



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

Biotechnologie rostlinných buněk

Enzymy v molekulární biologii - ON



prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

University of South Bohemia

**Faculty of Agriculture, Biotechnological Centre
Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice, CZ**



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - ostatní nukleázy

Ostatní nukleázy

- tímto termínem označujeme enzymy štěpící nukleové kyseliny, které nemají tak přísnou sekvenční specifitu, jako restriční nukleázy
- štěpí tedy buď v libovolných místech, nebo jen s malou specifitou (např. především za C), která neumožňuje mapování DNA
- nomenklatura ostatních nukleáz je trochu zmatečná, protože přesný mechanismus reakce je většinou nedostatečně prozkoumaný
- jsou to velmi běžné a široce rozšířené enzymy



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - ostatní nukleázy

Ostatní nukleázy

- obvykle se dělí podle čtyř hlavních kritérií:
 - ✓ zda štěpí DNA (DNázy) nebo RNA (RNázy), ale některé mohou štěpit oba typy nukleových kyselin
 - ✓ zda štěpí NA jednořetězcové nebo dvouřetězcové



Ostastní nukleázy

- obvykle se dělí podle čtyř hlavních kritérií:
 - ✓ zda štěpí NA endonukleolyticky - uprostřed řetězce (*endo*), nebo pouze od volného konce, což se obvykle v názvu vyznačuje předponou *exo*; opět platí, že některé nukleázy mohou provádět obojí reakci, zvl. *in vitro* za netypických podmínek, zatímco *in vivo* štěpí jen jedním způsobem
 - ✓ z hlediska mechanismu i pro praktické použití je důležité, zda vytvářejí 5'-estery ribosy (tj. štěpí vazbu mezi 3' OH a -P) nebo 3'-estery (štěpí mezi P- a 5' OH)



Ostastní nukleázy

z hlediska mechanismu i pro praktické použití je důležité, zda vytvářejí 5'-estery ribosy (tj. štěpí vazbu mezi 3' OH a -P) nebo 3'-estery (štěpí mezi P- a 5' OH)

- Nuclease cleavage sites
- Cleavage at bond A generates a 5'-phosphate and a 3' OH terminus
- Cleavage at bond B generates a 3'-phosphate and a 5'-hydroxyl terminus
- A given nuclease can catalyze at either A or B, but not both.

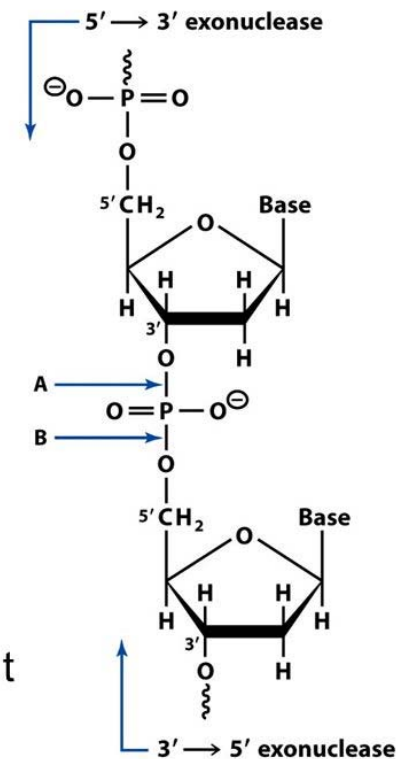


Figure 19-27 Principles of Biochemistry, 4/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.



