



Enzymy používané při manipulaci s nukleovými kyselinami

doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.

bartosm@vfu.cz

Přírodovědecká fakulta MU, 2014

Obsah přednášky

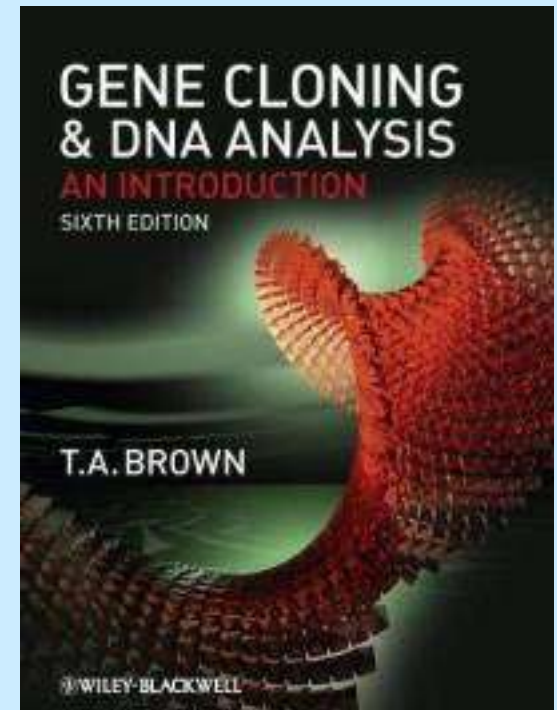
- 1) Přehled a funkce enzymů**
- 2) Restrikční endonukleázy – opakování**
- 3) Restrikční mapy**
- 4) Detekce polymorfismů v genomech**
- 5) DNA fingerprinty**
- 6) Proteinové fingerprinty**



Doporučená literatura

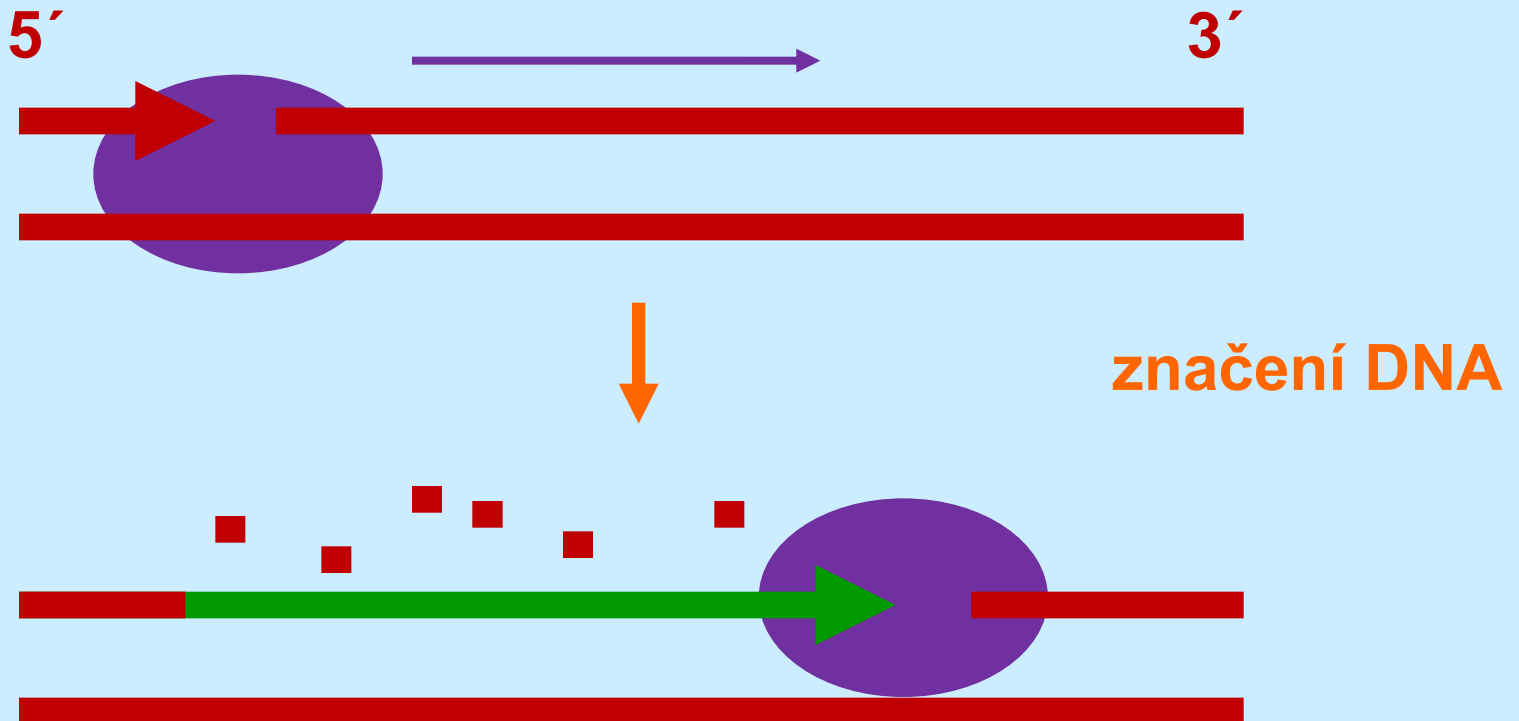
Brown (2010): Gene Cloning & DNA Analysis. Wiley-Blackwell, Sixth edition

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



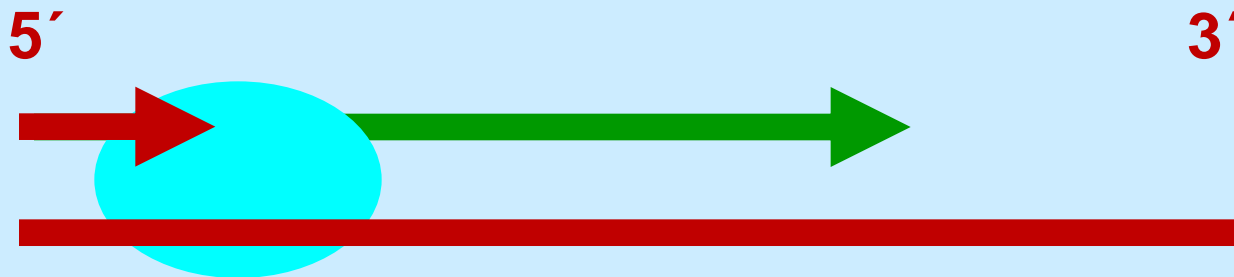
DNA polymeráza I

- syntéza ve směru 5' - 3'
- exonukleázové odbourávání ve směru 5' - 3'
- exonukleázové odbourávání ve směru 3' - 5'



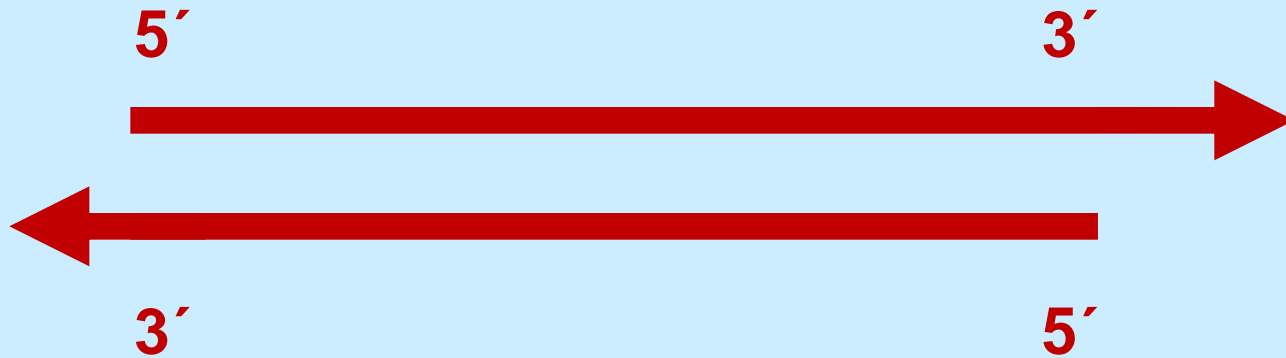
Klenowův fragment

- syntéza ve směru 5' - 3'
- exonukleázové odbourávání ve směru 3' - 5'
- tam, kde se neodbourává primer
- sekvenování, značení DNA

