



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

# Biotechnologie rostlinných buněk

## Enzymy v molekulární biologii - OE



**prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.**

**University of South Bohemia**

**Faculty of Agriculture, Biotechnological Centre**

**Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice, CZ**



## Enzymy v molekulární biologii

### Ligázy nukleových kyselin

- Jsou to enzymy, které spojují řetězce DNA. Vyskytují se u všech organismů, protože mají důležitou funkci při replikaci DNA - spojují Okazakiho fragmenty. Účastní se i různých reparačních procesů. Reakce vyžaduje na spojovaných koncích 5'P a volnou 3' OH skupinu. Nespojí se defosforylované konce, ani 5'P s 3'P, ani 5'PPP s 3'OH. K reakci je také nutný nízkomolekulární zdroj energie, ATP nebo NAD, se kterým enzym reaguje dříve než se substrátem a "nabije se" pro reakci.



## Enzymy v molekulární biologii

### T4 DNA ligáza

- Nejvíce používaný enzym, kódovaný genem 30 T4 bakteriofága. Původně byl izolován z infikovaných bakterií, dnes z nadprodukcujících kmenů, kde je gen na plasmidu pod silným promotorem. Tvoří ji jeden polypeptidický řetězec o molekulové váze asi 70kDa. In vivo enzym obvykle liguje pouze niky a k nim má největší afinitu ( $K_m = 1,5 \cdot 10^{-9} M$ ). In vitro má ale schopnost spojovat dvouřetězcové zlomy DNA s kohesivními konci ( $K_m = 6 \cdot 10^{-7} M$ ), i s tupými konci ( $K_m = 5 \cdot 10^{-5} M$ ) - ty asi 100x pomaleji. Spojuje dokonce (s velmi malou účinností) i konce se špatně spárovaným koncovým párem basí, DNA:RNA hybridy, 3'-OH RNA s 5'-P DNA a snad i dvouřetězcovou RNA. Je mírně sekvenčně závislá - např. nejlépe spojuje kohesivní konce vytvořené enzymem *HindIII* - ale v praxi se k tomu nepřihlíží.



## Enzymy v molekulární biologii

### T4 DNA ligáza

- Potřebuje ATP, se kterým tvoří před reakcí kovalentní intermediát. V přítomnosti pouze AMP je schopen provádět i opačnou reakci - dělat niky, ale této reakce se nevyužívá. dATP dává jen 0,5% rychlost reakce. DTT ve vyšší konc. je nutné.
- Pracuje dobře ve většině restričních pufrů, když do nich přidáme ATP, i když trochu vyšší koncentrace TRISu je prospěšná. Soli nad 150mM silně inhibují reakci; ligaci tupých konců i 50mM NaCl nebo 25mM fosfát.



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Biotechnologie rostlinných buněk  
Enzymy v molekulární biologii - ligázy

## Enzymy v molekulární biologii

### T4 DNA ligáza

- Teplotní optimum je 37°C, ale enzym je při této teplotě už velmi málo stabilní. Často se reakce provádí při mnohem nižší teplotě, která navíc umožní annealing kohesivních konců.
- Inaktivace: T4 ligáza se z reakční směsi snadno odstraní zahřátím na 68°C 10 min.



## Enzymy v molekulární biologii

### T4 DNA ligáza

#### Použití:

- Ligace kohesivních konců. Preparáty DNA, které chceme ligovat, smícháme v co největší koncentraci, obvykle v objemu 10-20  $\mu$ l s řádově 0,1  $\mu$ g DNA a zahřejeme krátce na 68°C, aby se rozbily případné kruhy a konkatemery, vznikající spojením kohes. konců v každém původním vzorku. Ochladíme, přidáme 1/10 obj. 10x ligačního pufru a nakonec asi 0,01-0,1 Weissovy jednotky ligázy na  $\mu$ g DNA. Dobu a teplotu reakce volíme obvykle v nepřímé úměře: nejlepší je přes noc při 10°C, vyhovuje ale i 4-6h při 16°C nebo 1h při pok. teplotě. Inaktivaci enzymu obvykle neprovádíme, jen vzorek zmrazíme (nebo hned použijeme).



