

Restrikční mapování DNA genomu

Restrikční mapování je postup, podle kterého probíhá sestavování restrikční mapy genomu.

Restrikční mapa je formou fyzikální mapy DNA, schematicky znázorňující polohy restrikčních míst na její molekule. Vzdálenosti mezi jednotlivými místy se udávají v počtech nukleotidů.

Restrikčním místem rozumíme sekvenci, ve které probíhá štěpení dvouřetězcové DNA katalyzované restriktázou.

Význam restrikčního mapování. Konstrukce restrikčních map je základním krokem při charakterizaci DNA, výchozím bodem sekvencovacích technik a genově inženýrských postupů a navíc jednou z nejdůležitějších metod genetické analýzy, která dovoluje zaznamenat různé změny v DNA, neboť restrikční místo může hrát důležitou úlohu genetické značky. Restrikční mapy umožňují srovnávat jednotlivé oblasti DNA u různých jedinců nebo příbuzných organismů, aniž by bylo nutné přesně stanovit jejich sekvence. Lze pomocí nich snadno nalézt polymorfizmy v sekvencích genomové DNA způsobené mutacemi, jejichž základem je substituce, delece nebo velikosti fragmentu DNA mezi dvěma sousedními restrikčními místy. Běžně používanou metodou pro separaci a určení velikosti restrikčních fragmentů je elektroforéza v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Velikost neznámého fragmentu se stanovuje porovnáním dráhy, kterou urazil, s drahami, které za stejných podmínek urazily fragmenty o známých velikostech. Pro určení polohy restrikčních míst nestačí pouze zjistit velikost fragmentů, které vznikly po úplném rozštěpení analyzované molekuly DNA určitou restriktázou, ale je nezbytné určit i jejich sled.

Výchozím materiálem pro mapování může být izolovaná genomová DNA nebo její fragmenty naklonované do vektoru. V závislosti na velikosti DNA se k restrikčnímu mapování používá několik různých postupů, které lze vzájemně kombinovat. Nejčastěji používaná metoda pro zjištění pořadí fragmentů je založena na hledání překryvů mezi fragmenty vzniklými účinkem dvou, popřípadě více restriktáz. Princip postupu si předvedeme na jednoduchém příkladu. Máme vzorek DNA skládající se ze stejných molekul, jejichž délka je 5 000 bp.

Po úplném štěpení restriktázou:

A vznikly fragmenty (bp): A1 (2 200) A2 (1400) A3 (900) a A4 (500).

B vznikly fragmenty (bp): B1 (2 500) B2 (1 300) a B3 (1 200).

Obě restriktázy použité současně, dávaly fragmenty (bp): 300, 500, 600, 800, 900 a 1900.