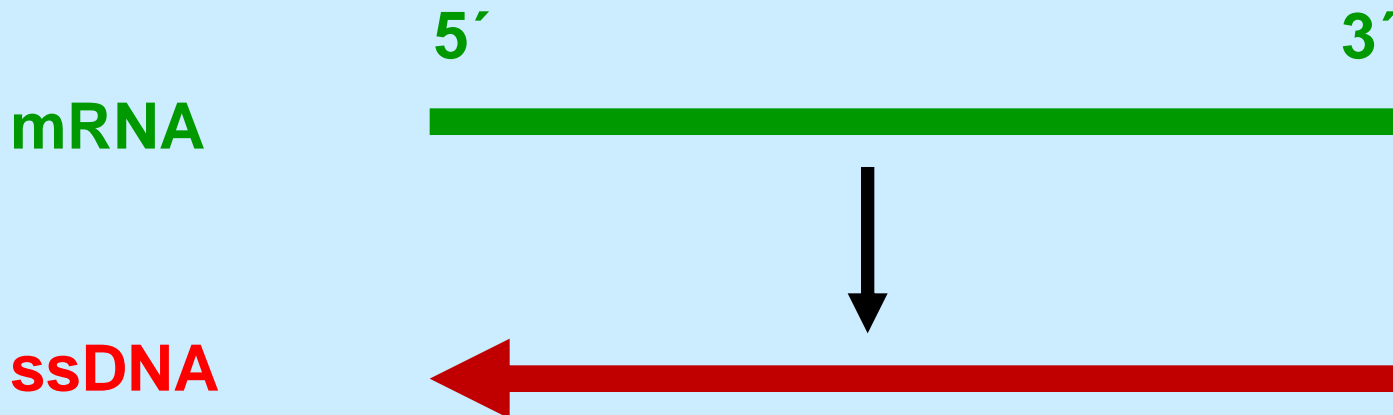


Další enzymy - I

Terminální deoxyribonukleotidyltransferáza

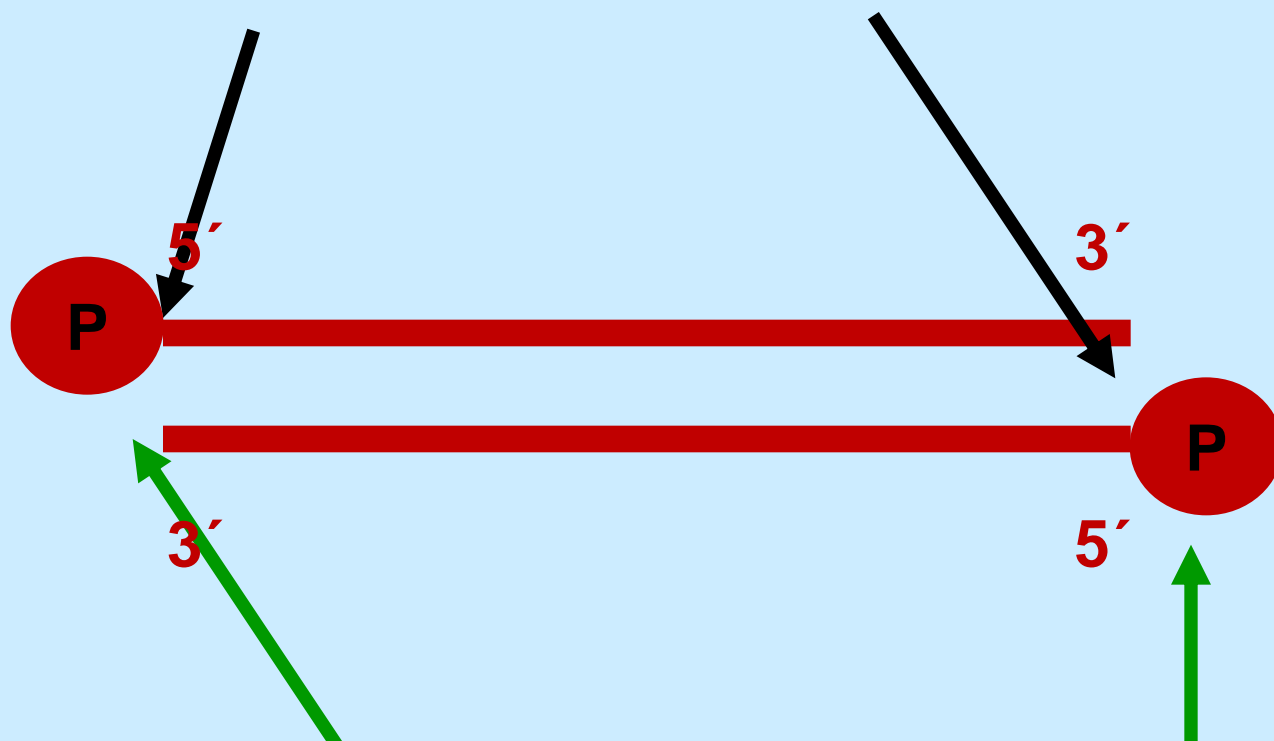


Zpětná transkriptáza



Fosfatázy a kinázy

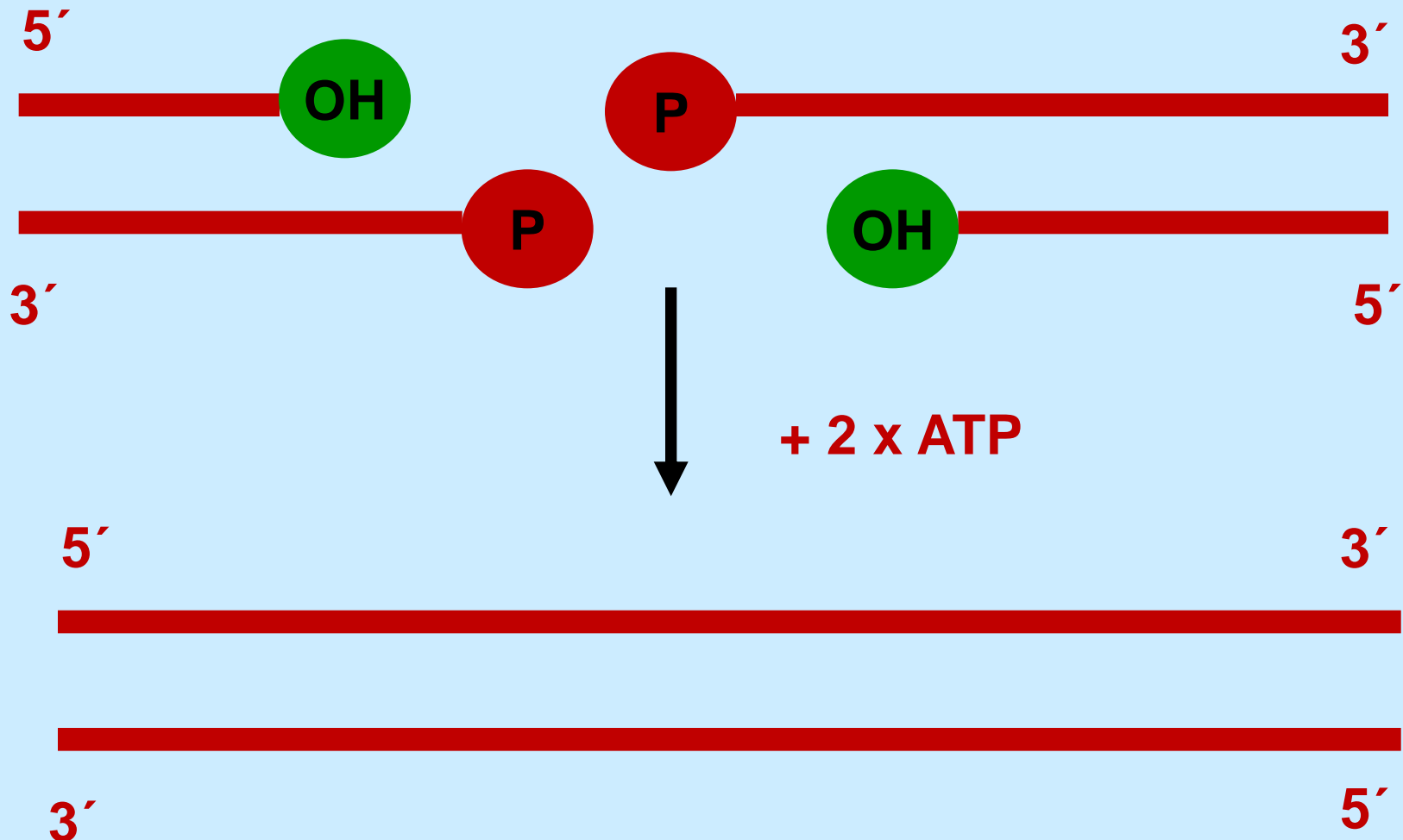
Fosfatázy - Alkalická fosfatáza (telecí střevo)



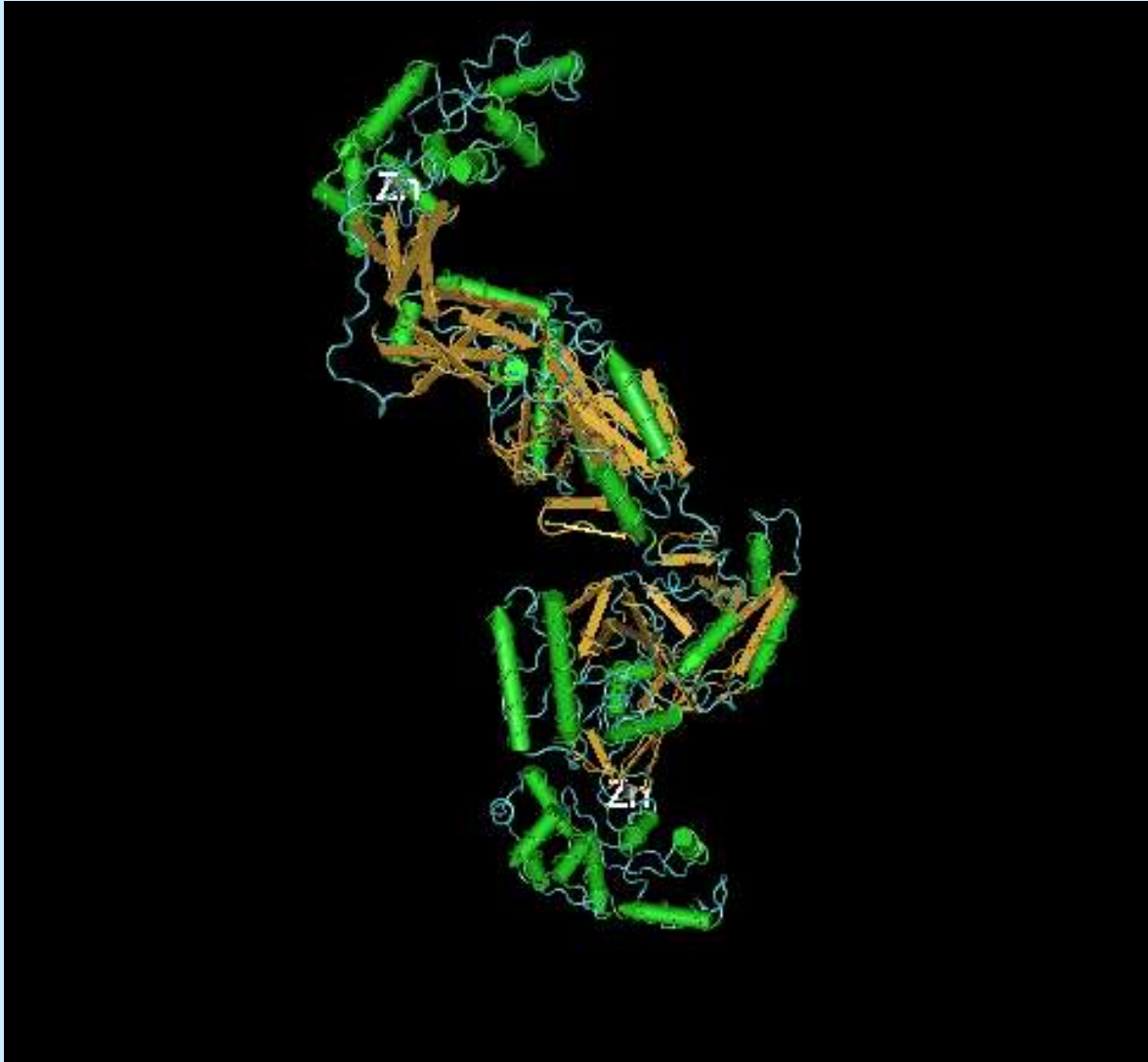
Kinázy - T4-polynukleotidkináza
(*E.coli* infikované bakteriofágem T4)

Ligáza

T4 DNA ligáza (*E. coli* infikované bakteriofágem T4)



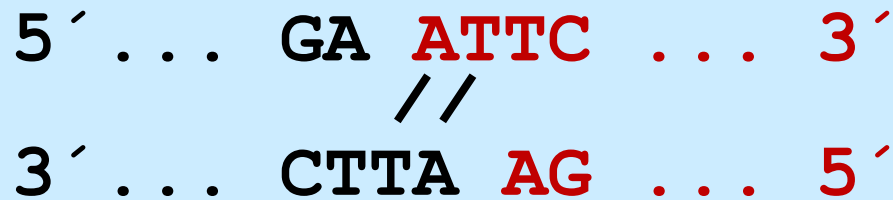
Ligáza



Ligace – spojení dvou fragmentů DNA



← samovolné připojení



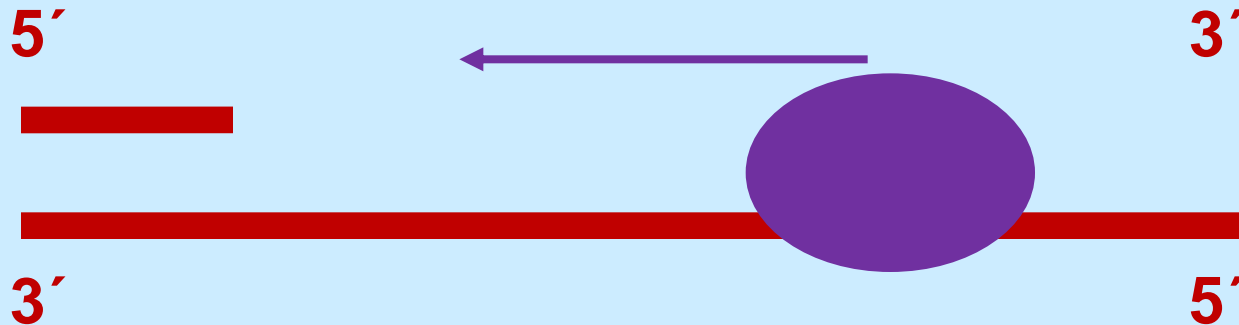
spojení ligázou

+ 2 x ATP



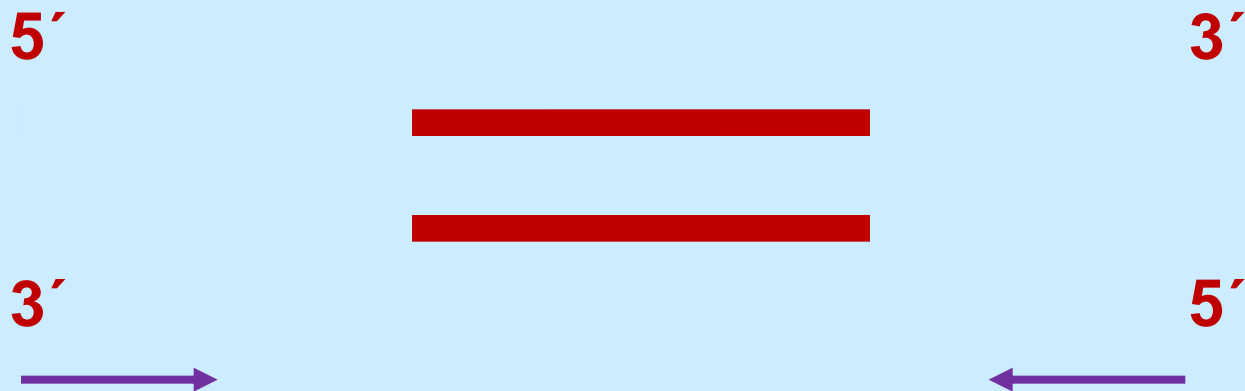
Exonukleáza III (E. coli)

- exonukleázové odbourávání ve směru 3' - 5'
- odbourává 3'-OH konec



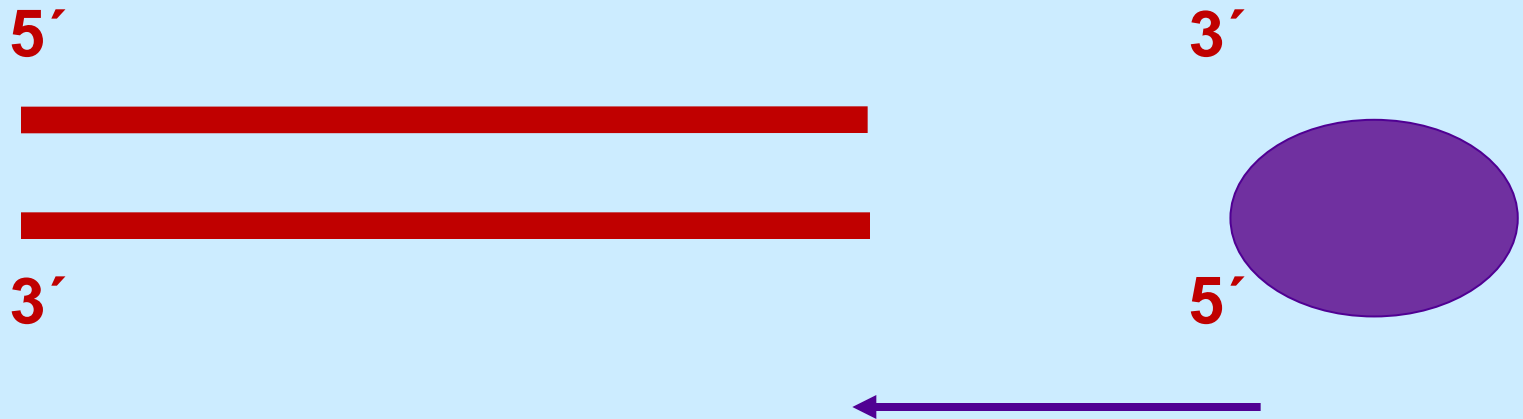
Exonukleáza Bal 31

- štěpí lineární dsDNA z obou konců
- zkracuje DNA fragmenty
- konce jsou zarovnané



S1 nukleáza (Aspergillus oryzae)

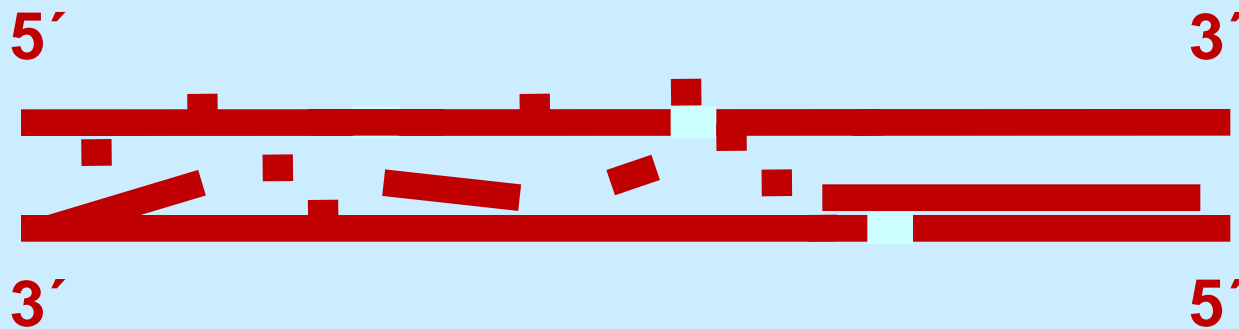
- specifická pro ssDNA
- odstraňuje jednořetězce na dsDNA



