

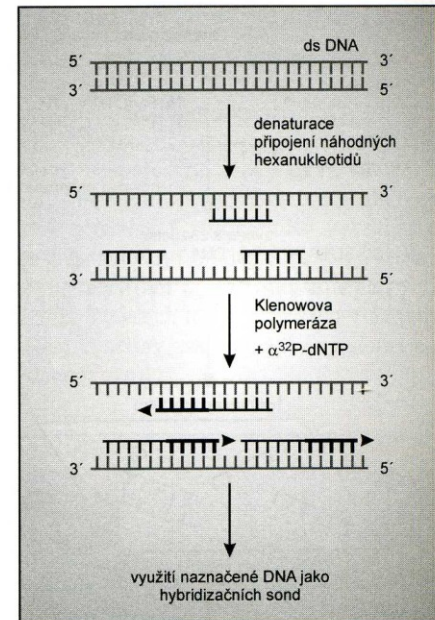
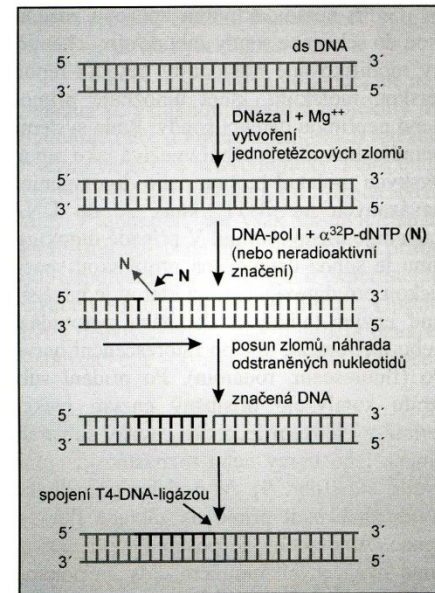
Enzymy používané v molekulární biologii

Rozdělení enzymů

- 1. Podle substrátové specifity:** většina metod molekulární biologie je závislá na použití enzymů, jejichž substrátem jsou nukleové kyseliny. Tyto reakce jsou velmi specifické a umožňují pracovat s velmi malým množstvím materiálu. Podle substrátové specifity se tyto enzymy dělí na dvě základní skupiny:
 - Enzymy, jejichž substrátem je DNA
 - Enzymy, jejichž substrátem je RNA
 - Substrátová specifita je obvykle absolutní, i když rozlišení mezi oběma druhy nukleových kyselin je podmíněno pouze přítomností nebo absencí 2'-OH skupiny ribosy.
- 2. Podle typu reakcí:**
 - Enzymy syntetizující nukleové kyseliny (polymerázy)
 - Enzymy modifikující nukleové kyseliny (fosfatázy, metylázy, kinázy)
 - Enzymy spojující nukleotidové řetězce (ligázy)
 - Enzymy odbourávající nukleové kyseliny (nukleázy)
 - Podle substrátové specifity se enzymy jednotlivých skupin dále dělí, např. na DNA-polymerázy, RNA-polymerázy apod.

DNA-polymerázy

- **DNA-polymeráza I (E. coli):** katalyzuje 3 odlišné reakce, jejich rychlost je ovlivněna stavem DNA a koncentrací dNTP v reakční směsi. Za vhodných podmínek degraduje polynukleotidový řetězec DNA ve směru $5' \rightarrow 3'$ a současně degradovaný řetězec nahrazuje polymerační reakcí. Těto vlastnosti se využívá ke značení DNA metodou tzv. posunu jednořetězcového zlomu („nick translation“).
 - Na dvouřetězcové DNA se vytvoří DNázou I náhodné jednořetězcové zlomy. Ty jsou substrátem pro působení DNA-polymerázy I.
- **Klenowův fragment DNA-pol I:** jde o větší ze dvou fragmentů DNA-pol I, které vznikají při štěpení subtilizinem. Vykazuje $5' \rightarrow 3'$ polymerázovou a $3' \rightarrow 5'$ exonukleázovou aktivitu, oproti DNA-pol I postrádá $5' \rightarrow 3'$ exonukleázovou aktivitu. Používá se při syntéze DNA, kdy nesmí docházet k odbourávání primerů, např. při enzymové metodě sekvencování, při značení DNA prodloužením primeru nebo při doplnění přechuhujících $5'$ -konců po restriktivním štěpení DNA.

