



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

Biotechnologie rostlinných buněk

Enzymy v molekulární biologii - RE



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

Manipulace s nukleovými kyselinami

Základní manipulaci s nukleovými kyselinami umožňují 3 hlavní faktory:

- **enzymy** – zásahy do struktury DNA a RNA
- **vektory** – klonování fragmentů DNA a RNA
- **hybridizace nukleových kyselin** – identifikace specifických sekvencí



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

- Enzymy jsou základním „pracovní nástrojem“ molekulární biologie, umožňují provádět celou řadu přesně cílených manipulací
- Enzymy jsou proteiny, které katalyzují chemické procesy v živých organismech, určují povahu i rychlost reakcí, harmonizují chemické procesy. Enzymové reakce závisí na koncentraci substrátu, teplotě, pH, přítomnosti aktivátorů a inhibitorů.
- Výhody enzymů:
 - vysoká specifita reakcí
 - možnost pracovat s minimálním množstvím substrátu



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

Klasifikace enzymů, jejichž substrátem jsou nukleové kyseliny:

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.



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

Klasifikace enzymů, jejichž substrátem jsou nukleové kyseliny:

Podle typu reakcí:

- enzymy anabolické – syntetizující nukleové kyseliny (polymerázy)
- enzymy modifikující nukleové kyseliny (fosfatázy, metylázy, kinázy)
- enzymy spojující nukleotidové řetězce (ligázy)
- enzymy katabolické – odbourávající nukleové kyseliny (nukleázy)

Podle substrátové specifity se enzymy jednotlivých skupin dále dělí, např. na DNA-polymerázy, RNA-polymerázy apod.



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

- restrikční endonukleázy
- ostatní nukleázy (DNázy, RNázy, exonukleázy)
- DNA polymerázy
- RNA polymerázy
- ligázy, topoizomerázy
- proteázy, fosfatázy, polynukleotid kinázy



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii

Restrikční endonukleázy

- Restrikční endonukleázy jsou jedním z nejdůležitějším typem enzymů používaných v molekulární biologii, objev restrikčních endonukleáz v roce 1970 umožnil zásadní pokrok v manipulaci s DNA. Za objev RE získali v roce 1978 Werner Arber, Hamilton Smith a Daniel Nathans Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. První izolovanou RE byl enzym *HindII*.

objevitelé prvního RE - HindIII: H.O. Smith, K.W., Wilcox, T.J. Kelley, (Johns Hopkins Univ., 1968)