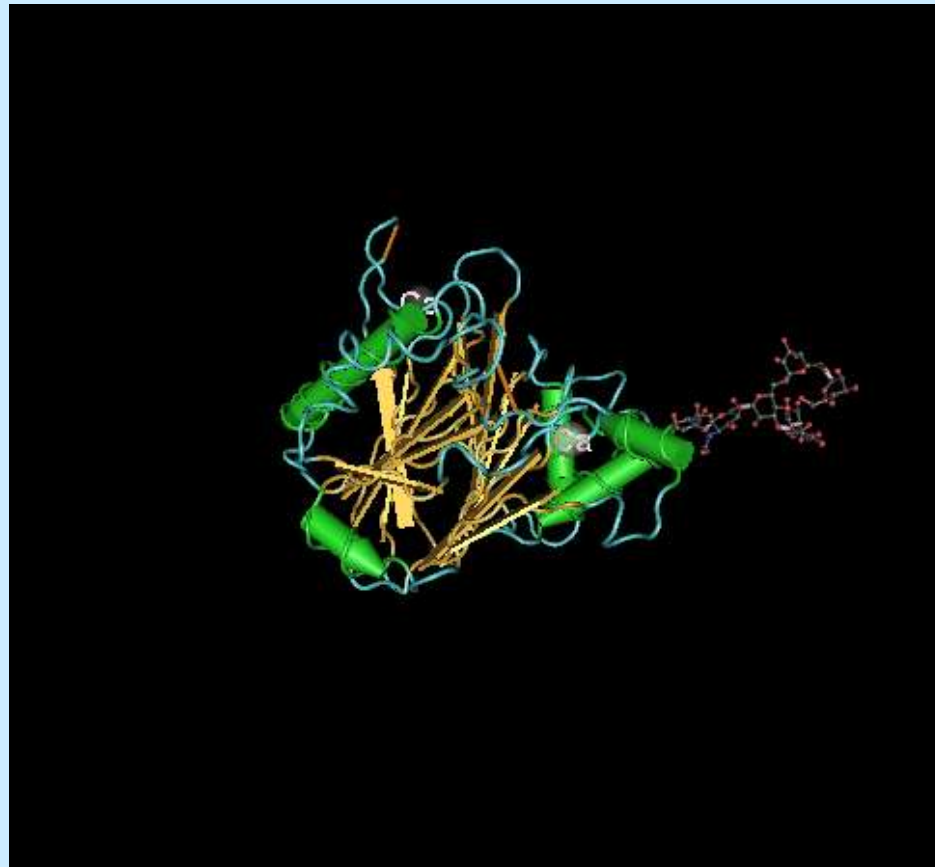
Deoxyribonukleázy

DNáza I (hovězí pankreas)

- nespecifická
- vytváří jednořetězcové zlomy
- následně DNA odbourává na mono a oligonukleotidy

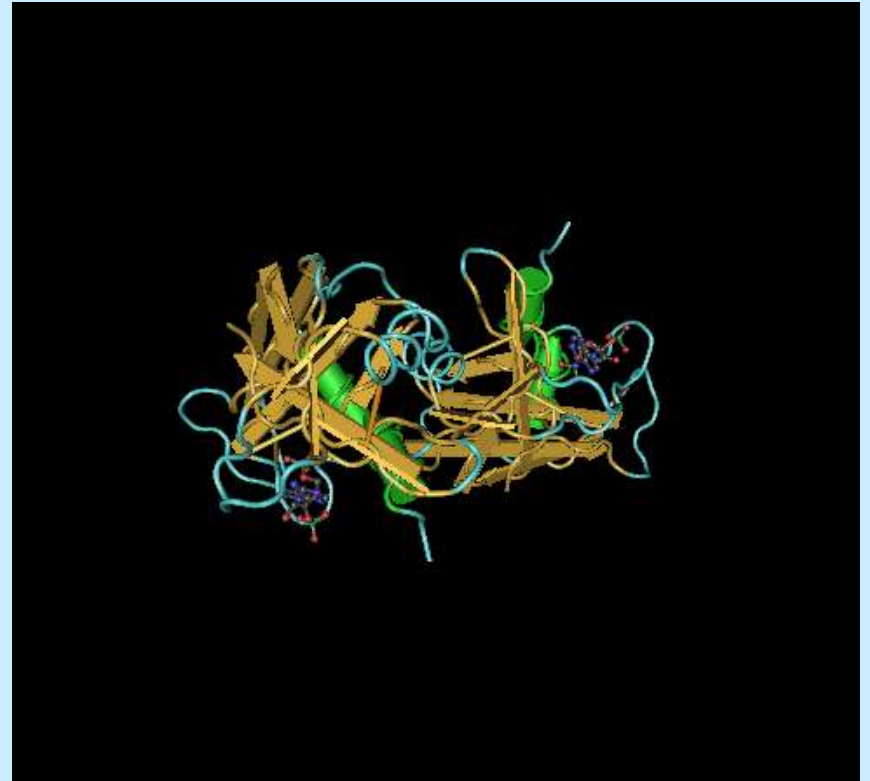


DNáza I



Ribonukleázy

- **nespecifické i specifické**
- **odbourávají RNA**
- **používají se k odstranění RNA ze vzorků s DNA**
- **extrémně stabilní enzymy**

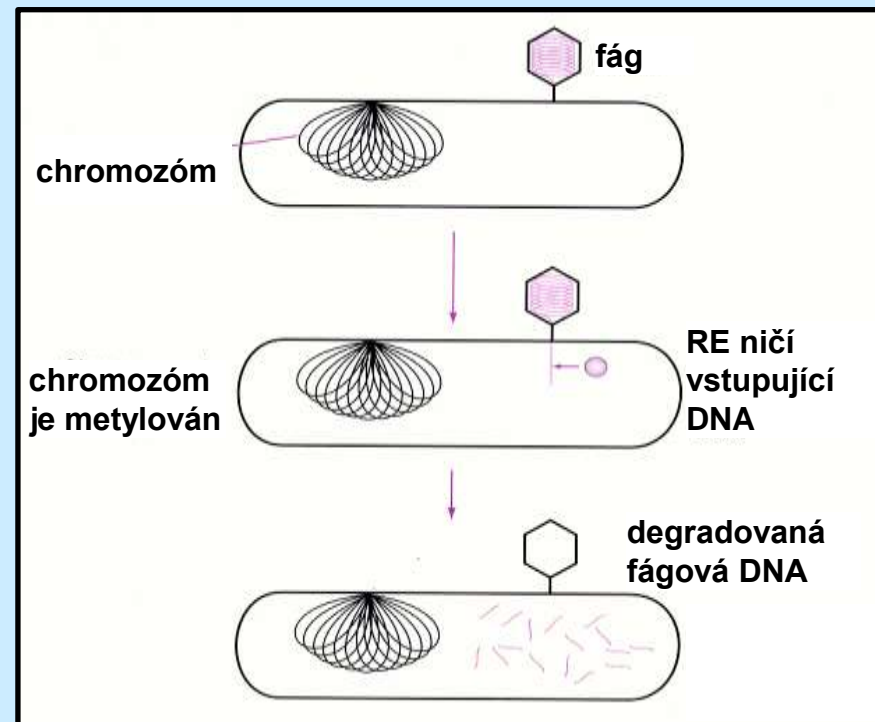


Restrikční endonukleázy

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



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 II

Rozpoznávají palindromy a štěpí ve stejném místě

- **vážou se na specifické (4-8 pb) 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?



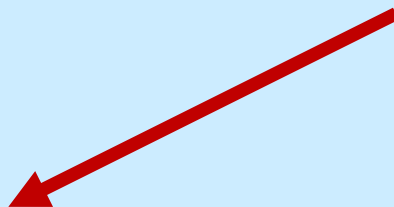
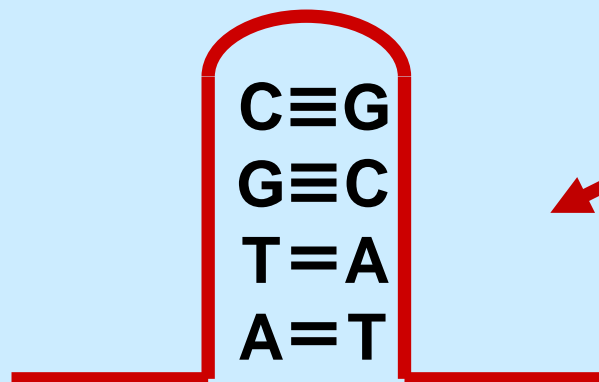
Přilehlá obrácená repetice

5' **ATGC**/GCAT 3'

3' TACG/**CGTA** 5'

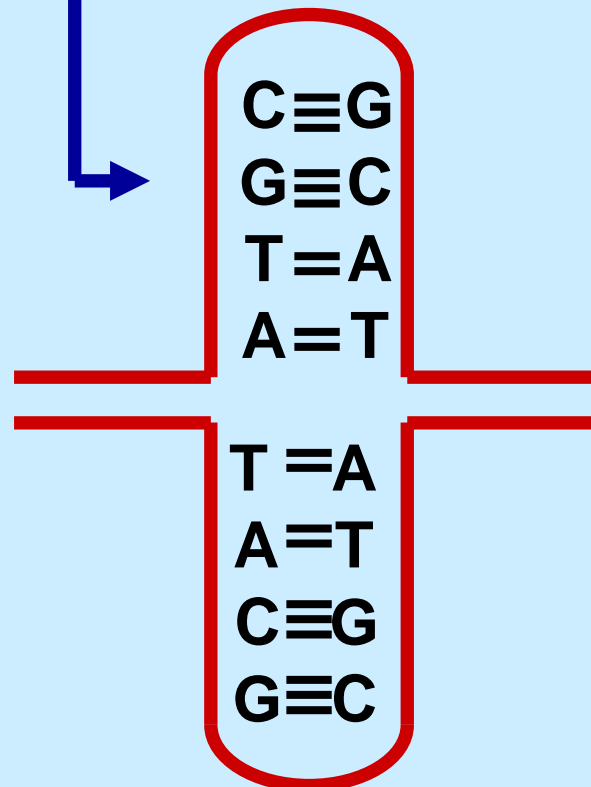
Vlášenska

ATGC GCAT



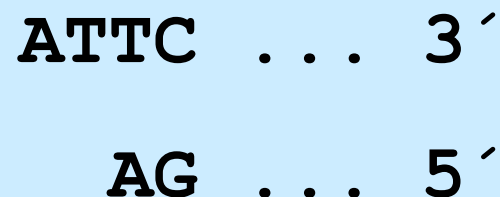
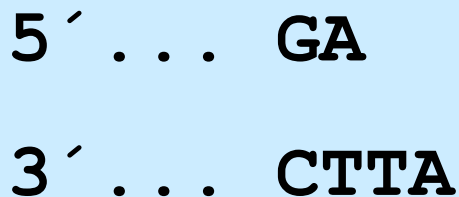
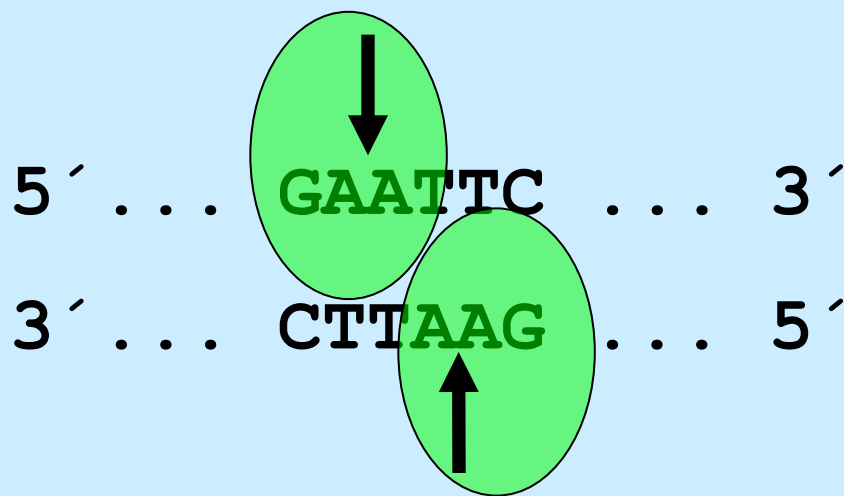
A na dvouřetězci to vypadá takto

ATGCGCAT
TACGCGTA



**Křížová
struktura**

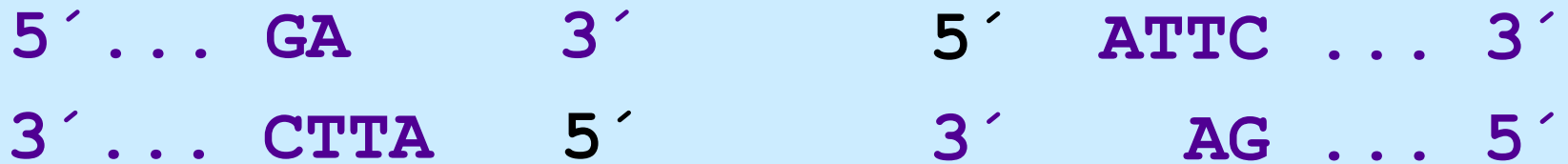
Jak funguje RE typu II



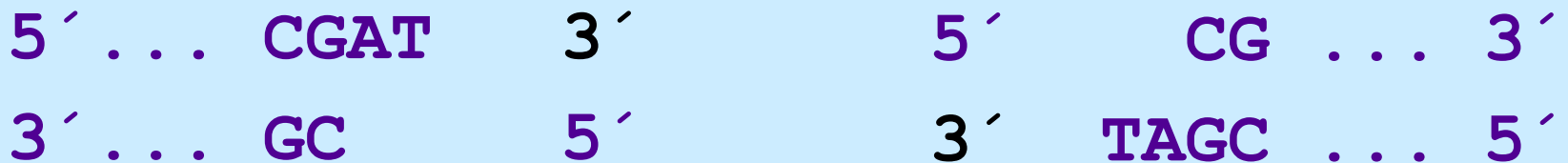
Je známo přes 3 500 RE, rozpoznávají asi 160 různých sekvencí