Ostatní nukleázy

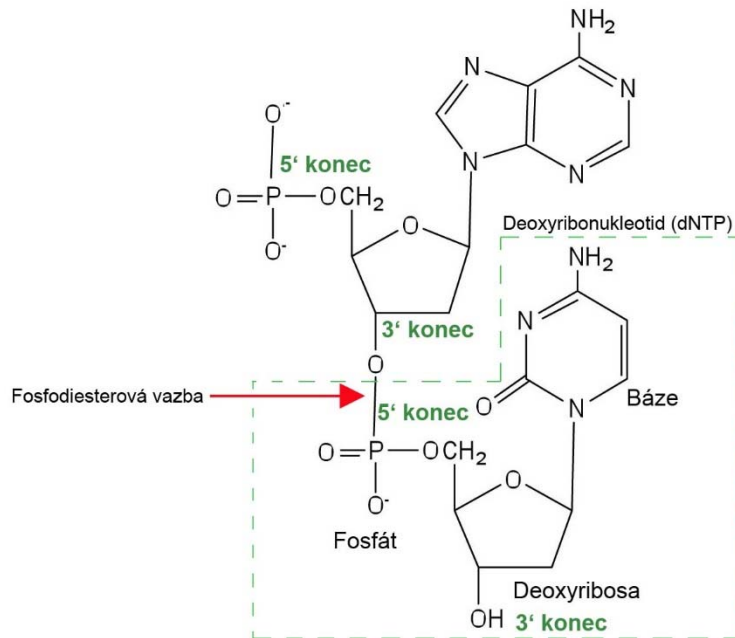
- vlastnosti běžných nukleáz

nukleáza	substrátem je					štěpí		tvoří		sekvenční specifita	obrázek
	DNA	RNA	<i>ds</i>	<i>H</i>	<i>ss</i>	endo	exo	5'–	3'–		
DNáza I	+	-	+	+	±	+	-	+	-	-	
DNáza II	+	-	+	+	±	+	-	-	+	-	
Bal31	+	+	+	+	±	±	+	+	-	A,T>G,C	
S1	+	+	-±	-±	+	+	-	+	-	-	
Mung bean	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	
exo VII	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	
exo III	+	+	+	+	-	-	+	+	-	C>A,T>G	
λ exo	+	?	+	?	-±	-	+	-	+	-	
RNáza A	-	+	-±	-	+	+	-	-	+	Y-↓	
RNáza T1	-	+	-±	-	+	+	-	-	+	G-↓	
RNáza ONE	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	
RNáza H	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	

H je RNA-DNA *ds* hybrid; na obrázcích je jednoduchou čarou DNA, dvojitou RNA
 ± štěpí s aktivitou jen 2-10% normálního substrátu
 -± štěpí s aktivitou jen 0,1-1%
 -± štěpí jen za anomálních podmínek, např. v apurinových místech, proti niku, v rozvolněné *ds* struktuře apod.

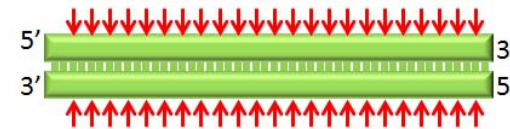


Ostatní nukleázy

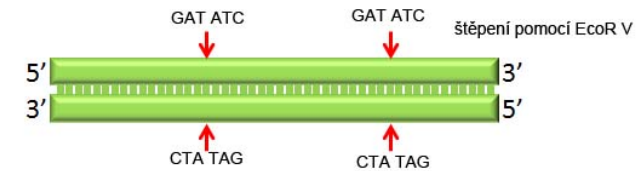


Endonukleolytické štěpení

Nespecifické štěpení (např. DNása I) - vznik mono- a oligonukleotidů



Specifické štěpení restričními endonukleázami v závislosti na příslušné sekvenci



Exonukleolytické štěpení

ve směru 3'-5' (např. Exo I)



ve směru 5'-3' (např. Lambda exonukleáza)





Ostastní nukleázy

DNÁZA I (HOVĚZÍ PANKREATICKÁ DNÁZA)

- Je nejdéle komerčně dostupná ze všech nespecifických nukleáz, už od konce 60. let, a dosud nejvíce používaná. Na rozdíl od jiných eukar. nukleáz podobných vlastností se snadno čistí a nemá přidruženou RNázovou aktivitu. Štěpí vazby mezi deoxyribosou a fosfátem uvnitř řetězce *dsDNA* (endo), ale vždy jen na jednom řetězci, takže ke zlomu molekuly dojde jen tehdy, jsou-li niky na protilehlých řetězcích náhodou blízko sebe (tzv. "double hit" mechanismus), tj. v praxi až po intenzivním štěpení.
- DNáza I vytváří fragmenty s 5'-fosfátovou skupinou a 3'-OH skupinou, pH optimum je 7-8, potřebuje nutně dvojmocné ionty. Obvykle se používá 10mM $MgCl_2$, ale intenzivněji štěpí v přítomnosti Mn^{2+} , kdy navíc začne štěpit vždy oba řetězce proti sobě ("single hit" mechanismus), snad proto, že tyto ionty dimerizují enzym a každá molekula štěpí jeden řetězec v daném místě.