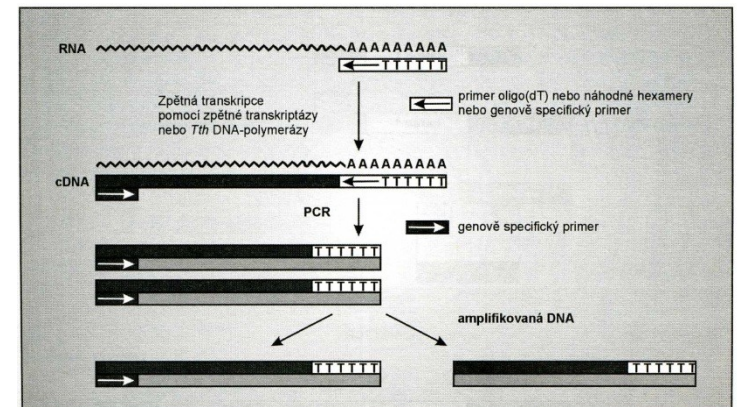
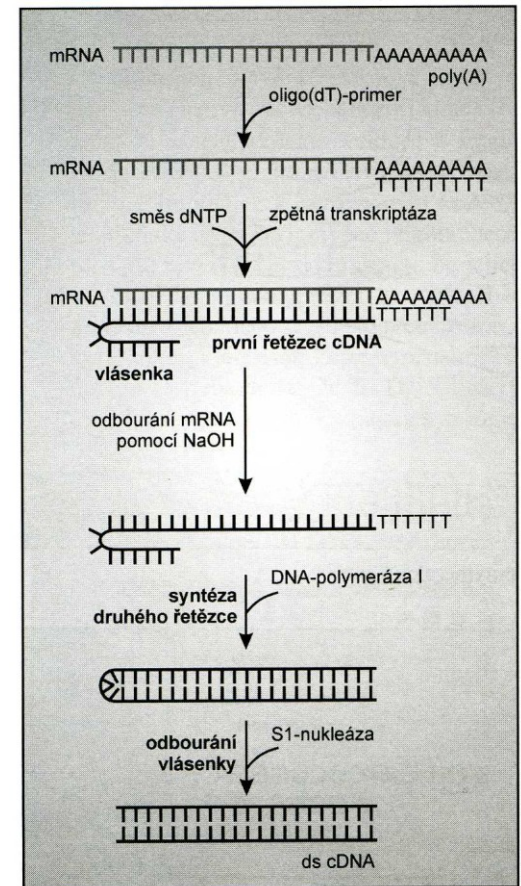


Polymerázy používané při PCR

- **Taq DNA-polymeráza** (*Thermus aquaticus*): nejběžněji používaná polymeráza pro PCR, nemá korektorskou („proofreading“) aktivitu, následkem se při syntéze delších úseků hromadí chyby. Frekvence chyb je zhruba 1 na 4-5 tisíc bp. Špatně začleněná báze většinou vede k terminaci řetězce a současně i syntézy DNA.
 - Při použití PCR v molekulární diagnostice nejsou chybně začleněné báze problémem, protože vznik molekul DNA se stejnou chybou je málo pravděpodobný a molekuly s chybně inkorporovanou bází tvoří jen zlomek z celkového produktu.
 - Chybné začlenění bází však nabývá na důležitosti v případě klonování PCR produktů, neboť každý klon je odvozen z jediné molekuly DNA. Případná mutace vlivem špatné inkorporace báze způsobí, že tuto mutaci ponесou všechny molekuly DNA v potomstvu. Tyto mutace také mohou znamenat substituci aminokyselin při expresi prováděné in vitro.
- Tyto problémy lze eliminovat buď použitím většího množství templátových molekul DNA při zahájení replikace. Pak je třeba méněcyklů a nasyntetizuje se méně DNA.
- Nebo lze použít termostabilní DNA-polymerázu s 3'-exonukleázovou aktivitou.
- **Pwo DNA-polymeráza** (*Pyrococcus woesei*) a **Pfu DNA-polymeráza** (*Pyrococcus furiosus*): frekvence chyb je 2-6 x nižší než u Taq DNA-polymerázy, což je způsobeno 3'-exonukleázovou aktivitou těchto enzymů. Na druhou stranu 3'-exonukleasová aktivita často způsobuje degradaci jednořetězcových primerů. Často se používají v kombinaci s Taq DNA-polymerázou pro amplifikaci dlouhých úseků DNA (stačí 1% Pwo nebo Pfu).
- **Tth DNA-polymeráza** (*Thermus thermophilus*): je doporučována pro PCR dlouhých molekul DNA místo Taq DNA-polymerázy.