Různé typy konců

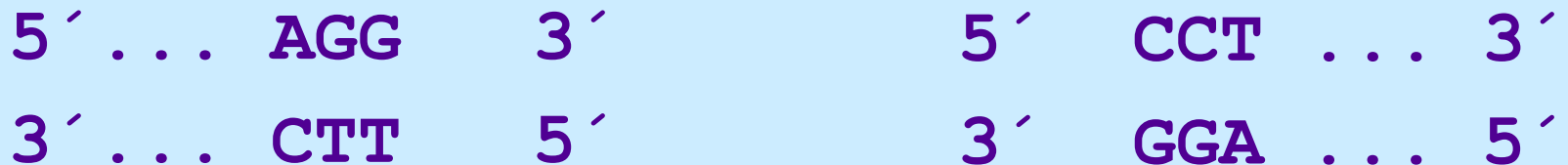
lepivé (kohezní) úseky přecházející na 5'- koncích, **EcoR I**



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>



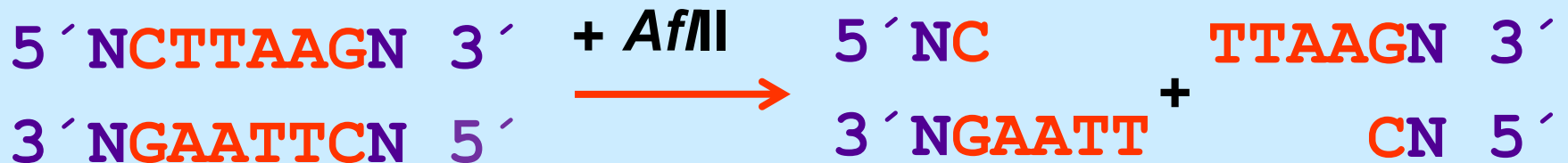
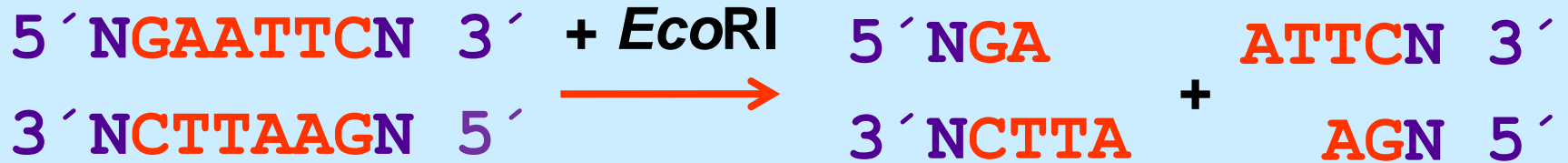
http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072437316/student_view0/chapter16/animations.html



Nebo si vyžádejte staženou prezentaci

Existuje i procvičovací pps soubor

Pro štěpení je důležitá orientace!



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'

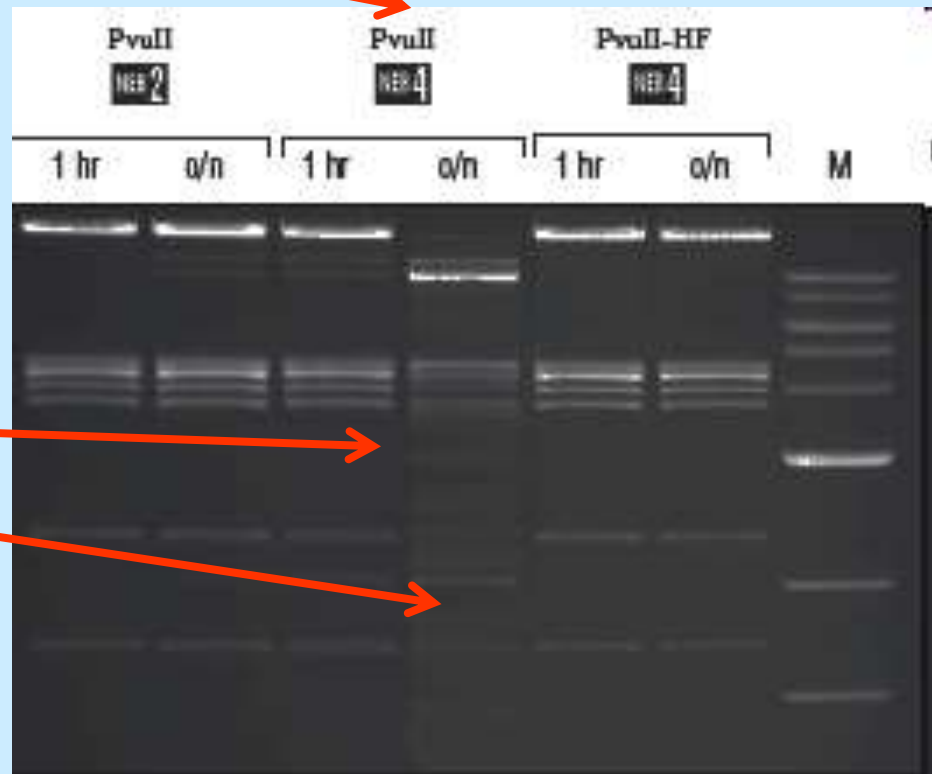
5' ... G **G** A T T **T** ... 3'

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

Důsledky relaxované specifičnosti

- nesespecifické produkty
- často za neoptimálních reakčních podmínek

nerozštěpené
fragmenty DNA



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

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



Homing endonucleases

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

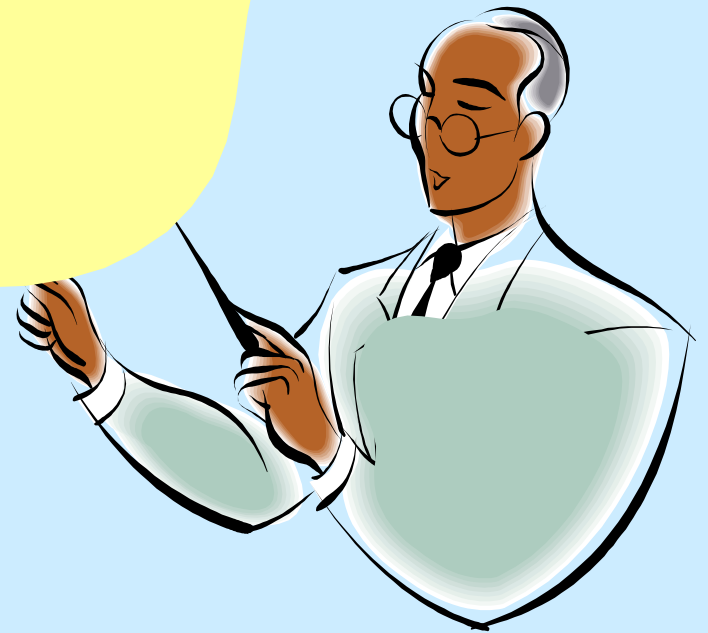
- Názvosloví jako u restriktáz s prefixem I- nebo PI-
- Štěpí s extrémně nízkou četností
- Nejsou příliš specifické, proto je průměrná frekvence štěpení jako by rozpoznávaly 10-12 bp

I-CeuI, I-SceI, PI-PspI

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/>**



Rozřezání genomu endonukleázami



dsDNA



Restrikční fragmenty

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

- 1) Elektroforézou můžeme stanovit velikost jednotlivých fragmentů**
- 2) Jednotlivé fragmenty můžeme poskládat a vytvořit tzv. restrikční mapu**



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

Využití restriktáz a PCR – detekce polymorfismů v genomech mikroorganismů

- **Krátké fragmenty = RFLP – polymorfismus délky restričních fragmentů**
- **Dlouhé fragmenty = PFGE – pulsní gelová elektroforéza**
- **Analýza produktů PCR = PCR-REA**
- **Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů = AFLP**
- **Polymorfismy konformace SSCP, DSCP**

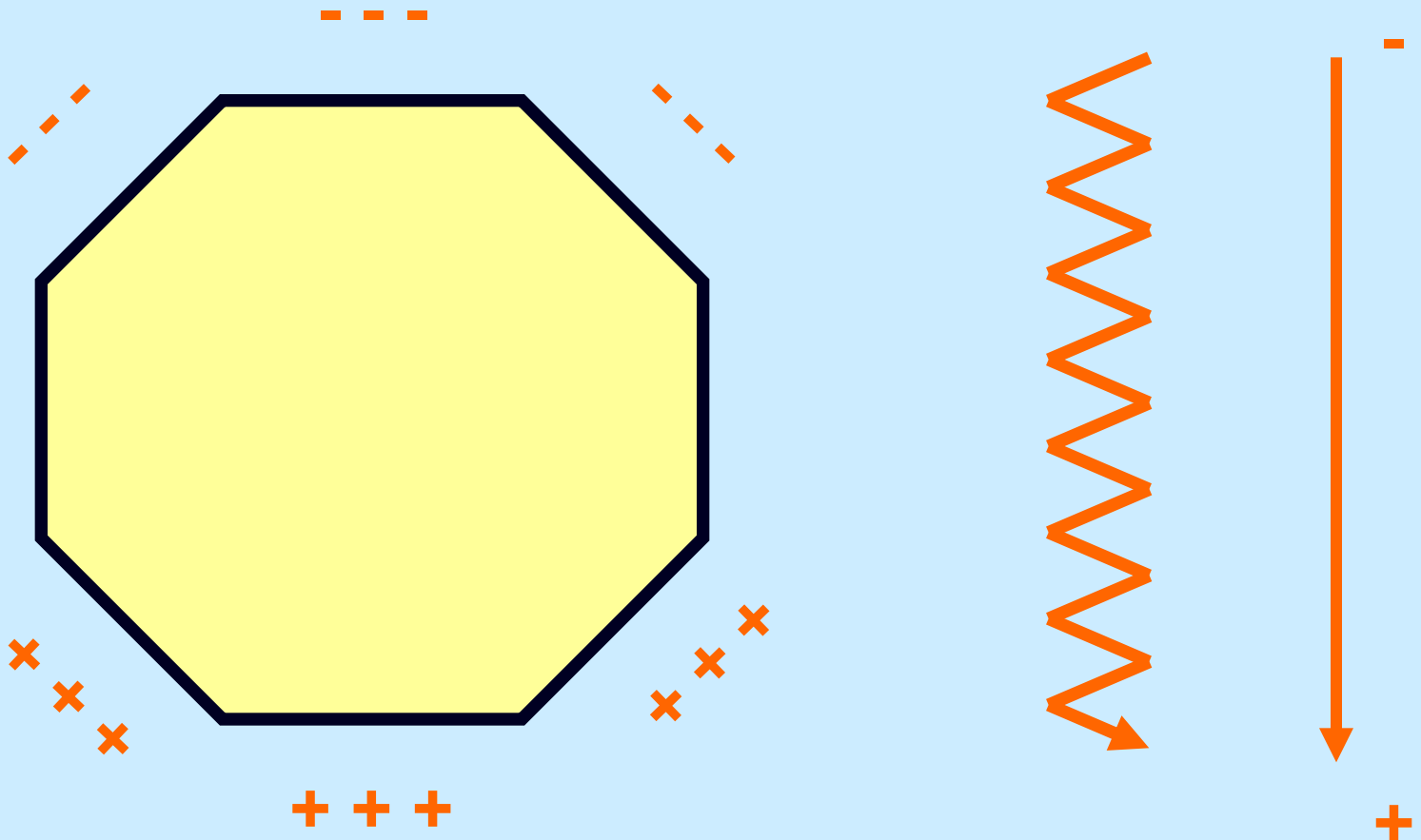
RFLP = polymorfismus délky restrikčních fragmentů

**Tuto část probereme v rámci
přednášky o hybridizaci**



PFGE Pulsní gelová elektroforéza

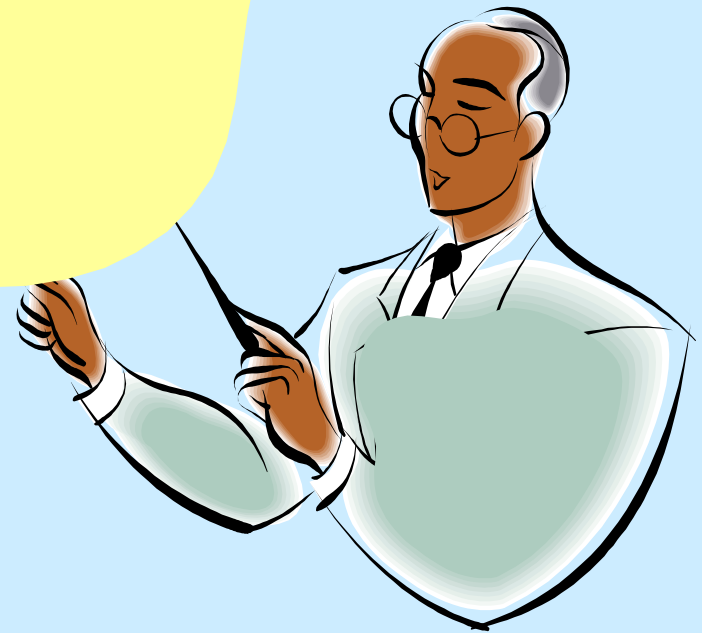
- určena k dělení velkých fragmentů DNA a chromozómů (nad 50 kbp, stovky kbp, megabáze)



Aparatura na PFGE

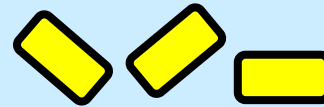


**Pěkná animace znázorňující pohyb
DNA v pulsním poli je na
http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/pulse_field.html**

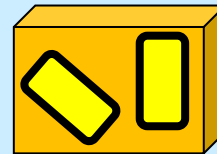


Jak se provádí PFGE

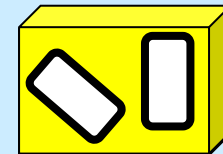
1) Buňky se naředí na vhodnou koncentraci



