Fragmentace molekul DNA, restrikční enzymy

doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

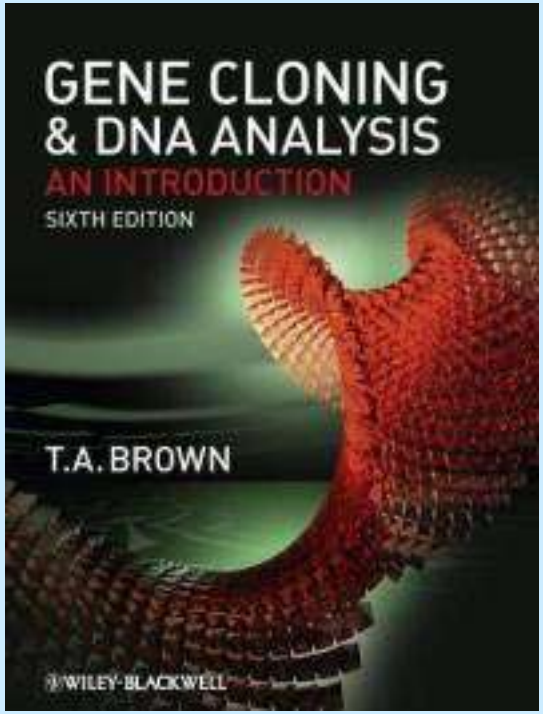
bartosm@vfu.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2012

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



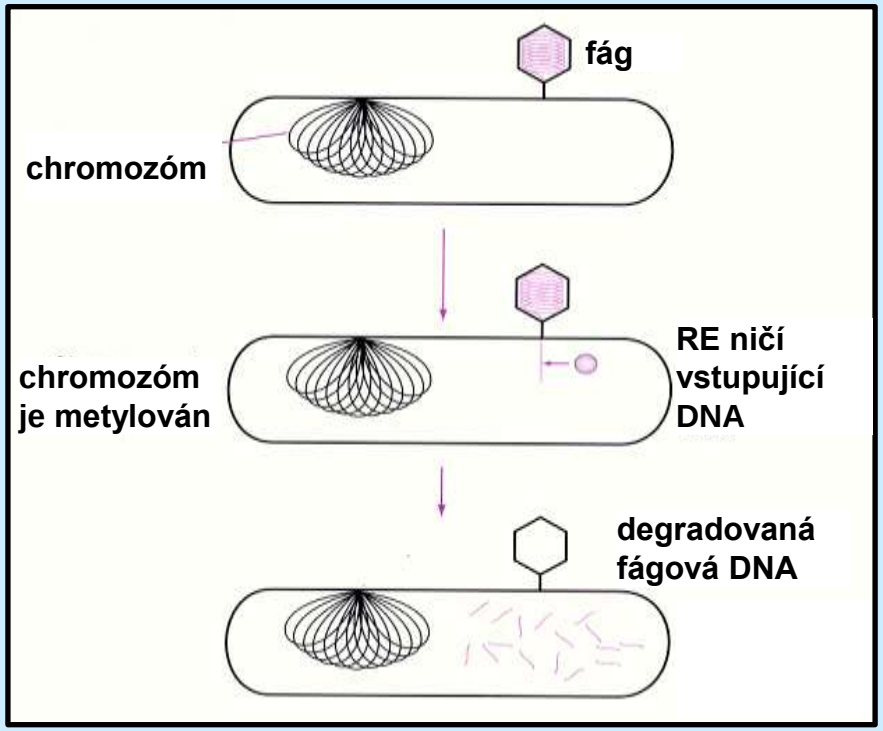
Brown (2010): Gene Cloning & DNA Analysis. Wiley-Blackwell, Sixth edition

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

Co to jsou restrikční endonukleázy

Enzymy, které štěpí dsDNA ve specifických místech, specifických sekvencích

- součást restrikčně 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 restrikčních 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

*Eco*K, *Eco*B

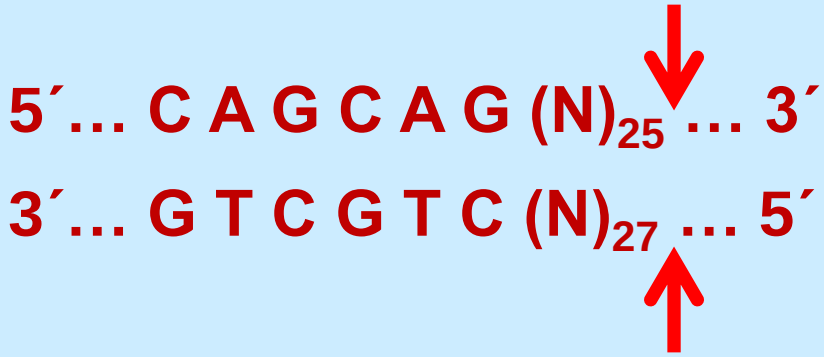
- vážou se na specifické nukleotidové sekvence
- katalyzují náhodné štěpení v místech vzdálených až několik 1 000 bp od místa vazby
- molekulová hmotnost dosahuje cca 300 000
- zajišťují modifikaci (metylaci) i štěpení DNA
- vyžadují kofaktory: ATP, Mg2+ a S-adenosylmetionin
- jsou nevhodné pro analýzu sekvencí DNA nebo genové inženýrství

