

# **Fragmentace molekul DNA, restriční enzymy**

**doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.**

**bartosm@vfu.cz**

**Přírodovědecká fakulta MU, 2013**

# *Obsah přednášky*

- 1) Definice restrikčních endonukleáz, jejich přirozená funkce
- 2) Typy restrikčních endonukleáz
- 3) Restrikční místa pro restriktázy typu II
- 4) Rozložení restrikčních míst na genomu
- 5) Využití restriktáz k mapování
- 6) Využití restriktáz v diagnostice mikroorganismů

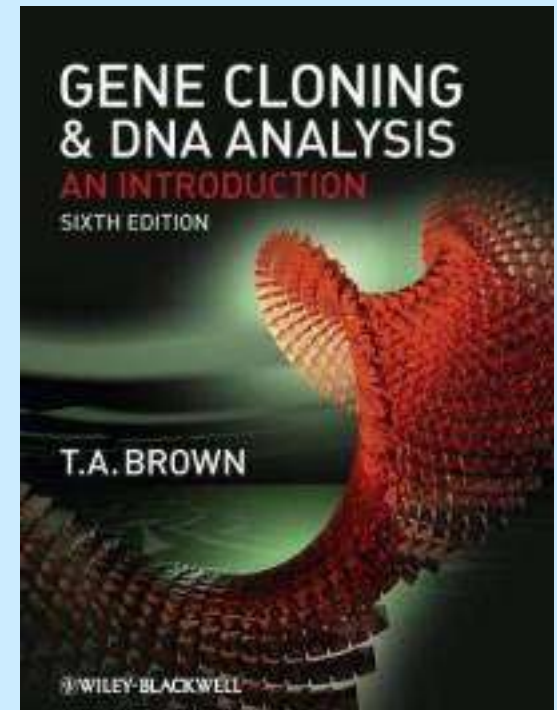




## *Doporučená literatura*

**Brown (2010): Gene Cloning & DNA Analysis. Wiley-Blackwell, Sixth edition**

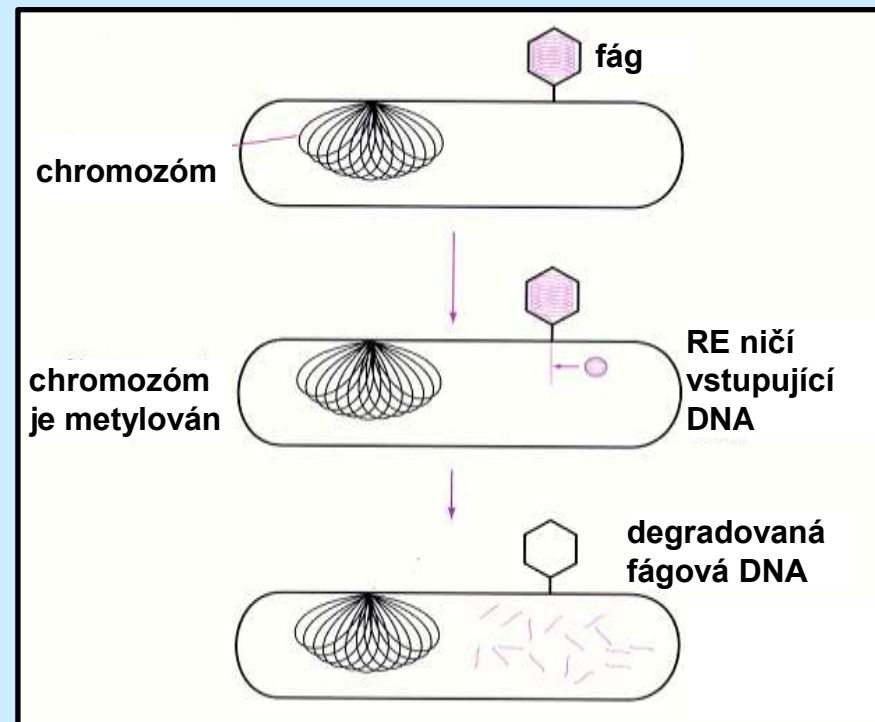
**katalog firmy New England Biolabs, USA, [www.neb.com](http://www.neb.com)**



# Co to jsou restriční endonukleázy

Enzymy, které štěpí dsDNA ve specifických místech, specifických sekvencích

- součást **restričně modifikačních** systémů bakterií
- omezují propagaci bakteriofágů v různých bakteriálních kmenech
- DNA hostitelské buňky je před účinkem vlastní RE chráněna metylací
- původní význam RE: **ochrana** před cizorodým genetickým materiálem



# *A jak se brání bakterie proti RNA fágům?*



**Prý existuje něco jako eukaryotický siRNA mechanismus, u bakterií tomu ale říkají CRISPR**



**Navštivte přednášky z  
Molekulární biologie, kde se o  
siRNA a CRISPR systémech  
hovoří**



- 1) **Brouns et al. (2008): Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes, Science 321, 960-964**
- 2) **Horvath et al., Science 327, 167-170 (2010)**

# *Dělení restričních endonukleáz*

- Typ I** - rozpoznávají specifickou sekvenci, štěpí v nahodilém místě
- Typ II** - přísně specifické, rozpoznávají a štěpí sekvence s rotační symetrií (palindrom)
- Typ III** - rozpoznávají nesymetrické sekvence a štěpí v jiném místě v definované vzdálenosti
- Typ IV** - štěpí mimo rozpoznávanou sekvenci, která musí být modifikována

# ***Restriktázy typu I***

**Rozpoznávají specifickou sekvenci, štěpí v nahodilém místě**

***EcoK, EcoB***

- **vážou se na specifické nukleotidové sekvence**
- **katalyzují náhodné štěpení v místech vzdálených až několik 1 000 bp od místa vazby**
- **molekulová hmotnost dosahuje cca 300 000**
- **zajišťují modifikaci (metylace) i štěpení DNA**
- **vyžadují kofaktory: ATP, Mg<sup>2+</sup> a S-adenosylmetionin**
- **jsou nevhodné pro analýzu sekvencí DNA nebo genové inženýrství**

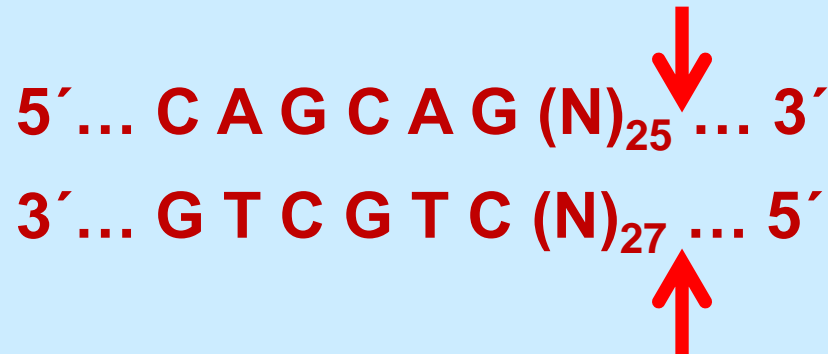


# *Restriktázy typu III*

Rozpoznávají dvě nepalidromatické sekvence  
inverzně orientované

## *EcoP15*

- Rozpoznávají sekvence dlouhé 5-6 nukleotidů
- Štěpí 20-30 bp za místem rozpoznání
- Obsahují dvě proteinové podjednotky
- Vyžadují kofaktory: AdoMet a ATP
- Metylují jen jeden z řetězců dsDNA v pozici N-6 adenosinu



