



Využití restriktáz ke studiu genomu mikroorganismů

doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

bartos.milan@atlas.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2017

Obsah přednášky

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

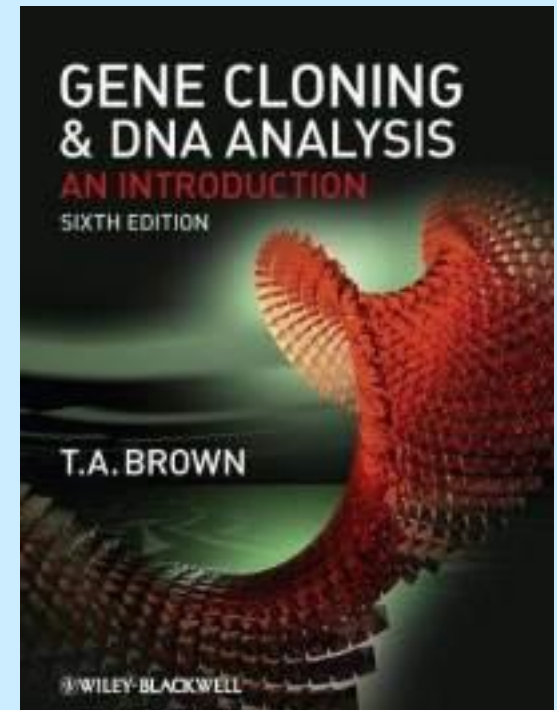




Doporučená literatura

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

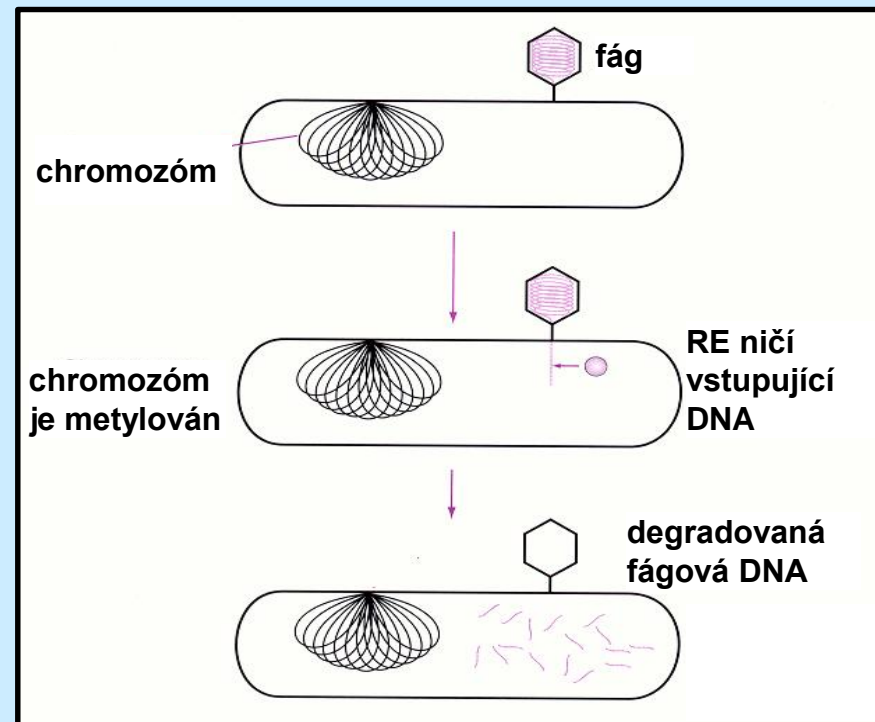
katalog firmy New England Biolabs, USA, www.neb.com



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?



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. (2010): Science 327, 167-170**

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, Mg²⁺ 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



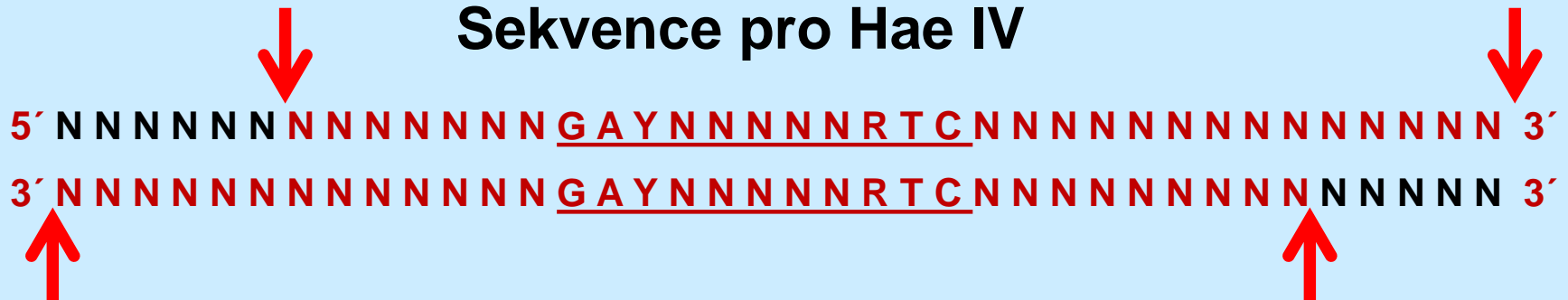
Restriktázy typu IV

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?