Restriktázy typu III

Rozpoznávají dvě nepalidromatické sekvence inverzně orientované

*Eco*P15

- 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



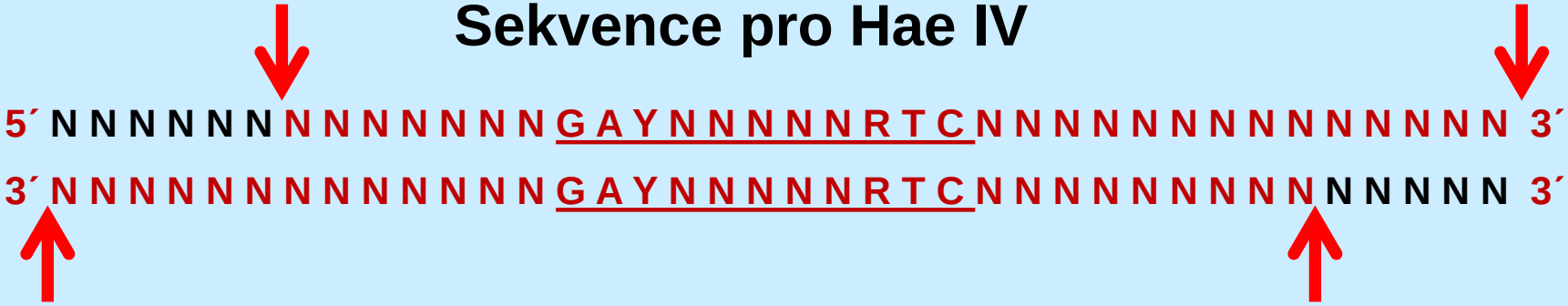
Restriktázy typu IV

Štěpí metylované sekvence mimo rozpoznávané místo

***Eco*57I, *Bce*83I, *Hae*IV, *Mme*I, *Bsp*LU11III, 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?

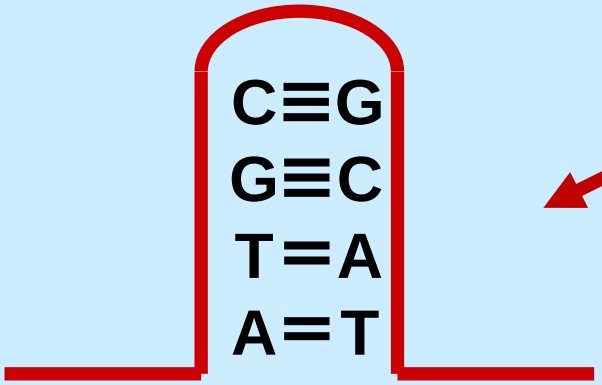
Přilehlá obrácená repetice

5´ ..... ATGC/GCAT ..... 3´

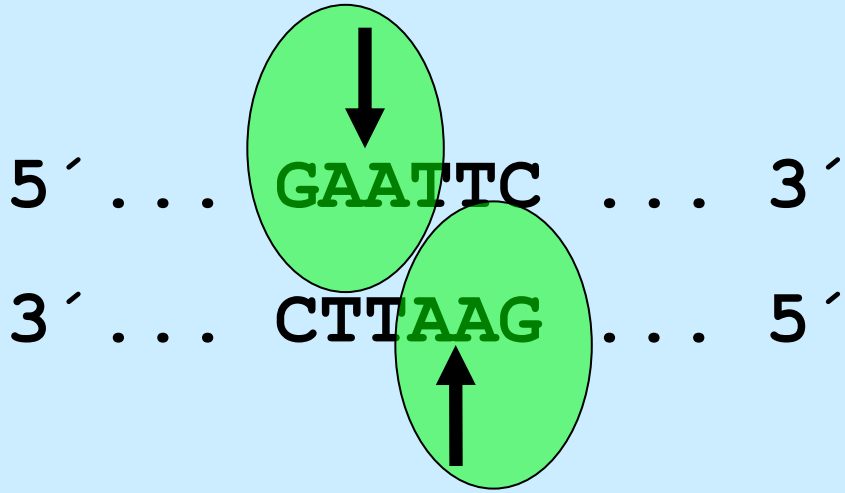
3´ ..... TACG/CGTA ..... 5´

A T G C G C A T

Vlásenka



Jak funguje RE typu II

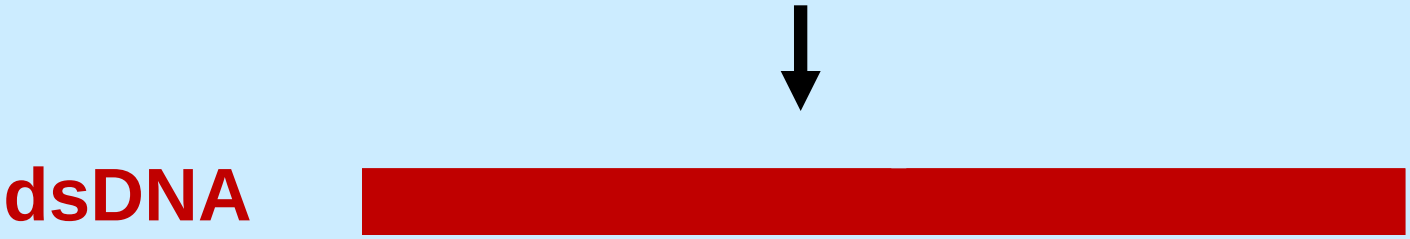


5´... GA ATTC ... 3´

3´... CTTA AG ... 5´

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

Rozřezání genomu endonukleázami



Restrikční fragmenty

Různé typy konců

lepkavé (kohezní) úseky přečnívající na 5´- koncích, *Eco*R I

```
5´... GA      3´          5´  ATTC ... 3´
3´... CTTA    5´          3´    AG ... 5´
```

lepkavé (kohezní) úseky přečnívající na 3´- koncích, *Pvu* II

```
5´... CGAT    3´          5´    CG ... 3´
3´... GC      5´          3´  TAGC ... 5´
```

zarovnané (tupé) konce, *Stu* I

```
5´... AGG    3´           5´  CCT ... 3´
3´... CTT    5´           3´  GGA ... 5´
```