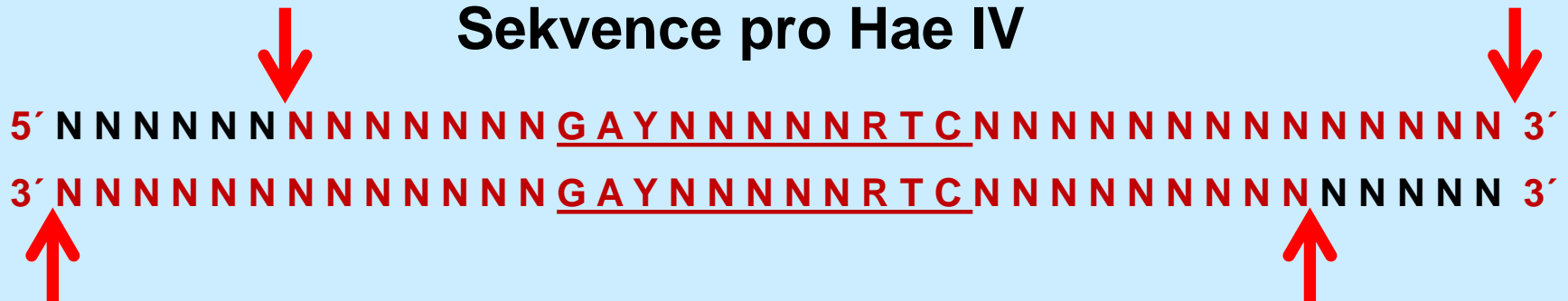
# Restriktázy typu IV

Štěpí metylované sekvence mimo  
rozpoznávané místo

*Eco57I, Bce83I, HaeIV, Mmel, BspLU11III, BseM II*

- mají obě funkce – methyltransferázovou i restriktázovou
- kofaktorem je AdoMet (S-adenosyl-L-metionin)
- kofaktorem není ATP

Sekvence pro Hae IV



# ***Restriktázy typu II***

## **Rozpoznávají palindromy a štěpí ve stejném místě**

- **vážou se na specifické (4-8 bp) sekvence nukleotidů**
- **katalyzují štěpení obou řetězců molekuly DNA uvnitř vazebného místa nebo v jeho bezprostředním sousedství**
- **štěpení se podrobují všechna cílová místa v dané molekule DNA**
- **molekulová hmotnost: 20 000 až 100 000**
- **kofaktor: pouze ATP**

# *Jak vypadá palindrom?*



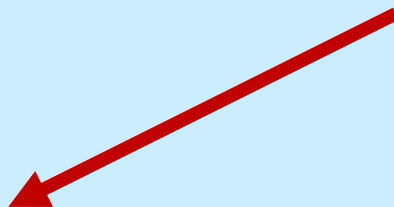
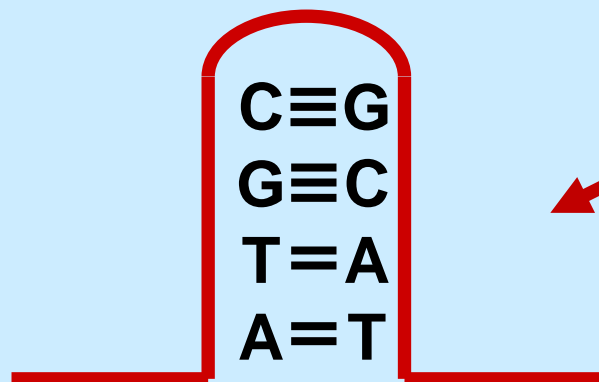
Přilehlá obrácená repetice

5' ..... **ATGC**/GCAT ..... 3'

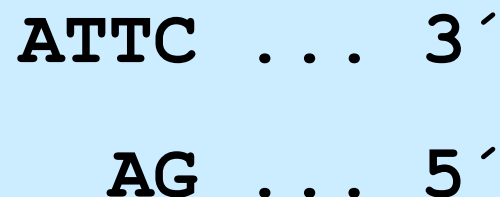
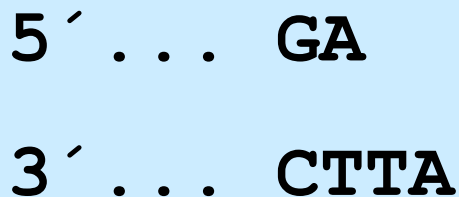
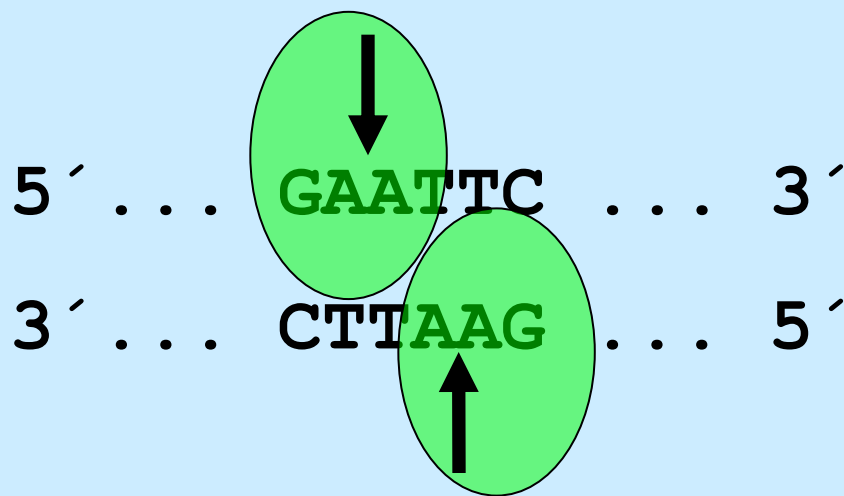
3' ..... TACG/**CGTA** ..... 5'