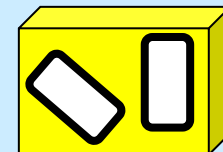
2) Buňky se zalijí do agarózy



3) Agarózové bločky se opracují enzymy – lyze, deproteinace

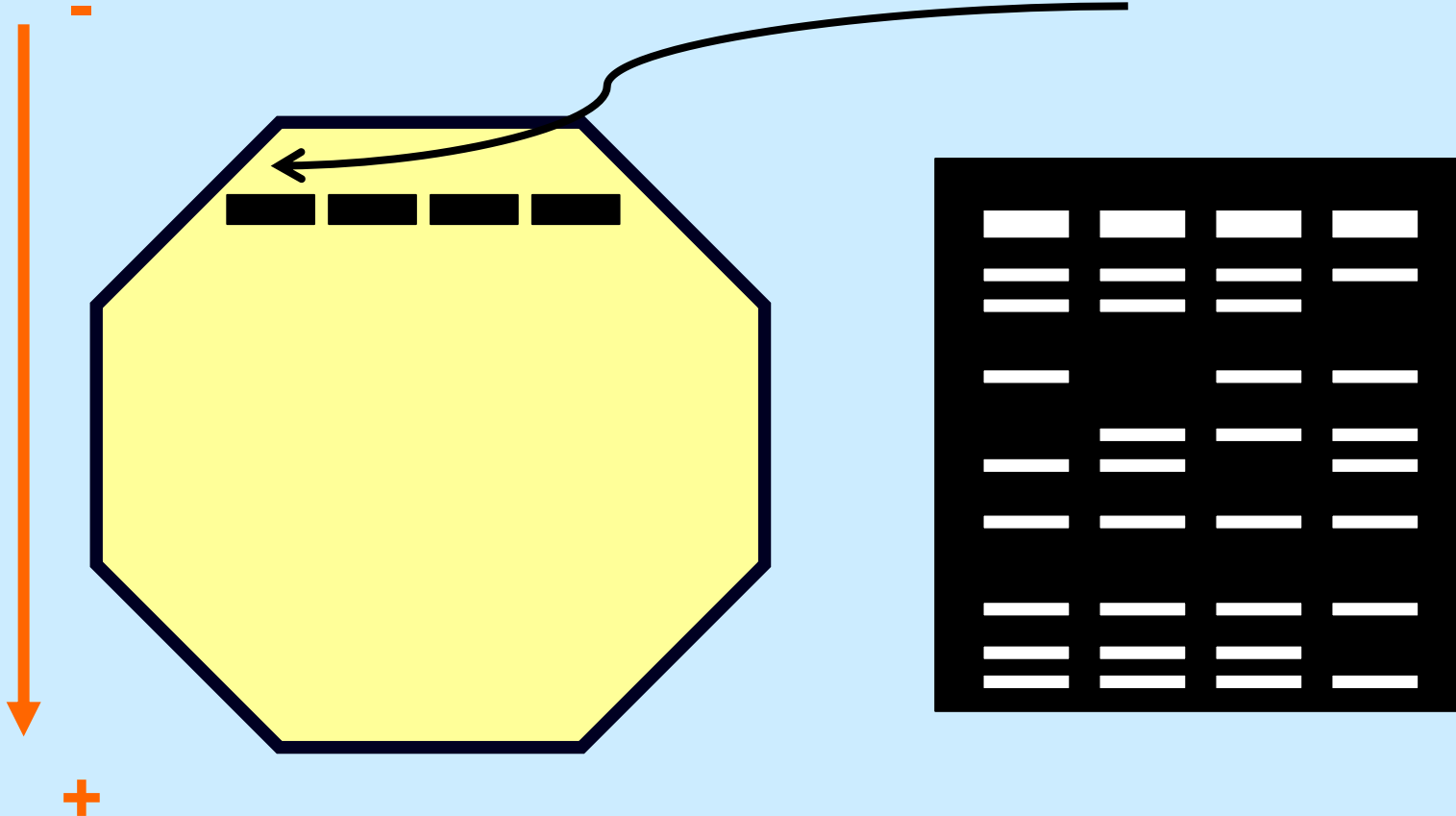
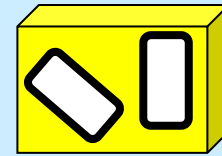


4) Na genomovou DNA v bločkách se aplikují restriktázy



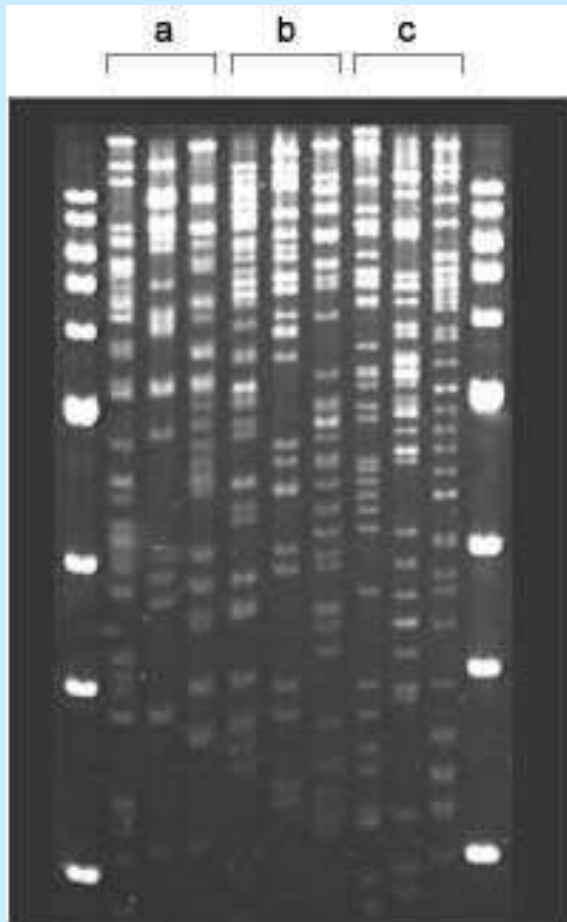
Jak se provádí PFGE

5) Bločky s rozštěpenou genomovou DNA se nanesou na elektroforézu



Příklad aplikace PFGE

Diferenciace mykobakterií po štěpení *NotI*

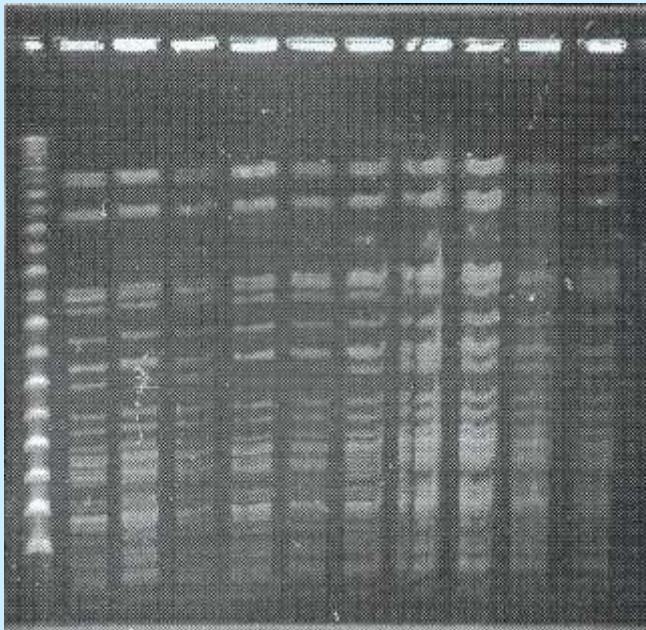


- nástroj pro epidemiology a epizootology
- stanovení fylogenetické příbuznosti
- nezbytná počítačová analýza dat

! porovnej s RFLP !

Jiný příklad aplikace PFGE

Diferenciace *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* po štěpení *SnaBI*, *SpeI*



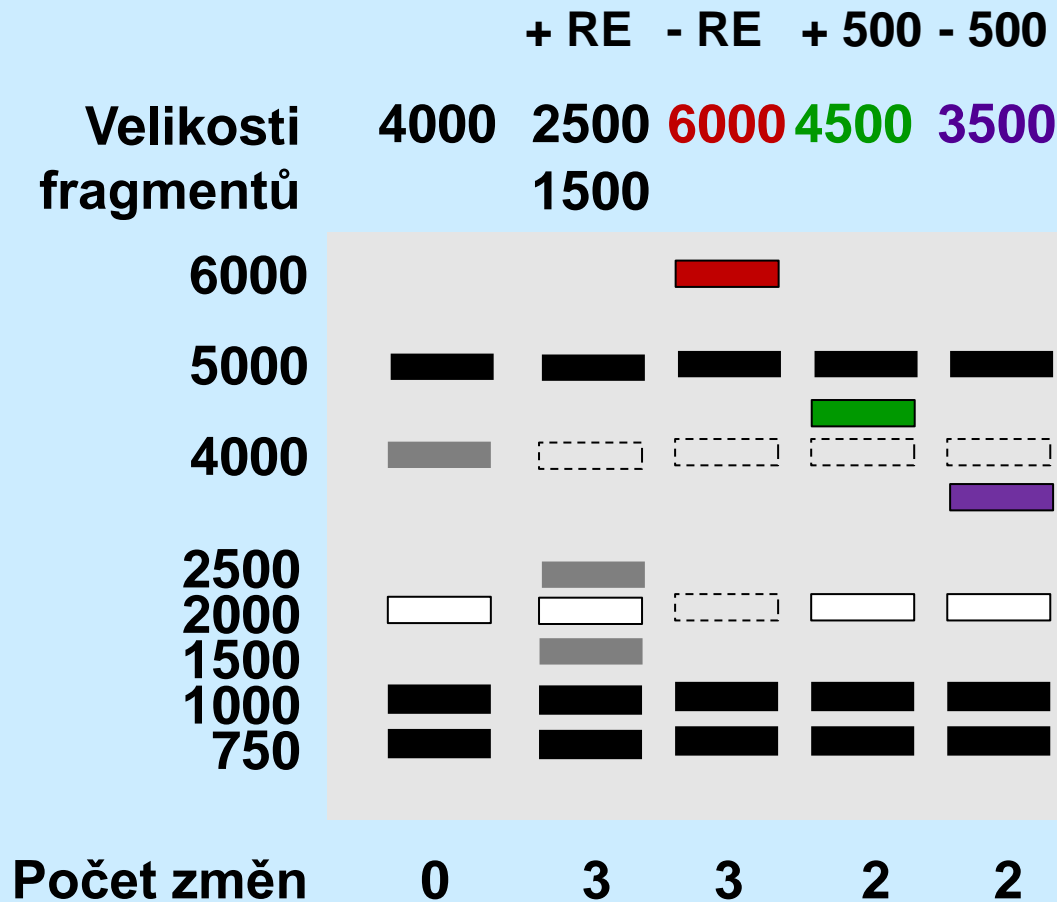
- Pokus odlišit RFLP typy B-C1

Diferenciace *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* po štěpení *XbaI*, *DraI*

- Studium genetické diversity kmenů izolovaných u pacientů s AIDS

Jak se vyhodnocují fragmenty získané po PFGE?

Analýza změn ve fragmentu 4 000 bp



Vliv mutace na RFLP spektrum

Mutace

Výsledek

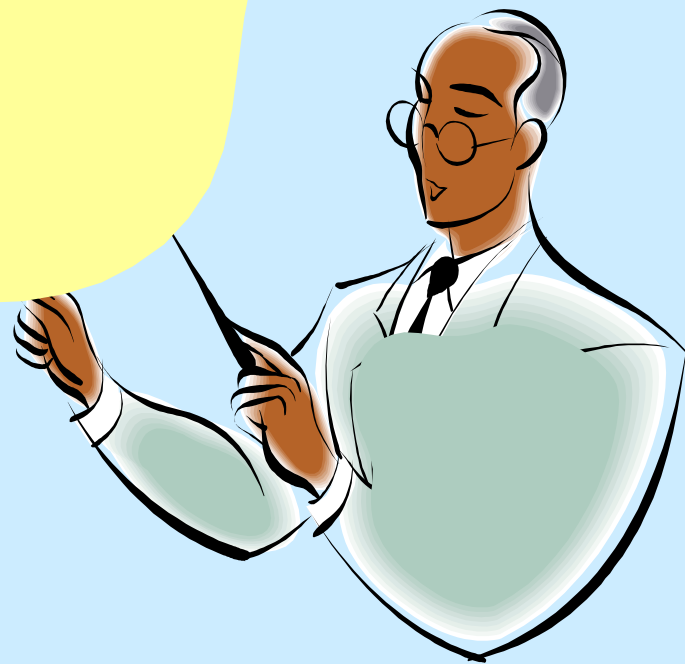
- **bodová +RE**
 - **bodová -RE**
 - **inzerce**
 - **delece**
- **ztráta fragmentu + 2 nové**
 - **ztráta 2 fragmentů + 1 větší nový**
 - **stejný počet fragmentů, ale jeden se „prodlouží“ o délku inzerce**
 - **stejný počet fragmentů, ale jeden se „zkrátí“ o délku delece**