Ostatní nukleázy

DNÁZA I (HOVĚZÍ PANKREATICKÁ DNÁZA)

- Nemá žádnou sekvenční specifitu. Štěpí také ssDNA. Nikdy nerozštěpí DNA až na nukleotidy, ani na krátké oligonukleotidy, protože neštěpí velmi krátké řetězce (*pod 100b*), jako ostatně i jiné DNázy.

Použití:

- Odstranění vysokomolekulární DNA z preparátu (např. při izolaci proteinů nebo bakteriofágů z lyzovaných bakterií a při některých metodách přípravy RNA *např. pro přípravu cDNA a následující amplifikaci PCR*).
- Při tzv. "nick-translaci" k vytvoření náhodných niků v DNA.



Ostatní nukleázy

DNÁZA I (HOVĚZÍ PANKREATICKÁ DNÁZA)

Použití:

- "DNA footprinting" ("DNase protection assay"). Metoda pro stanovení místa vazby proteinů apod. na DNA. Využívá se toho, že v místě vazby (proteinu) je DNA chráněna před DNázou. Fragment DNA se označí na jednom konci, nechá se navázat bílkovina a pak se přisítuje UV zářením, aby se při enzymatické reakci neodpojila. Komplex se štěpí DNázou I jen tak, aby v každém řetězci vznikl průměrně jeden nik. Po denuraci, odstranění proteinu a elfo ve velmi hustém denaturačním PAA gelu, který rozliší fragmenty lišící se i jednou basí, dostaneme "žebřík" fragmentů odpovídající nikům za každou basí, ve kterém bude mezera v místě vazby proteinu. Zjistíme hned, od kolikáté do kolikáté base se protein těsně váže.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - ostatní nukleázy

Ostatní nukleázy

DNÁZA II

- Jiným známým, ale málo používaným universálním endonukleolytickým enzymem je DNáza II (také slezinná nebo kyselá DNáza). Štěpí za vzniku 3'- \square esterů, vždy "single hit" mechanismem, pH optimum má jen 4,2-5,5.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - ostatní nukleázy

Ostatní nukleázy

MIKROKOKÁLNÍ NUKLEÁZA (ZE STAPHYLOCCOCUS AUREUS)

- Pro přípravu náhodných krátkých fragmentů DNA se více hodí mikrokokální nukleáza (ze *Staphylococcus aureus*), který je aktivnější na jednořetězcovou DNA a štěpí na kratší kousky. Má určitou preferenci pro *AT* úseky a uvolňuje 3'- \square estery.



Ostatní nukleázy

MUNG BEAN NUKLEÁZA

- Enzym izolovaný z výhonků *Phaseolus vulgaris* už od r. 1962. Je to asi nejlepší známá specificky jednořetězcová DN- a RNáza (nedělá rozdíl mezi cukry). Štěpí endo/exonukleolyticky za tvorby 5'-□ esterů mono, di a trinukleotidů, zřídka až heptanukleotidů. Asi 30 000x méně štěpí i dsDNA, zřejmě především v místech, kde je částečně rozvolněná (počátky replikace, místa transkripce, ohyby silně superhelixové molekuly, místa bohatá na AT). Kromě toho vykazuje i terminální 3' fosfatázovou aktivitu, což je vlastně její normální reakce na posledním fosfátu řetězce, probíhající i na dsDNA.
- Je to glykoprotein s 29% cukrů, ze dvou subjednotek 25 a 15kDa spojených S-S můstky. Pravý metaloenzym, vyžadující Zn²⁺ a redukční látky jak pro aktivitu, tak stabilitu. Velmi citlivý na reakční podmínky. pH optimum je 5.0, ale někdy se používá i při pH 7.0, kdy má relativně ještě nižší ds aktivitu (naopak pod pH 5 se selektivita na ssDNA částečně ztrácí), ale při pH 8 má už jen 0,01% aktivity. Nesnáší vyšší koncentrace solí; optimum je 0,025-0,05M; nad 0,2M je enzym inhibován z 80-90%.



