



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

Biotechnologie rostlinných buněk

Enzymy v molekulární biologii - POLY



prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

University of South Bohemia

Faculty of Agriculture, Biotechnological Centre

Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice, CZ

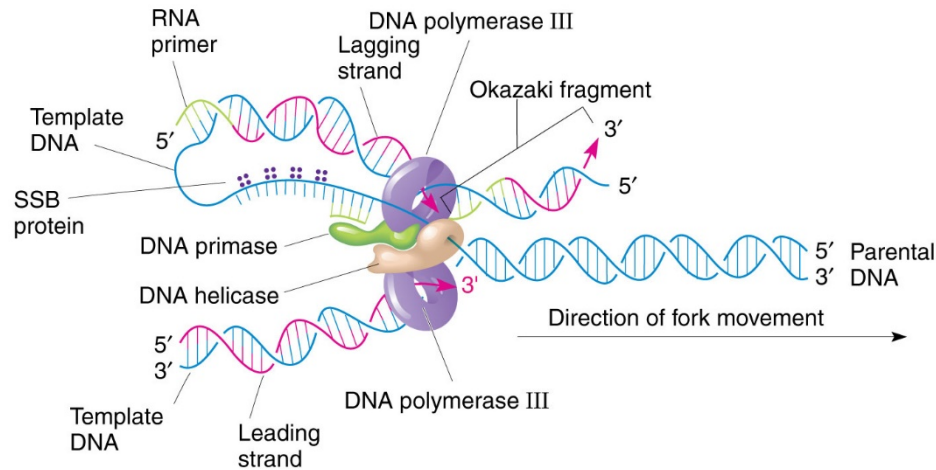


DNA a RNA polymerázy

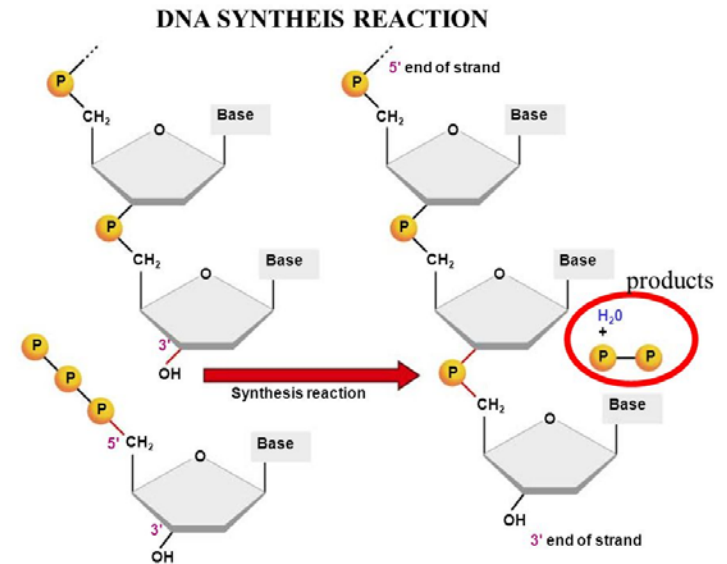
- Polymerázy nukleových kyselin jsou enzymy, které syntetizují nukleové kyseliny z nukleotid trifosfátů.
- Polymerázy nukleových kyselin se dělí do skupin podle toho jakou NA syntetizují, a podle jakého templátu vytváří novou molekulu NA.
- Je jich mnoho druhů, ale reakce je v podstatě vždy stejná. Potřebují templát, tj. v místě syntézy jednořetězcovou NA, na kterou se vážou volné NTP díky vzniku vodíkových můstků mezi basemi, a polymerázy pak připojují k 3'-OH předchozího nukleotidu sousední, vytvářením kovalentní vazby s jeho 5' α -fosfátem (5' β a γ fosfáty se přitom odštěpí jako pyrofosfát). Nový řetězec tedy vždy přirůstá ve směru 5' -3'.



DNA a RNA polymerázy



© 2010 Pearson Education, Inc.





Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - polymerázy

DNA a RNA polymerázy

- RNA polymerázy mají helikázovou aktivitu, kterou ale mohou uplatnit pouze v místě určité sekvence na dsDNA, na tzv. promotoru, kde DNA v místě startu syntézy rozpletou a odtud pokračují v krátkém lokálním rozplétání během syntézy.
- Z jiného místa, než z promotoru, nemohou syntetizovat.
- Nemají korekturní nukleázovou aktivitu; kontrolují pouze tvar zařazovaných 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 - polymerázy

DNA a RNA polymerázy

- DNA polymerázy nemají helikázovou aktivitu, a proto musí mít templát v celém rozsahu syntézy od počátku jednořetězcový. Větší vlásenkové smyčky na templátu ovšem způsobují problémy; polymeráza se na nich často zastaví.
- DNA polymerázy mohou syntetizovat z jakéhokoli místa na templátu, ale potřebují tam tzv. primer, krátký oligonukleotid navázaný na templát, ke kterému teprve mohou připojovat další nukleotidy – nemohou spojit jen dva vedle sebe připárované nukleotidy, jako RNA polymerázy.



DNA a RNA polymerázy

- Většinou kontrolují nejen tvar připojovaných nukleotidů, ale především jejich párování s templátem, a nesprávné párování připojeného nukleotidu většinou mohou "opravit" jeho odstraněním exonukleázovou aktivitou v opačném směru (3'-5', tzv. korekturní aktivita, jen v blízkosti replikační vidličky).
- Problémem in vitro syntéz bývá slabá procesivita DNA polymeráz, tj. časté odpadávání jednotlivých syntetizujících molekul od templátu. Příčinou je nepřítomnost dalších složek polymeračního komplexu, které in vivo procesivitu zvyšují.
- Syntéza ovšem může vždy pokračovat jinou molekulou od konce nasyntetizovaného řetězce, který slouží jako primer.



DNA a RNA polymerázy

- Vlastnosti důležitých polymeráz

	5'-3' exo	3'-5' exo	chyb na milion b.	K _m pro dNTP	protein kDa	dNTP μM (each)	MgCl ₂ mM	DTT mM
DNAP I	+	+	9	1-2μM	109	50	10	1
Klenow	-	+	40	2μM	68	25	10	1
T4 DNAP	-	+	<1	2μM	112	100-200	5	5
T7 DNAP	-	+	15	18μM	84	300	10	1
Taq DNAP	+	-	285	13μM	94	200-400	1.5	-
Vent DNAP	-	+	57	60μM	?	200	2	-
Pfu DNAP	-	+	30		?	200	2	-
TdT	-	-			8+24	5-500	CoCl ₂	0,2
RT MMLV	-	-	30	18μM	50	500	3	10
RNAP T7	-	-	?	?	90	400-4000	6-20	5



DNA dependentní DNA polymerázy

DNA polymeráza I z *E. coli* (DNAP I)

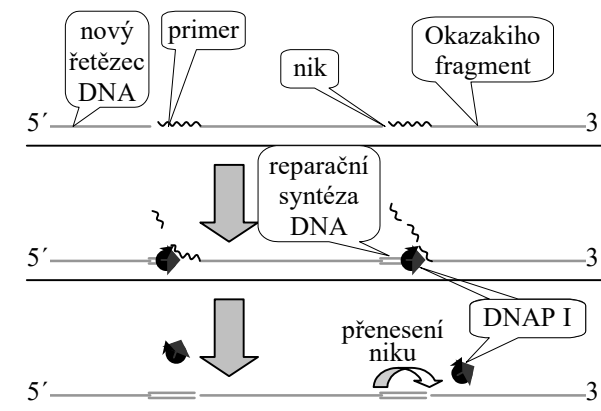
- Nejstarší známá DNA polymeráza, izolovaná Kornbergem už koncem 50. let (1956). Je kódovaná genem *polA* a tvoří ji jeden polypeptidický řetězec o 109kDa. V buňce je relativně hojně zastoupena (400 molekul/b), daleko více, než jiné DNAP. Její hlavní funkcí in vivo je nahrazování RNA primerů Okazakiho fragmentů při replikaci DNA.
- Proto má kromě běžných aktivit – 5'-3' polymerační a 3'-5' exonukleázové (korekturní, dost slabá), ještě exonukleázovou aktivitu 5'-3', kterou odstraňuje od konce, nebo i jen od niku, RNA primer (ale aktivita je funkční i na DNA).