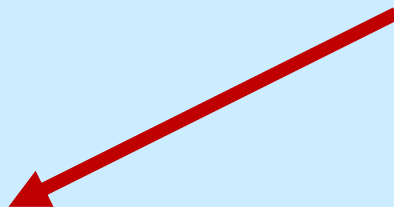
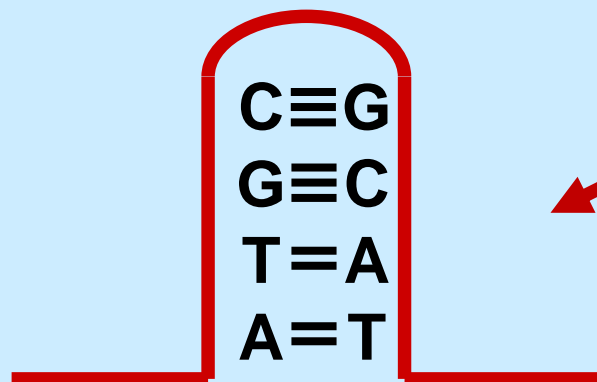
Přilehlá obrácená repetice

5' **ATGC**/GCAT 3'

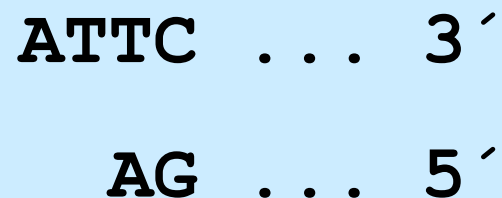
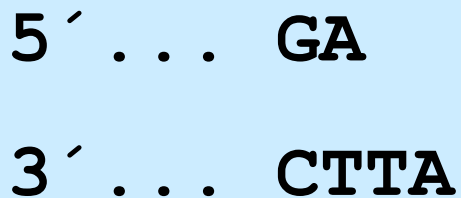
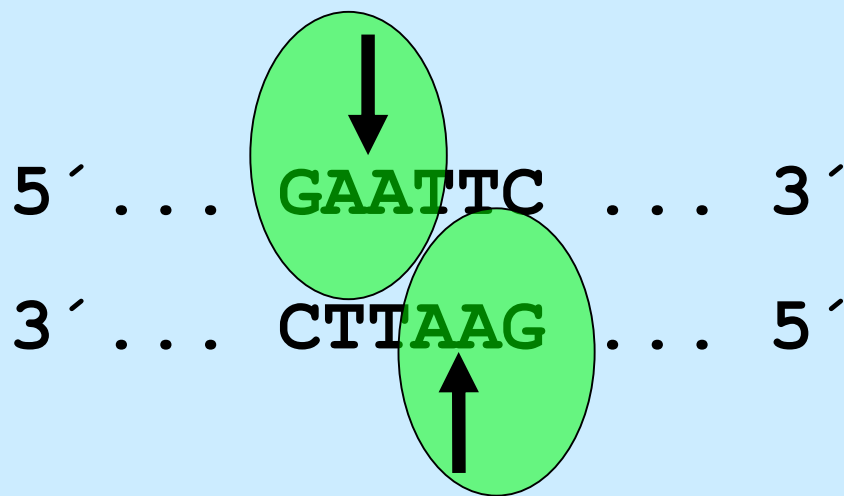
3' TACG/**CGTA** 5'

Vlášenska

ATGC GCAT



Jak funguje RE typu II



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

Rozřezání genomu endonukleázami



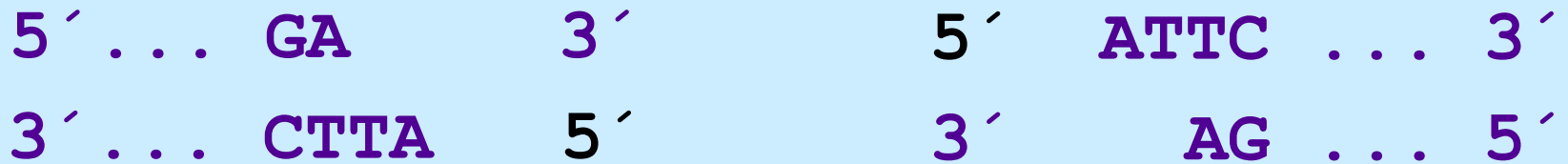
dsDNA



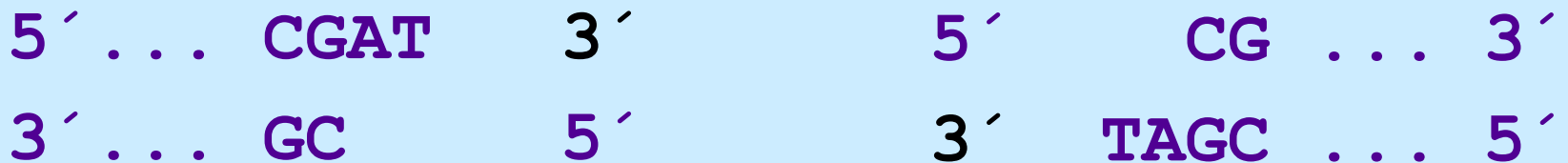
Restrikční fragmenty

Různé typy konců

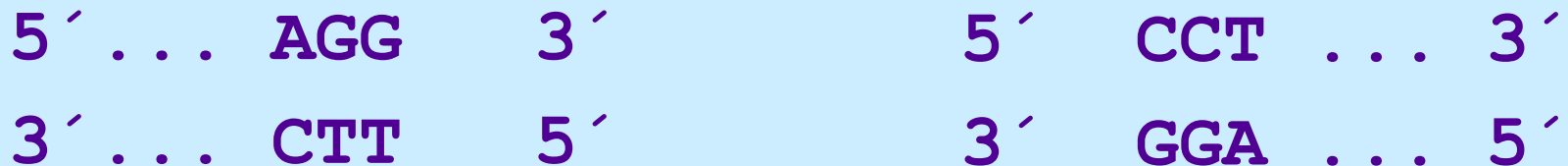
lepivé (kohezní) úseky přecházející na 5'- koncích, **EcoR I**