Podívejte se na animace

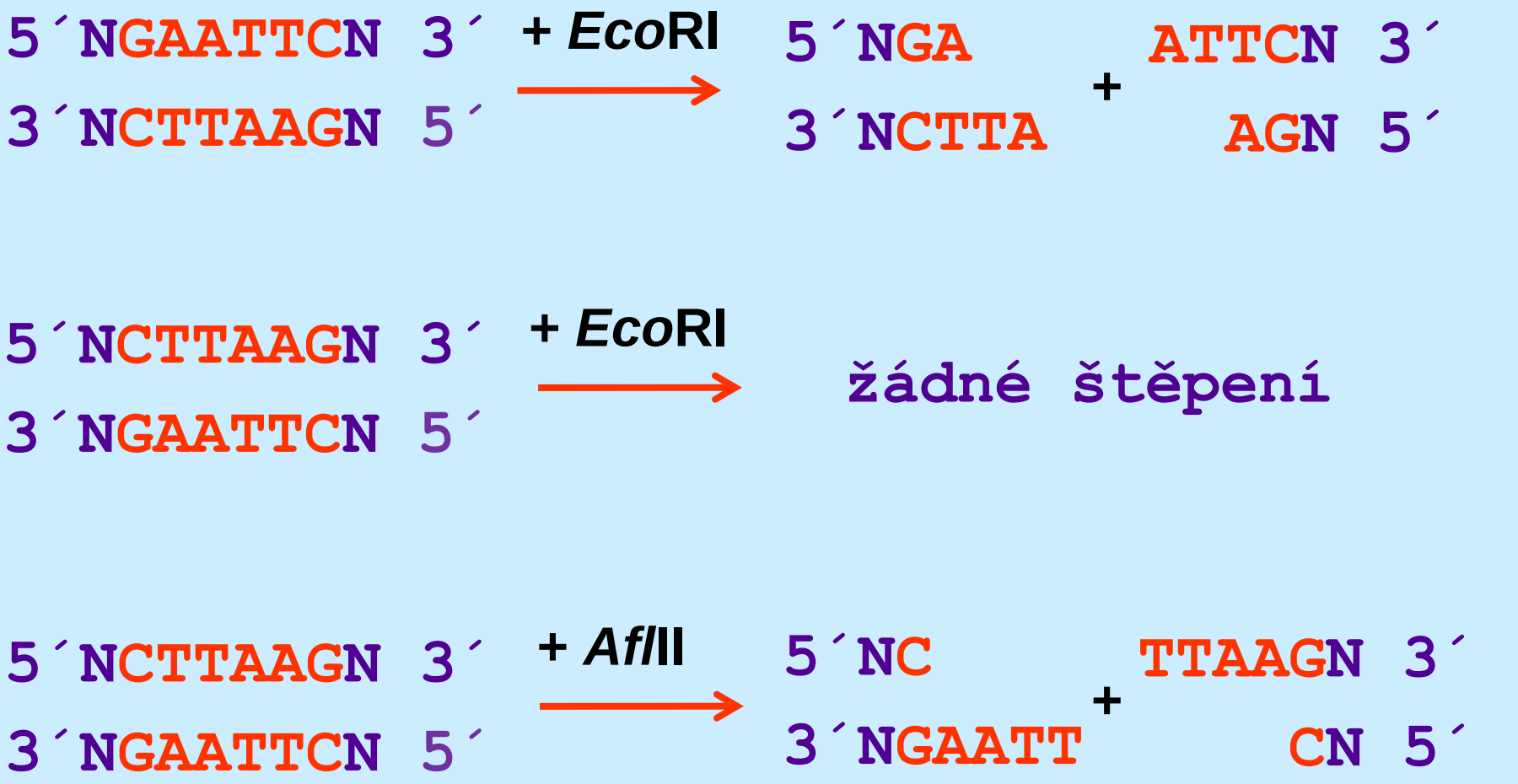
http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/animations.html

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

Nebo si vyžádejte staženou prezentaci

Existuje i procvičovací pps soubor

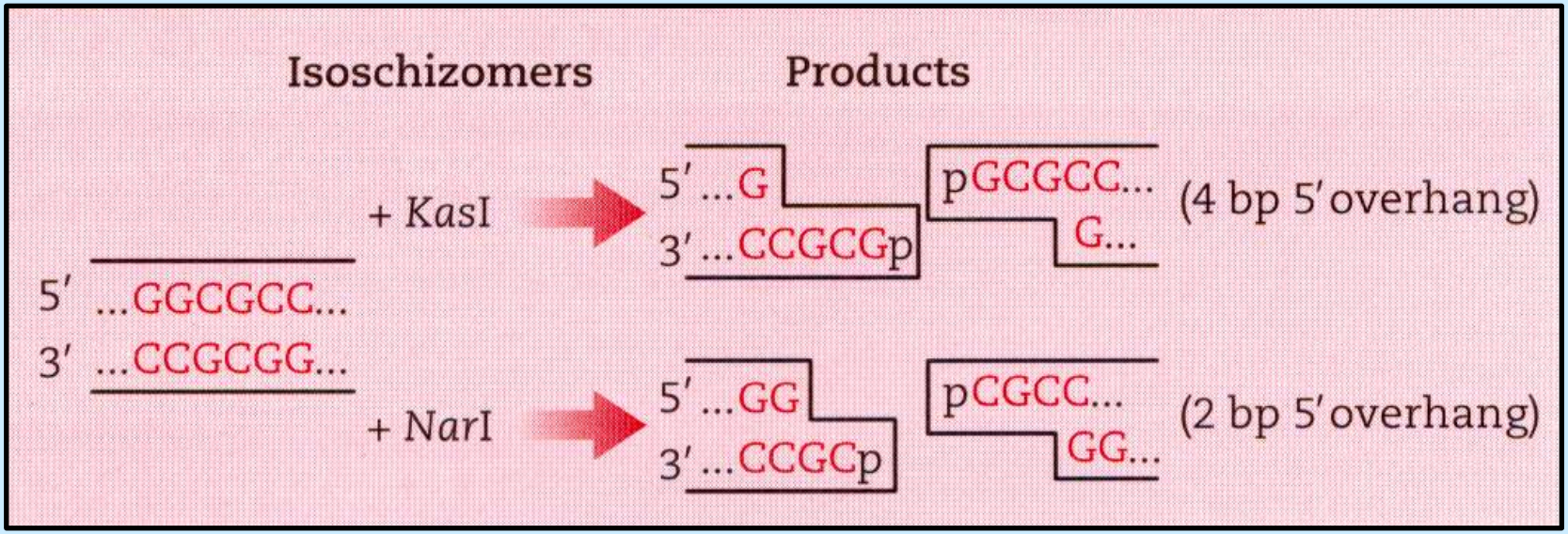
Pro štěpení je důležitá orientace!