Ostatní nukleázy

MUNG BEAN NUKLEÁZA

Použití:

- Především k "začištění" jednořetězcových konců. Odstraňuje přečnívající 5' i 3' (méně účinně) konce, a po vytvoření rovného (tupého) konce se štěpení zastaví. Tupé konce bývají spolehlivě rovné, je-li poslední pár G:C a výborně ligují; u A:T konce někdy enzym odštěpí o jednu basi navíc.
- Mapování rozsahu transkriptu. Isolovaná mRNA se hybridizuje s genomovou DNA (jednořetězcovou; pokud možno s izolovanými, hustotní centrifugací oddělenými řetězci) a mung bean nukleáza rozštěpí nehybridizované části. Elektroforéza ukáže, kde je dsDNA, tedy který řetězec je templátový, a sekvenováním DNA se stanoví na basi přesně začátek transkriptu.
- Štěpení vlásenkových smyček (např. při syntéze 2. řetězce cDNA). Zde se využívá schopnosti štěpit v místě špatně spárované dvoušroubovice.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - ostatní nukleázy

Ostatní nukleázy

MUNG BEAN NUKLEÁZA

Použití:

- Ke všem těmto účelům se dříve používala levnější, velmi stabilní, a na reakční podmínky méně citlivá tzv. **S1 nukleáza z *Aspergillus niger***, s podobnou specifitou. Má ale nepříjemnou schopnost nechávat jednobasové převisy a navíc tendenci "uždibovat" nepravidelně base z už zarovnaného řetězce (mung bean nukl. odštěpí jen fosfát). Tím je málokterý konec skutečně rovný a vhodný pro ligaci. Také štěpí řetězec proti jednořetězcovému niku, což vadí zvláště proto, že pracuje také v kyselém pH, kde může docházet k depurinacím. (Mung bean nukleáza štěpí protistojný řetězec jen když byl nik rozšířen na několik nukleotidů)



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - ostatní nukleázy

Ostatní nukleázy

EXONUKLEÁZA VII

- Jediný komerční zástupce jednořetězcových striktních exoDNáz. Enzym je z *E. coli*, ze dvou subjednotek, kódovaných geny *xseA* a *xseB*. Provádí více-méně stejnou reakci jako předchozí, tj. zarovnává přečnívající konce, ale štěpí DNA exonukleolyticky (i když produktem jsou i krátké oligonukleotidy) a stejně dobře z 3' jako z 5' konce. Je unikátní mezi všemi DNázami tím, že nepotřebuje dvojmocné ionty (pracuje v EDTA).



Ostatní nukleázy

Exonukleáza III

- Isoluje se ze speciálního kmene *E. coli*, který nadprodukuje protein genu *xthA*.
- Štěpí jeden řetězec NA, od 3' konce při odštěpování 5' monofosfátů nukleotidů, ale jen je-li součástí dvoušroubovice, tj. od tupých konců dvoušroubovice, od ustupujících 3' konců a vnitřních niků; neštěpí volnou jednořetězcovou DNA, ani delší (4-basové stačí) 3' přečnívající konce. Kromě toho působí jako RNázaH - tj. štěpí stejně i RNA hybridizovanou s DNA a (logicky) i jako 3' fosfatáza. Endonukleolyticky štěpí pouze v apurinových místech.
- Není zvlášť procesivní - obvykle vytvoří po určité době soubor molekul rozštěpených v podobném rozsahu. Má mírné basové preference v pořadí C>A=T>G; thioesterové vazby neštěpí vůbec.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - ostatní nukleázy

Ostatní nukleázy

Exonukleáza III

Použití:

- K vytváření řízených postupných delecí ("nested deletions"). Připraví se DNA fragment s přečnávajícím 5' nebo tupým koncem na jedné straně a 3' koncem na druhé. Necháme působit enzym a odebíráme časové vzorky. K těm se následně přidá Mung bean nukleáza, která zarovná konce a umožní výsledné molekuly hromadně klonovat.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - ostatní nukleázy

Ostatní nukleázy

Exonukleáza III

Použití:

- K produkci strand-specifických prob. Fragment DNA, který má 5'nebo tupé konce na obou stranách a ve středu dvě restrikční místa blízko sebe se štěpí tak dlouho, až je většina řetězců rozložena, načež se opět dosyntetizují DNA polymerázou I se značeným nukleotidem. Po rozštěpení centrálních míst, elektroforetickém oddělení fragmentů a denaturaci dostaneme proby specifické pro určitý řetězec. (Stejnou reakci může provést i samotná T4 DNA polymeráza).