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>



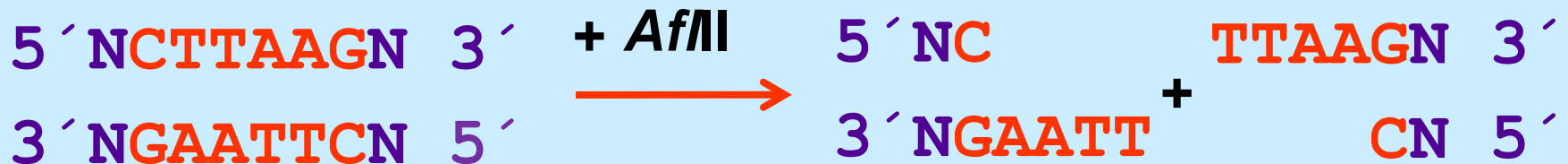
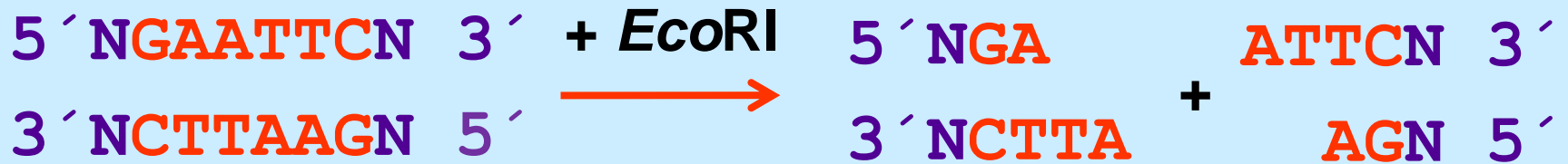
http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072437316/student_view0/chapter16/animations.html



Nebo si vyžádejte pptx prezentaci

Existuje i procvičovací pps soubor

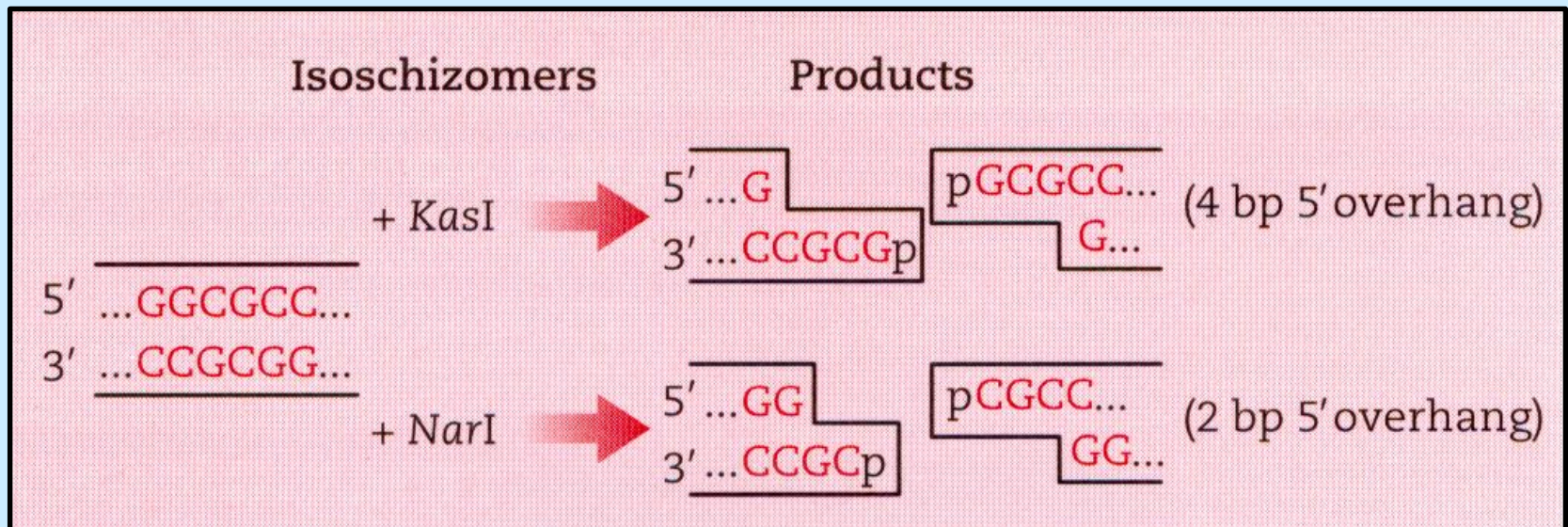
Pro štěpení je důležitá orientace!