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-

***Bgl*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 specifičnost

Star activity

Některé restriktázy za určitých reakčních podmínek štěpí blízce příbuzné sekvence

***Eco*RI**

5´ … G A A T T C … 3´

5´ … G G A T T C … 3´

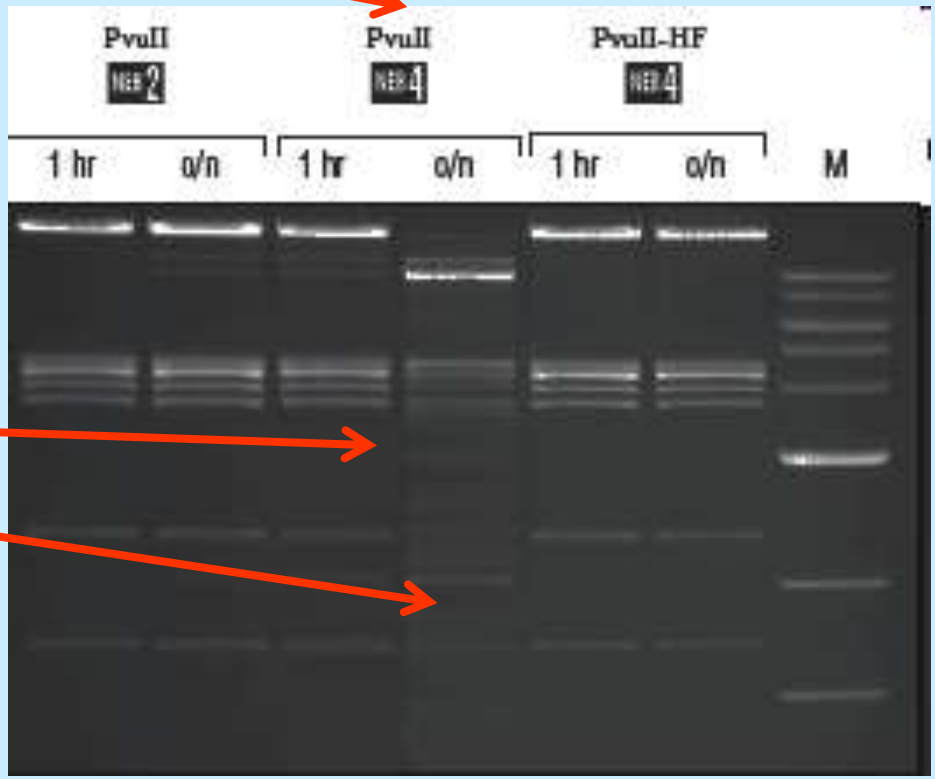
5´ … G G A T T T … 3´

5´ … A G A T T T … 3´

Důsledky relaxované specifičnosti

- **nespecifické 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

Metylace 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 restrikční endonukleázy *Bam*HI je množství enzymu, které rozštěpí 1µg 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 restrikční místo pro tuto restriktázu, jaké podmínky štěpení použijeme? Máme linearizovat 10^{10} molekul plasmidu.

Řešení je zde

Dokument
ikace Microsoft W

Názvosloví restrikčních 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

***Eco*R I**		
Označení	**Význam**	**Vysvětlení**
E	***Escherichia***	**rod**
co	***coli***	**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 *Eco*R I (štěpí sekvenci GAATTC) ?

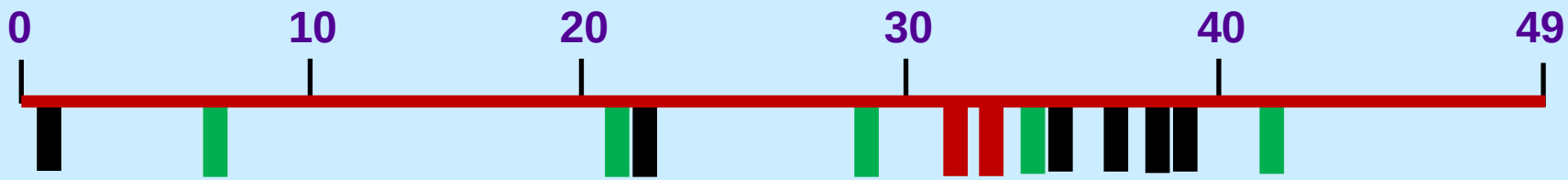
Frekvence výskytu štěpícího místa pro restriktázu *Eco*R I je 1 ku 4^6

$$4^6 = 4\ 096\ (bp)$$

Šedivá je teorie a zelený strom života

Reálná situace

DNA fága λ → 49 kbp → 12 míst pro RE štěpící hexamery



***Bgl*II** ***BamH*I** ***Sal*I**

***Bgl*II**

22 010

13 286

9 698

2 392, 651, 415, 60

***Sal*I**

32 745

15 258

499

***BamH*I**

16 841

7 233

6 770

6 527, 5 626, 5 505

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

	DNA source	Genome size (kb)	Number of restriction sites		
			4 bp	6 bp	8 bp
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?