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Biotechnologie rostlinných buněk  
Enzymy v molekulární biologii - ligázy

## Enzymy v molekulární biologii

### T4 DNA ligáza

Použití:

- Ligační reakce se dá provádět i tak, že vyříznutý vzorek DNA z gelu z nízkotající agarosy roztavíme při 65°C, a 10 µl roztoku přímo přidáme do 25 µl ligančí směsi. Ušetříme si dost práce, ale je třeba dát aslepoň 10x více ligázy a výsledek bývá přesto asi 10x horší. Metoda je použitelná tehdy, kdy stačí velmi málo zligovaných molekul, tedy když může vzniknout je jeden typ produktu, na který je silná selekce.



## Enzymy v molekulární biologii

### T4 DNA ligáza

#### Použití:

- Ligujeme-li jako obvykle fragment izolované DNA s DNA rozštěpeného vektoru, musíme vytvořit podmínky pro to, aby se ligovalo co nejvíce molekul vektoru s co nejvíce molekulami fragmentu a aby se naopak minimalizovala ligace mezi stejnými molekulami nebo cirkularizace jednotlivých molekul. Dá se spočítat, že optimální je koncentrace vektoru 3kb velkého mezi 20-60  $\mu\text{g/ml}$  a koncentrace stejně velkého fragmentu stejná až 2x větší (a příslušně vyšší/nížší u větších/menších fragmentů). Za těchto podmínek by mělo být 40% konečných ligačních produktů tvořeno jednou molekulou vektoru s integrovanou jednou molekulou fragmentu. V praxi ovšem většinou vystačíme s daleko horší ligací, protože na správnou konstrukci bývá účinná selekce.





## Enzymy v molekulární biologii

### T4 DNA ligáza

#### Použití:

- Ligace tupých konců je vždy problematická, ale velmi praktická, protože umožňuje spojit (případně po jednoduché úpravě konců) jakékoli fragmenty. Provádí se v podstatě stejně, ale v co nejkoncentrovanější DNA a se 100x vyšší koncentrací ligázy (kolem 50U/ml). Přesto vždy probíhá s nízkou účinností.
- Pro její zvýšení se doporučuje:
  - Poloviční koncentrace ATP a MgCl<sub>2</sub> (0,5 a 5mM; = 0,5x lig. pufr)
  - 1 mM hexaminkobalt chlorid zvyšuje ligaci tupých konců asi 50x, snad tím, že nějak umožňuje jejich spojování předem.
  - Příklad 15% PEGu 8000 zvýší ligaci 10x-1000x, zřejmě především tím, že vytěsňuje DNA z většiny objemu roztoku a tím zvýší efektivní koncentraci konců. Potlačuje také intramolekulární ligaci (cyklizaci) a podporuje tvorbu lineárních konkatemerů.
  - Pomocí těchto látek je možno účinně ligovat i krátké syntetické oligonukleotidy.



## Enzymy v molekulární biologii

### T4 DNA ligáza

#### Použití:

- Protože se při ligaci spojují konce náhodně, vznikne už při ligaci linearizovaného vektoru s třemi fragmenty DNA (z nichž nás obvykle zajímá jen jeden) velmi komplexní směs, obsahující kromě cirkulárních forem molekul vektoru spojených s fragmenty i takové molekuly lineární, kruhově uzavřené samotné fragmenty, samotné vektory, konkatemery fragmentů apod. Ligační směs ale obvykle transformujeme do bakterií, které pak selektujeme na antibiotickou resistenci vektoru. Tím vyloučíme nejen všechny fragmenty bez vektoru, ale i kruhově neuzavřené konstrukce s vektorem. Další selekce obvykle vychází z toho, že integrovaný fragment nějak mění vlastnosti vektorového plasmidu a z toho, že produkty získané jednou ligační reakcí bývají mnohem hojnější než ty získané dvěma, třemi atd.



## Enzymy v molekulární biologii

### Jiné DNA ligázy

- Dříve se dost používala ***E. coli* DNA ligáza**, kódovaná genem lig. Pracuje obdobně, ale používá jako kofaktor NAD a nepotřebuje DTT. Je velmi citlivá na správnou strukturu ligovaných konců (pouze DNA), neliguje tupé konce, což je velmi závažná nevýhoda.
- Podobné jsou ostatní bakteriální DNA ligázy. Naopak **T7 DNA ligáza** je aktivitou velmi podobná T4 DNA ligáze, ale nerozlišuje mezi ATP a dATP kofaktory.