Izoschizomery

Restriktázy se stejným rozpoznávacím místem

- různé producenti
- mohou být odlišně citlivé k metylaci
- výsledné produkty nemusí být stejné



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'

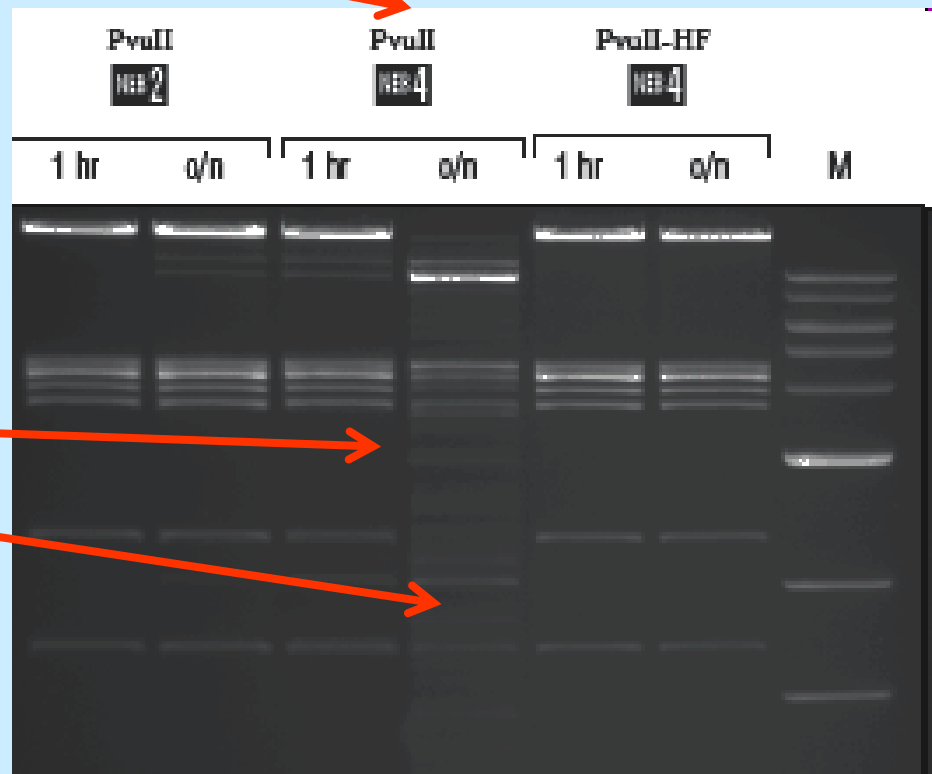
5' ... G **G** A T T **T** ... 3'

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 μg DNA fága λ (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 μ g DNA fága λ za optimálních reakčních podmínek při 37°C za 1 hodinu. Na molekule DNA fága λ 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

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

**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**

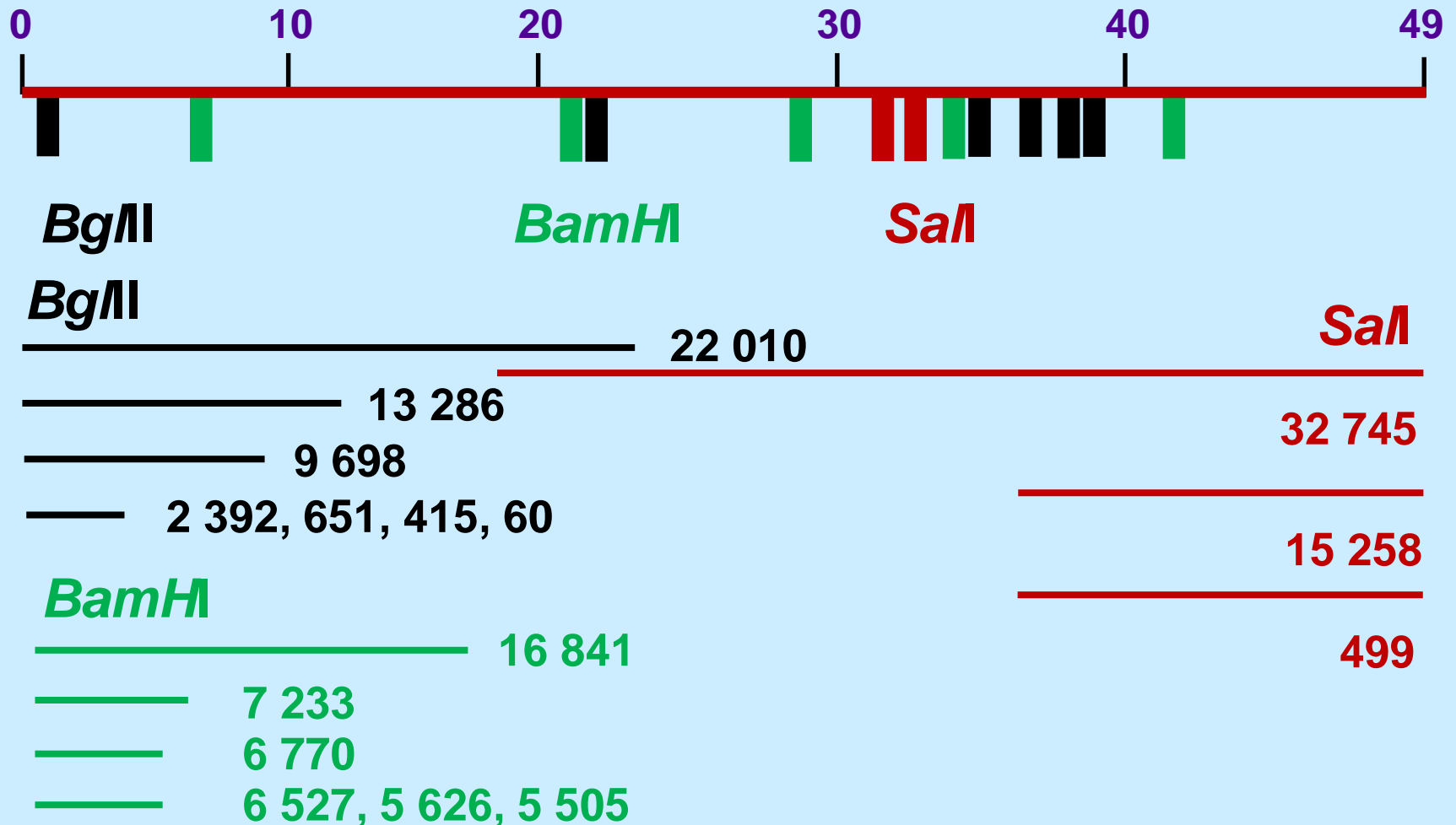
$$4^6 = 4\ 096 \text{ (bp)}$$

**Šedivá je teorie a zelený
strom života**



Reálná situace

DNA fága λ \rightarrow 49 kbp \rightarrow 13 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 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)