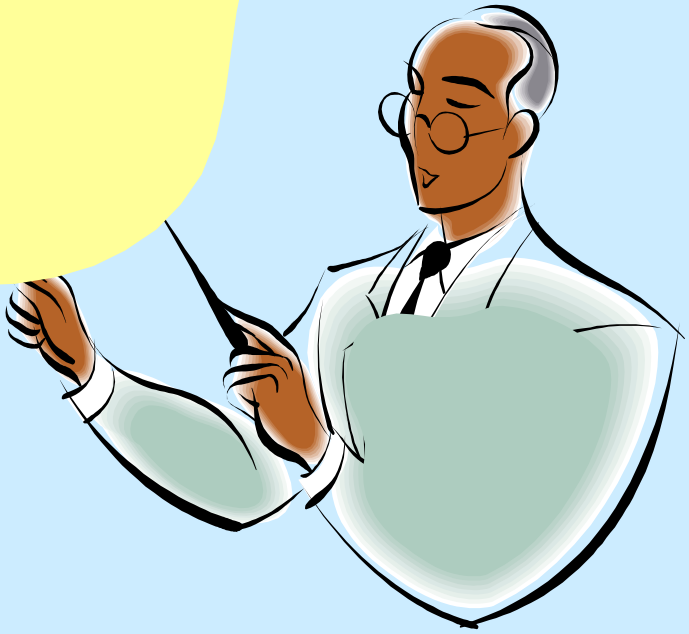
Řešení je zde

Dokument
ikace Microsoft W

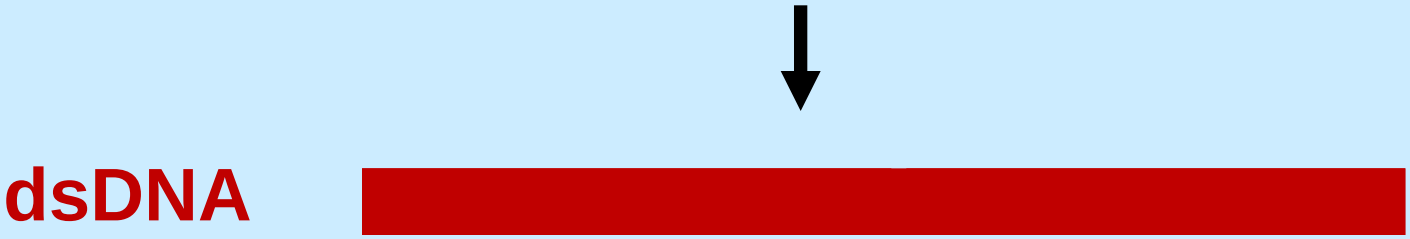
Význam restrikčních endonukleáz

- **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



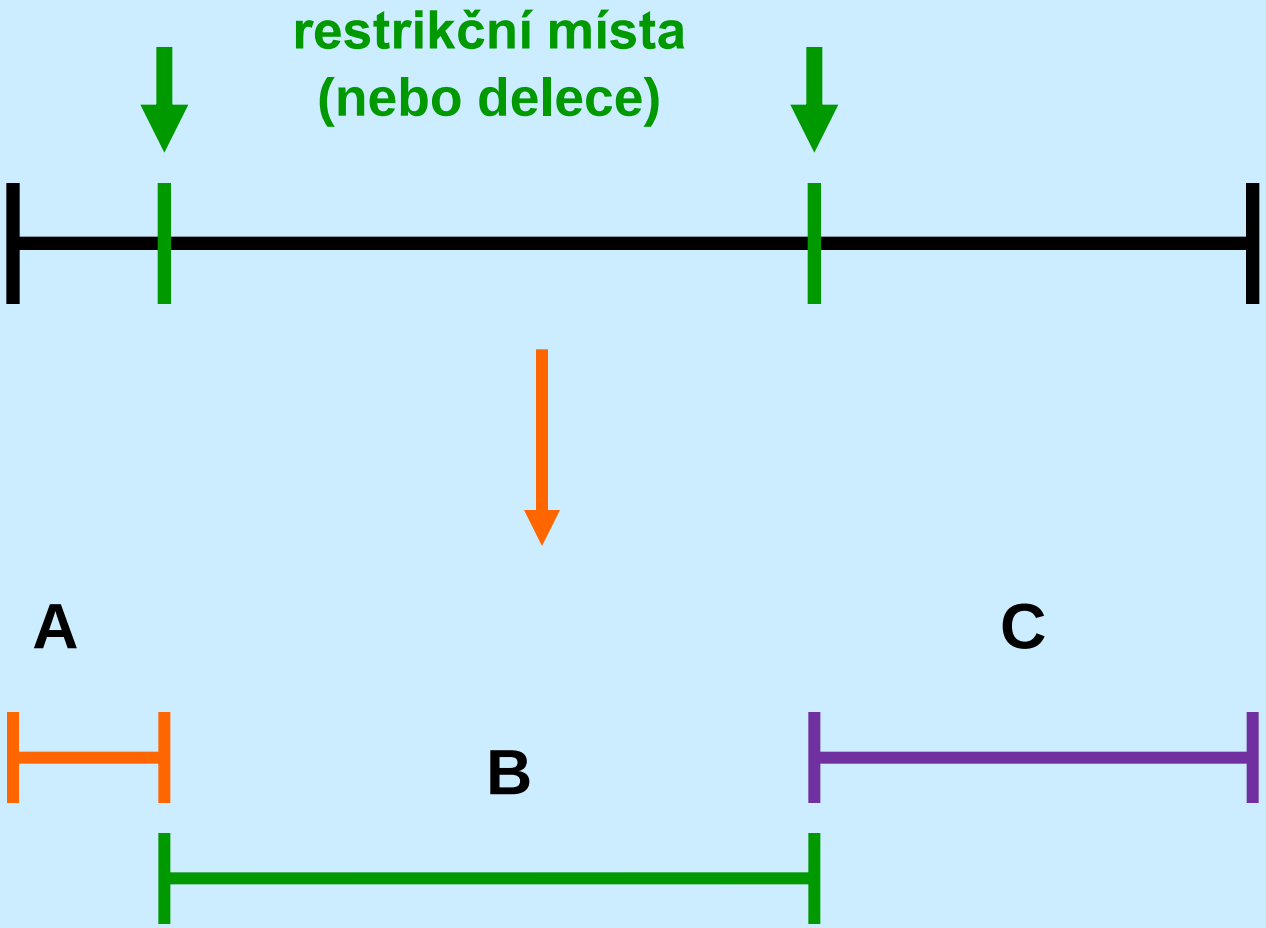
Restrikční fragmenty

Fragmenty vzniklé restrikčním 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

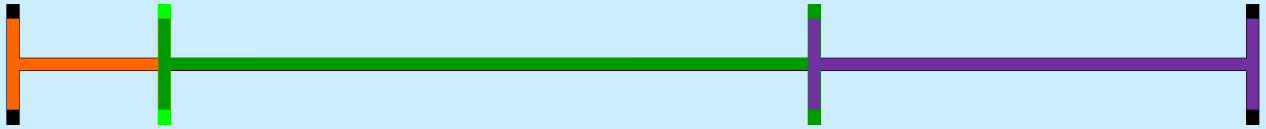
Skládání restrikční mapy

Restrikční štěpení lokusu



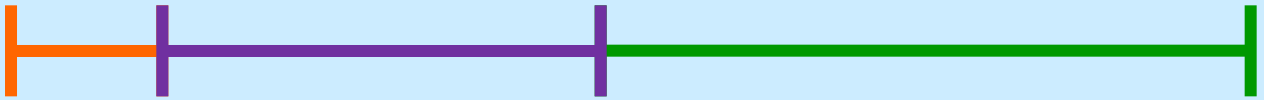
Získané fragmenty lze uspořádat více způsoby