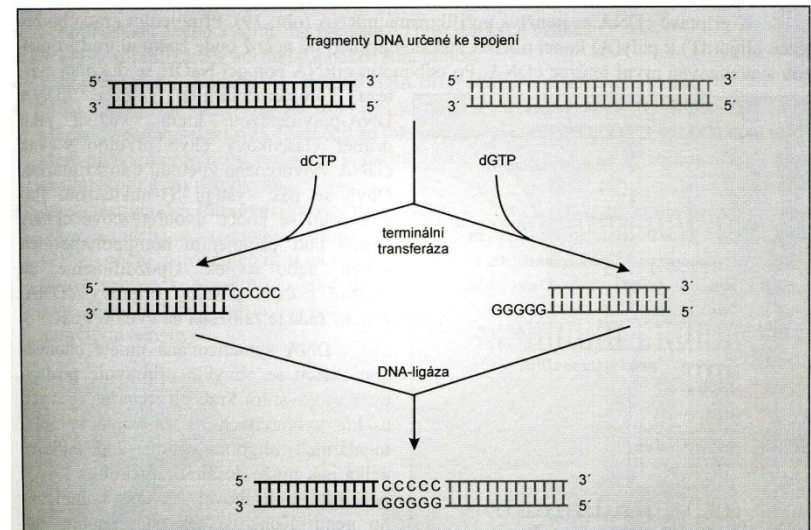
Zpětná (reverzní) transkriptáza (retroviry)

- Patří do skupiny RNA-dependentních DNA-polymeráz.
- Katalyzuje přepis genetické informace z RNA do DNA.
- Využívá se k přípravě cDNA z mRNA.
- Zpětné transkripty se využívají také k sekvencování RNA, jako sondy pro hybridizaci, případně jako templát při PCR.



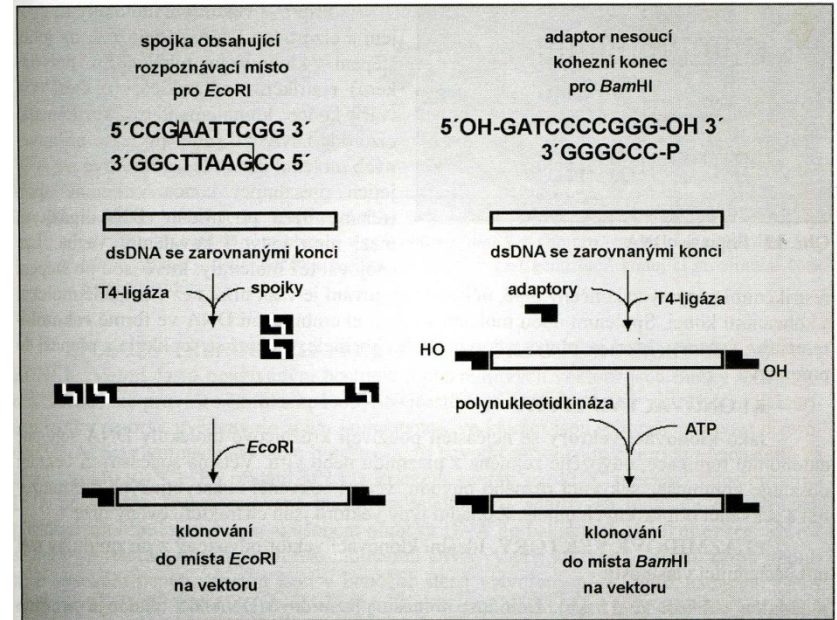
Terminální deoxyribonukleotidyltransferáza (telecí brzlík)

