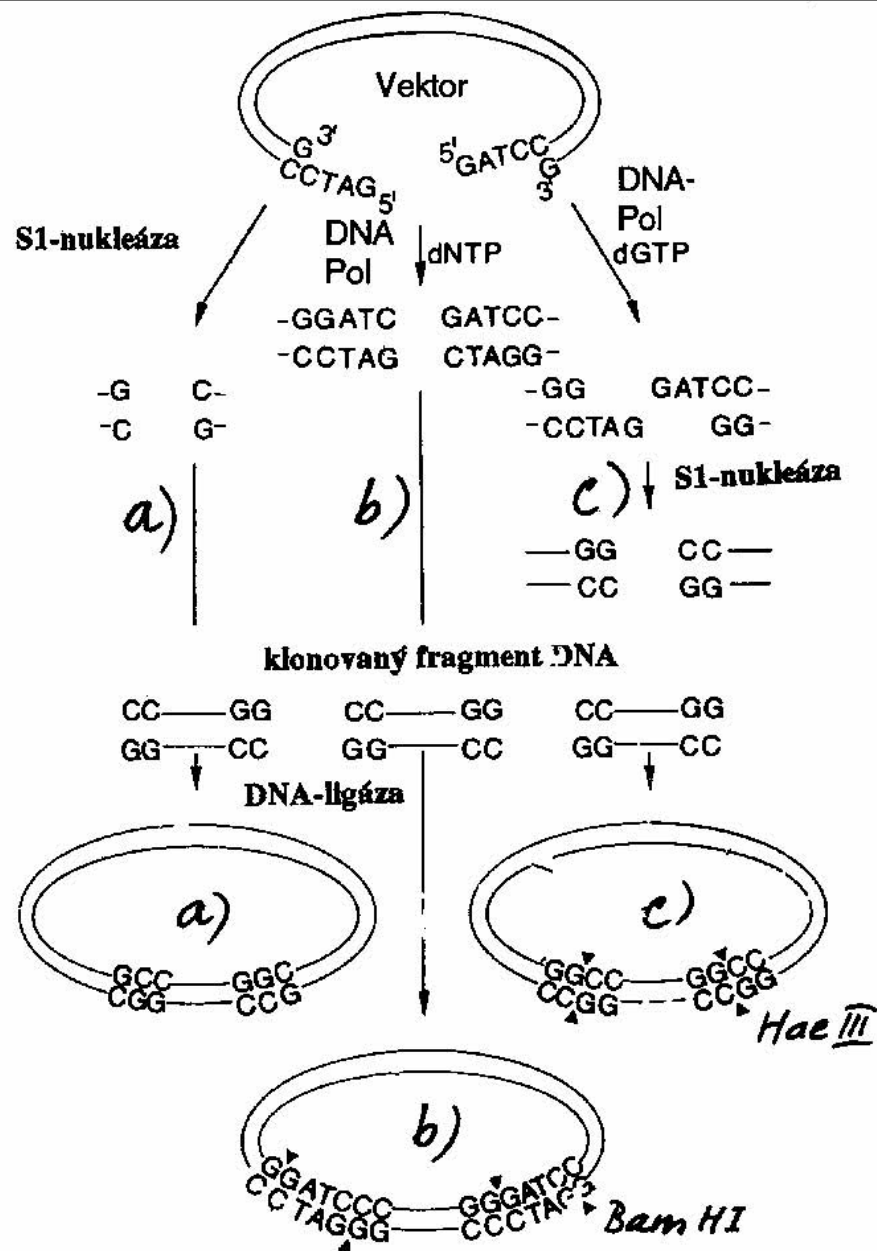
Lysozym (muramidáza)

- enzym používaný pro lýzu buněk

Působení enzymů používaných při manipulaci s DNA



Přestavba restrikčního místa *Bam*HI



Jednořetězcové přesahující konce lze:
 a) odstranit (hydrolyzovat),
 b) zaplnit
 c) nebo částečně doplnit.

Aliž dojde ke změně struktury klonovaného fragmentu, je restrikční místo pro *Bam*HI buď
 a) odstraněno
 b) regenerováno
 c) nebo změněno

Způsoby modifikace konců DNA