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

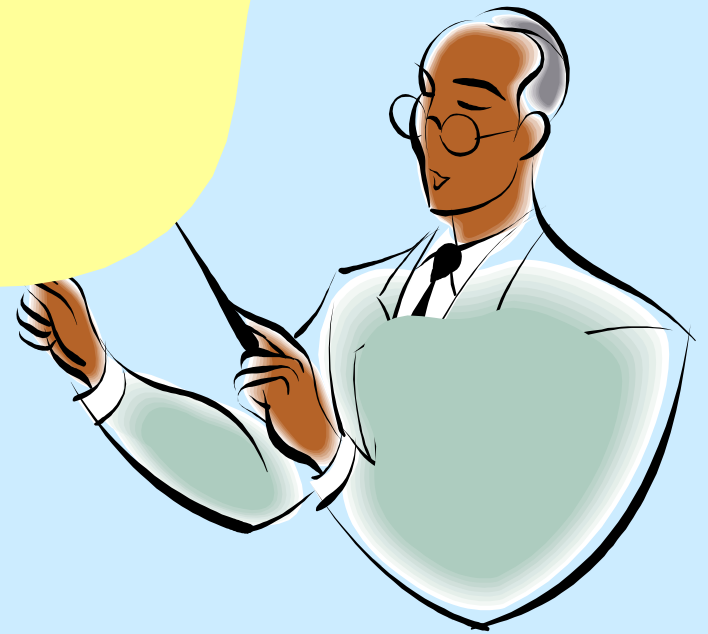


Dokument
ikace Microsoft W

Význam restričních 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

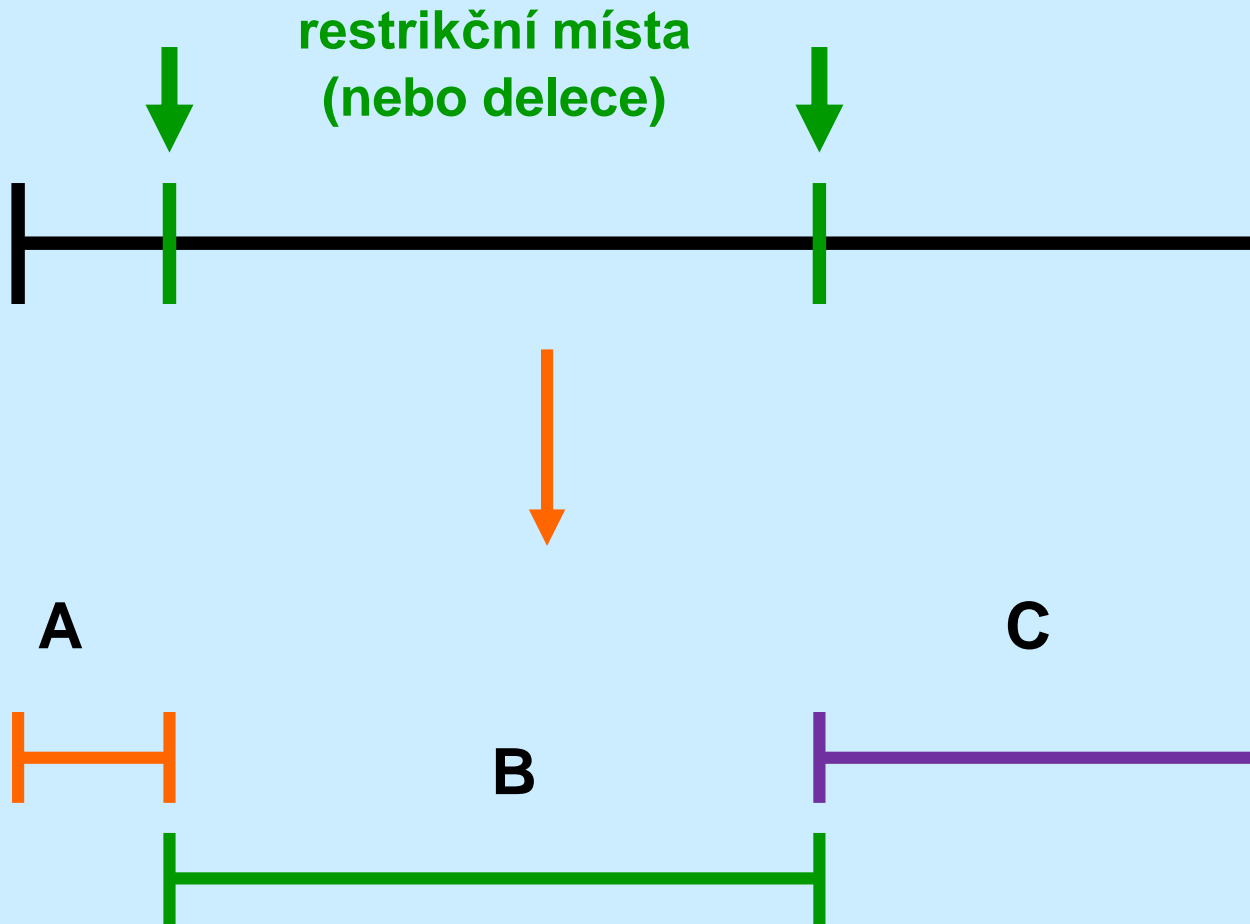
***Fragmenty vzniklé restričním
štěpením lze rozdělit
elektroforézou***