Ostatní nukleázy

Bal31 exonukleáza

- Byla izolována v r. 1968, při studiu bakteriofága mořské bakterie *Pseudomonas* BAL31 (enzym ho zkracoval); později byl kmen přejmenován na *Alteromonas espejana*.
- Je to enzym s pozoruhodně bohatým souborem nukleázových aktivit: má vysokou aktivitu jako 3'-5' dsNA specifická exonukleáza (štěpící jeden řetězec v dvouřetězcové DNA; štěpí i od niku), podstatně slabší aktivitu (2-3%) jako 5' - 3' exonukleáza a současně má i slabou ssNA endonukleázovou aktivitu (i v rozvolněných, silně superhelixových, ohnutých místech). Nedělá rozdíl mezi cukry a je vysoce procesivní – digeruje snadno i několik tisíc basí a aktivita je v širokém rozsahu úměrná množství přidaného enzymu. K aktivitě i stabilitě nutně potřebuje Ca²⁺ ionty - Mg²⁺ je nemohou nahradit.



Ostatní nukleázy

Bal31 exonukleáza

- Spojením nukleázových aktivit zkracuje Bal31 DNA od konců. Při nízké koncentraci enzymu (0,2 U/ml) se vytvářejí dlouhé 5' konce, ale při vysoké koncentraci (2-5 U/ml) se 5'-3' a endonukleázová akt. relativně zvýší a vzniká asi 10% molekul s tupými konci, které jdou ligovat; zbytek má asi 5ti basové 5' přečnívající konce. AT bohaté sekvence jsou štěpeny daleko rychleji.
- Komerční preparáty obsahují dvě formy enzymu, S (slow) a F (fast), z nichž druhá je proteolytickým štěpem první. Trochu se liší aktivitou: F se hodí spíš na digesci dlouhých kusů, S krátkých, protože má sníženou 3'-5' exonukleázovou aktivitu.
- Výhodné je po reakci doplnit přečnívající konce, nejlépe T4 DNA polymerázou.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - ostatní nukleázy

Ostatní nukleázy

Bal31 exonukleáza

Použití:

- Ke zkracování dsDNA od konců („nested deletions“), jako exonukleáza III.
- Mapování restrikčních míst u velkých fragmentů DNA. Pořadí fragmentů zjistíme postupným odštěpováním DNA z konců - koncové fr. se zmenšují.
- Příprava rekombinantních RNA
- Mapování špatně spárovaných míst na dsDNA.



Ostatní nukleázy

Další komerční nukleázy

- **T7 endonukleáza I** (produkt genu 3, fy NEB) štěpí specificky Hollidayovy struktury, špatně spárované heteroduplexy, a všechna špatně spárovaná místa; proti níku jen pomalu.
- **Exonukleáza I** z *E. coli* (z klonovaného genu *exoI* - NEB, AMERSHAM) štěpí 3'-5' pouze jednořetězcovou DNA a odštěpuje jednotlivé nukleotidy.
- **Exonukleáza V** z *Micrococcus luteus* (AMERSHAM) štěpí DNA z obou konců, jak jednořetězcovou, tak dvouřetězcovou, potřebuje ATP pro aktivitu.
- **Nukleáza P1** z *Penicillium citrinum* štěpí endonukleolyticky všechny NA (RNA, DNA, snáze jednořetězcovou, ale i ds) až na 5'-nukleotidy.



Enzymy v molekulární biologii

- Hollidayova struktura

REKOMBINACE

Přestavby DNA \Rightarrow variace v kombinacích genů v genomu
 \Rightarrow adaptace
 \Rightarrow evoluce

1. Obecná rekombinace („General recombination“)

Genetická výměna mezi jakýmkoli párem homologních DNA sekvencí - často lokalizovaných na 2 kopiích téhož chromosomu.

Výměna úseků homologních chromosomů při meiose „crossing over“ \Rightarrow nové kombinace alel

2. Místně-specifická rekombinace („Site-specific recombination“) \Rightarrow není nutná DNA homologie

Rekombinace v krátkých specifických nukleotidových sekvencích \Rightarrow rozpoznávané místně specifickými rekombinačními enzymy

\Rightarrow Alterace posice nukleotidových sekvencí v genomu (integrace virů, transponovatelné elementy ..)