Vlášenska

ATGCGCAT



# *Jak funguje RE typu II*



Je známo přes 3 500 RE, rozpoznávají asi 160 různých sekvencí

# *Rozřezání genomu endonukleázami*



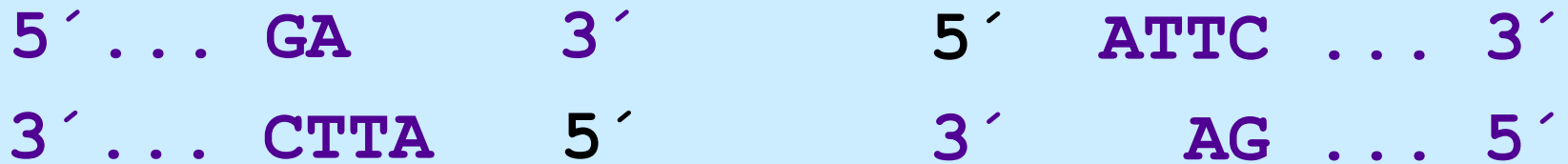
**dsDNA**



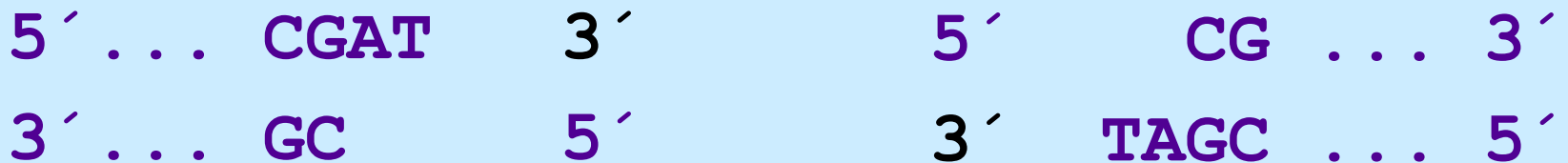
**Restrikční fragmenty**

# Různé typy konců

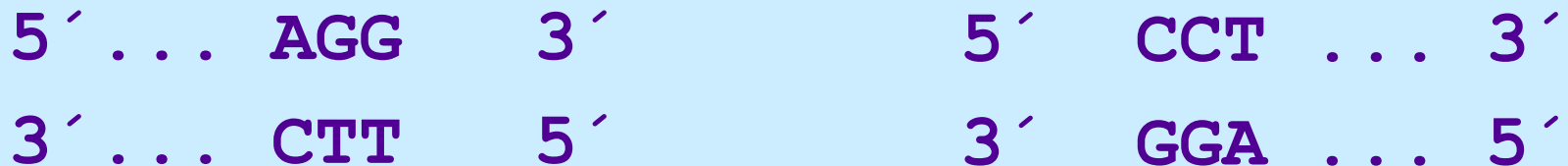
lepivé (kohezní) úseky přecházející na 5'- koncích, **EcoR I**



lepivé (kohezní) úseky přecházející na 3'- koncích, **Pvu II**



zarovnané (tupé) konce, **Stu I**



## Podívejte se na animace

<http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/animations.html>



[http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072437316/student\\_view0/chapter16/animations.html](http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072437316/student_view0/chapter16/animations.html)

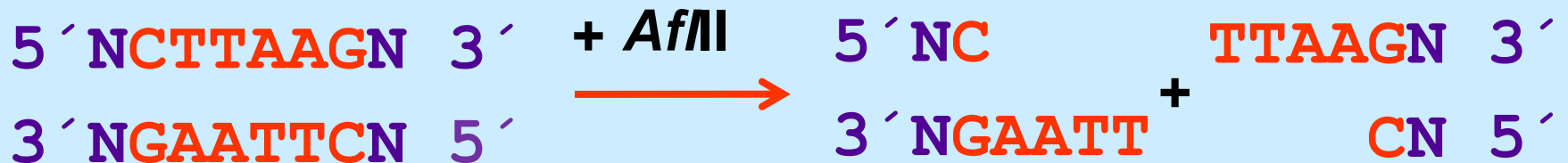
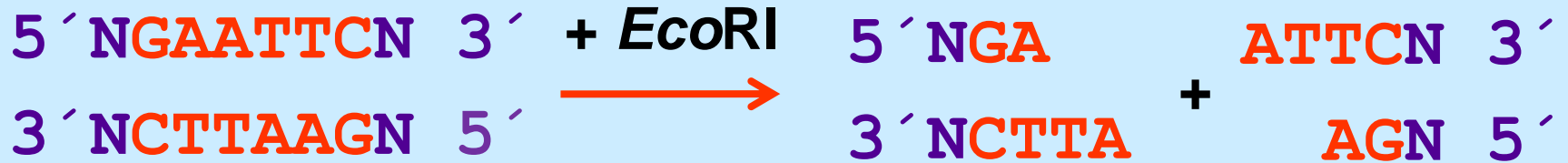


**Nebo si vyžádejte staženou prezentaci**

**Existuje i procvičovací pps soubor**



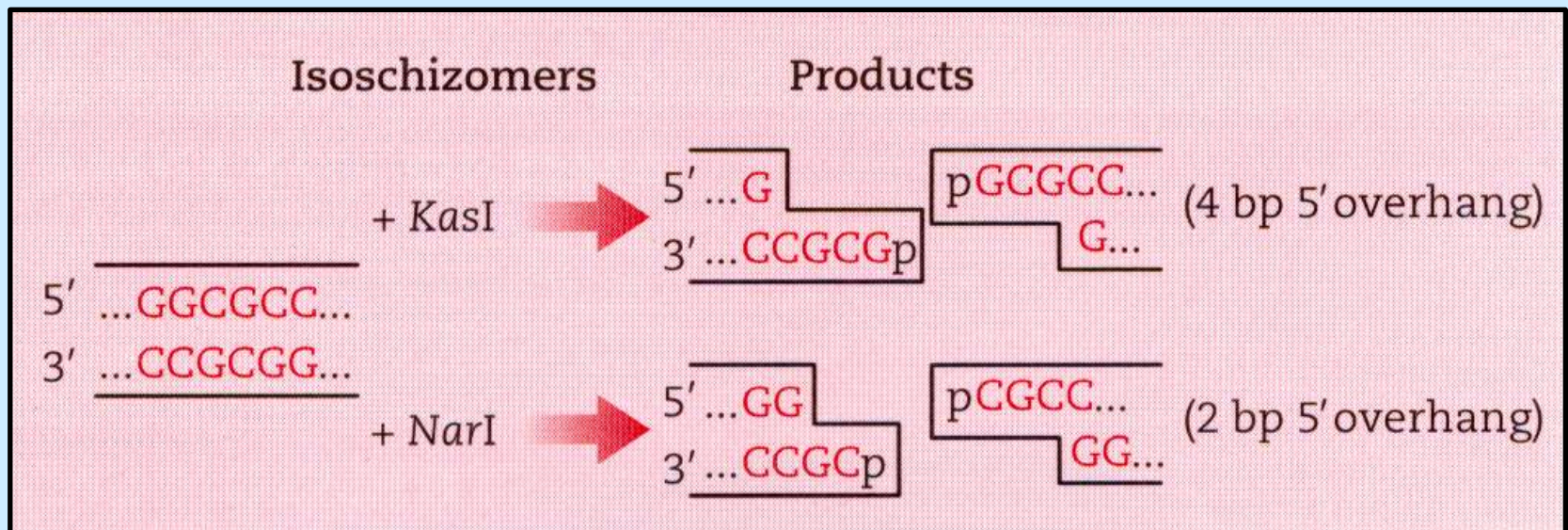
# Pro štěpení je důležitá orientace!