Kritéria pro epidemiologii

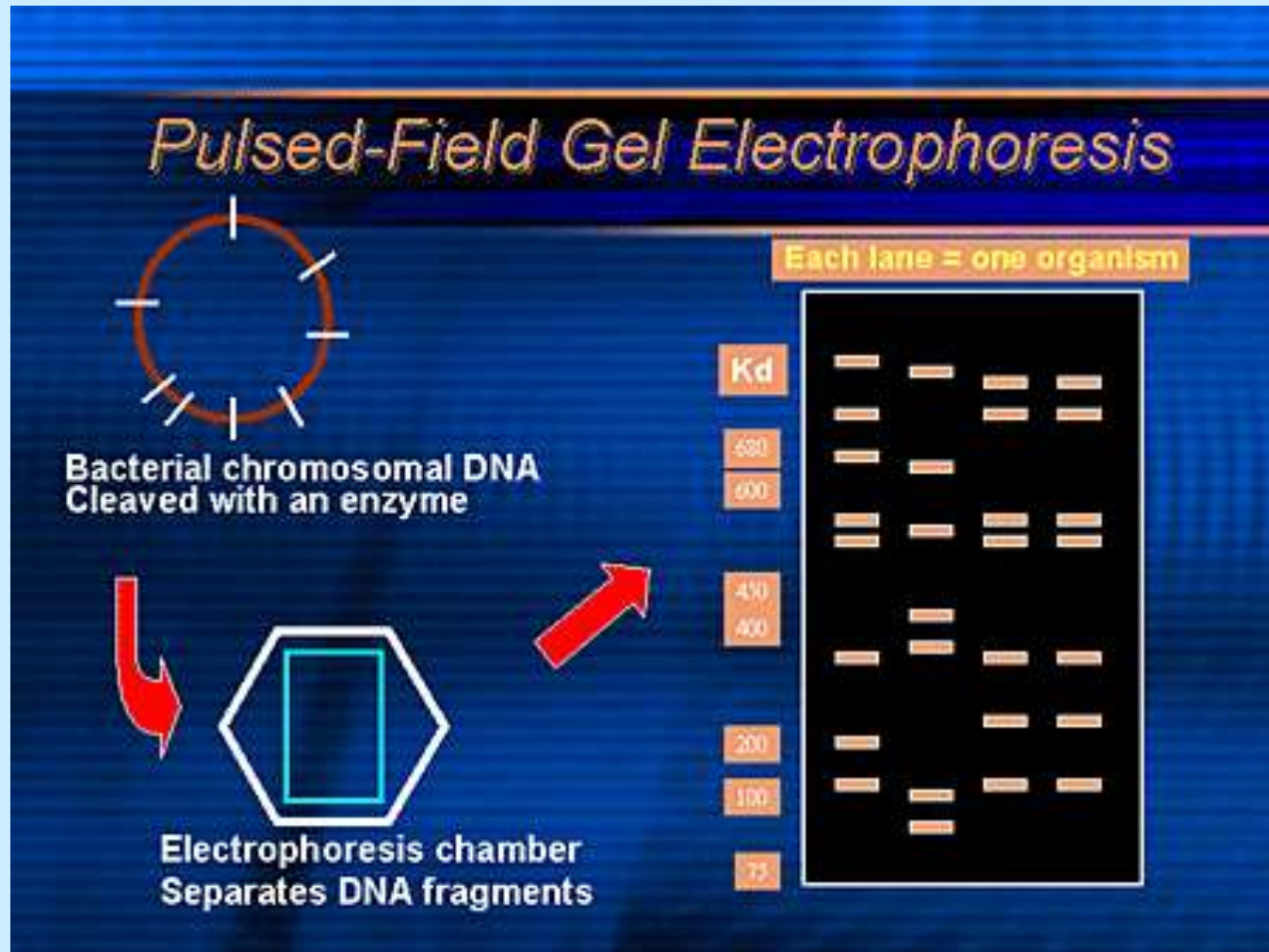
Kategorie	Počet genetických změn	Počet změn v PFGE	Epidemiologie
Neodlišitelné	0	0	Součást ohniska
Blízce příbuzné	1	2-3	Pravděpodobně (probably) součást ohniska
Asi příbuzné	2	4-6	Možná (possibly) součást ohniska
Odlišné	≥ 3	≥ 7	Mimo ohnisko

Tenover et al. (1995): Journal of Clinical Microbiology 33 (9), 2233-2239

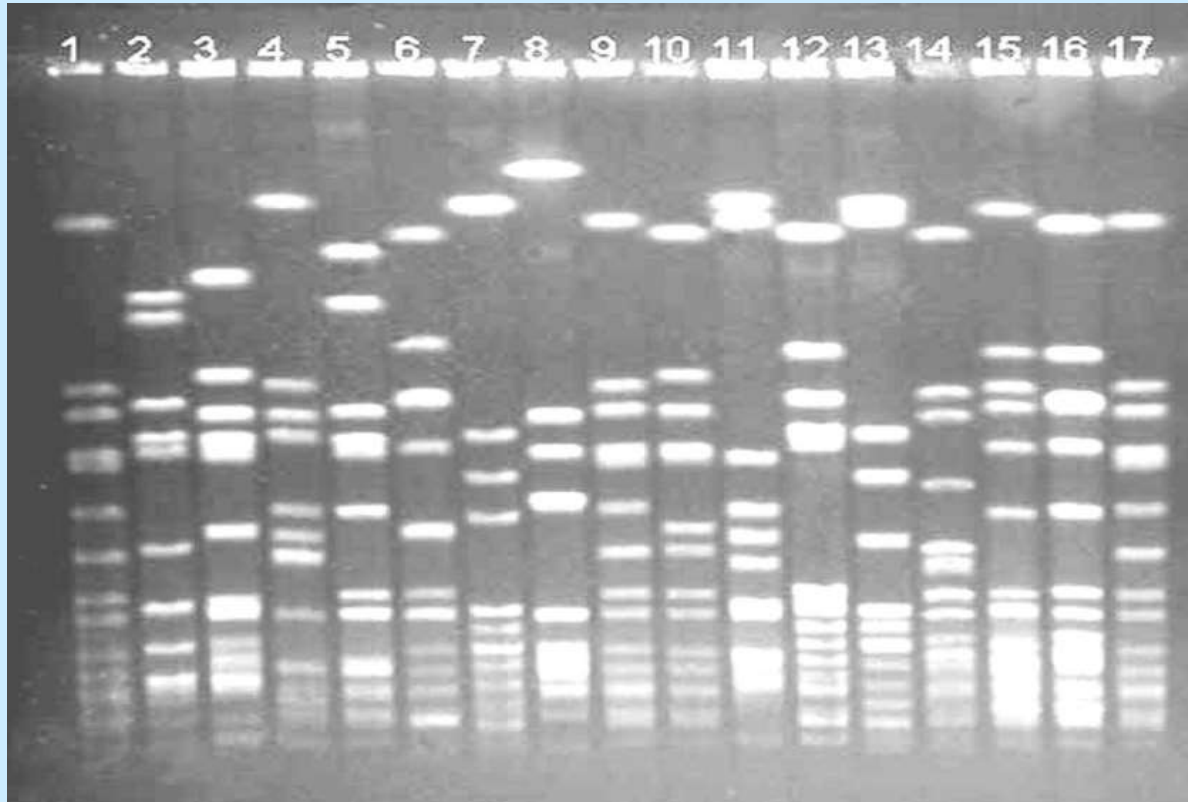
Stejná pravidla platí pro RFLP



Analýza methicilin rezistentních *S. aureus* pomocí PFGE



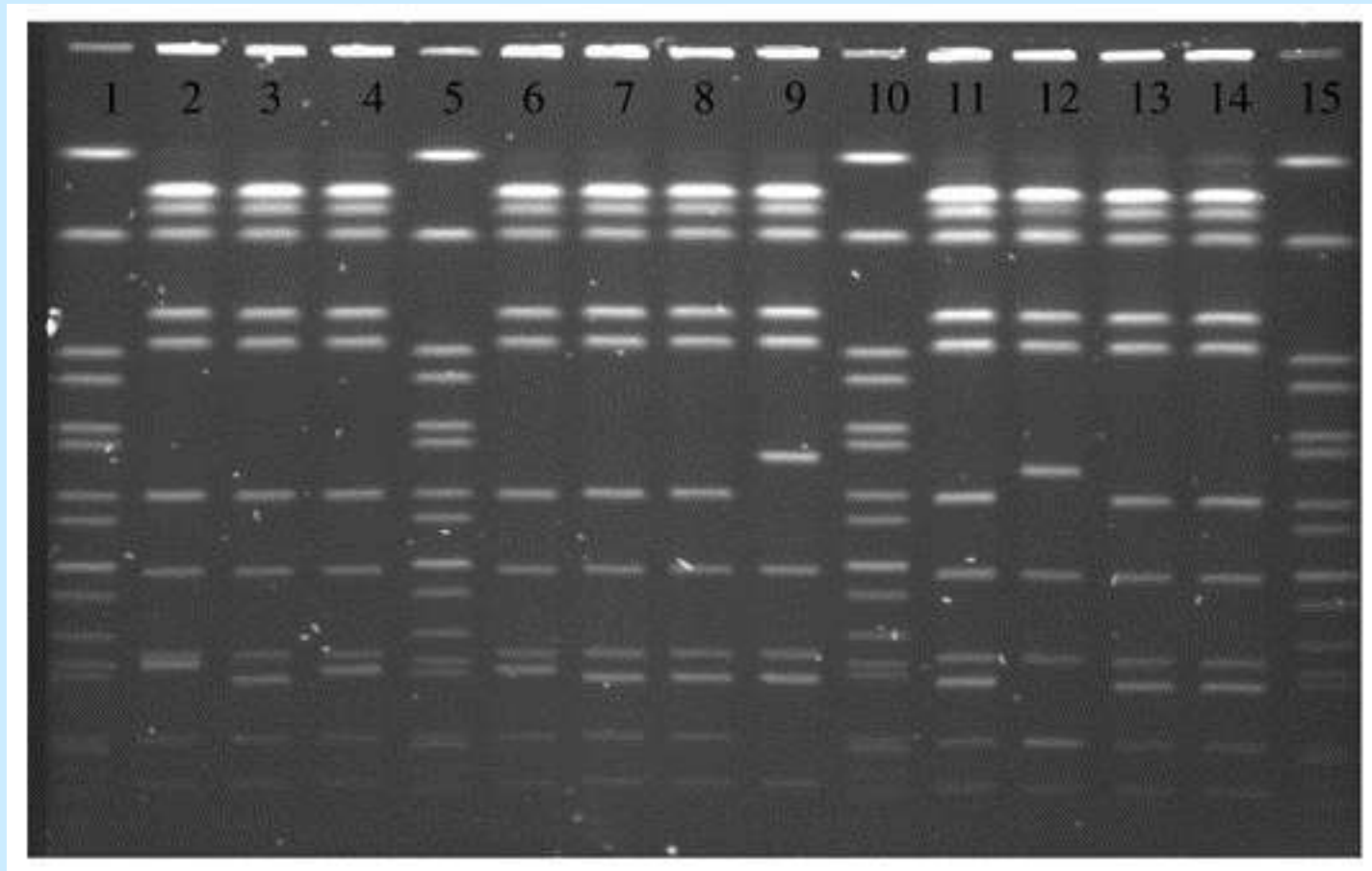
Příklad PFGE pro MRSA



Štěpení restriktázou *Sma*I

Dar et al. (2006): Molecular epidemiology of clinical and carrier strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the hospital settings of north India. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 5:22

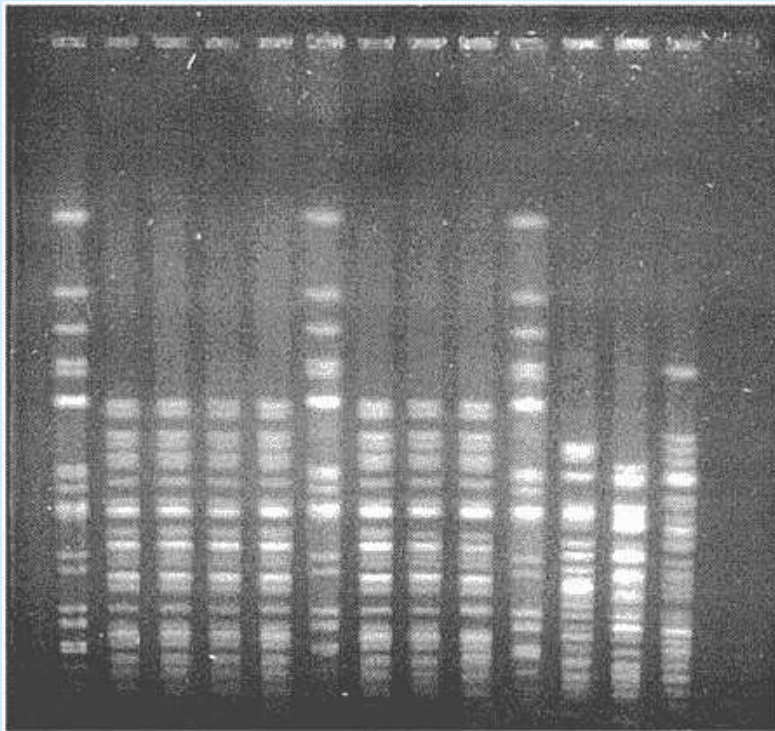
Typizace salmonel pomocí PFGE



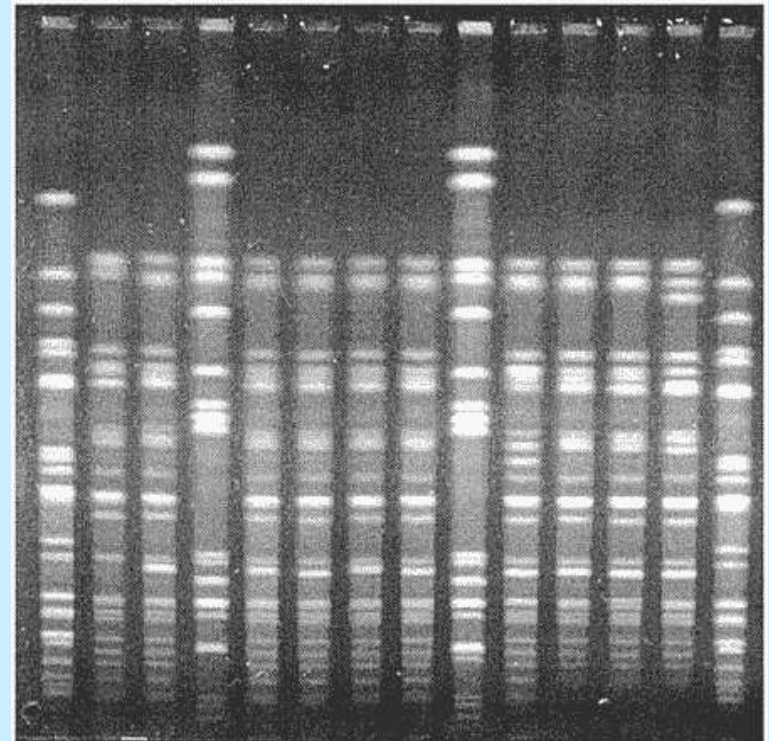
Štěpení restriktázou *BlnI*

De Lappe et al. (2009): Role of subtyping in detecting Salmonella cross contamination in the laboratory. BMC Microbiology 9: 115

Shigella flexneri a *Shigella sonnei*



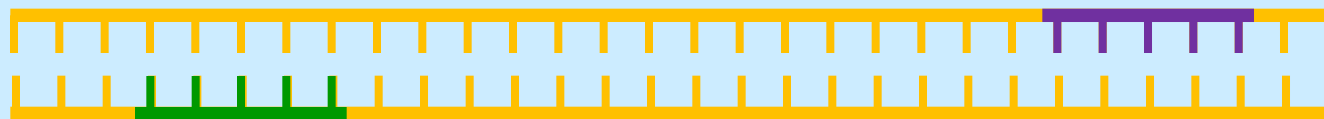
Štěpení restriktázou *BlnI*



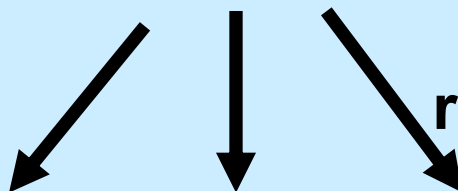
Štěpení restriktázou *XbaI*

Kolektiv (2005): Outbreak of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* enterocolitis in men who have sex with men, Quebec, 1999 to 2001. CCDR 31-08