Specifická sekvence na jedné nebo na obou rekombinujících molekulách

1. Obecná rekombinace („General recombination“)

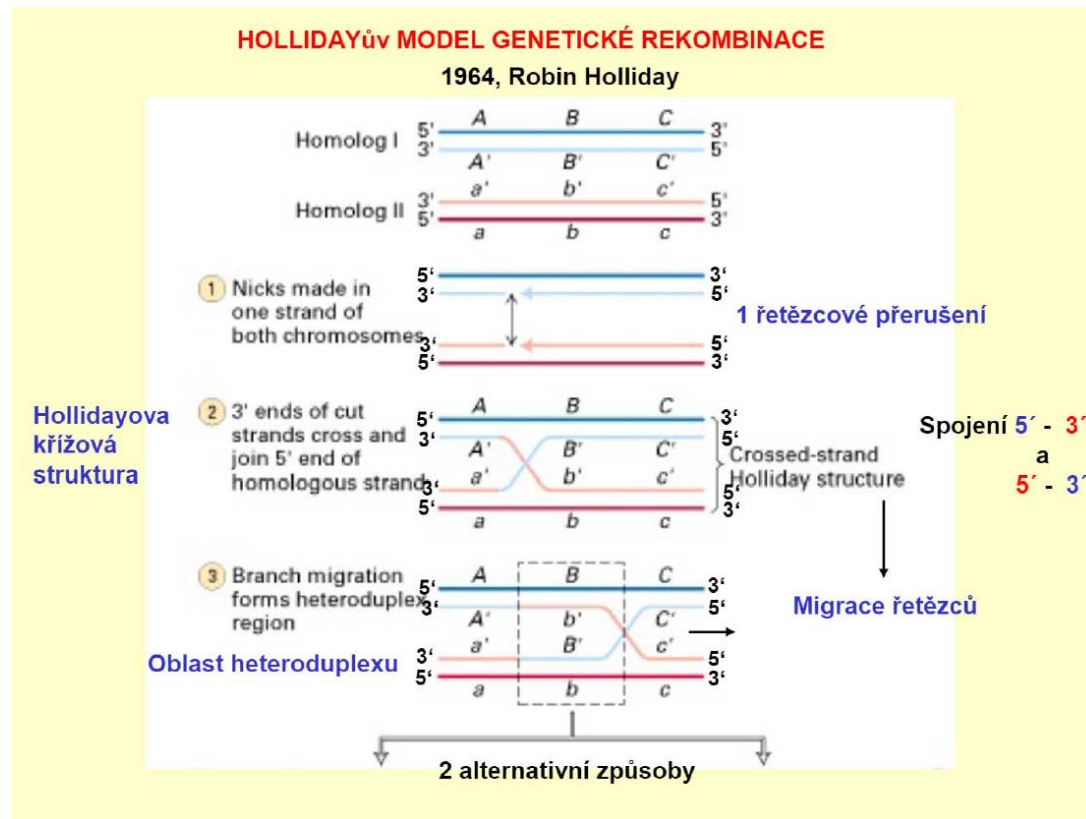
Základní mechanismus stejný u různých organismů \Rightarrow 2 homologní sekvence \Rightarrow vznik Hollidayovy struktury a heteroduplexního spojení (i 1000ce bp dlouhé)

Nedochází ke změnám sekvencí (většinou)