# Izoschisomery

Restriktázy se stejným rozpoznávacím místem

- různí producenti
- mohou být odlišně citlivé k metylaci



# *Izokaudamery*

- Restriktázy s odlišným rozpoznávacím místem
- Výsledné produkty jsou ale stejné

***Bam*HI      G/GAATCC**

-N-N-G                      **G-A-T-C**-C-N-N-

-N-N-C-**C-T-A-G**                      G-N-N-

***Bg*II            A/GATCT**

-N-N-A                      **G-A-T-C**-T-N-N-

-N-N-T-**C-T-A-G**                      A-N-N-

***Sau*3A        /GATC**

-N-N-N                      **G-A-T-C**-N-N-N-

-N-N-N-**C-T-A-G**                      N-N-N-

# *Relaxovaná specifčnost*

## Star activity

Některé restriktázy za určitých reakčních podmínek štěpí blízce příbuzné sekvence

*EcoRI*

5' ... G A A T T C ... 3'



5' ... G **G** A T T C ... 3'

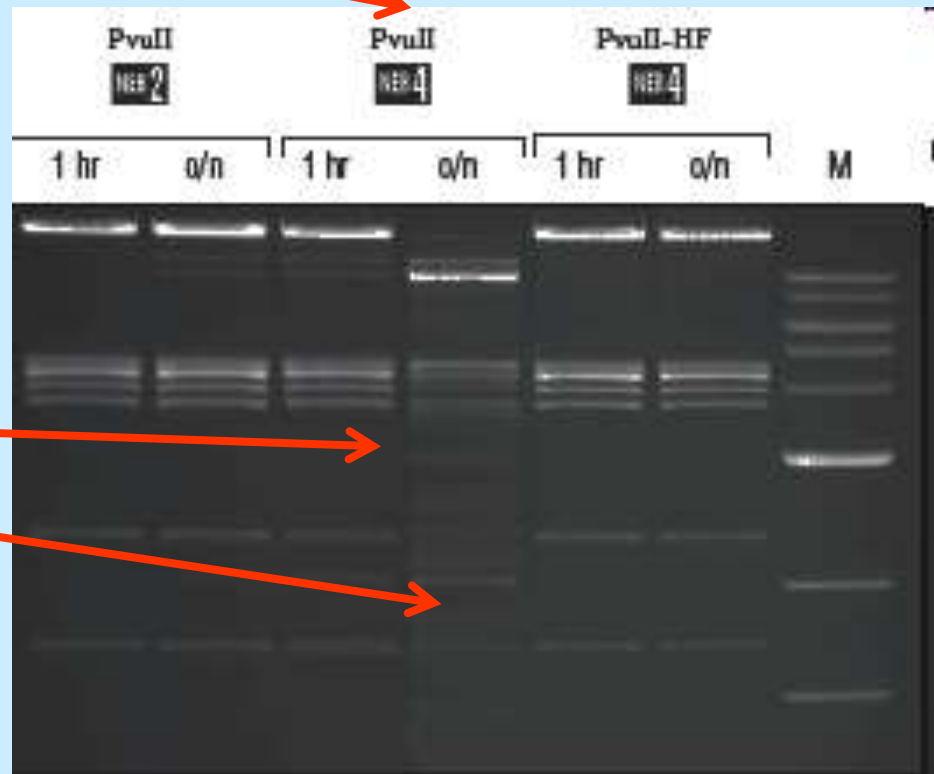
5' ... G **G** A T T **T** ... 3'

5' ... **A** **G** A T T **T** ... 3'

# *Důsledky relaxované specifičnosti*

- nesespecifické produkty
- často za neoptimálních reakčních podmínek

nerozštěpené  
fragmenty DNA



# ***Citlivost k metylaci***

**Izoschisomery, které se liší v citlivosti k metylaci, lze využít při studiu metylace nukleotidových sekvencí**

**Methylace je způsobena prokaryotickými metylázami Dam, Dcm a Eco KI a eukaryotickými CpG MTázami**

**Po izolaci DNA z buněk, které mají tyto metylázy nemusí restriktáza fungovat správně!**

# ***Definice jednotky***

**Množství restriktázy, které zcela rozštěpí 1  $\mu\text{g}$  DNA fága  $\lambda$  (lambda) za 1 hodinu při optimální teplotě a v optimálním prostředí**

**Pozor na počet restrikčních míst v dané molekule!**



# Zkuste vypočítat



Jedna jednotka restriční endonukleázy *Bam*HI je množství enzymu, které rozštěpí 1  $\mu$ g DNA fága  $\lambda$  za optimálních reakčních podmínek při 37°C za 1 hodinu. Na molekule DNA fága  $\lambda$  je celkem 5 štěpných míst pro restriktázu *Bam*HI. Chceme-li linearizovat plasmid, který obsahuje jediné restriční místo pro tuto restriktázu, jaké podmínky štěpení použijeme? Máme linearizovat  $10^{10}$  molekul plasmidu.

Řešení je zde



Dokument  
ikace Microsoft W



# ***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

# ***Příklad odvození názvu restriktázy***

<b><i>EcoR I</i></b>		
<b>Označení</b>	<b>Význam</b>	<b>Vysvětlení</b>
<b>E</b>	<b><i>Escherichia</i></b>	<b>rod</b>
<b>co</b>	<b><i>coli</i></b>	<b>druh</b>
<b>R</b>	<b>RY13</b>	<b>kmen</b>
<b>I</b>	<b>první identifikovaná</b>	<b>pořadí identifikace v bakterii</b>

**Počet rozpoznávaných  
sekvencí pro určitou  
restrikční endonukleázu na  
DNA o známé délce můžeme  
vypočítat**



# *Jak často se vyskytuje čtveřice?*

Předpokládáme, že ....