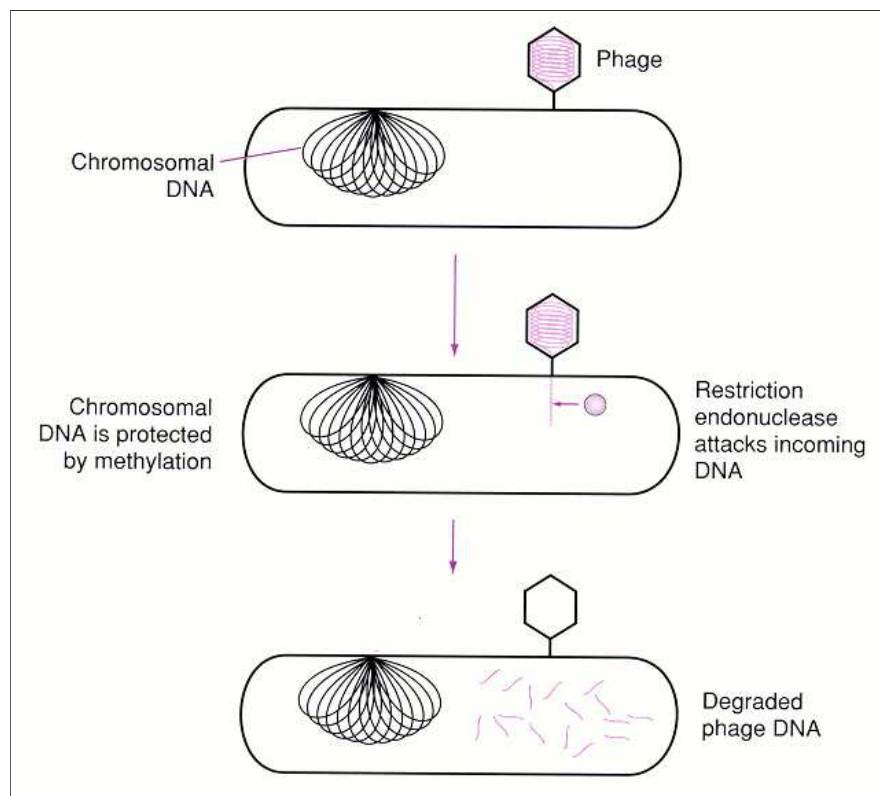


Restrikční endonukleázy

- endonukleázy izolované z bakterií
- spolu s metylázami představují jednoduché varianty imunitního systému: jejich úkolem je ochrana bakteriálních buněk před cizorodými molekulami DNA
- součást **restrikčně modifikačních systémů** bakterií
- omezují propagaci bakteriofágů (např. fág namnožený v jednom kmeni *E. coli* nemůže účinně infikovat jiný kmen *E. coli* protože fágová DNA je v druhém kmeni účinně degradována)
- DNA hostitelské buňky je před účinkem vlastní endonukleázy chráněna metylací



Restrikční endonukleázy





Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii

Restrikční endonukleázy

- **sekvenčně specifické endonukleázy**, produkované kmeny většiny bakteriálních druhů
- štěpí **oba** řetězce dvouřetězcové DNA
- většinou rozeznávají palindromy
- rozdělují se do 3-5 tříd



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii

Restrikční endonukleázy

Třídy RE:

- klasifikace založena na způsobu štěpení DNA, molekulové hmotnosti a požadavcích na kofaktory
- RE třídy I a III nesou v jediném proteinu aktivitu modifikační a restrikční
- v genovém inženýrství se téměř výhradně používají RE třídy II, které mají pouze aktivitu restrikční (restrikčně modifikační systém v *in vivo* buňce - RE třídy II a jí odpovídající metyláza)



Restrikční endonukleázy třídy I

- RE třídy I (*EcoK*, *EcoB*) - 1968
- heterotrimer
- vážou se na specifické nukleotidové sekvence
- katalyzují náhodné štěpení v místech vzdálených až několik tisíc pb od místa vazby
- molekulová hmotnost dosahuje cca 300.000
- zajišťují modifikaci (metylace - *HsdM*) i restrikci (*HsdR*) DNA
- *HsdS* – rozpoznávací funkce, DNA binding site
- vyžadují kofaktory ATP, Mg²⁺ a S-adenosylmetionin
- nevhodné pro analýzu sekvencí DNA nebo genové inženýrství



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii

Restrikční endonukleázy třídy III

- RE třídy III (*EcoP15*)
- heterodimer
- dva enzymy sdílející společnou podjednotku
- vážou se na specifické nukleotidové sekvence
- katalyzují náhodné štěpení v místech vzdálených 24-26 pb od místa vazby
- molekulová hmotnost dosahuje cca 300.000
- zajišťují modifikaci (metylace - *HsdM*) i restrikci (*HsdR*) DNA
- *HsdS* – rozpoznávací funkce, DNA binding site
- vyžadují kofaktory Mg^{2+} a S-adenosylmetionin
- nevhodné pro analýzu sekvencí DNA nebo genové inženýrství



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii

Restrikční endonukleázy třídy IV

- RE třídy IV
- štěpí modifikovanou DNA – metylované, hydroxymetylované a glukosyl-hydroxymetylované molekuly dsDNA



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii

Restrikční endonukleázy třídy V

- RE třídy V
- The cas9-gRNA complex from CRISPRs - utilize guide RNAs to target specific non-palindromic sequences found on invading organisms. They can cut DNA of variable length, provided that a suitable guide RNA is provided. The flexibility and ease of use of these enzymes make them promising for future genetic engineering applications.



Restrikční endonukleázy

- Restrikční endonukleázy typu II jsou spolu s příslušnými metylázami jednou ze složek ochrany bakterií před cizorodou DNA. Jsou velmi hojné; asi v každém třetím izolátu bakterií z prostředí je nějaká. Restriktázy i metylázy jsou obvykle tvořeny jedním polypeptidickým řetězcem, pracují nezávisle na sobě a samy vyhledávají cílovou sekvenci. Tou bývá symetrická (palindromická) sekvence 4 nebo 6ti basí, méně často i sekvence 5ti, 7mi nebo 8mi basí. Restriktázy vyhledávají cílovou sekvenci na DNA jako dimery z obráceně orientovaných jednotek. Význam palindromických cílových sekvencí je zřejmě v tom, že poskytují možnost oboustranného specifického kontaktu s dsDNA dimerizovanému enzymu, čímž se zvýší počet specifických interakcí i s krátkou sekvencí. Je ale možné, že určité palindromy nebo jiné sekvence vytvářejí na dvoušroubovici nějakou výraznou strukturu (ohyb apod.), která umožňuje rychlé nalezení sekvence a případně i další reakce.