Enzymy v molekulární biologii

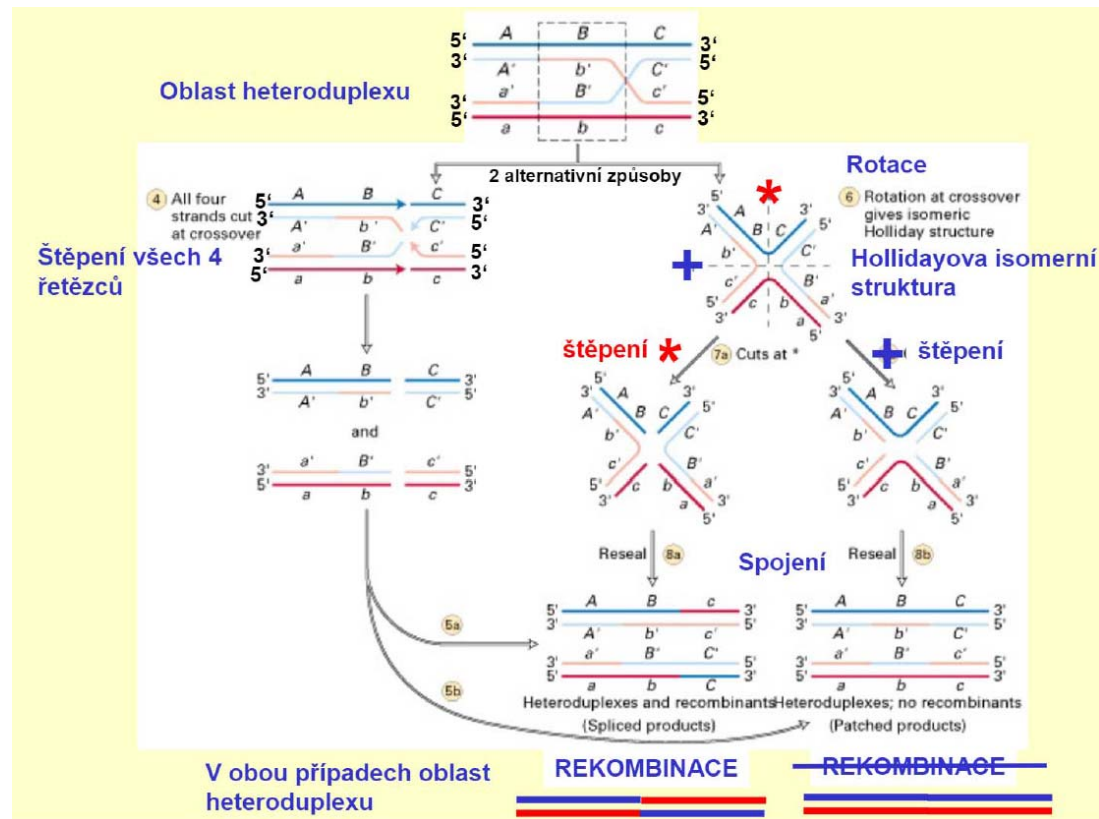
- Hollidayova struktura





Enzymy v molekulární biologii

- Hollidayova struktura





Ostatní nukleázy

RNáza A (také RNáza I nebo pankreatická RNáza)

- Je nejdéle známou a daleko nejvíce používanou RNázou. Byla izolována v krystalické formě už v r. 1940 Kunitzem z hovězího pankreatu. Je to jeden z nejmenších enzymů. Má jen 124 aminokyselin (12 600Da), když 25 aa z N-konce bylo odstraněno při sekreci. Terc. struktura je stabilizována 4mi disulfidickými můstky, jejichž redukce ruší aktivitu, ale na vzduchu se můstky samovolně obnoví. Na čtyřech místech je glykosylována na asparaginech, díky čemuž se snad méně vstřebává ve střevě. Její nejvýznamnější úlohou *in vivo* je asi štěpit RNA lyzovaných buněk střevní mikroflory.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - ostatní nukleázy

Ostatní nukleázy

RNáza A (také RNáza I nebo pankreatická RNáza)

- Štěpí endonukleolyticky za pyrimidinovými basemi tak, že vznikají cyklické 2'-3' fosfáty ribos, které se dále štěpí na 3'- estery. *In vivo* zřejmě štěpí jen ssRNA, *in vitro* při vysoké koncentraci enzymu (alespoň 2.2 Kunitzovy jednotky/ml) a vhodných podmínkách (nízká iontová síla - NaCl pod 0,3M, nižší pH) i spárované úseky RNA-RNA resp. RNA v hybridech s DNA.



Ostatní nukleázy

RNáza A (také RNáza I nebo pankreatická RNáza)

- Skladování, stabilita, zásobní roztok RNázy A:
 - ✓ Enzym se dodává většinou jako krystalický prášek o akt. kolem 40U/mg a je velmi levný. Zásobní roztok se připravuje 10mg/ml v 0,01M octanu sodném, povaří se (čímž se odstraní případné DNázové aktivity), pH se upraví Trisem na 7.4; rozplní se do malých aliquotů a zmrazí při -200C.
- Stabilita je úžasná, v širokém rozsahu pH a dokonce i za varu (zvl. v kyselejších pH). Příčinou je zřejmě malá molekula, umožňující vrátit se po denuraci do terc. struktury.
- Podobně stabilní jsou i jiné RNázy a to často způsobuje velké problémy.



Ostatní nukleázy

RNáza A (také RNáza I nebo pankreatická RNáza)

- Pracuje-li se v laboratoři s RNA, často se vyžaduje, aby se tam vůbec nepoužívaly RNázy. Pro práci s RNA se také většinou používá jen nové sterilní plastické nádobí; myté skleněné nádobí jen po zahřátí na 200°C několik hodin.
- Inhibice: Specifické inhibitory RNázy A a dalších RNáz jsou nutné při práci s RNA. Nejúčinnější je jedna bílkovina z lidské placenty, tzv. "human placental RNase inhibitor", která s RNázou A tvoří komplex 1:1. Levnější jsou některé soli vanadu, tvořící stabilní komplex s nukleotid monofosfáty, který RNázy inhibuje.
- Inaktivace: Z roztoku nukleových kyselin lze RNázu A odstranit vytřepáním fenolem (ale nikoli chloroformem!), zvláště je-li předtím působeno proteinázou K.