- máme nekonečně dlouhou molekulu
- sekvence nukleotidů je naprosto nahodilá

Máme 4 nukleotidy a děláme z nich čtveřice

$$4^4 = 256 \text{ bp}$$

# ***Restriktázy štěpí nejčastěji čtveřice nebo šestice nukleotidů***

**Jaká je frekvence výskytu štěpícího místa pro  
restriktázu *EcoR* I (štěpí sekvenci GAATTC) ?**

**Frekvence výskytu štěpícího místa pro  
restriktázu *EcoR* I je 1 ku  $4^6$**

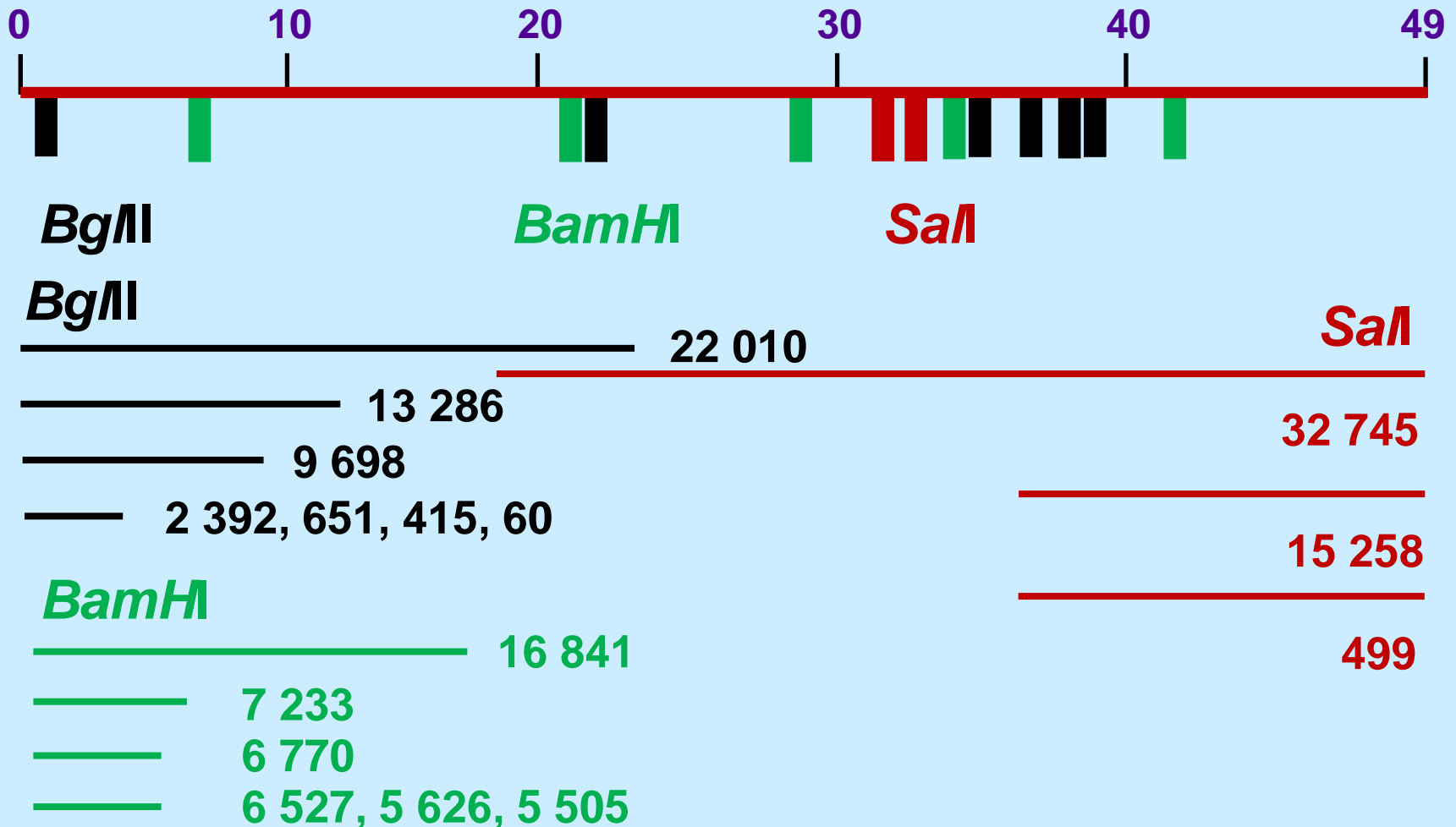
$$4^6 = 4\ 096 \text{ (bp)}$$

**Šedivá je teorie a zelený  
strom života**



# Reálná situace

DNA fága  $\lambda$   $\rightarrow$  49 kbp  $\rightarrow$  12 míst pro RE štěpící hexamery



# 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 $\lambda$	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)



# *Homing endonucleases*

Nukleázy, které štěpí dsDNA a rozpoznávají dlouhé nesymetrické sekvence (12-40 nukleotidů) a kódující sekvence intronů a inteinů

- Názvosloví jako u restriktáz s prefixem I- nebo PI-
- Štěpí s extrémně nízkou četností
- Nejsou příliš specifické, proto je průměrná frekvence štěpení jako by rozpoznávaly 10-12 bp

**I-CeuI, I-SceI, PI-PspI**

# Vypočítejte



Jestliže je počet nukleotidů v diploidním genomu člověka roven přibližně 3 miliardy párů bází, jaká je nejmenší délka sekvence, která se v takovém genomu bude vyskytovat pouze jedenkrát?

Řešení je zde

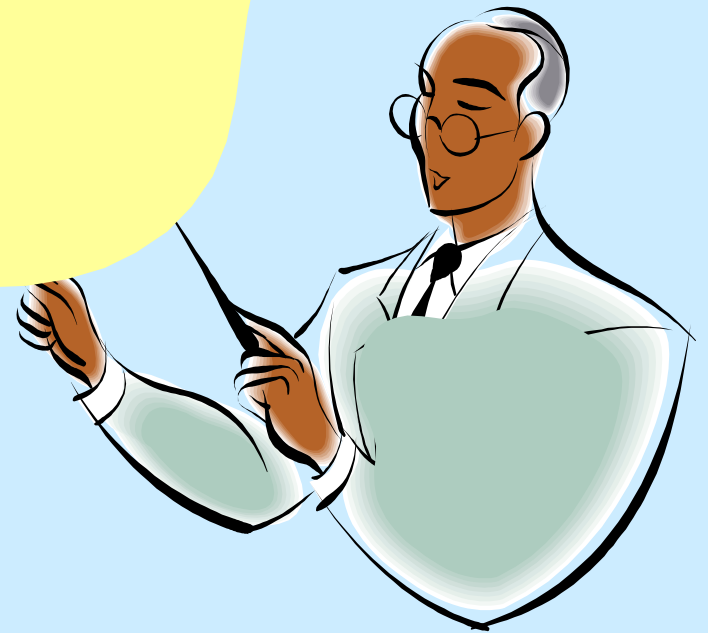


Dokument  
ikace Microsoft W

# ***Význam restrikčních endonukleáz***

- nástroj pro přípravu rekombinantních molekul DNA
- prostředek pro studium struktury, organizace, exprese a evoluce genomu
- základ pro genové inženýrství
- fyzikální mapování DNA
- analýza populačních polymorfizmů
- změny v uspořádání molekul DNA
- příprava molekulárních sond
- příprava mutantů
- analýza modifikací DNA