Restrikční endonukleázy

- Restriktázy štěpí většinou nemetylované cílové sekvence a to uvnitř této sekvence nebo na jejích bezprostředních okrajích, přičemž fosfát zůstává na 5' konci; napřed štěpí jeden řetězec a potom symetricky druhý. Nepotřebují ATP.
- Metylázy metylují cílová místa na N6 adeninu nebo na C5 cytosinu jako monomery, tak že vždy přidají jen jednu metylovou skupinu a z DNA oddisociují (*in vivo* totiž normálně metylují jen jeden řetězec – nově syntetizovaný po replikaci). Druhá metylová skupina ovšem může být přidána při dalším navázání enzymu. Souvislost štěpení a metylace není vždy tak jednoznačná, jako u restrikčních systémů typu I; některé restriktázy štěpí i plně metylovaná cílová místa (podle specifity známých metyláz), většina metyláz příslušných k jednotlivým restriktázám ovšem není známá.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii

Restrikční endonukleázy

- Podobné restriktázy typu IIS štěpí nepalindromické (asymetrické) nepřerušené sekvence 4-7b, obvykle mimo tuto sekvenci, ale v určitém místě do vzdálenosti 20b (na jednu nebo druhou stranu), nebo nepalindromické přerušené sekvence, které podobným způsobem štěpí na obou stranách (vyštěpují je).
- Příslušné metylace provádějí v obou případech dva různé enzymy, každý pro jiný řetězec a každý také může metylovat jiné base.



Restrikční endonukleázy

- Využití restrikčních endonukleáz (RE) typu II v genovém inženýrství
- Tyto enzymy se na rozdíl od jiných nukleáz výborně hodí ke štěpení DNA *in vitro* ve zcela určitých místech. V čistotě vhodné pro praktické účely byly poprvé izolovány začátkem 70. let. a od té doby jich bylo izolováno z různých bakterií přes 3000 druhů s více než 200 sekvenčními specifitami. Umožňují rozštěpit dsDNA nejčastěji v sekvencích 4- a 6-ti basových palindromů, kterých je na DNA velmi mnoho. Restriktázy štěpící většinu krátkých palindromů a pár desítek dalších, štěpících nepalindromické sekvence, jsou dnes komerčně dostupné a staly se základním prostředkem manipulací s DNA *in vitro*.



Restrikční endonukleázy

- Využití restrikčních endonukleáz (RE) typu II v genovém inženýrství
- Tyto enzymy se na rozdíl od jiných nukleáz výborně hodí ke štěpení DNA *in vitro* ve zcela určitých místech. V čistotě vhodné pro praktické účely byly poprvé izolovány začátkem 70. let. a od té doby jich bylo izolováno z různých bakterií přes 3000 druhů s více než 200 sekvenčními specifitami. Umožňují rozštěpit dsDNA nejčastěji v sekvencích 4- a 6-ti basových palindromů, kterých je na DNA velmi mnoho. Restriktázy štěpící většinu krátkých palindromů a pár desítek dalších, štěpících nepalindromické sekvence, jsou dnes komerčně dostupné a staly se základním prostředkem manipulací s DNA *in vitro*.



Restrikční endonukleázy

- Názvy restriktáz jsou odvozeny z názvu bakterie, ze které byly izolovány; velkým písmenem je zaznamenán rod, dvěma malými druh, a římskou číslicí pořadí RE v tomto druhu: *SacII* je restriktáza ze *Streptomyces achromogenes*, která se eluuje z iontoměničového sloupce jako 2. v pořadí (některé bakterie mají více restriktáz typu II). Někdy je v názvu podchycen i speciální kmen, ze kterého se enzym dá získat, např. *Eco130I* z kmene *E. coli* RFL(sbírka) 130. Díky tomuto zavedenému označování se ovšem enzymy se stejným cílovým místem často jmenují jinak (tzv. isoschizomery), protože jsou vyisolovány z různých bakterií. První enzym s danou specifitou je někdy nazýván prototyp; nejstarší známé prototypy, jako *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *PstI* nebyly patentovány a proto je všechny firmy vyrábějí z původních osvědčených kmenů (resp. dnes častěji z klonovaných genů v *E. coli*).