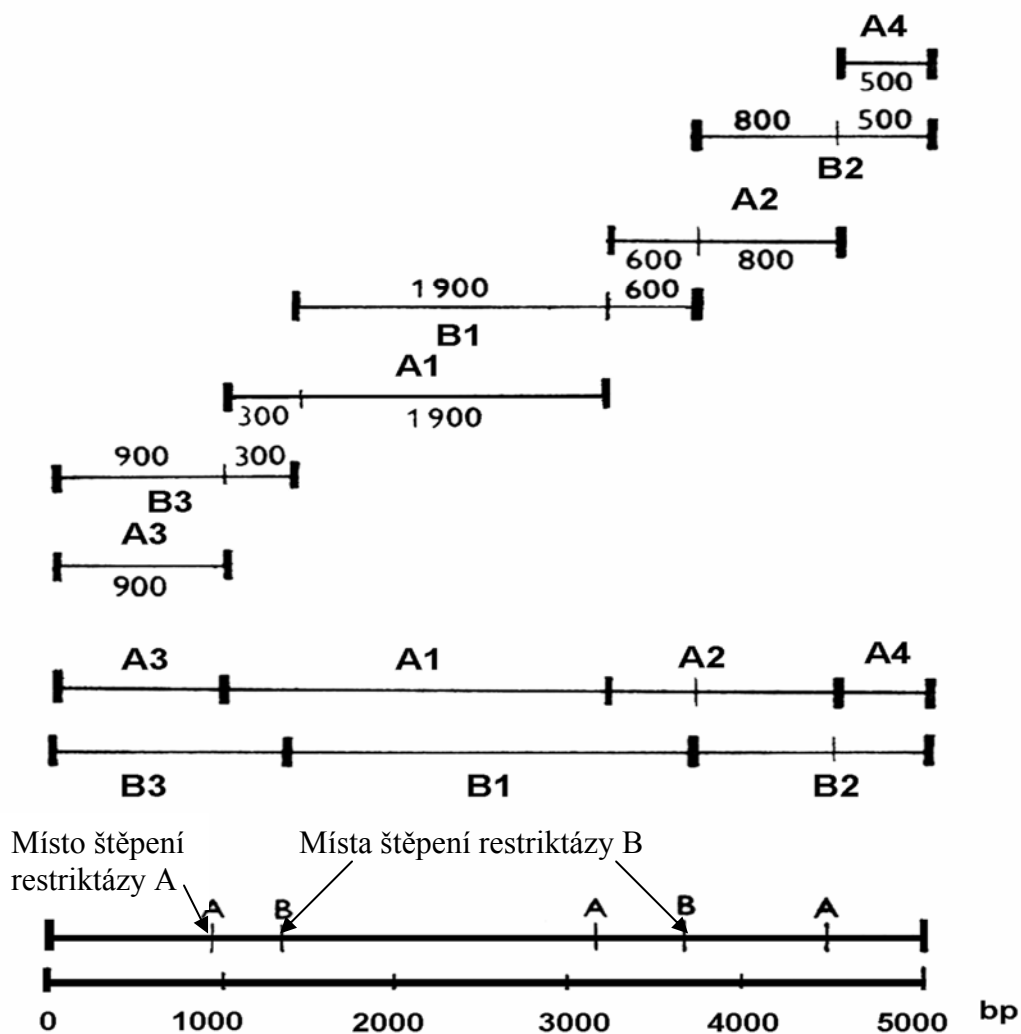
Jednotlivé fragmenty získané účinkem první restriktázy lze separovat a podrobit je v nezávislých pokusech náhodnému štěpení druhou restriktázou a naopak. Je zřejmé, že analyzovaná molekula sestává ze čtyř restrikčních fragmentů typu A neboli obsahuje tři restrikční místa štěpená restriktázou A. Původní molekula obsahuje $3 - 1 = 2$ restrikční místa pro restriktázu B a jejím štěpením vznikly tři fragmenty. Celkový počet restrikčních míst pro obě restriktázy je $6 - 1 = 5$. Protože restriktáza B má na molekule pouze 2 restrikční místa, mohou maximálně dva ze čtyř primárních fragmentů získaných pomocí restriktázy A dát vznik dvěma sekundárním fragmentům po následném působení restriktázy B, což se právě stalo v našem případě. Tento závěr lze s jistotou vyslovit pouze tehdy, jsme-li schopni všechny fragmenty na základě elektroforetického stanovení velikosti odlišit. **Součet zjištěných délek fragmentů po úplném štěpení restriktázou se musí rovnat délce původní molekuly DNA (v našem případě 5 000 bp).**

Určitý fragment typu A se překrývá s určitým fragmentem typu B tehdy, obsahují-li oba sekundární fragmenty stejné délky nebo je-li délka primárního fragmentu např. typu A, který se dále druhou restriktažou neštěpí, totožná s délkou sekundárního fragmentu vzniklého z primárního fragmentu typu B. První případ lze ilustrovat na příkladu primárních fragmentů A4 a B2 (obr. 1). Tyto primární fragmenty se překrývají v oblasti svých sekundárních fragmentů o délce 300 bp.

Obr. 1. Příklad mapování DNA genomu o velikosti 5000 bp pomocí restriktaž A a B.