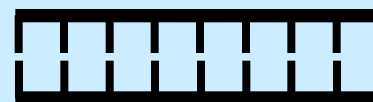
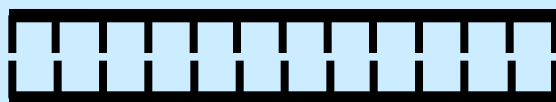
PCR-REA, PRA, PCR-RFLP



amplifikace



restrikční štěpení



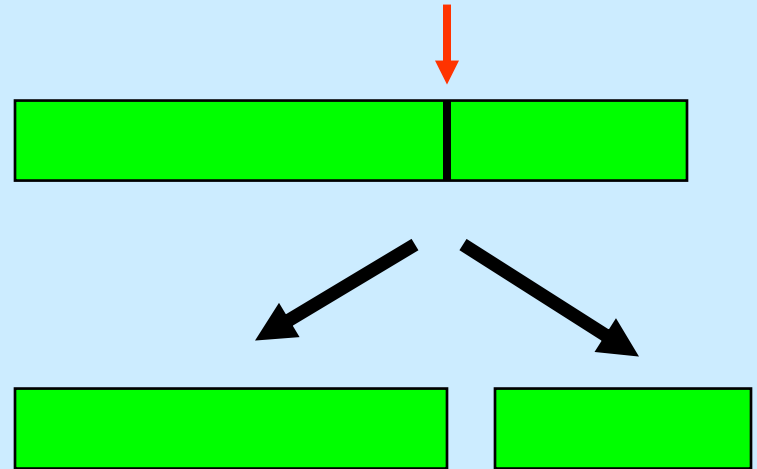
Bodová mutace u PCR-REA

- 1) Amplifikace specifické DNA sekvence
- 2) Štěpení restriktázou



bez štěpení

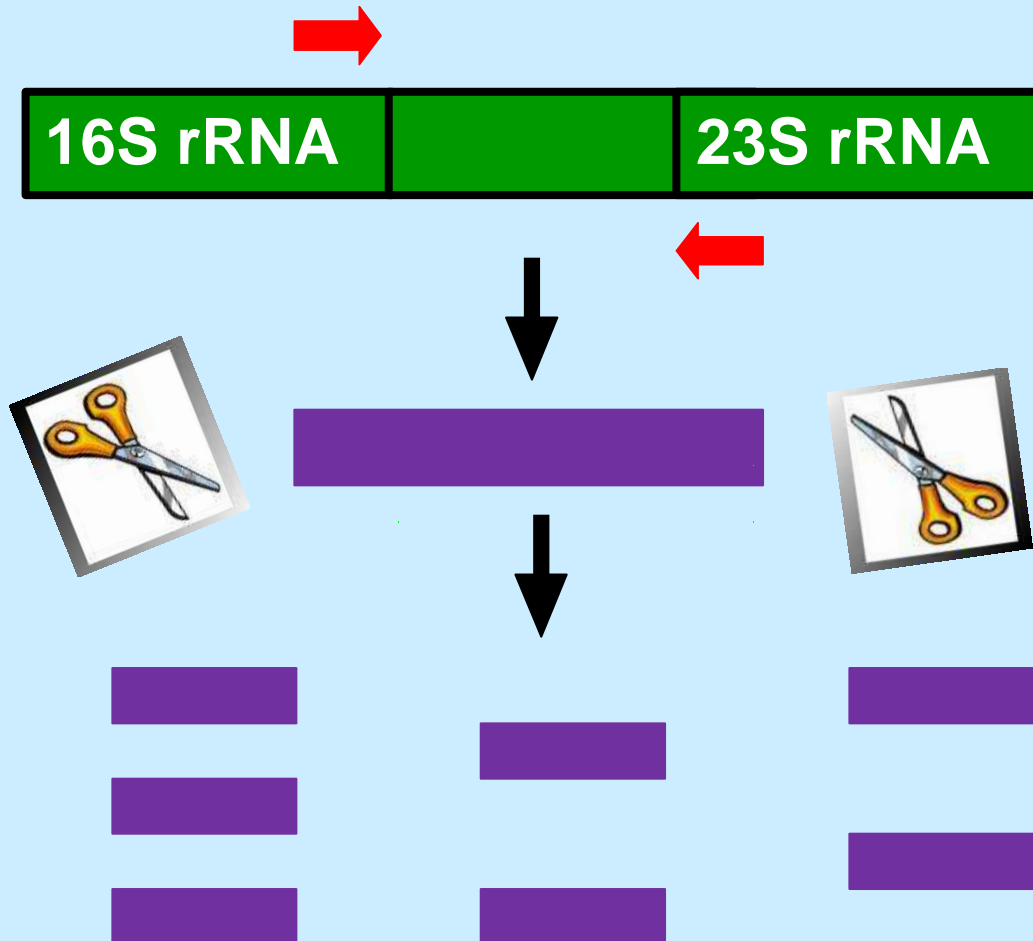
bodová mutace



Příklady aplikací PCR-REA

Diferenciácie zástupců rodu Mycobacterium

16S-rRNA, mezerník 16S-23S-rRNA

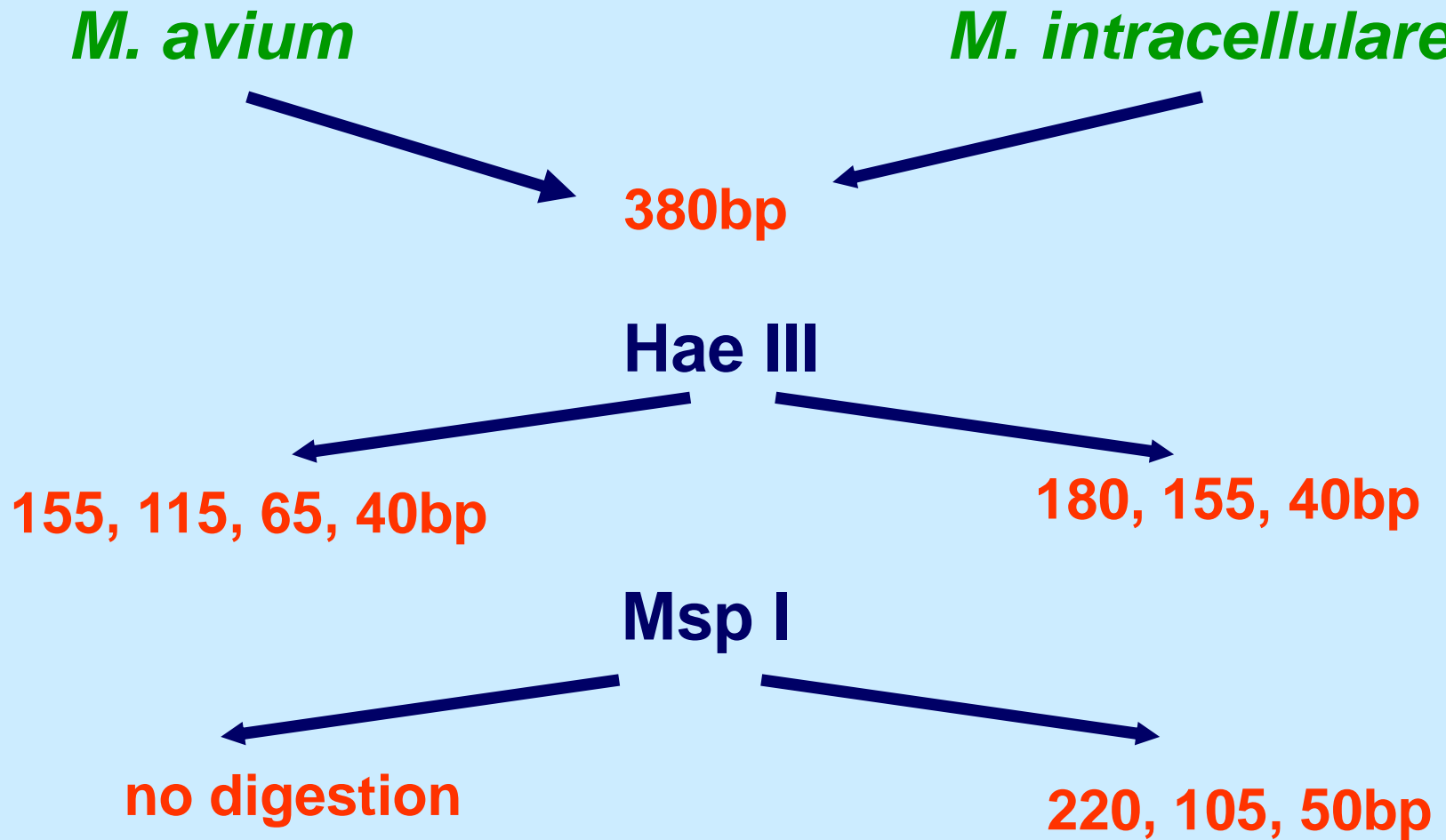


Diferenciace některých mykobakterií

mezerník 16S-23S rRNA, podle Sansila et al. 1998

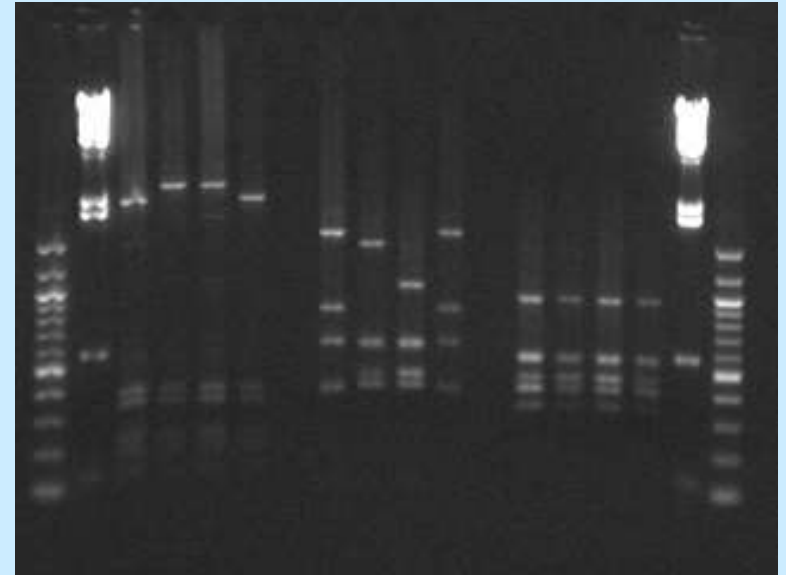
Druh	Amplikon	RE
<i>M. tuberculosis</i> komplex	380	-
<i>M. avium</i> komplex	380	<i>HaellI, MspI</i>
<i>M. fortuitum</i>	435-480	-
<i>M. aurum</i>	490-530	-
<i>M. flavescens</i>	460-500	-

Využití mezeríku k diferenciaci MAC



Příklad pro 16S rRNA

- Dvoustupňový identifikační protokol
- Thierry et al. 1990
- PCR produkt o délce 1 300bp
- Štěpení *RsaI* a *CfoI*



Výsledky diferenciacie pro 16S rRNA

<i>RsaI</i>	<i>CfoI</i>	<i>RsaI, CfoI</i>
<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i>	<i>M. intracellulare</i> <i>M. goodii</i> <i>M. ulcerans</i>	<i>Corynebacterium</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Gordonia</i> <i>Nocardia</i>
<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i>	-	<i>M. ulcerans</i> <i>M. terrae</i>
<i>M. bovis</i> <i>M. bovis caprae</i>	<i>M. fortuitum</i> complex	<i>M. kansasii</i> <i>M. chelonae</i> serotypes

Velikosti fragmentů po štěpení RsaI

Druh	Velikost fragmentů					
<i>M. xenopi</i>	780		355			113
<i>M. ulcerans</i>	600	467		167		
<i>M. terrae</i>		391	355	167	167	113
<i>M. parafortuitum</i>		373	355	171	167	113
<i>M. flavescens</i>		421	355	171	167	113
<i>M. fortuitum</i>		421	355	171	167	113
MAC	556		355	167	113	
MTBC	617		355	171	167	113

Velikosti fragmentů po štěpení Cfol

Druh	Velikost fragmentů					
<i>M. terrae</i>	410	337	314	252		
<i>M. parafortuitum</i>	408	343	314	252		
<i>M. flavescens</i>	408	337	253	225		
<i>M. fortuitum</i>	408		253	225	190	145
<i>M. avium</i>	408	337	312	253		
<i>M. paratuberculosis</i>	408	337	312	253		
<i>M. intracellulare</i>	408		312	253	187	139
<i>M. scrofulaceum</i>	408		309	253	187	150



Na elektroforetickém snímku jsou velikosti restrikčních fragmentů amplikonu ze 16S rRNA po štěpení restriktázou *RsaI*



Určete přibližně, z jakého druhu bakterie pocházela DNA

L = velikostní standard

Délky fragmentů v L = 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp



Řešení

1,2 = není jasné

3, 6, 7, 8, 12 = *M. tuberculosis*

4 = *M. xenopi* nedoštěpený

5, 10, 13, 14 = nelze stanovit

9 = *M. terrae*, *M. parafortuitum*

11 = *M. terrae*, *M. parafortuitum*, nedoštěpený

15 = *M. flavescens*, *M. fortuitum*



Řešení – jiný zápis

1,2 = není jasné

3 = *M. tuberculosis*

4 = *M. xenopi* nedoštěpený

5 = nelze stanovit

6, 7, 8 = *M. tuberculosis*

9 = *M. terrae*, *M. parafortuitum*

10 = nelze stanovit

11 = *M. terrae*, *M. parafortuitum*, nedoštěpený

12 = *M. tuberculosis*

13, 14 = nelze stanovit

15 = *M. flavescens*, *M. fortuitum*

Detekce genů rezistence

Gen	Metoda	K čemu
<i>katG</i>	PCR-REA, RFLP	INH resistance u <i>MTBC</i>
<i>pncA, oxyR</i>	PCR-REA sekvenování PCR-RFLP	rezistence k pyrazinamidu tuberculosis x bovis
<i>ahpC</i>	sekvenování	MDR- <i>MTB</i>