Původní pořadí = A-B-C



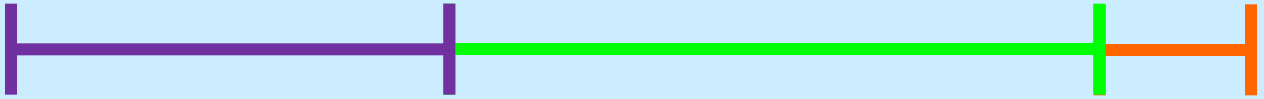
Další možnosti

A-C-B



C-A-B

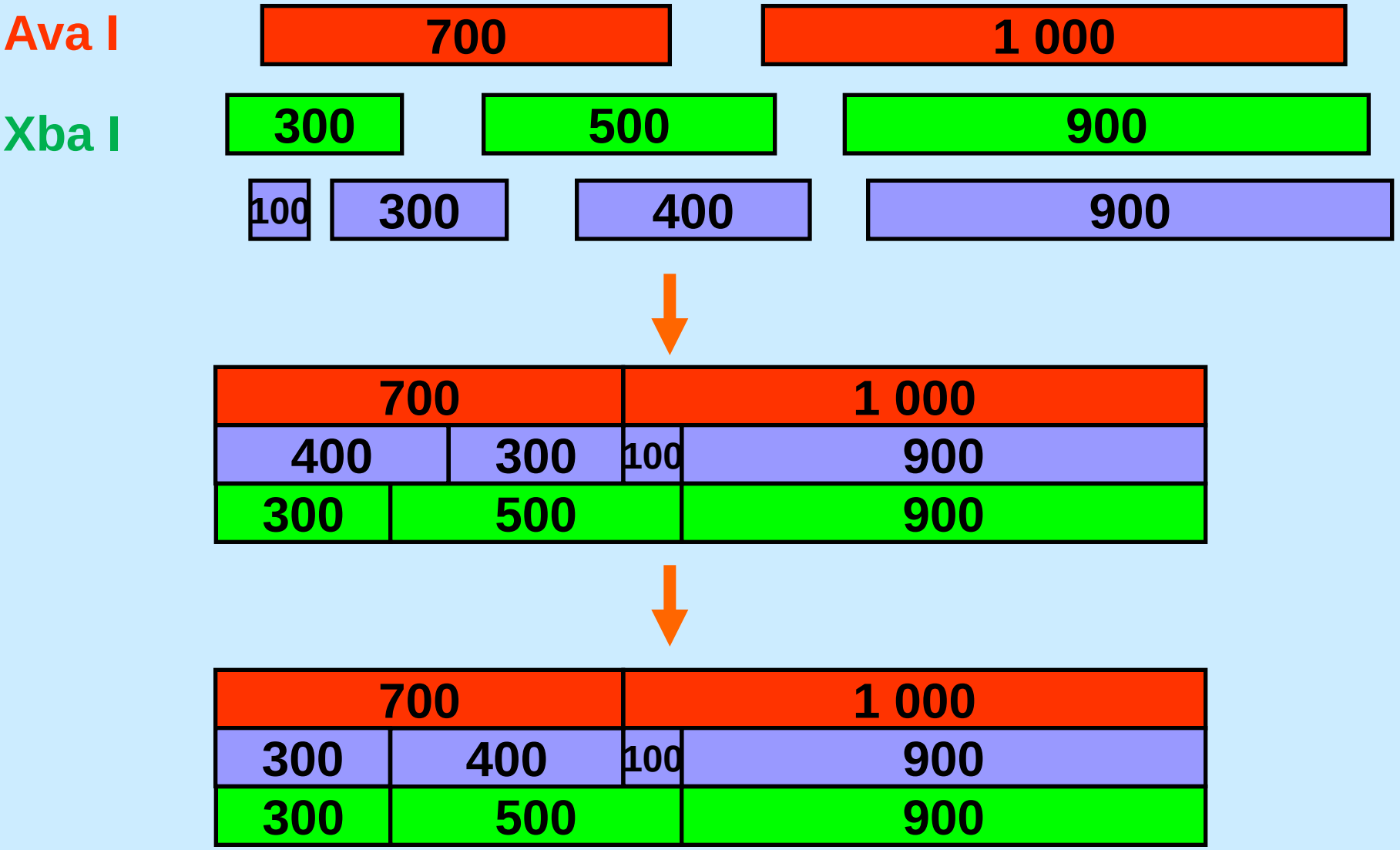
C-B-A



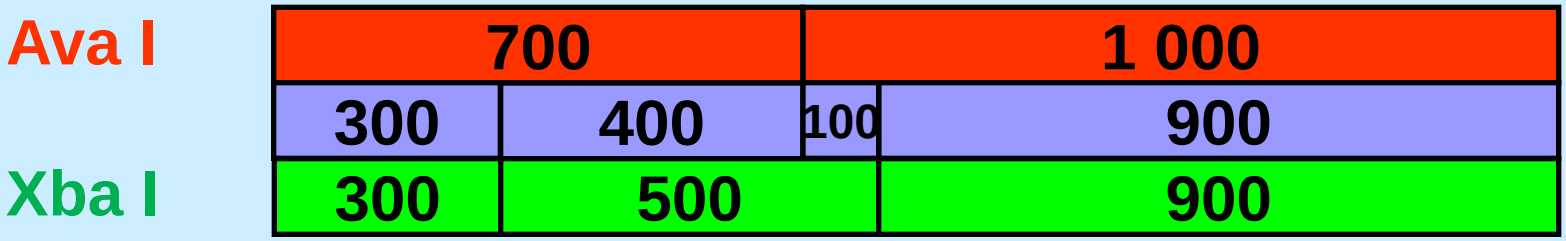
Mapy se skládají po štěpení více restriktázami