Restrikční endonukleázy

- Velmi významný je způsob štěpení DNA různými REII enzymy. Část z nich vytváří tupé konce (např. při štěpení 6b palindromů za 3. basí cílové sekvence), které se všechny mohou navzájem spojit enzymem ligázou, tedy i když jde o fragmenty z různých genomů. Např. ze sekvence pro počátek replikace, ORF antibiotikové resistance a promotoru laktosového operonu můžeme ve zkumavce sestavit nové funkční genomy.
- Vzniknou-li jednořetězcové přečnívající konce (např. při štěpení za 1. nebo 2. basí 6b palindromu), je možno je převést na tupé konce vhodnými metodami, např. dosyntetizováním kratšího nebo odbouráním delšího řetězce. Ale přečnívající konce vytvořené tímž enzymem k sobě pasují (mají komplementární base), takže se fragmenty jimi spojují za nízké teploty (4°C; tzv. kohesivní konce) i bez ligázy a přídavek ligázy je pak spojí natrvalo asi 100x rychleji, nežli tupé konce - není tedy třeba je upravovat



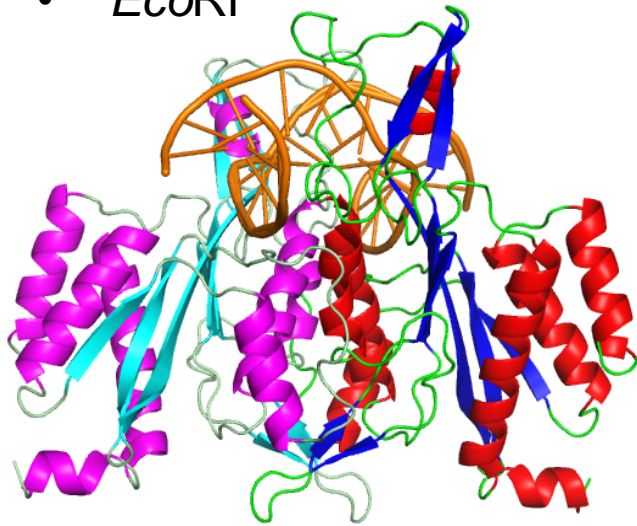
Restrikční endonukleázy třídy II

- homodimery
- vážou se na specifické (4-8 pb) sekvence nukleotidů
- katalyzují štěpení dvou řetězců molekuly DNA uvnitř vazebného místa nebo v jeho bezprostředním sousedství
- k štěpení dochází vždy ve stejném místě
- štěpení se podrobují všechna cílová místa v dané molekule DNA
- rozeznávací sekvence mají téměř vždy charakter obrácených opakování: stejná sekvence je štěpena ve stejném místě v obou řetězcích
- molekulová hmotnost: 20.000 - 100.000
- kofaktor: pouze Mg²⁺

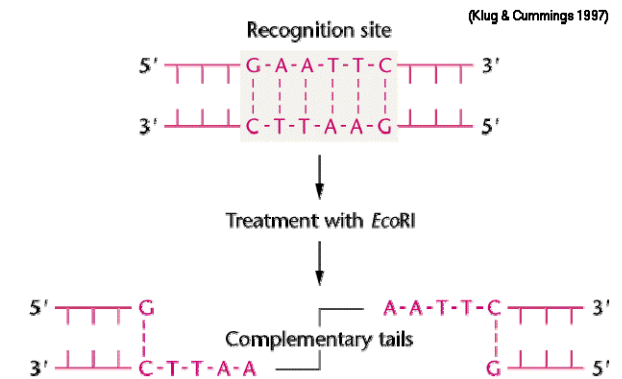
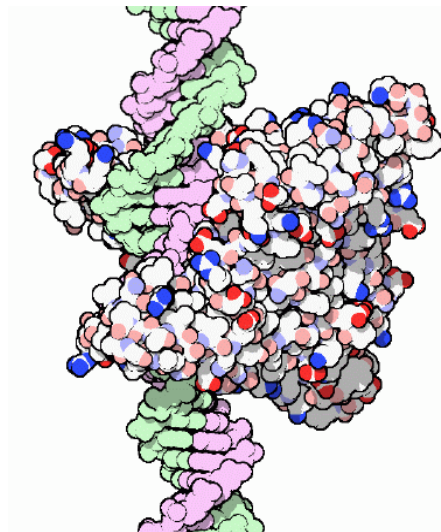