## Enzymy v molekulární biologii

### Jiné DNA ligázy

- Existují také termostabilní DNA ligázy, izolované z termostabilních bakterií *Thermus aquaticus* (**Taq DNA ligáza**, NEB) nebo *Thermus scodoductus* (**Tsc DNA ligáza**, BOEHRINGER), které jsou svými vlastnostmi analogické *E. coli* DNA ligáze. Používají se ke speciálním účelům, především ke spojování oligonukleotidů při hybridizovaných na templát těsně vedle sebe. Veliké citlivost na přesné párování se využívá ke zvláštnímu typu mutační analýzy. Opakováním cyklů denaturace a ligace se dosáhne amplifikace sekvence, podobně jako při PCR, ovšem nikoli z nukleotidů, ale ze synt. oligonukleotidů.



## Enzymy v molekulární biologii

### T4 RNA ligáza

- Je rovněž z bakteriofága T4 (gen 63) a dnes je také produkovaná klonovaným genem v plasmidu *E. coli*.
- Tvoří ji jeden polypeptidický řetězec 45 kDa. Není jasné, jakou roli má *in vivo*, snad při splicingu T4 transkriptu.
- Pracuje stejně jako DNA ligáza, ale na RNA. Přirozeným substrátem je jednořetězcová RNA, ale *in vitro* pracuje i s dvouřetězcovou RNA a DNA.
- Liguje ale jen velmi krátké substráty s maximem asi 40b. Nejmenším 5' substrátem je p-N-p (3', 5' bis fosfát ribonukleosid), minimálním akceptorem je trinukleotid. Ke krátkému oligonukleotidu přidává nejrůznější nukleotidy, i deoxy, a i různě modifikované, ovšem každý jinou rychlostí (nejlépe pyrimidinové). Podobně jako DNA ligáza potřebuje kofaktor ATP a tvoří s ním kovalentní meziprodukt, ale dATP vyhovuje také.



## Enzymy v molekulární biologii

### T4 RNA ligáza

#### Použití:

- Používá se málo.
- Ke značení konců RNA. Např. s 5'- 32P-N-OH, který přidává na volné 3'-OH konce. Vezmeme-li pro reakci 3', 5' bifosfát nukleotidu, bude na každém konci jen jeden značený atom.
- K dosyntetizování konců RNA (např. po předchozím chemickém odštěpení ke stanovení funkčního významu basí). Může se použít i ke spojování fragmentů DNA, ale jde to pomalu a jen s velkým množstvím enzymu.
- K syntéze oligonukleotidů z nukleotid fosfátů nebo z krátkých N-merů
- K cirkularizaci (deoxy)ribonukleotidů.



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Biotechnologie rostlinných buněk  
Enzymy v molekulární biologii - fosfatázy

## Enzymy v molekulární biologii

### Fosfatázy

- Fosfatázy (fosfomonoesterázy), jsou enzymy katalyzující hydrolýzu esterů fosfátu, tedy odštěpování fosfátů z alkoholů, cukrů, apod.
- Nejvýznamnější třídu tvoří tzv. alkalické fosfatázy, s optimem reakční rychlosti i stability v mírně alkalickém pH. Jsou přítomny v mnoha tkáních živočichů a i u některých bakterií; + nikoli u rostlin. Jejich biologická funkce není jasná vzhledem k naprostému nedostatku substrátové specifity, snad při transportu fosfátu.



## Enzymy v molekulární biologii

### CIP alkalická fosfatáza

- Isolovaná z tenkého střeva telat ("calf intestine phosphatase") je glykoprotein o 100-140 kDa ze dvou stejných subjednotek. Má 4 atomy zinku nutné pro funkci.
- Defosforyluje nukleové kyseliny na koncových fosfátech ve všech polohách (2', 3', 5'), i řadu dalších substrátů; na bifosfáty (pyrofosfáty) obvykle nefunguje. Teplotní optimum je 37°C, kdy je aktivita 2x vyšší než při 25°C.





Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Biotechnologie rostlinných buněk  
Enzymy v molekulární biologii - fosfatázy

## Enzymy v molekulární biologii

### CIP alkalická fosfatáza

Použití:

- K různým detekcím pomocí umělých barevných substrátů je to nejpoužívanější enzym. Využívá se toho, že fosfátová skupina se složitou konjugovanou elektronovou strukturou může silně ovlivňovat rozložení elektronů, a tím i vlastnosti látek, na které je fosfát navázán. Po jeho odštěpení fosfatázou se vlastnosti "viditelně" změní. Významný je i vysoký obrat enzymu ("turnover number", počet molekul sub. zpracovaných za vteřinu), nízké pozadí samovolného rozkladu fosfoesterů a značná teplotní stabilita.



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Biotechnologie rostlinných buněk  
Enzymy v molekulární biologii - fosfatázy

## Enzymy v molekulární biologii

### CIP alkalická fosfatáza

Použití:

- Substráty jsou ve fosforylované formě bezbarvé nebo neluminiskují, po odštěpení fosfátu se zbarví nebo začnou luminiskovat. Význam enzymatické reakce je v silné amplifikaci signálu; jedna molekula enzymu zpracuje během vyvolávání barvy statisíce molekul barevné látky (tzv. ELISA testy). Často přitom bývá fosfatáza kovalentně navázána na jiné bílkoviny (např. protilátky), aniž ztrácí aktivitu. Tyto bílkoviny mohou mít afinitu k určité lokální značce a pomocí konjugované fosfatázy místo se značkou obarví (použití při hybridizaci a neradioaktivním značení nukleových kyselin).



## Enzymy v molekulární biologii

### CIP alkalická fosfatáza

#### Použití:

- K defosforylaci klonovacích vektorů. Odstraněním 5' koncových fosfátů se zabrání uzavření vektoru ligázou; životaschopný plasmid, tj. kruhový a s replikátorem pak může vzniknout pouze ligací našeho fragmentu do vektoru, čímž se silně sníží pozadí nežádoucích konstrukcí. Fosfáty pro ligaci dodá fragment; zligován bude ovšem jen jeden řetězec DNA na každé straně fragmentu, což ale nebrání replikaci, po které se nikdy zacelí.
- 5' přečnívající konce se defosforylují snadněji než tupé nebo ustupující; u těch je vhodné reakci rozdělit dvě části: po 15 min. při 37°C přidat další dávku enzymu a inkubovat dalších 15 min. při 56°C.



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Biotechnologie rostlinných buněk  
Enzymy v molekulární biologii - fosfatázy

## Enzymy v molekulární biologii

### CIP alkalická fosfatáza

Použití:

- Vzhledem k vysoké aktivitě fosfatáz je velmi důležité, aby fosfatáza ve vzorku vektorové DNA byla dokonale zničena před přidáním DNA fragmentu, jinak proběhne i defosforylace fragmentu což zamezí ligaci úplně. Přesto, že CIP fosfatáza je údajně termosensitivní, extrakce fenol/chloroformem po reakci je nezbytná a mnozí před ní ještě vkládají štěpení enzymu proteinázou K, protože zkušenosti s inaktivací jsou všeobecně špatné.



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Biotechnologie rostlinných buněk  
Enzymy v molekulární biologii - fosfatázy