DNA dependentní DNA polymerázy

DNA polymeráza I z *E. coli* (DNAP I)

- DNAP I napřed vytěsňuje primer z dvoušroubovice, přitom začíná syntézu DNA od 3'-OH předchozího Okazakiho fr. a zároveň jiným aktivním centrem digeruje vytěsněný primer. Tato činnost se projeví jako přenesení niku ("nick translace") ve směru 5'-3' o délku primeru, nebo i dále (spojit nik neumí; to dělají ligázy). Kromě toho může syntetizovat DNA v různých reparačních systémech, místo jiných DNA polymeráz.





DNA dependentní DNA polymerázy

DNA polymeráza I z *E. coli* (DNAP I)

- In vitro pracuje s nízkou procesivitou střední rychlostí (45b/s). Původně se používala při všech in vitro syntézách DNA, ale dnes je nahrazována jinými enzymy, protože její 5'-3' exonukleázová aktivita vadí (z jedné strany fragment prodlužuje a z druhé degraduje; korekturní 3'-5' exonukleázová akt. se naproti tomu dá eliminovat in vitro vyšší koncentrací dNTP). Nepříznivé efekty 5'-3' exonukleázové akt. se dají snížit reakcí za nižší teploty (15°C) a/nebo při nižším pH (6,9), kdy je exonukleázová akt. snížena podstatně více než polymerázová.
- Dnes se DNAP I využívá jen ve speciálních syntézách, kdy je jeden řetězec nahrazován druhým, a 5'-3' exonukleázová akt. je naopak prospěšná, jako při její reakci in vivo.



DNA dependentní DNA polymerázy

DNA polymeráza I z *E. coli* (DNAP I)

Použití

- Značení DNA metodou "nick-translace". Od uměle vytvořených niků (DNázou) v přítomnosti značených dNTP probíhá nahrazovací syntéza přímo na dvouřetězcové DNA, kdy jsou nahrazovány staré řetězce úseky nově synt. DNA. Štěpení DNázou a syntéza DNA polymerázou probíhají paralelně
- Nahrazovací syntéza 2. řetězce cDNA. V hybridu DNA-RNA vzniklém po nasyntetizování 1. řetězce DNA podle RNA reversní transkriptázou se udělají v RNA niky RNázou H a fragmenty RNA slouží jako primery pro DNA polymerázu I, která odštěpí RNA a nahradí ji DNA, jako in vivo. Při nízké teplotě i pH, ale přesto bývá 8b a více ze začátku cDNA ztraceno



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - polymerázy

DNA dependentní DNA polymerázy

Klenowův fragment

- Je to 68kDa polypeptid, získávaný původně z DNAP I štěpením subtilizinem (proteáza), který nemá 5'-3' exonukleázovou akt., ale další dvě si zachovává. Klenowův fragment nahradil DNA polymerázu I ve většině syntetických aplikací. Je asi 2x dražší než DNAP I, jinak pro jeho dodávání a uskladnění platí totéž co pro DNAP I. Pro nízkou procesivitu se nejvíc hodí pro syntézu kratších úseků.



DNA dependentní DNA polymerázy

Klenowův fragment

Použití:

- Značení DNA metodou "multiprime". Komplementární řetězec k denaturovanému templátu se syntetizuje z náhodných hexanukleotidů, které slouží jako primery, ve směsi s jedním značeným dNTP. Odpadá riskantní štěpení DNázou I. Podrobný návod v praktiku.
- Pro zarovnání 5' přečnívajících konců dosyntetizováním druhého řetězce. Vytvoří dokonale tupé konce; s přidavkem značeného dNTP DNA na koncích označí. Pak dáváme jeden dNTP značený a ostatní v 10x vyšší koncentraci, aby se reakce urychlila, protože značený nukleotid bývá obvykle ve velmi nízké koncentraci a reakci zpomaluje.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - polymerázy

DNA dependentní DNA polymerázy

Klenowův fragment

Použití:

- Pro syntézu 2. řetězce cDNA "self primed" metodou, kdy se využívá toho, že 3' konec 1. řetězce cDNA tvoří zpětné smyčky, které slouží jako primer pro Klenowa; vznikne ds vlásenková struktura, která se nakonec v ohybu štěpí S1 nukleázou. Starší metoda, dnes většinou nahrazovaná "replacement syntézou" RNázou H a DNAP I, nebo syntézami s použitím specifických primerů.
- Další aplikace jsou prodloužení mutantního oligonukleotidu při specifické mutagenezi a sekvenování - dnes už vzácně.