- Katalyzuje připojování nukleotidů k 3'-koncům DNA.
- Nevyžaduje templát, tím se liší od DNA-polymeráz.
- Je využívána k připojování polydeoxyribonukleotidových úseků (tzv. homopolymerních konců) k fragmentům DNA a vektorovým molekulám s tupými konci. Tím se vytvářejí kohesivní (lepivé) navzájem komplementární konce.
- Rovněž je využívána při koncovém značení nukleových kyselin.



DNA-ligáza

- Katalyzuje tvorbu fosfodiesterové vazby mezi 5'-fosfátovou skupinou a 3'-OH skupinou sousedního nukleotidu. Používá se k vzájemnému spojení dvou molekul DNA zakončených komplementárními konci, k připojení spojek a adaptorů a cirkularizaci lineárních molekul DNA.
- T4-DNA-ligáza (zdroj *E. coli* infikovaná bakteriofágem T4) dokáže na rozdíl od DNA-ligázy z *E. coli* spojovat i fragmenty s tupými konci.

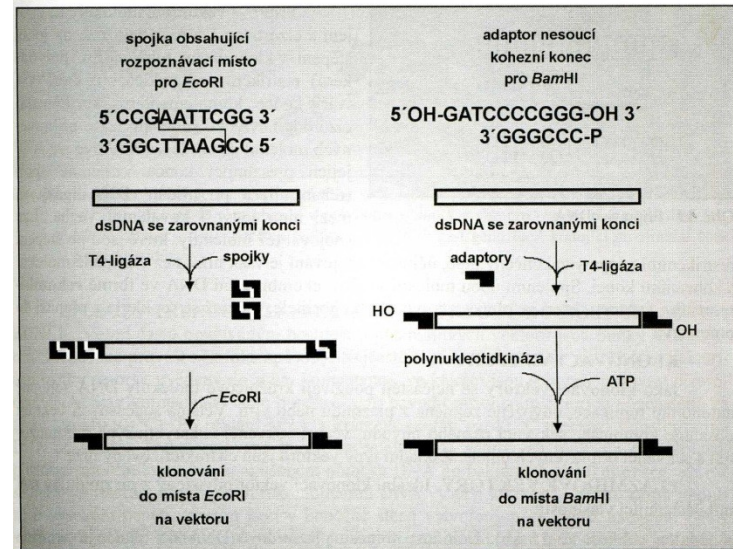


Alkalická fosfatáza

- Zdroje: telecí střevo, bakterie
- Odstraňuje fosfátové skupiny z 5'-konců DNA, RNA a oligonukleotidů.
- Využívá se při koncovém značení DNA, kdy se původní fosfátová skupina odstraní a její místo zaujme značená fosfátová skupina (^{32}P , ^{35}S).
- Při klonování DNA se často odstraňují 5'-koncové skupiny u vektoru – zabraňuje se tím ligaci samotné vektorové molekuly bez inzertu, zvyšuje se účinnost klonování.