## Enzymy v molekulární biologii

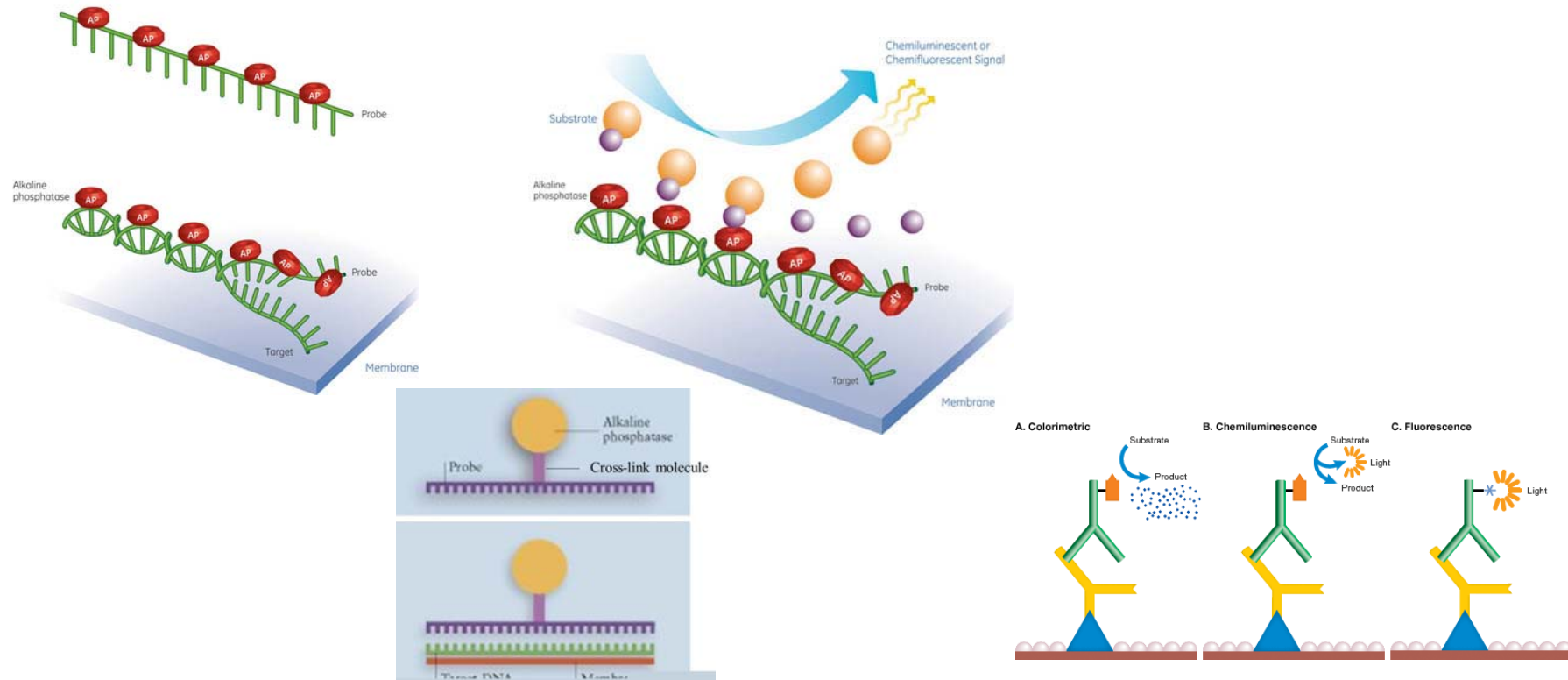
### CIP alkalická fosfatáza

Použití:

- Pro defosforylaci konců DNA, které mají být následně označeny radioaktivním fosfátem polynukleotid kinázou. Používá se např. u Maxam-Gilbertovy metody sekvenování DNA.
- V podstatě se k takové detekci dá použít jakýkoli enzym, štěpící vhodně vytvořenou vazbu mezi barevnou látkou a konjugovanou strukturou.



## Enzymy v molekulární biologii





Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Biotechnologie rostlinných buněk  
Enzymy v molekulární biologii - fosfatázy

## Enzymy v molekulární biologii

### Bakteriální alkalická fosfatáza (BAP)

- Pracuje analogicky jako CIP, i když je to zřejmě zcela jiná bílkovina. Dnes se používá už málo, protože je termostabilní a je obtížné se jí zbavit.



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Biotechnologie rostlinných buněk  
Enzymy v molekulární biologii - fosfatázy

## Enzymy v molekulární biologii

### Termosensitivní fosfatázy

- Problémy s inaktivací běžných fosfatáz vedly k hledání termosensitivních typů, většinou v arktických organismech ("heat killing"). Fy Boehringer a AMERSHAM dodávají alk. fosfatázu z arktické krevety *Pandalus borealis* ("shrimp phosphatase"), která by měla být spolehlivě inaktivována při 65°C, ale jinak má podobné vlastnosti jako CIP fosfatáza. Fy Epicentre dodává HK fosfatázu z nějaké bakterie z Antarktidy, která je rovněž dokonale inaktivovatelná, ale dobře defosforyluje jen 5' přečnívající konce. Oba enzymy pracují i v běžných restričních pufrech.





Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Biotechnologie rostlinných buněk  
Enzymy v molekulární biologii - kinázy

## Enzymy v molekulární biologii

### Polynukleotid kinázy

- Jsou to enzymy katalyzující opačnou reakci než předchozí, tedy fosforylaci nukleových kyselin. Jsou známy především z *E. coli* infikované T-sudými bakteriofágy a dále z mnoha živočišných tkání. Jejich funkcí *in vivo* je pravděpodobně udržovat konce nukleových kyselin v 5' fosforylovaném a 3' defosforylovaném stavu, nutném pro další reakce, např. ligaci.



## Enzymy v molekulární biologii

### T4 polynukleotid kináza

- Je jediným komerčním enzymem této třídy. Je kódován genem *pseT* bakteriofága T4; táž molekula má i 3' fosfatázovou aktivitu, která je ale u mutanta využívaného většinou firem inaktivována.
- Enzym je složen ze 4 stejných subjednotek; celkem má asi 140 kDa. Katalyzuje přenos fosfátu z NTP (jakéhokoli, nebo dNTP) na 5' konec DNA nebo RNA.
- Fosforyluje i oligonukleotidy nebo i jednotlivé nukleotidy, mono- i difosfáty. Reakce je tedy v podstatě reversibilní, i když zpětný přenos fosfátu z NA na ADP probíhá mnohem pomaleji. 5' přečnávající konce fosforyluje lépe, ale v nadbytku donoru fosfátu reagují dobře i tupé a 5' ustupující konce. Fosforyluje i niky v dvouřetězcové DNA, ale 10-30x pomaleji a i v nadbytku NTP neúplně.



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Biotechnologie rostlinných buněk  
Enzymy v molekulární biologii - kinázy

## Enzymy v molekulární biologii

### T4 polynukleotid kináza

- Teplotní optimum je 37°C; při 0°C má ale ještě 7% kinázové aktivity (ale jen 1% zpětné aktivity). Polynukleotidkináza potřebuje nutně Mg<sup>2+</sup> ionty a DTT, je stimulována KCl, které usnadňuje tetramerizaci, a polyaminy jako je spermidin, ze stejného důvodu.
- Vyrábí se z buněk *E. coli* infikovaných T4 bakteriofágem, nebo nověji z buněk s klonovaným genem.



## Enzymy v molekulární biologii

### T4 polynukleotid kináza

#### Použití:

- Fosforylace syntetických oligonukleotidů: Syntetické nukleotidy obvykle nejsou fosforylované a neligují se k defosforylované DNA. Výše uvedenou reakcí se ale snadno nafosforylují.
- Značení 5' konců DNA přímou reakcí. Ve výše uvedené reakci nahradíme ATP značeným ATP - např. 50 pM P-32 ATP o spec. akt. 3000 Ci/mmol (= 150  $\mu$ Ci). Je třeba mít dobře vyčištěnou DNA, neboť jakákoli kontaminace RNA, oligonukleotidy nebo nukleotidy představuje relativně velké množství 5' konců, které soutěží o značený fosfát. DNA vyisolovaná z agarosy a přečištěná běžnými metodami se většinou značit nedá. Od nezreagovaného ATP vyčistíme preparát přes spin-column; často stačí i přesrážení.



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Biotechnologie rostlinných buněk  
Enzymy v molekulární biologii - proteázy

## Enzymy v molekulární biologii

### Proteázy

- Obecný název pro enzymy štěpící bílkoviny hydrolýzou peptidických vazeb. Jsou známy desítky proteáz (trypsin, chymotrypsin, pepsin, papain, subtilizin, karboxypeptidáza A atd.) a mnohé z nich se vyrábějí ve velkém množství pro použití ve vědě i v průmyslu. Většina z nich má více-méně výraznou specifitu na určitý typ peptidických vazeb (např. trypsin štěpí pouze vazby Lys/Arg-X), čehož se využívá při sekvenování bílkovin. Protože se ale dovnitř terciární struktury štěpené bílkoviny nedostanou, záleží stupeň digesce do značné míry na tom, zda jsou na povrchu molekuly vhodné vazby, po jejichž rozštěpení se struktura uvolní. Mnohé bílkoviny se dají štěpit jen po denaturaci.