DNA dependentní DNA polymerázy

T4 DNA polymeráza (T4 DNAP)

- Replikační enzym bakteriofága T4, kódovaný genem 43, tvořený jedním polypeptidickým řetězcem 112 kDa. In vivo jedna z nejrychlejších polymeráz (1000b/s), in vitro mnohem pomalejší, ale stále dost rychlá a asi nejpřesnější ze všech.
- Aktivita má stejné jako Klenow fragment, ale korekturní 3'-5' exonukleázová akt. je asi 200x silnější, čehož se využívá při některých aplikacích. Dá se eliminovat vysokou konc. dNTP a nižší teplotou (11°C). Optimální pufr je 50 mM Tris pH 8-9, 5mM MgCl₂, 5 mM DTT, ale pracuje dobře i v "low" a "medium salt" restričních pufrech.



DNA dependentní DNA polymerázy

T4 DNA polymeráza (T4 DNAP)

Použití

- Zarovnání přečnívajících konců (včetně 3' přečnívajících; + případné označení). 5' konce dosyntetizuje jako Klenow ve vysoké konc. dNTP, při nízké teplotě; 3' konce jsou napřed v nepřítomnosti dNTP digerovány a změněny na 5'; pak přidáme dNTP.
- Značení tzv. "replacement synthesis" je analogické, jen štěpení exonukleázovou aktivitou je intenzivnější, takže jsou označeny rozsáhlé části DNA, nejen okolí konců. Využívá se především pro selektivní značení řetězců DNA, k čemuž jsou nutná dvě restriční místa blízko sebe uvnitř značeného fragmentu.



DNA dependentní DNA polymerázy

T7 DNA polymeráza

- Replikační enzym bakteiřofága T7, kódovaný jeho genem 5, tvořený jedním polypeptidem 84kDa. In vivo i in vitro funguje v komplexu s bakteriálním proteinem thioredoxinem (12kDa), který ho nějakým způsobem drží na templátu a zvyšuje mnohonásobně jeho procesivitu i schopnost prorážet sekundární struktury.
- Je to polymeráza s největší procesivitou (jedna molekula syntetizuje několik tisíc nukleotidů zasebou) i rychlostí in vitro.
- Má ale ještě 5x silnější korekturní 3'-5' exonukleázovou aktivitu, což komplikovalo její využití, dokud nebyl objeven způsob kontrolované oxidace enzymu, který tuto aktivitu z 99% odstraní, aniž poškodí polymerázovou akt.



DNA dependentní DNA polymerázy

T7 DNA polymeráza

- Pod názvem Sekvenáza prodávala tento enzym fy Amersham (dříve USB). Pracuje ve stejných pufrch jako jiné DNA polymerázy; protože syntetizuje dlouhé kusy, dává se obvykle vysoká konc. dNTP
- Použití: Sekvenáza především k sekvenování dlouhých úseků; také k extensi oligonukleotidu při místě spec. mutagenezi. Nemodifikovaná se používá málo, pro stejné účely jako T4 DNAP.



DNA dependentní DNA polymerázy

Taq DNA polymeráza (Taq DNAP)

- Je nejznámějším zástupcem termostabilních DNA polymeráz. Všechny dříve uvedené enzymy jsou termosensitivní a už při teplotě kolem 60°C jsou rychle inaktivovány.
- S nástupem PCR metod vznikla potřeba DNA polymeráz, které snesou alespoň na několik minut denaturační teplotu DNA (min. 94°C). Logicky byly hledány v termofilních baktériích, přizpůsobených životu v horkých pramenech. Tato je izolována z bakterie *Thermus aquaticus*.