**Mnoho dalších informací k  
restriktázám najdete na  
<http://rebase.neb.com/rebase/>**



*A ještě jednou ...*

*Rozřezání genomu endonukleázami*



**dsDNA**



**Restrikční fragmenty**

***Fragmenty vzniklé restričním  
štěpením lze rozdělit  
elektroforézou***

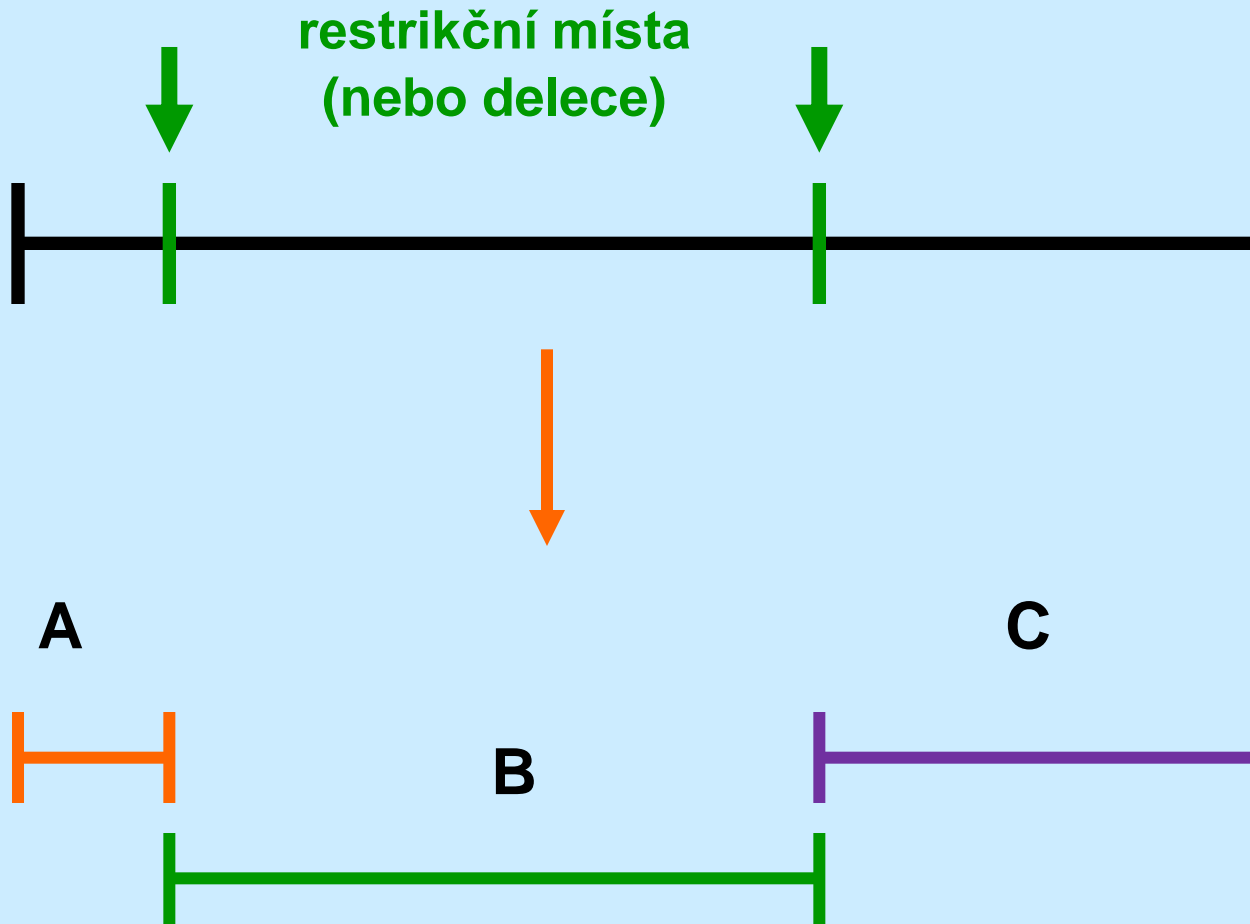
- 1) O elektroforéze budeme hovořit na příští přednášce
- 2) Nyní stačí si jen říci, že jejím prostřednictvím můžeme stanovit velikost jednotlivých fragmentů
- 3) Jednotlivé fragmenty můžeme poskládat a vytvořit tzv. restrikční mapu



# ***Skládání restriční mapy***

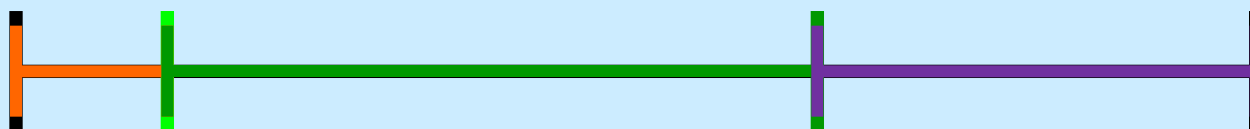


# *Restrikční štěpení lokusu*



# *Získané fragmenty lze uspořádat více způsoby*

**Původní pořadí = A-B-C**



**Další možnosti**

**A-C-B**



**C-A-B**



**C-B-A**



# *Mapy se skládají po štěpení více restriktázami*

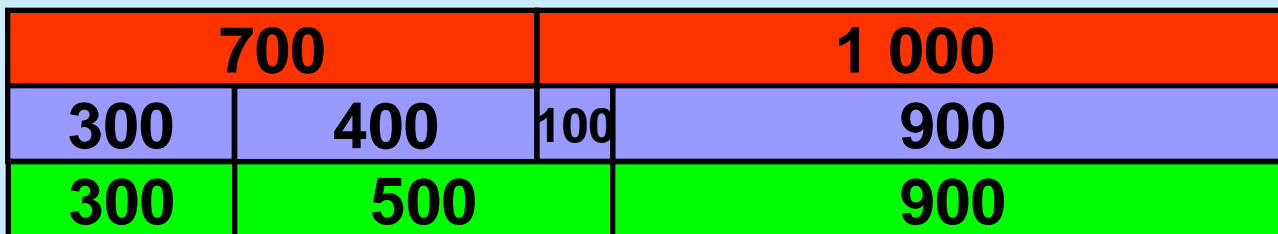
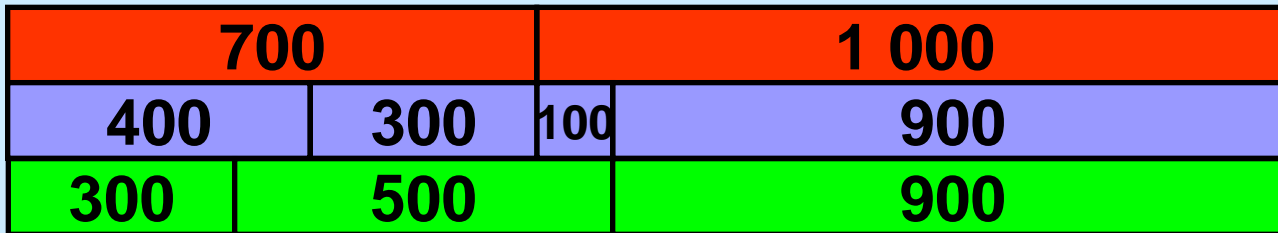
- po štěpení restriktázou Xba I jste získali fragmenty o velikosti 300, 500 a 900 bp
- po štěpení restriktázou Ava I fragmenty o velikosti 700 a 1 000 bp
- po štěpení oběma restriktázami současně fragmenty o velikosti 100, 300, 400 a 900 bp