PCR-REA – závěry

Výhody

- **Jednoduchá, levná a rychlá metoda**
- **Univerzální, vhodná pro široké spektrum organismů**

Nevýhody

- **Nutné mít sadu standardních druhů, poddruhů a kmenů**
- **Bodové mutace během PCR**
- **Nízká rozlišovací schopnost elektroforézy**

Kdo chce vědět víc



**Dvorska L., Bartos M., Martin G., Erler W.,
Pavlik, I. (2001):**

**Strategies for differentiation,
identification and typing of medically
important species of mycobacteria by
molecular methods.**

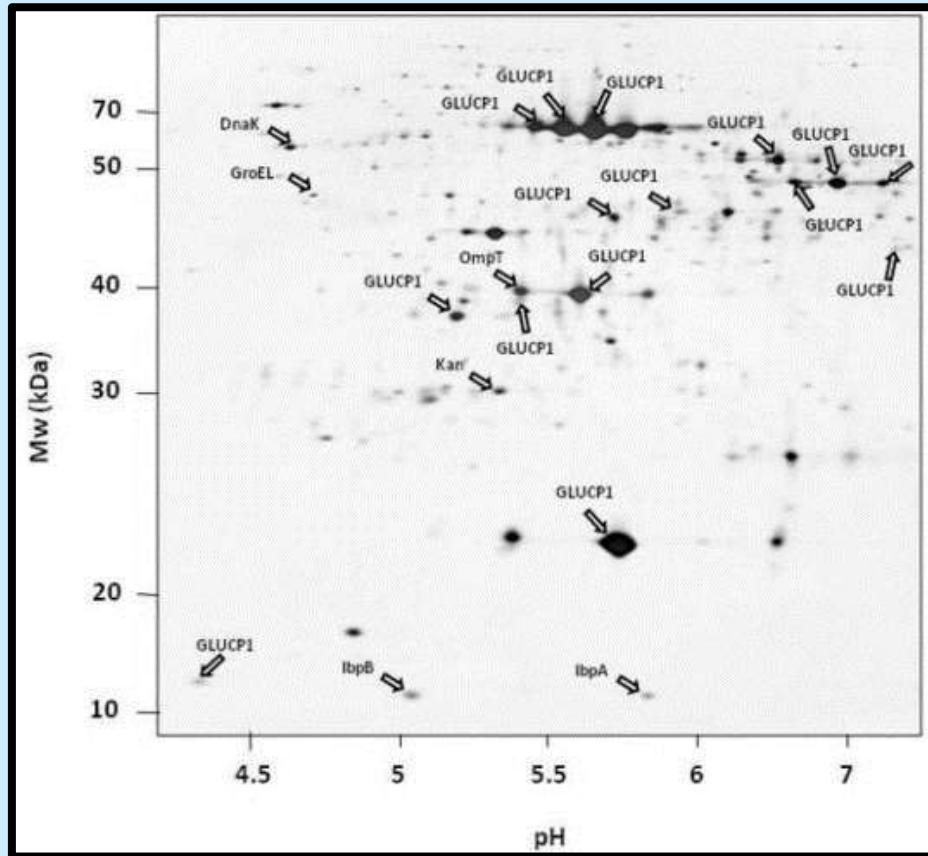
Vet.Med.-Czech 46, 309-328

Protein fingerprinting

- **Dvourozměrná proteinová elektroforéza**
- **Nejnověji hmotnostní spektrofotometrie**

Příklad 2D elektroforézy

E. coli FtsH deficientní kmen produkující α -glukozidázu



Jürgen, B. et al.: (2010): Quality control of inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 2010, 9:41

Protein mass fingerprinting

**Analytická metoda pro identifikaci proteinů
vyvinutá v roce 1993**

- **Protein je nejprve štěpen na menší peptidy**
- **Jejich hmotnost je změřena hmotnostním spektrofotometrem (MALDI-TOF, ESI-TOF)**
- **Následuje porovnání výsledných hmotností s databází hmotností referenčních peptidů**

Protein mass fingerprinting



Proboha jak?

**Srovnávací vzorek referenčních peptidů lze
připravit rovněž *in silico* !**



In silico příprava referenčních peptidů

ATG CAA TAG TTC AAG AAA GAT AGT TAA



Translace *in silico*

Met-Leu-Cys-Thr-Asp-Gln-His-Ile



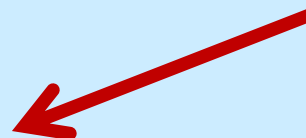
Specifické štěpení
známou proteázou

Met-Leu-Cys-Thr

Asp-Gln-His-Ile



Výpočet molekulové
hmotnosti



Porovnání se
vzorkem



Princip MALDI-TOF

matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight

- varianta hmotnostní spektrofotometrie
- peptidy jsou ionizovány a stanoví se poměr hmoty k náboji na základě doby letu (time-of-flight) k detektoru
- vypočte se M a ta je specifická pro každou aminokyselinu

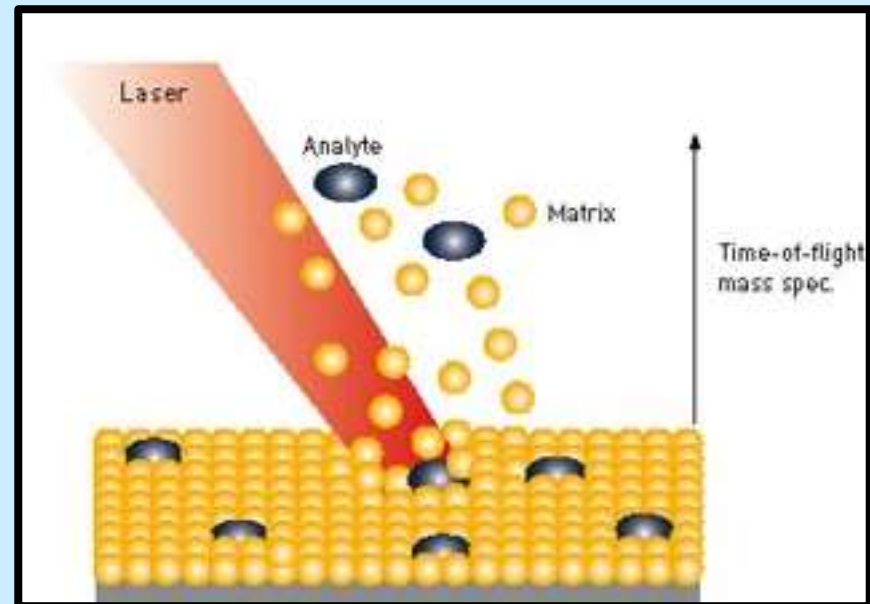
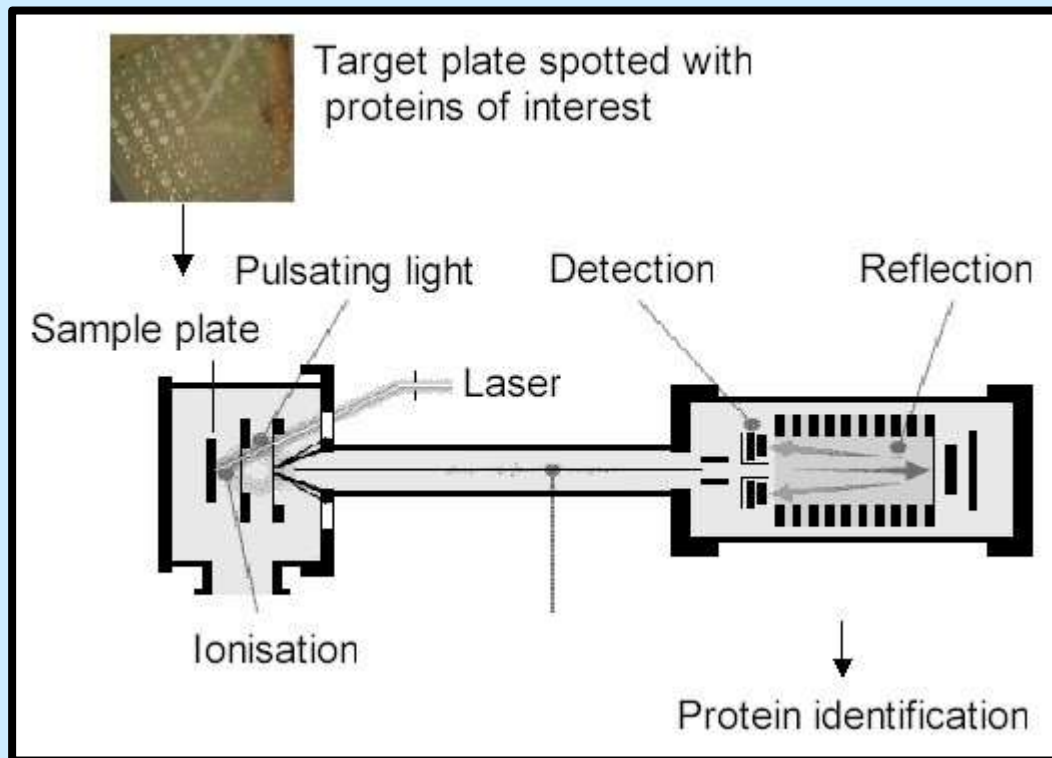


Schéma zařízení



Výhody a nevýhody



- 1) **Není zapotřebí sekvenovat proteiny**
- 2) **Stačí jen znalost molekulové hmotnosti**

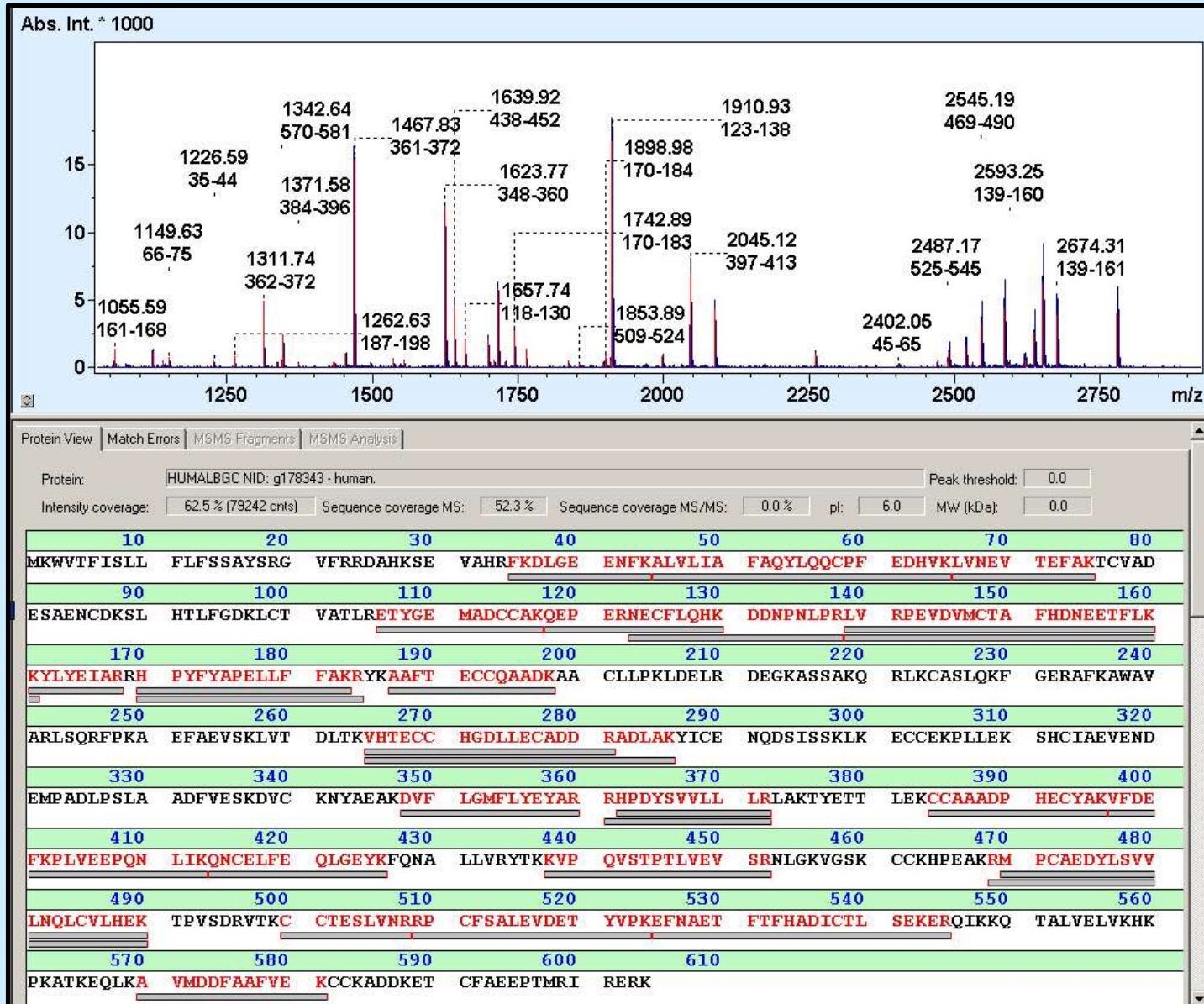


- 1) **Nelze analyzovat multimerní proteiny**
- 2) **Vzorky se izolují z SDS-PAGE**

Příprava vzorku pro spektrometrii

- 1) SDS-PAGE**
- 2) Chemická modifikace – odbourání disulfidických můstků, karboxymetylace cysteinů**
- 3) Štěpení proteázami**
- 4) Extrakce peptidů acetonitrilem a vakuové vysušení**
- 5) Rozpuštění ve vodě**
- 6) Purifikace a úprava pro spektrofotometrii**

Výsledek MALDI-TOF



Shrnutí

- 1) Přehled a funkce enzymů**
- 2) Restrikční endonukleázy – opakování**
- 3) Restrikční mapy**
- 4) Detekce polymorfismů v genomech**
- 5) DNA fingerprinty**
- 6) Proteinové fingerprinty**