

Speciální metody analýzy mikroorganismů

▪

Enzymy používané k úpravám nukleových kyselin

- lze klasifikovat podle substrátové specifity
- podle typů reakcí

Enzymy lze klasifikovat podle substrátové specificity

- na enzymy,
- jejichž substrátem je DNA
- jejichž substrátem je RNA

Enzymy podle typů reakcí, které katalyzují lze klasifikovat

- Na enzymy
- Syntetizující NK (polymerázy)
- Modifikující NK (fosfatázy, metylázy, kinázy)
- Spojující nukleotidové řetězce (ligázy)
- Odbourávající NK (nukleázy)

Enzymy syntetizující nukleové kyseliny

- **DNA polymeráza I** (DNA-polI) (*E.coli*) katalyzuje 3 odlišné reakce, jejichž rychlost je ovlivněna stavem DNA a koncentrací dNTP v reakční směsi
- degraduje polynukleotidový řetězec ve směru 5'-3'
- degradovaný řetězec nahrazuje novým (značení DNA metodou tzv. posunu jednořetězcového zlomu)
- má 3'-5' exonukleázovou aktivitu

Enzymy syntetizující nukleové kyseliny

- **Klenowův fragment DNA – polymerázy I**
(Klenowův enzym, velký fragment DNA-poll)
- větší peptidový fragment vznikající po štěpení DNA-poll subtilizinem
- má 5'-3' polymerázovou aktivitu a
- 3'-5' exonukleázovou aktivitu
- Postrádá 5'-3' exonukleázovou aktivitu
- Používá se při enzymové metodě sekvencování
(nesmí docházet k odbourávání primerů)

Enzymy syntetizující nukleové kyseliny

- **Terminální deoxyribonukleotidyltransferáza**
- Z telecího brzlíku
- Katalyzuje připojování nukleotidů k 3' koncům DNA
- Nevyžaduje matrici ani primer (na rozdíl od DNA polymerázy)
- Používá se ke koncovému značení NK
a k připojování homopolymerních konců k fragmentům DNA a vektorovým molekulám se zarovnanými konci (pro vytvoření komplementárních úseků, které umožní jejich spojení)

Enzymy syntetizující nukleové kyseliny

- **Zpětná transkriptáza**
- Retroviry např. virus ptačí myeloblastózy
- Využíván k přípravě cDNA z mRNA (zpětná transkripce)
- Zpětných transkriptů se využívá k sekvencování RNA a jako sond pro hybridizaci

Enzymy modifikující NK

- **Alkalická fosfatáza**
- Telecí střevo, bakterie
- Odstraňuje fosfátové skupiny z 5'-konců DNA, RNA a oligonukleotidů
- Využívá se při koncovém značení molekul, při klonování k zabránění recirkularizace vektorů a tvorbě dimerů

Enzymy modifikující NK

- **T4-polynukleotidkináza**
- Buňky *E. coli* infikované bakteriofágem T4
- Enzym katalyzuje přenos fosfátové skupiny z ATP na 5'OH skupinu DNA nebo RNA
- Výměnu fosfátových skupin na 5'konci
- Používá se ke značení fragmentů NK na 5' koncích pomocí radioizotopu P (^{32}P)

Enzymy spojující nukleotidové řetězce

- **T4-DNA-ligáza**
- Buňky *E. coli* infikované bakteriofágem T4
- Katalyzuje tvorbu fosfodiesterové vazby mezi 5'-fosfátovou skupinou a 3'-OH skupinou sousedního nukleotidu
- Používá se ke spojení dvou molekul DNA zakončených komplementárními konci
- K připojení spojek a adaptorů, k cirkularizaci lineárních molekul
- Lze jí využít i ke spojení fragmentů se zarovnanými (tupými) konci (na rozdíl od DNA-ligázy *E.coli*)

Enzymy odbourávající nukleotidové řetězce

- **Exonukleáza III**
- *E.coli*
- Působí ve směru 3' - 5' a na ds DNA odstraňuje od jejího 3' konce jedno vlákno
- Působí pouze na DNA, jejíž konce mají přesahující 5' - konec (ne 3' - konec) nebo jsou zarovnány
- Využívá se k vytváření jednosměrných delecí (druhý řetězec je odstraněn S1 nukleázou)

Enzymy odbourávající nukleotidové řetězce

- **Exonukleáza Bal31**
- *Alteromonas espejiana*
- Štěpí lineární ds DNA od obou konců za vzniku zkrácených fragmentů DNA se zarovnanými konci
- Je používána k přípravě obousměrných delecí

Enzymy odbourávající nukleotidové řetězce

- **Nukleáza S1**
- *Aspergillus oryzae*
- Endonukleáza specifická pro ss DNA
- Používá se k odstraňování jednořetězcových úseků na dsDNA, smyček na cDNA, vznikajících při jejich syntéze, mapování intronů analýzou hybridních molekul DNA-mRNA
- Po štěpení S1-nukleázou jsou konce DNA často heterogenní a chybějící úseky musí být zaplněny polymerázou

Enzymy odbourávající nukleotidové řetězce

- **Deoxyribonukleáza - DNázaI**
- Hovězí pankreas
- štěpí nespecificky
- Za přítomnosti Mg^{2+} vytváří na DNA ss zlomy, od nichž pak DNA dále degraduje na mono- a oligonukleotidy
- Za přítomnosti Mn^{2+} dochází ke vzniku zlomů v protilehlých místech (ds zlomy)
- Používá se při značení DNA, pro zavádění mutací
- Ve větších koncentracích se používá k odstanění DNA při izolaci RNA

Enzymy odbourávající nukleotidové řetězce

- **Ribonukleázy - Ribonukleáza A**
- z hovězího pankreatu
- k odstranění RNA z roztoků DNA používána
- **Ribonukleáza T1** je sekvenčně specifická, využívá se při analýze a sekvencování RNA

Enzymy odbourávající nukleotidové řetězce

- Restrikční endonukleázy – restriktázy typu II
- Sekvenčně specifické, produkované kmeny většiny bakteriálních druhů
- V současné době je jich známo víc než 3500
- K rozštěpení molekuly DNA dochází hydrolýzou fosfodiesterových vazeb obou řetězců v restrikčním místě neboli místě štěpení, které se nachází uvnitř rozpoznávacího místa nebo těsně vedle něho
- Produktem štěpení jsou restrikční fragmenty
- Restriktázy jsou používány v genových manipulacích při izolaci specifických fragmentů DNA, při tvorbě rekombinantní DNA, při fyzikálním mapování genomů.
- Známo 3500 enzymů

- PřF12.10.2010