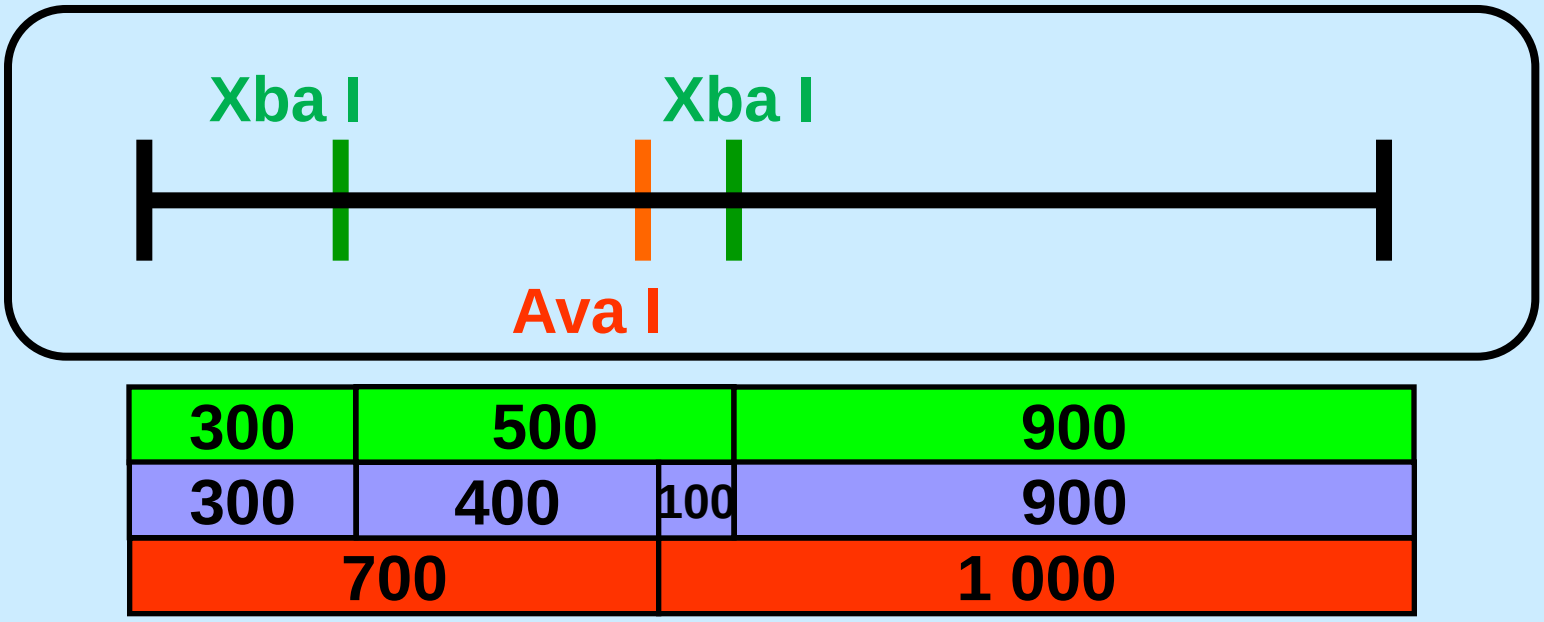
- **po štěpení restriktázou Xba I jste získali fragmenty**
  - **o velikosti 300, 500 a 900 bp**
- **po štěpení restriktázou Ava I fragmenty**
  - **o velikosti 700 a 1 000 bp**
- **po štěpení oběma restriktázami současně fragmenty**
  - **o velikosti 100, 300, 400 a 900 bp**