## Enzymy v molekulární biologii

### Proteázy

- V molekulární biologii se proteázy často používají k nejjemnějšímu odstranění bílkovin z preparátů nukleových kyselin. Zde se uplatňují proteázy s co nejmenší specifitou, štěpící co nejvíce vazeb a pokud možno i za vysoké teploty, kdy je struktura bílkovin rozvolněná. V některých případech je jejich použití nezbytné, protože bílkoviny jsou vázány na NA tak pevně, že je detergenty v isolačních směsích "nesvléknou" a bílkoviny pak při běžných deproteinačních extrakcích (fenol, chloroform) stáhnou NA s sebou.
- Naopak proteázy s vysokou sekvenční specifitou se v poslední době využívají při konstrukcích a aplikacích hybridních proteinů.



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Biotechnologie rostlinných buněk  
Enzymy v molekulární biologii - proteázy

## Enzymy v molekulární biologii

### Proteináza K

- Je nejlepší ze známých proteáz; používá se asi od r. 1985. Je to hlavní proteolytický enzym houby *Tritirachium album*, který jí umožňuje růst na jinak těžko rozložitelném keratinu (proto "K"), jako jediném zdroji uhlíku a dusíku. Téměř ideální enzym pro štěpení nejrůznějších proteinů pevně vázaných na nukleové kyseliny.
- Štěpí většinu peptidických vazeb (i když vazby Ala-X nejlépe) a proteiny rozloží na peptidy 2-6 aa dlouhé, za podmínek, které se často používají při izolaci nukleových kyselin



## Enzymy v molekulární biologii

### Proteináza K

- Aktivita - v širokém rozsahu alk. pH (7.5-9.5, ale akt. si zachová až do pH 12.5) a teploty (do 60°C + plně aktivní), zachovává plnou aktivitu v 0,5% SDS i v 1% Tritonu, a v podstatě jí nevadí ani přítomnost EDTA (bez Ca<sup>2+</sup> iontů má sice jen 20% aktivity, ale její pokles po přidání EDTA je velmi pomalý - na 20% za 16h, asi pro pevnou vazbu Ca<sup>2+</sup> na enzym).
- Pozoruhodné je, že v koncentrovaných roztocích (>1mg/ml) neprobíhá autolýza enzymu (štěpení jedné molekuly druhou - je to také protein!) takže se dá zásobní roztok uchovávat v lednici i několik let. Dá se vyizolovat zcela bez nukleázových aktivit.
- Je tvořena jedním peptidickým řetězcem o 29 kDa.





Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Biotechnologie rostlinných buněk  
Enzymy v molekulární biologii - proteázy

## Enzymy v molekulární biologii

### Proteináza K

Použití:

- Pro izolaci nukleových kyselin, které nejdou jiným způsobem. Podstatou je uvolnění vazby proteinu k DNA, po porušení jeho terciární struktury.
- Pro studium membránových proteinů - poznají se ty, které jsou před digescí chráněny uvnitř membrány.



## Enzymy v molekulární biologii

### Pronáza

- Dlouho známá směs asi 10ti proteolytických enzymů, které uvolňuje *Streptomyces griseus* do prostředí. Má velmi rozsáhlou proteolytickou aktivitu, která štěpí proteiny obvykle až na aminokyseliny. Asi polovina enzymů jsou serinové proteázy, dva jsou  $Zn^{2+}$  endopeptidázy, dva  $Zn^{2+}$  aminopeptidázy, dva  $Zn^{2+}$  karboxypeptidázy. Vzhledem ke komplexitě směsi je obtížné stanovit optimální reakční podmínky. Snáší 1% SDS, ale v přít. EDTA ztrácí 70% aktivity, protože mnoho enzymů potřebuje zinek nebo vápník. Používá se obvykle při pH 7-8, ale některé komponenty mají optimum až při pH 9-10. Jedna komponenta je stabilní i při 70°C, ale ostatní ztrácejí 90% aktivity. Některé enzymy snášejí i 9M močovinu a 6M guanidinium chlorid, jiné ne.