Restrikční endonukleázy třídy II

- *EcoRI*



G|AATTC
CTTAA|G





Restrikční endonukleázy třídy II

- *EcoRI*



Sequence specificity

EcoRI recognizes the sequence G/AATC and generates fragments with 5'-cohesive termini (1).

Compatible ends

EcoRI generates compatible ends to *Acs I* and *Mun I*.

Enzyme with compatible ends	Recognition sequence	New sequence if <i>EcoRI</i> is ligated to enzyme with compatible ends		Enzyme that can cut this new sequence
		<i>EcoRI</i> - Enzyme	Enzyme - <i>EcoRI</i>	
<i>Acs I</i>	(A,G)/AATT(C,T)	G/AATT(C,T)	(A,G)/AATTC	<i>Acs I</i> , <i>EcoRI</i>
<i>EcoRI</i>	G/AATC	G/AATC	G/AATC	<i>EcoRI</i> + <i>Rsr I</i>
<i>Mun I</i>	C/AATTG	G/AATTG	C/AATTC	<i>Tsp EI</i>

Isoschizomers

EcoRI is an isoschizomer to *Rsr I*.

Methylation sensitivity

EcoRI is inhibited by the presence of N⁶-methyladenine at either or both A residues, and by the presence of 5-methylcytosine as indicated (*).

Storage buffer

10 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM Dithioerythritol, 0.2% Triton X-100 (v/v), 50% Glycerol (v/v), pH approx. 7.2 (at 4°C).

Incubation buffer (10x, included)

SuRE/Cut Buffer **H**: 0.5 M Tris-HCl, 1 M NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTE, pH 7.5 (at 37°C).

Activity in SuRE/Cut Buffer System

Bold face printed buffer indicates the recommended buffer for optimal activity:

A	B	L	M	H
100%	100%	25-50%	50-75%	100%



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii

Restrikční endonukleázy třídy II

Názvosloví RE

- např. *EcoRI*
 1. písmeno: počáteční písmeno jména rodu produkční bakterie
 2. a 3. písmeno: první dvě písmena jména druhu bakterieoznačení kmene (serotypu) produkční bakterie (ne vždy)
římská číslice vyjadřuje pořadové číslo endonukleázy izolované z této bakterie



Restrikční endonukleázy třídy II

Izoschizomery

- různé RE, které mají stejné cílové sekvence (odlišní producenti, většinou stejná reakce)
- izoschizomery mohou mít odlišnou citlivost k metylovaným bazím v cílové sekvenci

Izokaudamery

- různé RE, které mají odlišné cílové sekvence, ale vytvářejí stejné lepidivé konce
- výhodné pro cílené spojování různých molekul DNA



Restrikční endonukleázy třídy II

Recognition Sequence	Enzyme
AA/CGTT	AclI
A/AGCTT	HindIII HindIII-HF®
AAT/IATT	SspI SspI-HF®
/AATT	MluCI
A/CATGT	PciI
A/CCGGT	AgeI AgeI-HF®
ACCTGC(4/8)	BspMI BfuAI
A/CCWGGT	SexAI
A/CGCGT	MluI MluI-HF®
ACGGC(12/14)	BceAI
A/CGT	HpyCH4IV
ACN/GT	HpyCH4III
(10/15)ACNNNNGTAYC(12/7)	BaeI
(9/12)ACNNNNCTCC(10/7)	BsaXI
A/CRYGT	AflIII
A/CTAGT	SpeI SpeI-HF®
ACTGG(1/-1)	BsrI
ACTGGG(5/4)	BmrI