DNA dependentní DNA polymerázy

Taq DNA polymeráza (Taq DNAP)

- Enzymy z různých kmenů se trochu liší molekulovou vahou a vlastnostmi; nejběžnější je z kmene YT-1, kde jeden polypeptidický řetězec Taq DNAP má 94 kDa. Sekvenčně je enzym podobný DNAP I a má in vivo asi i podobnou funkci (spíš reparační než replikační). Má 5'-3' exonukleázovou aktivitu, ale nikoli korekturní 3'-5', takže dělá více chyb (asi jednu na 4000b). Má také schopnost netemplátově připojovat jeden nukleotid (většinou dATP) k tupému konci DNA, jako ostatně i jiné DNAP bez korekturní aktivity.
- Enzym pracuje optimálně v 50mM KCl (NaCl ho nenahradí) a jen 2 mM MgCl₂; s vyšší konc. dNTP; vadí mu už 0,1% SDS, ale nikoli 10% etanol nebo 1,5M močovina. Má vysokou procesivitu a je relativně levný.



DNA dependentní DNA polymerázy

Taq DNA polymeráza (Taq DNAP)

Vlastnosti Taq DNA polymerázy

teplota	rychlost syntézy nukleotidů/s	přežívání v reakční směsi
97,5°C	?	5,5 min.
95°C	?	40 min.
92,5°C	?	130 min.
75-80°C	150	∞
55°C	60	∞
37°C	24	∞
22°C	1	∞

Další termostabilní DNA polymerázy

DNA Poly	poločas aktivity	
	95°C	100°C
Taq	0,7 h	1 min.
Vent	6,7 h	1,8 h
Pfu	23 h	8 h

Vent = Tli, Pfu = Deep Vent



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - polymerázy

DNA dependentní DNA polymerázy

Taq DNA polymeráza (Taq DNAP)

Použití:

- PCR
- Sekvenování. Vysoká procesivita, syntéza při vyšší teplotě, kdy jsou rozpleteny sek. struktury templátu a dobrá inkorporace modifikovaných nukleotidů jsou vlastnosti pro sekvenování velmi výhodné. Dělá ale chyby.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - polymerázy

DNA dependentní DNA polymerázy

- Vzhledem k obrovskému rozšíření PCR metod je snaha nahradit Taq DNAP dalšími enzymy. Snaha je především najít polymerázy s ještě vyšší teplotní stabilitou a s korekturní aktivitou. Dnes je jich dostání celá řada, ale většinou mají zase velmi nízkou procesivitu, nebo jiný nedostatek. Je také pravda, že in vitro korekturní aktivita nevede k nějakému dramatickému snížení frekvence chyb; jen asi 20x.



DNA dependentní DNA polymerázy

- **Tli DNA polymeráza** z archeota *Thermococcus litoralis*, který žije v pramenech 98°C horkých. Polymeráza má korekturní aktivitu 3'-5' a je teplotně stálejší než Taq DNAP. NEB ji prodává pod názvem "**VENT polymeráza**".
- DNAP z druhů rodu *Pyrococcus* (**Pfu, Pwo, Deep Vent**) jsou asi teplotně nejstabilnější a mají korekturní aktivitu. Baktérie žijí na mořském dně blízko horkých pramenů, často teplejších než 100°C.
- **Tth DNA polymeráza** z *Thermus thermophilus* nemá žádnou exonukleázovou aktivitu, ale v přítomnosti Mn²⁺ iontů značnou reversně transkriptázovou akt., tedy schopnost syntetizovat DNA i podle RNA templátu. Dá se výhodně použít pro syntézu cDNA, bezprostředně následovanou PCR amplifikací produktu.