## Enzymy v molekulární biologii

### Pronáza

- Dodává se jako prášek o specifické aktivitě jen o málo menší než má proteináza K, 1mg asi za 2 Kč. Zás. roztok se připravuje ve vodě o konc. 10-20 mg/ml. Pro plnou aktivaci vyžaduje zahřát na 56°C 15 min. a pak inkubovat 1h při 37°C, přičemž se jednotlivé molekuly vzájemnou digescí aktivují (odštěpují N-koncové peptidy inaktivující proteázy při jejich syntéze a sekreci). Zároveň se tím zničí případná DNázová a RNázová aktivita. Zás. roztok se pak musí uchovávat zmražený.
- Používá se v konečné koncentraci 250-500 µg/ml (tj. ředí se 40x) jako 10x levnější náhražka proteinázy K, ale nedává tak dobré výsledky.



## Enzymy v molekulární biologii

### Vysoce specifické proteázy

- Vzácné jsou proteázy vysoce specifické na delší sekvenci aminokyselin, které tedy štěpí jen některé proteiny a vesměs jen v jednom místě.
- Byly charakterizovány až v posledních letech a používají se pro specifické oddělení částí hybridních proteinů exprimovaných z různých expresních kazet.
- Do polylinkeru, spojujícího markerový gen (např. lacZ) a klonovaný/exprimovaný gen, se vloží sekvence kodonů, představující cílové místo proteázy. Je-li třeba oddělit produkt klonovaného genu od markerového proteinu, působí se na produkt specifickou proteázou a předpokládá se, že v produktu klonovaného genu není žádné cílové místo.



## Vysoce specifické proteázy

Proteáza	kDa	cílové místo	zdroj	poznámky
<b>faktor Xa</b>	27S = S16	Ile-Glu/Asp- <u>Gly-Arg</u> ↓X(Arg/Pro)	z hovězí plasmy; musí být aktivována zmijím jedem	dá se odstranit benzami-din- agarosou
<b>enterokináza</b>	27	Asp-Asp-Asp-Asp-Lys↓X(Pro)	gen ze skotu exprimovaný v E. coli	dá se odstranit trypsin inhib.- agarosou
<b>genenáza I</b>	28	Pro-Gly-Ala-Ala- <u>His- Tyr</u> ↓X(Pro/Ile)	Bacillus amyloliquefaciens	z mol.gen. modifikovaného genu pro subtilizin BPN.
<b>furin</b>	53	Arg-X-X(Lys/Arg)-Arg↓X	zkrácený lidský; exprimo-vaný v hmyzích buňkách	hlavní procesingový enz. v sekreční dráze. Ca dep.
Vysvětlivky:	X - libovolná aminokyselina, kromě přeškrtnutých; <u>aa</u> v rámečku jsou naopak štěpeny přednostně <u>potrženě</u> - tzv. sekundární místa, štěpení s nižší specifitou, obvykle v nepřírozně rozvolněných proteinech			



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice



Biotechnologie rostlinných buněk  
Enzymy v molekulární biologii

## Enzymy v molekulární biologii

Další enzymy se vztahem k nukleovým kyselinám

- **topoisomeráza I** z pšeničných klíčků nebo z hovězího thymu
- **topoisomeráza II** z embryí Drosofily
- **uracil glykosyláza** odstraňující uracily z DNA
- **pyrofosfatáza** z kvasinek nebo z termofilních bakterií.



## Enzymy v molekulární biologii

Další enzymy se vztahem k nukleovým kyselinám

- **Agaráza** - enzym štěpící agarosu, z bakterií *Pseudomonas atlantica*, pro některé způsoby izolace DNA z gelu.
- Dlouho známý, velmi aktivní a stabilní **lysozym** z vaječného bílku se používá pro digesci bakteriální buněčné stěny (při jemné izolaci velkých plasmidů), podobně se sféroplasty z kvasinek připravují velmi drahými "**šnekázami**", enzymy izolovanými původně z hlemýždů, nebo analogy (**Lytikáza** BOEHRINGER).
- Rostlinné protoplasty se připravují pro speciální účely, ale i pro izolaci vysoce polymerní DNA, digescí buněčné stěny směsí **celulázy** Onozuka z *Trichoderma viride* a **Macerozemu** z *Rhizopus* sp. Řada dalších enzymů na štěpení sacharidů se využívá k odstranění/modifikaci glykosylace proteinů.