Restriktáza	A				B		
Fragment	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3
Velikost primárního fragmentu (bp)	2200	1400	900	500	2500	1300	1200
Velikost sekundárního fragmentu (bp)	1900 300	800 600	900	500	1900 600	800 500	900 300

POSTUP KONSTRUKCE RESTRIKČNÍ MAPY



Druhý případ lze demonstrovat na fragmentech A3 a B3 (obr.1). Primární fragment A3 se restriktázou B neštěpí a je totožný se sekundárním fragmentem o délce 900 bp vzniklým účinkem restriktázy A na primární fragment B3. Protože se fragment B3 překrývá jak s fragmentem A3, tak s fragmentem A1, lze uzavřít, že fragment A3 sousedí s fragmentem A1, a to v orientaci znázorněné na obr. 1. Na základě obdobné úvahy lze do sousedství fragmentu B3 zařadit fragment B1, který se překrývá s fragmentem A1 svým sekundárním fragmentem 1 900 bp vzniklým štěpením restriktázou A. Vedle restriktu A1 leží A2 překrývající se s fragmentem 600 bp B1 a vedle B1 leží B2 překrývající se s A2 fragmentem 800 bp. Sekvenci fragmentů typu A uzavírá koncový fragment A4 (500 bp) překrývající se s fragmentem B2 (500 bp). Na základě tohoto seřazení fragmentů lze sestavit restriktční mapu pro restriktční místa typu A i B. V uvedeném případě bylo postupné přiřazování v každém kroku jednoznačné. To ale nemusí platit obecně. V nejednoznačných případech je třeba použít buď další restriktázy, nebo pomocnou metodu založenou na jiném principu. V některých případech lze správné řazení fragmentů určit i na základě štěpení jedinou restriktční endonukleázou. Porovnává se velikost fragmentů po úplném a částečném štěpení analyzovaných molekul DNA. Např. po částečném štěpení již dříve popsané molekuly restriktázou B vzniknou navíc fragmenty o délce 3 700 bp a 3 800 bp, což znamená, že fragment B1 musí na jedné straně sousedit s B3 a na druhé straně s B2, neboť $B1 + B3 = 2\,500 + 1\,200 = 3\,700$ bp a $B1 + B2 = 2\,500 + 1\,300 = 3\,800$ bp.

Konstrukce restriktční mapy

1. Izolace DNA
2. Rozdělení vzorku na 2 části. První část štěpíme restriktční endonukleázou A, druhou část štěpíme restriktční endonukleázou B.
3. Separace vzniklých restriktčních fragmentů na agarózovém gelu pomocí elektroforézy.
 - Každý pruh na gelu odpovídá fragmentu o určité velikosti. Čím kratší fragment, tím rychleji se pohybuje.
 - Velikost fragmentů lze stanovit podle standardu.
 - Součet délek fragmentů udává celkovou velikost (v bp).
4. Po osvětlení UV světlem zjistíme polohu fragmentů a izolujeme je (každý zvlášť).
5. Izolované fragmenty podrobíme následnému štěpení druhou restriktázou.
6. Na základě překrývání primárních restriktčních fragmentů v oblasti sekundárních fragmentů sestavíme restriktční mapu.

Pro konstrukci restrikční mapy DNA, jejíž velikost se pohybuje řádově v jednotkách kilobází, se používá některá z následujících metod:

- 1. Štěpení DNA dvěma nebo více restriktázami a vyhledávání překrývajících se restrikčních fragmentů (obr. 1). Postup je vhodný v případech, kdy celkový počet restrikčních míst na molekule DNA není příliš vysoký. DNA se štěpí nejdříve každým enzymem samostatně a dále pak vždy dvěma enzymy současně. Stanoví se velikosti vytvořených fragmentů v každém ze štěpení a srovnáním jejich délek se určí polohy restrikčních míst pro každý enzym. Lze postupovat rovněž tak, že fragmenty vzniklé štěpením jednoho enzymu jsou odděleny a po izolaci z gelu štěpeny dalším enzymem.
- 2. Částečné štěpení DNA a separace fragmentů vytvořených elektroforézou. Oddělené fragmenty jsou jednotlivě izolovány z gelu, doštěpeny stejnou restrikční endonukleázou a vzniklé subfragmenty znovu separovány. Soubory vzniklých subfragmentů jsou pak přiřazeny k prvotním fragmentům.
- 3. Částečné štěpení DNA radioaktivně značené na jednom z konců, elektroforetická separace vytvořených fragmentů a odečtení jejich délek z autoradiogramu. Délky vytvořených fragmentů odpovídají přímovzdálenostem restrikčních míst použitého enzymu od značeného konce výchozí molekuly DNA. Tento postup je vhodný u větších molekul, které enzym štěpí na více místech.