RNA dependentní DNA polymerázy

Reversní transkriptáza z retrovirů (RT)

- Její objev v r. 1970 byl velkou senzací, protože zpochybňoval centrální dogma molekulární biologie, že genetická informace se přenáší vždy ve směru DNA→RNA→proteiny. Dnes se ví, že enzymy s podobnou aktivitou se vyskytují nejen u ptačích a živočišných retrovirů, kde byly původně objeveny. Umožňují kopírovat RNA na DNA, nazývanou obvykle cDNA (copy DNA). Komerčně dostupné jsou dva preparáty reversní transkriptázy (RT): enzym izolovaný z partikulí viru ptačí myeloblastózy (AMV) a enzym z v *E. coli* klonovaného genu pro RT z viru Moloneyovy myší leukemie (MMLV), který se dnes používá více. Enzymy jsou navzájem velmi homologní, tvořené jedním polypeptidickým řetězcem 50 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 - polymerázy

RNA dependentní DNA polymerázy

Reversní transkriptáza z retrovirů (RT)

- RT se zdá být hodně primitivní DNA polymerázou. Je nápadně polyfunkční, schopná syntetizovat DNA nejen podle RNA, ale i podle DNA templátu a navíc má RNázaH aktivitu, někdy i jinou endonukleázovou akt. Nemá korekturní aktivitu a je mimořádně pomalá (asi 5b/s); navíc se při průměrné procesivitě často zastavuje, zřejmě v místě sek. struktur templátu. Asi pro svou pomalost nedělá zase tolik chyb - asi jednu na 30 000b.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - polymerázy

RNA dependentní DNA polymerázy

Reversní transkriptáza z retrovirů (RT)

Použití:

- Používá se především pro syntézu 1. řetězce cDNA podle RNA. Syntéza cDNA je jednou z nejdůležitějších procedur v molekulární biologii; umožňuje manipulaci (klonování a další úpravy) s produkty transkripce a tím vlastně s funkčními součástmi genomu. Oproti genomovým fragmentům DNA se zde zbavíme nadbytku nefunkční DNA a navíc snadno získáme přímo celé geny (ovšem bez intronů) a nikoli fragmenty nesoucí těžko identifikovatelné části genů.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - polymerázy

RNA dependentní DNA polymerázy

Reversní transkriptáza z retrovirů (RT)

Použití:

- Jako primer se užívá buď polydT (máme-li vyisolovanou polyA mRNA), nebo směs náhodných hexanukleotidů, nebo i specifické oligonukleotidy, pokud chceme cDNA jen k nějakému konkrétnímu genu a máme nějakou informaci o sekvenci. Pro označení 1. řetězce DNA můžeme přidat 100 μ Ci jednoho radioaktivního dXTP (není nutné, nechceme-li kontrolovat syntézu 1. řetězce na elfo).



RNA dependentní DNA polymerázy

Reversní transkriptáza z retrovirů (RT)

Použití:

- *Má-li mít reakce smysl, musí syntéza proběhnout od konce RNA až po její začátek, abychom získali celý gen a to bývá často problém. Samozřejmě velmi vadí jakákoli RNázová aktivita, likvidující templát. Existují podrobné návody, jak se odolných RNáz zbavit; nejlepší je mít všechno nádobí na jedno použití a sterilizované, roztoky i vodu speciálně upravené a RNázový inhibitor v kritických roztocích. Vadí ale i RNázaH aktivita samotné RT, která je in vivo nutná pro tvorbu primerů 2. řetězce. In vitro často odštěpí templát od primeru dříve, než syntéza začne, nebo odštěpí templát během syntézy tak blízko syntetickému a.c., že způsobí odpadnutí enzymu od templátu. Proto byl genetickou manipulací gen pro MMLV RT modifikován tak, že tuto aktivitu ztratil a příslušná RT H- se také prodává. I s ní ale bývá sotva 50% molekul RNA překopírováno do cDNA a mnoho řetězců bývá neúplných.*



RNA dependentní DNA polymerázy

Jiné reversní transkriptázy

- Některé problematické vlastnosti retrovirové RT vedly k hledání jiných reversně transkriptázových aktivit. Byla už zmíněna RT aktivita termostabilní **Tth DNA polymerázy**, která ale umožňuje syntetizovat jen kratší cDNA (do 1kb) a její manganaté ionty způsobují chyby při následné amplifikaci. V poslední době je inserován jako nejlepší RT **Klenowův fragment z DNA polymerázy Carboxydothemus hydrogenoformans** (zřejmě analog DNAP I), který pracuje při 60-70°C, navíc v pufru s DMSO, takže jsou všechny sek. struktury templátu rozpletené. Má korekturní aktivitu a potřebuje Mg²⁺ ionty, takže je možná i následná amplifikace.
- Z toho důvodu se stále uplatňuje i **AMV RT**, která má vyšší teplotní optimum (42°C) než **MMLV RT**.