# Mapy se skládají po štěpení více restriktázami

Ava I



Xba I

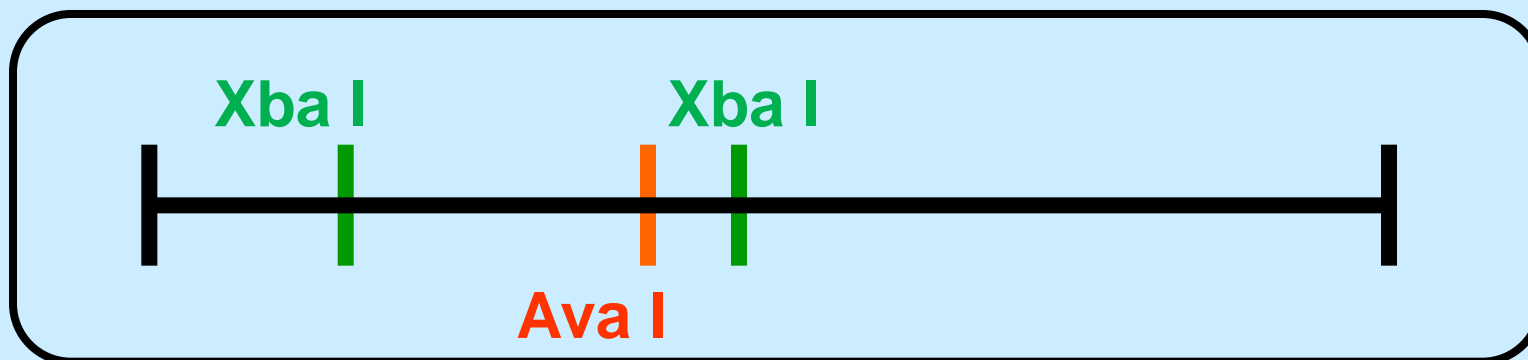


# Výsledná mapa

Ava I

700		1 000	
300	400	100	900
300	500	900	

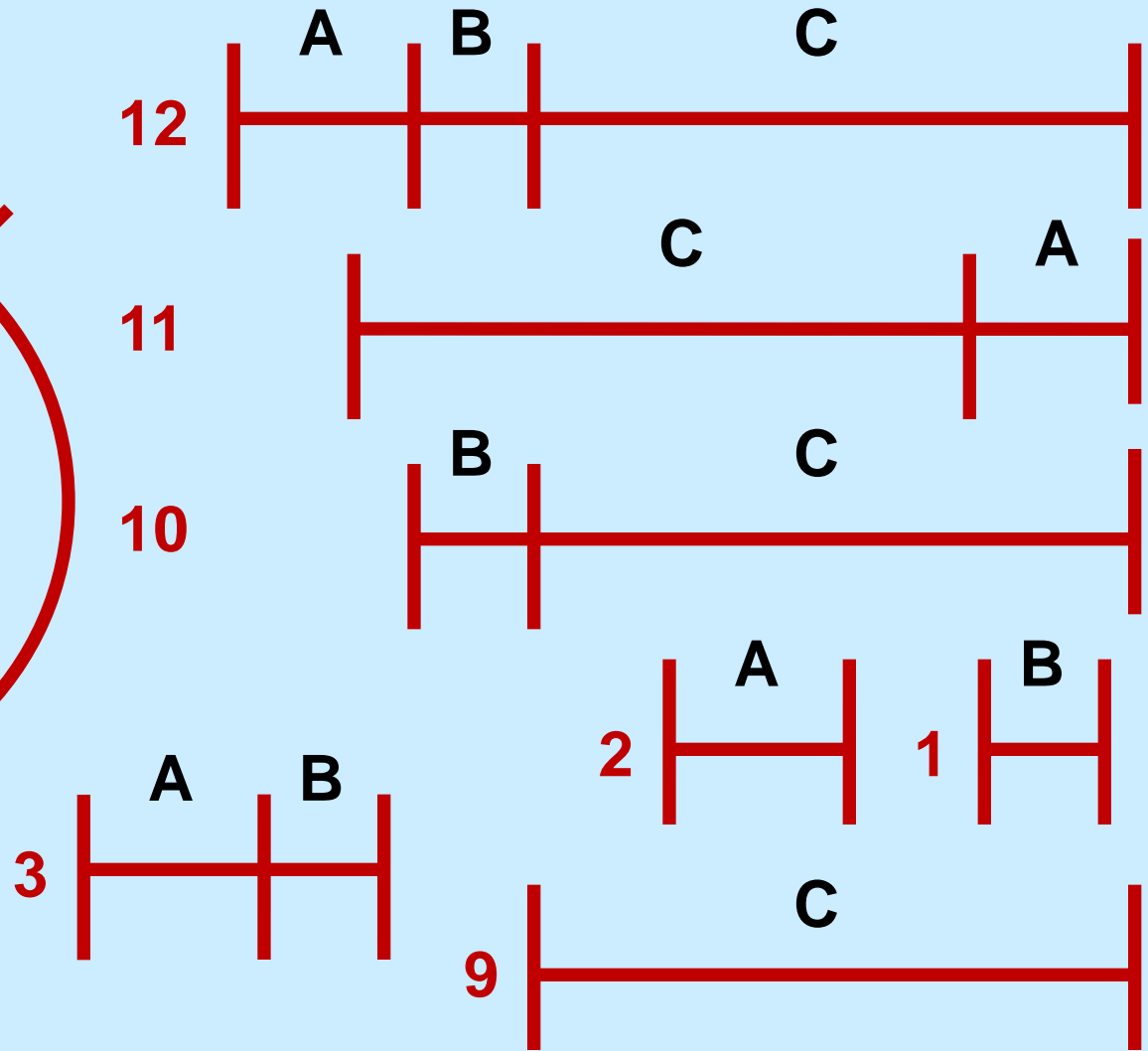
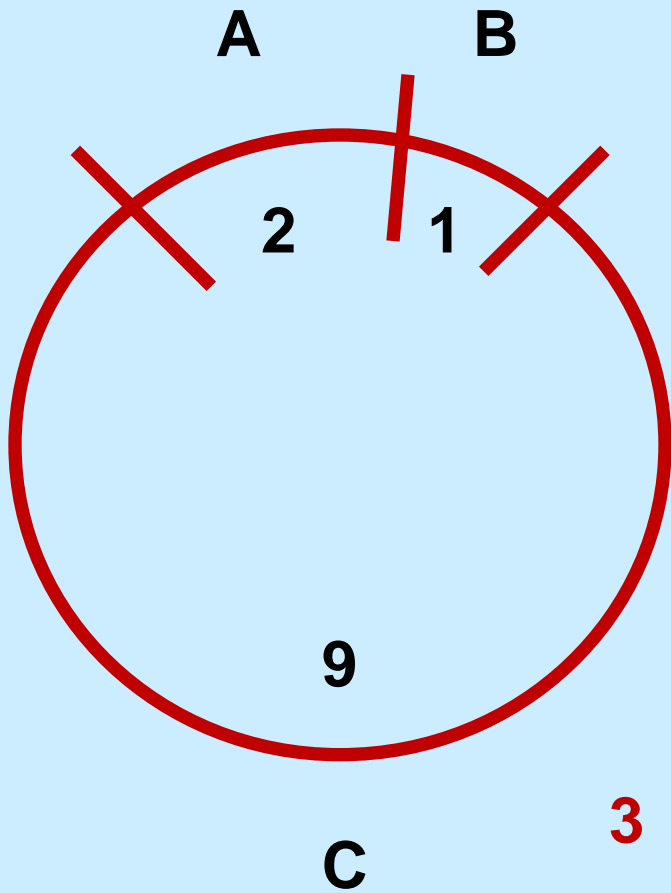
Xba I