Mapy se skládají po štěpení více restriktázami



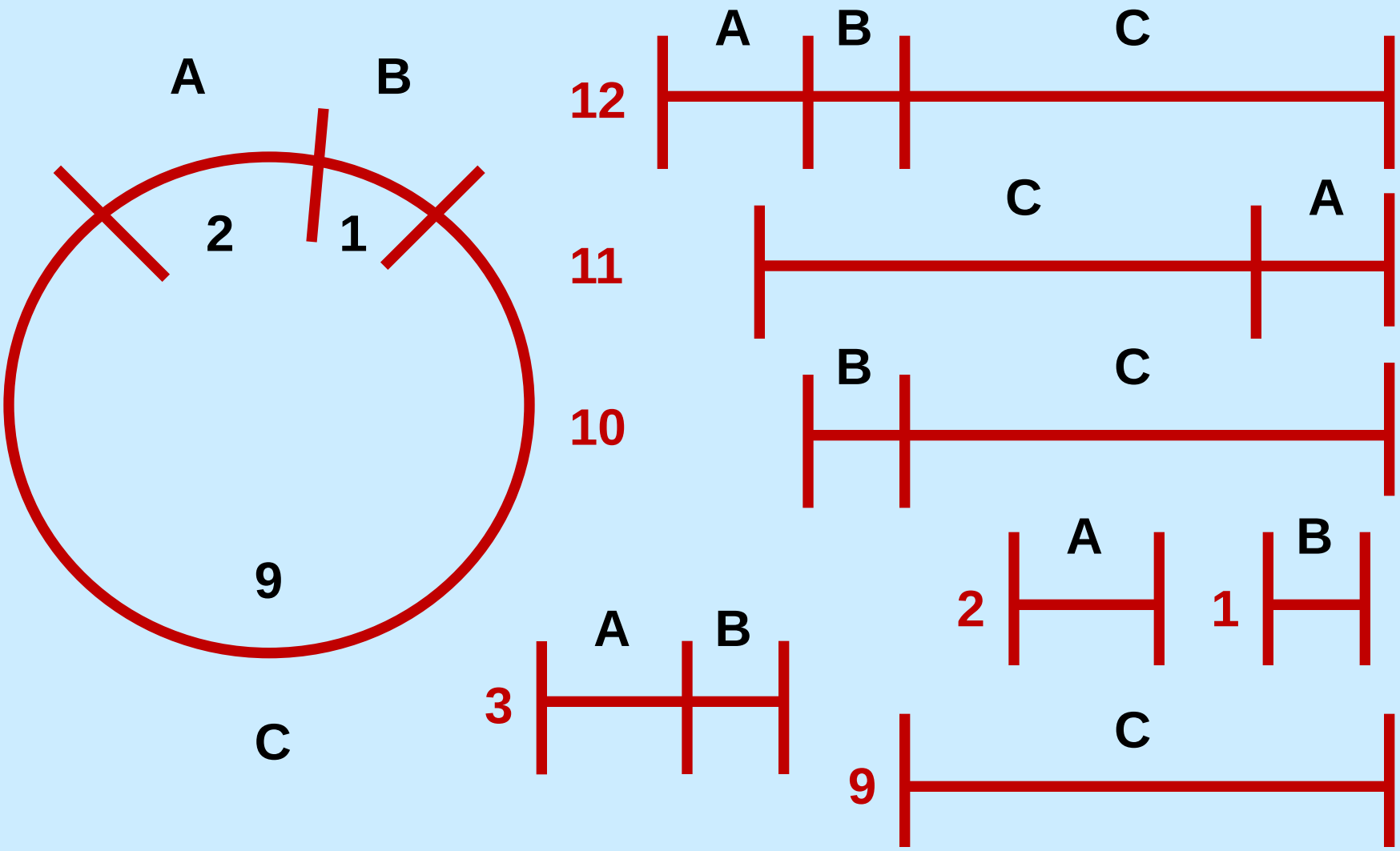
Výsledná mapa





Vytvoření restrikční mapy po parciálním štěpení

Co je to parciální štěpení



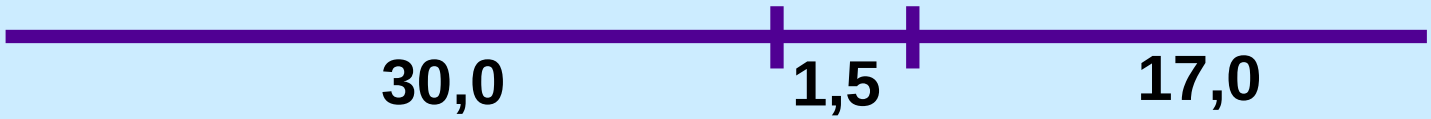
Příklad parciálního štěpení

1) **Po částečném štěpení DNA bakteriofága λ restriktázou *Kpn*I 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 *Kpn*I musí být



A teď si to ještě procvičte

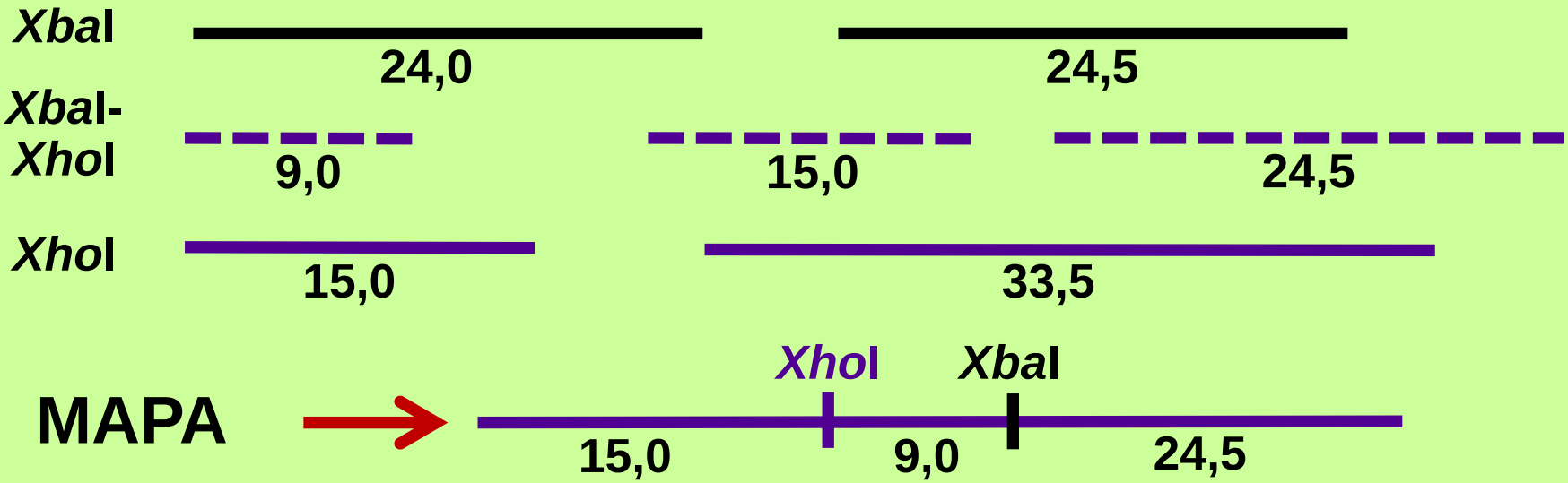
Jestliže z předchozího příkladu znáte restrikční mapu pro *Kpn*I, pak vytvořte restrikční mapu pro *Kpn*I, *Xba*I a *Xho*I podle výsledků shrnutých v tabulce

Enzym	Počet fragmentů	Velikosti (kbp)
*Xba*I	2	24,0; 24,5
*Xho*I	2	15,0; 33,5
*Kpn*I	3	1,5; 17,0; 30,0
*Xba*I + *Xho*I	3	9,0; 15,0; 24,5
*Xba*I + *Kpn*I	4	1,5; 6,0;17,0; 24,0

Postup řešení

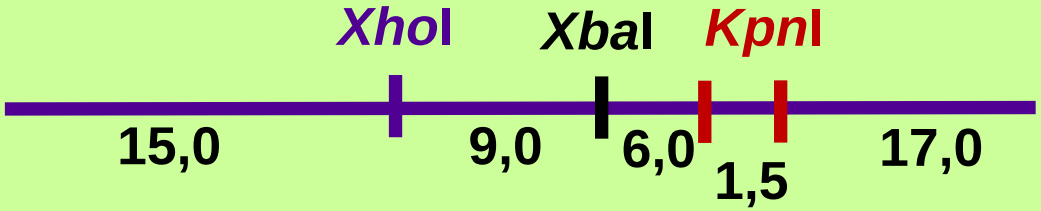
1) DNA fága λ je lineární, proto jsou počty restrikčních míst pro jednotlivé restriktázy rovny: *Xba*I = 1, *Xho*I = 1, *Kpn*I = 2

2) Fragmenty pro *Xba*I a *Xho*I jsou následující:



3) Všechna místa pro *Kpn*I jsou ve fragmentu *Xba*I (24,5), protože se tento fragment po štěpení *Xba*I-*Kpn*I neštěpí. Pořadí míst *Kpn*I 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**