Netemplátové DNA polymerázy

Terminální deoxyribonukleotidyl transferáza (TdT)

- Zajímavá DNA polymeráza, která nepotřebuje templát. Přidává jakékoli deoxyribonukleotid trifosfáty k volnému 3'-OH konci DNA. V malé míře je schopna syntetizovat i RNA. Je známa pouze z prekursorů B- a T-lymfocytů, kde zvyšuje diversitu imunoglobulinových genů přidáváním náhodných tzv. N- nukleotidů do míst, kde se exony těchto genů spojují. Isoluje se z telecího brzlíku.
- In vivo je to jeden polypeptidový řetězec o asi 60 kDa se značnými homologiemi s eukaryotní DNA polymerázou ale při izolaci se rozpadá na fragmenty, z nichž dva (8kDa a 24kDa) tvoří komerční preparát (kupodivu několikrát aktivnější než nedegradovaná forma).



Netemplátové DNA polymerázy

Terminální deoxyribonukleotidyl transferáza (TdT)

Použití:

- V nejpůvodnějších klonovacích procedurách bylo velmi oblíbené tzv. "homopolymeric tailing" (1973), tj. přisyntetizování neurčitě dlouhých úseků polyG resp. polyC k fragmentům DNA, které se pak spojovaly do hybridních genomů schopných transformace do bakterií i bez ligace.
- Syntéza modelových homopolymerů NA (od jednořetězcového primeru)
- Značení 3' konců DNA. Inkorporace dCT32P bývá 50%. Použijeme-li značený terminační nukleotid (např. 32P kordycepin trifosfát), dostaneme na každém konci jeden označený atom



DNA dependentní RNA polymerázy

- To jsou v podstatě **transkripční enzymy**. U bakterií se skládají z 5ti subjednotek, z nichž jedna (tzv. σ -faktor), je zodpovědná za nalezení promotorové sekvence, kde rozpletení dvoušroubovice a syntéza RNA začínají. Tato RNA polymeráza ale není příliš vhodná pro in vitro použití, protože se těžko izoluje, má in vitro malou procesivitu (syntetizuje max. 100-500b a z jiného místa než z promotoru začít nemůže) a často iniciuje od nespecifických sekvencí.
- Eukaryotní RNA polymerázy jsou ještě daleko složitější, z více než 10ti subj. a nemají pravou sekvenci specifitu, protože promotory vyhledávají pomocí rozmanitých proteinových faktorů.



DNA dependentní RNA polymerázy

Bakteriofágové RNA polymerázy

- Několik málo dsDNA bakteriofágů nevyužívá buněčnou RNAP pro svoji transkripci, ale syntetizují si vlastní RNAP, vysoce specifickou na fágové promotory. Tyto RNAP jsou ideální pro in vitro syntézu RNA komplementární k templátové DNA. Používají se tři, z bakteriofágů **T3**, **T7** a **SP6** a jejich vlastnosti jsou podobné.
- Jsou vysoce specifické na dlouhou promotorovou sekvenci asi 20ti basí (samozřejmě je pro každý enzym jiná) a od ní syntetizují RNA in vitro velmi rychle a s vysokou procesivitou (jedna molekula i několik tisíc basí). Tvoří je jeden polypeptidický řetězec 90-110 kDa a snadno se izolují z baktérií *E. coli* (T3 a T7) nebo *Salmonella typhimurium* (SP6), infikovaných fágem. Dnes se ovšem vyrábějí pomocí klonovaných genů.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - polymerázy

DNA dependentní RNA polymerázy

Bakteriofágové RNA polymerázy

Použití:

- Pro přípravu značených prob nejvyšší kvality. Fragment DNA, k němuž chceme připravit RNA probu, naklonujeme do plasmidového vektoru, který má před klonovacím místem sekvenci fágového promotoru. Za klonovaným genem plasmid rozštěpíme (linearizujeme) enzymem, který nedělá 3' kohesivní konce a s plasmidovou DNA provedeme výše uvedenou reakci ve zkumavce, ale obvykle stačí objem jen 10 μ l, protože výtěžek je obrovský - opakovanou transkripcí se fragment amplifikuje.