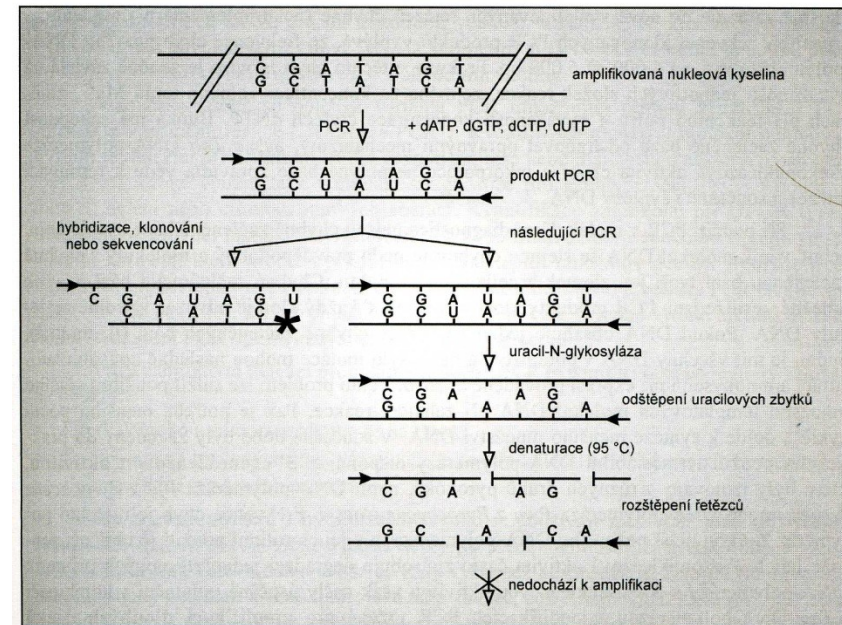
T4-DNA-polynukleotidkináza

- Zdroj: buňky *E. coli* infikované bakteriofágem T4
- Katalyzuje přenos terminální fosfátové skupiny z ATP na 5'-OH skupinu DNA nebo RNA.
- Může katalyzovat i výměnu fosfátových skupin na 5'-konci.
- Katalyzovaných reakcí se využívá ke značení fragmentů nukleových kyselin na 5'-koncích pomocí ^{32}P .