- 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



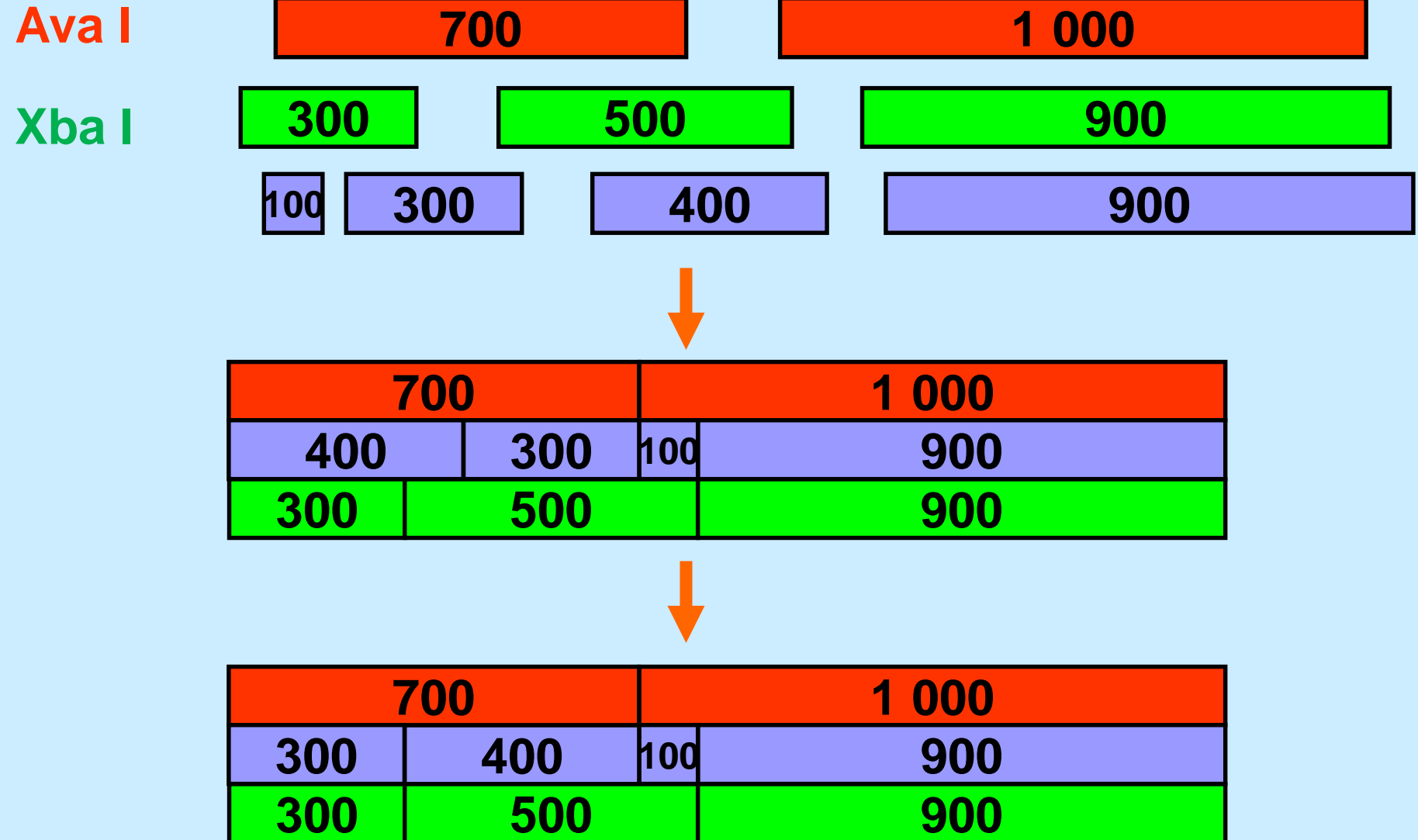
C-B-A



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