Ostatní nukleázy

RNáza A (také RNáza I nebo pankreatická RNáza)

- Reakce: Pracuje téměř v jakémkoli prostředí, kromě příliš vysoké iontové síly (nad 1M). Výborně i v čisté vodě. EDTA jí spíše prospívá. SDS je uváděno mezi slabými inhibitory, ale v praxi moc nevadí. Obvykle při 37OC, 30 min., nebo při pokojové teplotě 1h.
- Stanovení a jednotky: Používají se různé metody stanovení a definice jednotek; klasická Kunitzova metoda je založena na poklesu absorbance preparátu 0,05% kvasničné RNA při 300 nm díky činnosti enzymu; jednotka je množství RNázyA, které způsobí pokles na konečnou stabilní hodnotu během 1 min.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - ostatní nukleázy

Ostatní nukleázy

RNáza A (také RNáza I nebo pankreatická RNáza)

Použití:

- Pro jakékoli odstranění RNA, např. z preparátů DNA, se obvykle používá v koncentraci 10 µg/ml. Je ale třeba vést v patrnosti, že se tím odstraní pouze vysokomolekulární RNA a přítomné oligoribonukleotidy mohou při aplikaci mnohých metod představovat větší problém, než původní RNA. Oligoribonukleotidy se odstraňují poměrně komplikovaně a s omezenou kontrolou, buď na sloupci sepharosy, nebo centrifugací přes hustotní gradient.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - ostatní nukleázy

Ostatní nukleázy

RNáza A (také RNáza I nebo pankreatická RNáza)

Použití:

- Pro tzv. "RNase protection assay". Velmi významná metoda, kdy se silně radioaktivní RNA(DNA) proba hybridizuje s RNA izolovanou ze vzorku a směs RNA se štěpí RNázami za podmínek, kdy štěpí jen jednořetězcovou RNA. Hybridizované úseky zůstanou zachovány a na elektroforéze směsi se objeví jako pruhy charakteristické velikosti (podle velikosti proby). Je to velmi citlivá metoda pro nalezení komplementární mRNA v tkáních, protože odpadají ztráty spojené s přenosem na membránu při blotovacích metodách a navíc je RNA proba intensivněji značená. Modifikace metody umožňuje určit i místa vazby proteinů, pokud jsou dost rozsáhlá.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - ostatní nukleázy

Ostatní nukleázy

RNáza A (také RNáza I nebo pankreatická RNáza)

Použití:

- Tzv. "mismatch" analýza využívá schopnosti RNázy A štěpit za nespárovanými basemi v hybridu RNA-DNA. K mutované DNA se přidá mRNA typu a po štěpení RNázou A se rozpadne na tolik kousků, kolik bylo nespárovaným pyrimidinů.



Ostatní nukleázy

RNáza T1, U2 a jiné

- **T1** je z *Aspergillus oryzae*, má podobné vlastnosti jako RNázaA, ale štěpí RNA za G, na které je vysoce specifická. Používá se ke stejným účelům jako RNázaA, někdy ve směsi s ní.
- Podobně RNáza **U2** z *Ustilago sphaerogena* štěpí za A.
- Existuje několik dalších RNáz s podobnými vlastnostmi ale odlišnými specifitami; **RNáza ONE** firmy PROMEGA, periplasmatický enzym z *E. coli*, štěpí RNA zcela nespecificky, což je výhodné pro RNase protection assay.



Ostatní nukleázy

RNáza H

- Štěpí endonukleolyticky pouze RNA hybridizovanou s DNA.
- Velmi významný bakteriální i eukaryotní enzym, který vytváří *in vivo* v hybridní dvoušroubovici oligoribonukleotidy s volnými 3'-OH, které slouží jako primery pro DNA polymerázy.
- K témuž účelu se používá *in vitro*, např. při syntéze 2. řetězce c-DNA.
- Může být použita i pro místně specifické štěpení RNA, máme-li hybridizující úseky DNA.