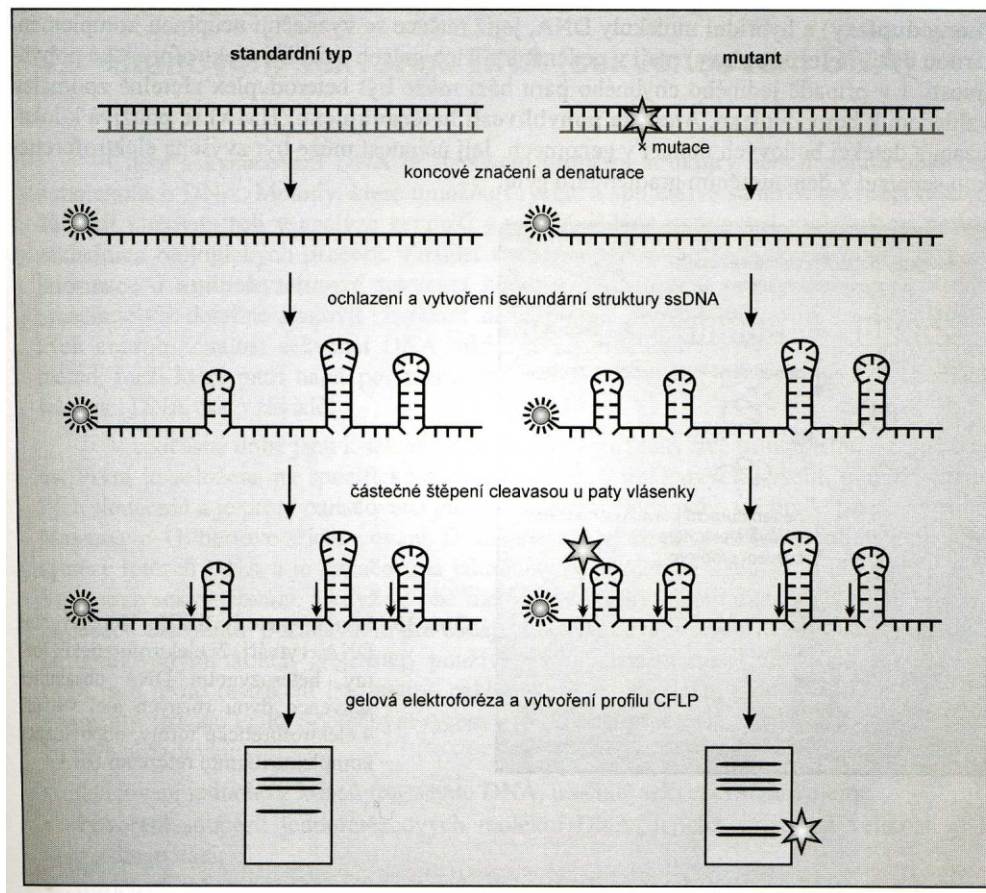
Uracil-DNA glykosylasa

- Účastní se oprav poškozené DNA. Uracil v DNA vzniká deaminací cytosinu.
- Uracil-DNA glykosylasa – katalyzuje uvolnění volného uracilu z DNA. Hydrolyzuje uracil z jedno- nebo dvouřetězcové DNA, ne z krátkých oligomerů (6 a méně nukleotidů).
- Používá se preventivně v laboratořích k odstranění dříve amplifikované DNA:
 - Protože přenesené sekvence z dříve amplifikované DNA patří k nejvýznamnějším zdrojům kontaminace vzorků podrobených PCR, používá se v laboratořích rutinně provádějících PCR 2'-deoxyuridin-5'-trifosfát (dUTP) místo dTTP.
 - Před amplifikací dalších vzorků se do reakční směsi přidá uracil-DNA-glykosylasa (uracil-N-glykosylasa), která odstraní z případných kontaminantů uracilové báze. Tím se v molekule DNA vytvoří abazická místa a DNA se stane termolabilní. Při první denaturaci dojde k rozštěpení DNA a zároveň denaturaci a inaktivaci uracil-DNA-glykosylasy.
- Používá se spolu s dalšími reparačními enzymy ke studiu a detekci poškození DNA.



Cleavasa I

- Specifická endonukleasa upravená metodami genového inženýrství.
- Její cílové místo se nachází vždy u paty vlásenky vytvořené v molekule jednořetězcové DNA.
- Používá se při diagnostické metodě CFLP (Polymorfismus délky fragmentů DNA vytvořených cleavasou).
- Touto metodou se detekují a lokalizují polymorfizmy v molekulách ssDNA připravených denurací fragmentů koncově značené genomové DNA.
- Optimální velikost těchto fragmentů je do 2700 bp.
- ssDNA vytváří po rychlém ochlazení roztoku různé sekundární struktury v závislosti na své primární struktuře.
- Cleavasa I nepůsobí na všechny vlásenky, dochází pouze k částečnému štěpení ssDNA.
- Mutace a modifikace v nukleotidových sekvencích ovlivňují sekundární strukturu ssDNA. Konečným výsledkem je vytvoření rozdílných míst rozpoznávaných enzymem a vznik spektra fragmentů, které je charakteristické pro danou molekulu.
- Jde vlastně o analogii s RFLP metodou.



Jaké enzymy a prekurzory použiji pro značení DNA?

- 5'-konec: radioaktivním fosfátem – polynukleotid kináza + γ - ^{32}P -ATP (^{33}P , ^{35}S)
- 3'-konec: celým deoxynukleotidem (včetně α -fosfátu) a polymerázou
 - tedy α - ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S dNTP (báze podle potřeby)
 - libovolný fluorofor, redox značka, biotin... vhodně připojený k cukru nebo bázi
 - primer extension (DNA polymerázy vč. Klenowova fragmentu)
 - výměna 3'-koncových nukleotidů (proofreading exo+ polymerázy vč. Klenowa)
 - terminální deoxynukleotidyl transferázou (TdT) – jeden nebo několik nukleotidů náhodně bez templátu
- inkorporace značek dovnitř syntetizovaného řetězce
 - „nick translation“ (DNA polymerázy s 5'→3' exo aktivitou; Pol I, Klenow+malý fragment – nikoli samotný Klenow!)
 - „random priming“ (DNA polymerázy vč. Klenowova fragmentu)
 - PCR (vhodné termostabilní DNA polymerázy)