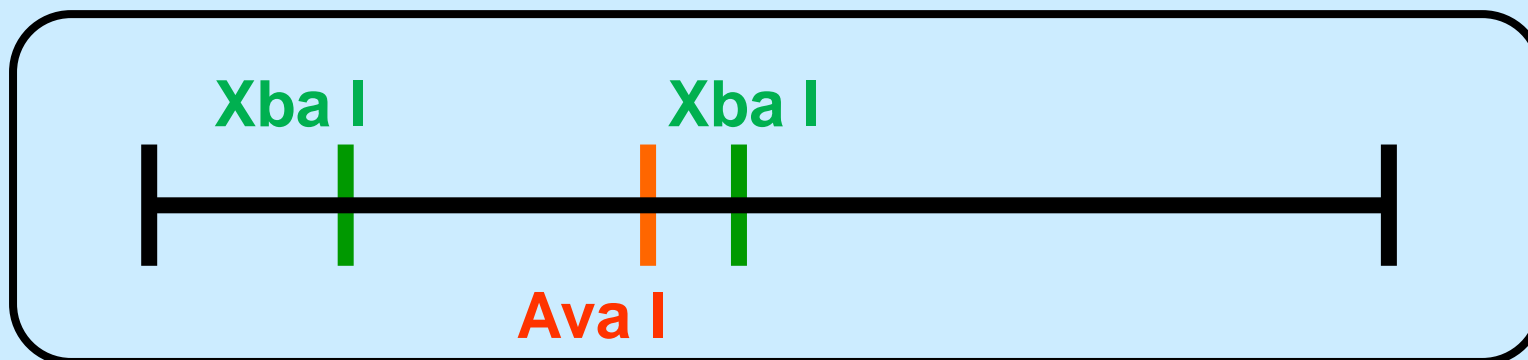


Výsledná mapa

Ava I

700		1 000	
300	400	100	900
300	500	900	

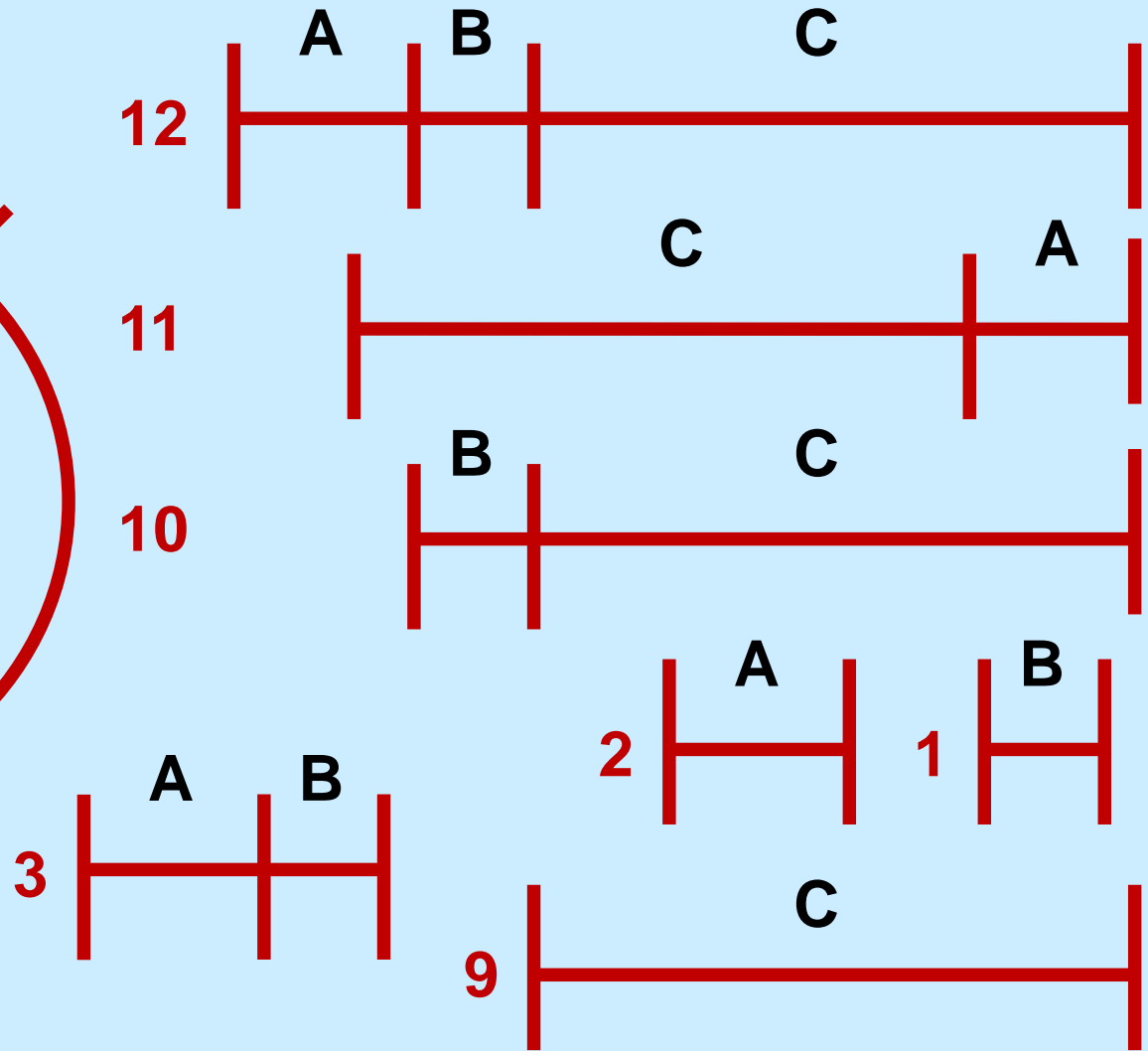
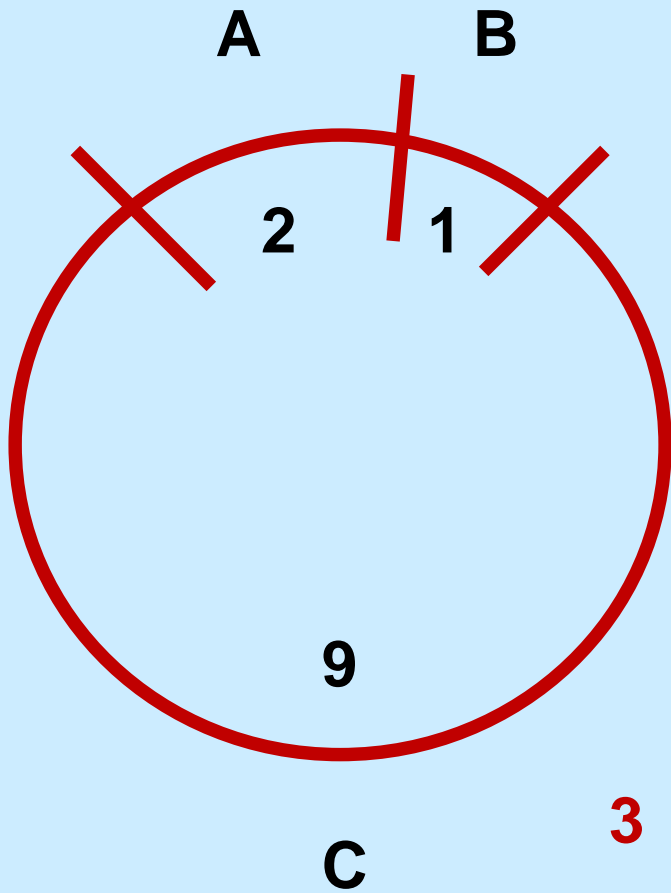
Xba I