300	500	900	
300	400	100	900
700		1 000	

***Vytvoření restriční mapy  
po parciálním štěpení***

# Co je to parciální štěpení



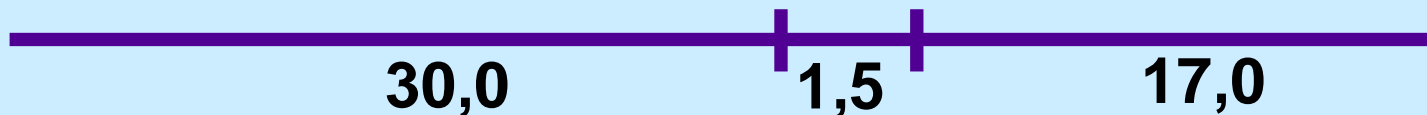
# ***Příklad parciálního štěpení***

- 1) Po částečném štěpení DNA bakteriofága  $\lambda$  restriktaázou *KpnI* jste získali fragmenty o velikosti 1,5; 17,0; 18,5; 30,0; 31,5 a 48,5 kbp.
- 2) Úplným štěpením jste získali fragmenty 1,5; 17,0 a 30,0 kbp.
- 3) Sestavte restrikční mapu.

Z daných výsledků lze odvodit

- 1) Fragment 48,5 odpovídá neštěpené molekule fága
- 2) Fragmenty 1,5; 17,0; a 30,0 jsou produkty kompletního štěpení
- 3) Fragmenty 18,5 a 31,5 kbp jsou produkty částečného štěpení

**Restrikční mapa pro *KpnI* musí být**





# A teď si to ještě procvičte



Jestliže z předchozího příkladu znáte restriční mapu pro *KpnI*, pak vytvořte restriční mapu pro *KpnI*, *XbaI* a *XhoI* podle výsledků shrnutých v tabulce

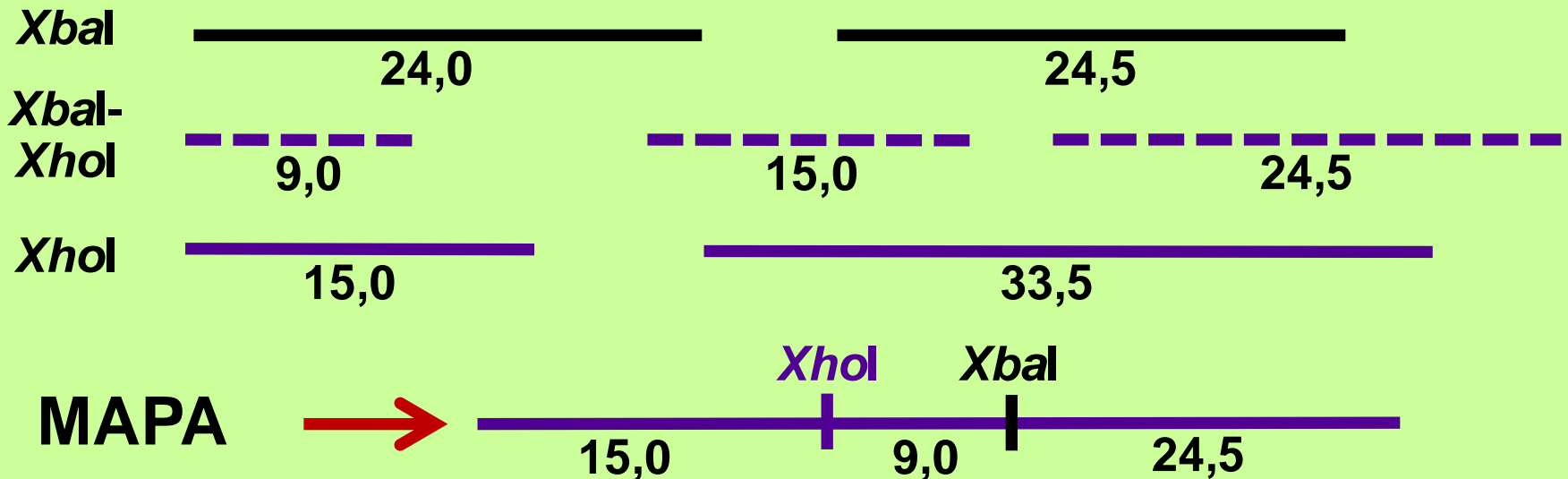
Enzym	Počet fragmentů	Velikosti (kbp)
<i>XbaI</i>	2	24,0; 24,5
<i>XhoI</i>	2	15,0; 33,5
<i>KpnI</i>	3	1,5; 17,0; 30,0
<i>XbaI</i> + <i>XhoI</i>	3	9,0; 15,0; 24,5
<i>XbaI</i> + <i>KpnI</i>	4	1,5; 6,0; 17,0; 24,0

# Postup řešení



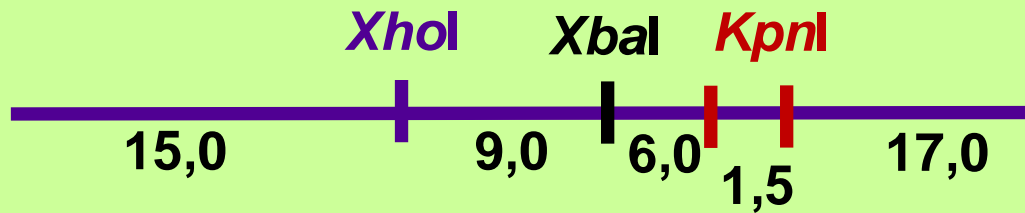
1) DNA fága  $\lambda$  je lineární, proto jsou počty restričních míst pro jednotlivé restriktázy rovny:  $XbaI = 1$ ,  $XhoI = 1$ ,  $KpnI = 2$

2) Fragmenty pro  $XbaI$  a  $XhoI$  jsou následující:



3) Všechna místa pro  $KpnI$  jsou ve fragmentu  $XbaI$  (24,5), protože se tento fragment po štěpení  $XbaI$ - $KpnI$  neštěpí. Pořadí míst  $KpnI$  je určeno z částečného štěpení.

# Výsledná mapa



# ***Využití restriktáz k diagnostice mikroorganismů***

- **Krátké fragmenty = RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů**
- **Dlouhé fragmenty = PFGE – pulsní gelová elektroforéza**
- **Analýza produktů PCR = PCR-REA**

# ***Shrnutí***

- 1) Definice restrikčních endonukleáz, jejich přirozená funkce**
- 2) Typy restrikčních endonukleáz**
- 3) Restrikční místa pro restriktázy typu II**
- 4) Rozložení restrikčních míst na genomu**
- 5) Využití restriktáz k mapování**
- 6) Využití restriktáz v diagnostice mikroorganismů**