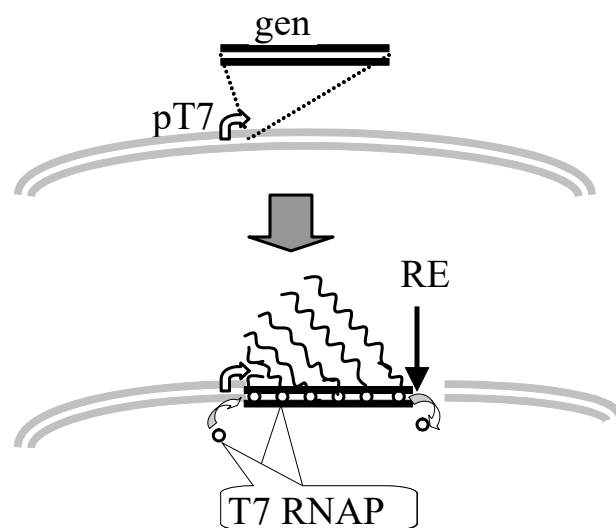


DNA dependentní RNA polymerázy

Bakteriofágové RNA polymerázy

Použití:

- Pro přípravu značených prob nejvyšší kvality.



Isotop	poločas	záření max. keV
^{32}P	14,3 dní	1 710
^{33}P	25,4 dní	
^{35}S	87,4 dní	167
^3H	12,4 let	18
^{14}C	5730 let	156



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - polymerázy

DNA dependentní RNA polymerázy

Bakteriofágové RNA polymerázy

Použití:

- Protože vznikají proby od začátku genu nakonec nebo o něco dále, mohou se kromě normální detekce použít i pro mapování rozsahu transkriptu, kódujících částí, alternativních sestřihů apod. Proba se hybridizuje s čerstvě izolovanou mRNA, jednořetězcové úseky se odstěpí směsí RNáz a na denaturačním gelu nám velikost značeného úseku umožní identifikovat přesně 5' a 3' konec různých typů mRNA. Podobně s DNA genu zjistíme rozsah intronů.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - polymerázy

DNA dependentní RNA polymerázy

Bakteriofágové RNA polymerázy

Použití:

- Reakce se využívá i pro přípravu neznačené RNA, např. pro studium splicingu nebo translace in vitro nebo in vivo. Pracujeme-li s eukar. geny, je možno do reakční směsi přidat nasyntetizovaný analog čepičky $m^7G(5')ppp(5')G$, který RNAP často použijí jako "primer" a tak vzniká translatovatelná a stabilnější mRNA.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii - polymerázy

RNA dependentní RNA polymerázy

- Mnoho takových polymeráz se vyskytuje u RNA virů (nikoli retrovirů) jako replikační enzymy.
- Jsou velmi variabilní a mají mnoho pozoruhodných vlastností: v něčem se blíží DNA polymerázám (např. mnohé potřebují primer, na rozdíl od všech ostatních RNA polymeráz), mívají složitou subjednotkovou strukturu a díky tomu mohou mít mnoho dalších aktivit: syntetizují čepičku, netemplátově polyA apod.).
- Jejich využití in vitro je ale zřejmě problematické a komerčně se nevyrábějí.



Netemplátové RNA polymerázy

- Jediný komerční enzym je **polyA polymeráza** (PAP) z *E. coli* B nebo z kvasinek, která *in vivo* přidává polyA konce syntetizované z ATP jako monomeru, k 3' -OH transkriptů (u bakterií jen k některým).

Použití:

- Pro připojení polyA konce k RNA, která ho nemá, např. chceme-li syntetizovat cDNA s poly(dT) primerem, nebo chceme-li studovat expresi genu po elektroporaci RNA do buněk.
- Má omezené použití pro značení izolované RNA (připojováním značeného ATP). Máme-li příslušnou DNA, je ovšem transkripce *in vitro* daleko lepší metodou, a i u izolované RNA dosáhneme lepšího označení syntézou cDNA pomocí RT (v r.s. se značeným nukleotidem).