300	500	900	
300	400	100	900
700		1 000	

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

Co je to parciální štěpení



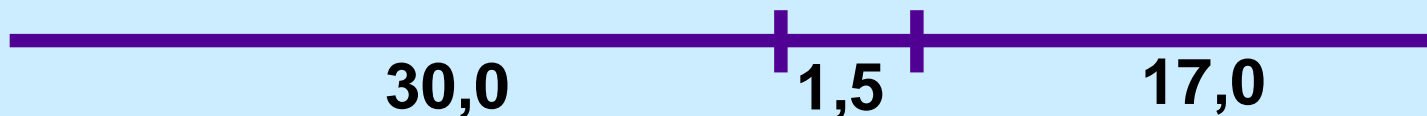
Příklad parciálního štěpení

- 1) Po částečném štěpení DNA bakteriofága λ restrikázou *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

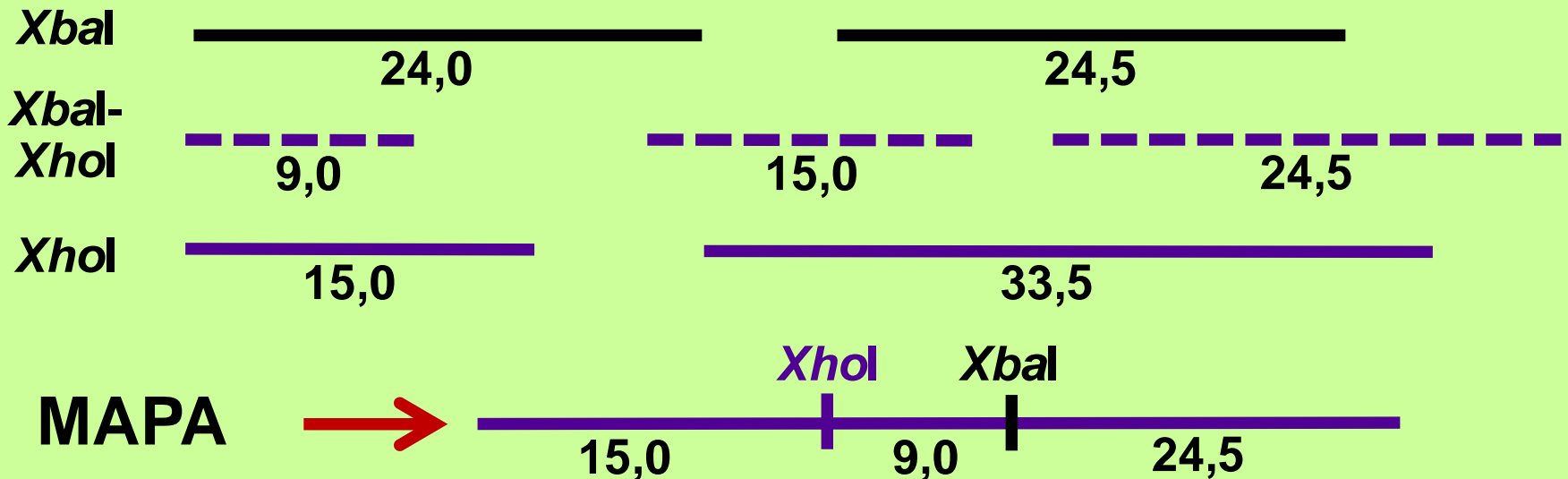
Enzym	Počet fragmentů	Velikosti (kbp)
<i>XbaI</i>	2	24,0; 24,5
<i>XhoI</i>	2	15,0; 33,5
<i>KpnI</i>	3	1,5; 17,0; 30,0
<i>XbaI</i> + <i>XhoI</i>	3	9,0; 15,0; 24,5
<i>XbaI</i> + <i>KpnI</i>	4	1,5; 6,0; 17,0; 24,0

Postup řešení



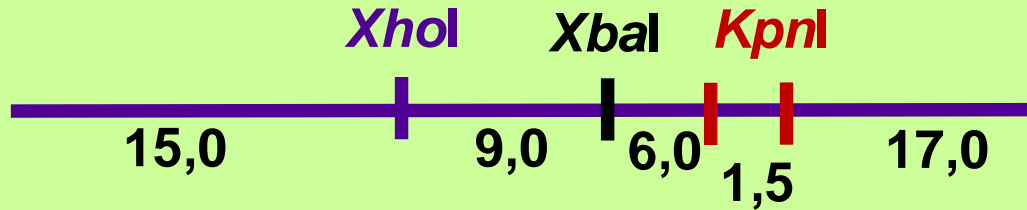
1) DNA fága λ je lineární, proto jsou počty restričních míst pro jednotlivé restriktázy rovny: $XbaI = 1$, $XhoI = 1$, $KpnI = 2$

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