Restrikční endonukleázy třídy II

Enzyme	Sequence	NEB Enzyme	Catalog Number	Cut Site	Other Isoschizomers
AanI	TTA/TAA	Psil	R0657	TTA/TAA	Psil
AarI	CACCTGC(4/8)				
AasI	GACNNNN/NGTC	DrdI	R0530	GACNNNN/NGTC	DrdI, DseDI
AatII	GACGT/C	AatII	R0117	GACGT/C	ZraI ^A
		ZraI ^A	R0659	GAC/GTC	
Aba6411II x	CRRTAAG				
AbaCIII x	CTATCAV				
AbaSI	C(11/9)	AbaSI	R0665	C(11/9)	
AbaUMB2I x	YCCGSS				
AbsI	CC/TCGAGG				
Acc16I	TGC/GCA	FspI	R0135	TGC/GCA	FspI, Nsbl
Acc36I	ACCTGC(4/8)	BfuAI	R0701	ACCTGC(4/8)	BfuAI, BspMI, BveI
		BspMI	R0502	ACCTGC(4/8)	
Acc65I	G/GTACC	Acc65I	R0599	G/GTACC	Asp718I, KpnI ^A , KpnI-HF ^A
		KpnI ^A §	R0142	GGTAC/C	
		KpnI-HF ^A	R3142	GGTAC/C	
Acc65V x	GACGCA				
AccB1I	G/GYRCC	BanI	R0118	G/GYRCC	BanI, BshNI, BspT107I



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii

Restrikční endonukleázy třídy II

Relaxovaná aktivita (uvolněná, “star“aktivita)

- schopnost RE štěpit kromě cílového místa také jiné příbuzné sekvence
- většinou za neoptimálních reakčních podmínek
- např. *EcoRI* může vedle sekvence GAATTC štěpit i sekvence GGATTC, GGATTT, AGATTT



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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



Biotechnologie rostlinných buněk
Enzymy v molekulární biologii

Restrikční endonukleázy třídy II

Relaxovaná aktivita (uvolněná, “star“aktivita)

- schopnost RE štěpit kromě cílového místa také jiné příbuzné sekvence

Jednotka aktivity restrikčního enzymu

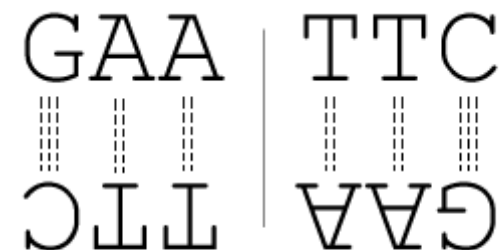
- množství RE, které zcela rozštěpí 1 mg DNA fága Lambda za 1 hodinu při optimální teplotě a v optimálním prostředí



Restrikční endonukleázy třídy II

Charakter cílových míst RE třídy II

- jsou rotačně (ne zrcadlově) symetrická
- orientace cílových míst je důležitá





Restrikční endonukleázy třídy II

Produkty štěpení restrikčních endonukleáz

- tupé („blunt“) konce (po štěpení obou řetězců ve stejném místě)
- ostré (lepivé, „sticky“, přečnívající, kohezivní) konce (po štěpení řetězců v místech obvykle vzdálených 1-4 nukleotidy)
 - - 5' přečnívající („overhang“)
 - - 3' přečnívající
- přečnívající kompatibilní konce usnadňují spojení různých fragmentů DNA
- spojování cizorodých fragmentů DNA – základ tvorby rekombinantních konstruktů



Restrikční endonukleázy třídy II

- *EcoRI*

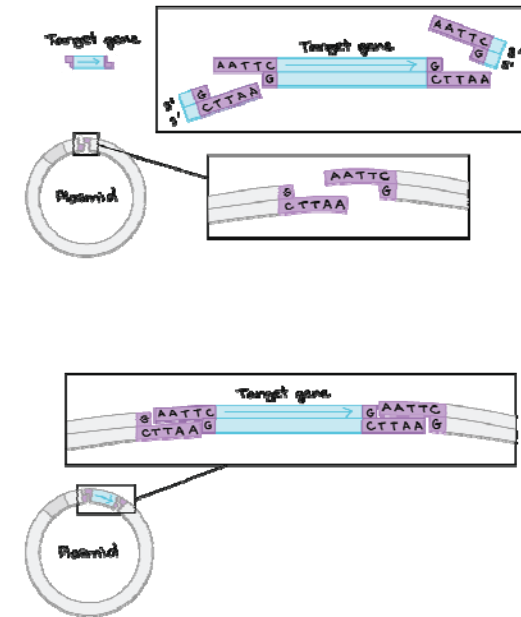
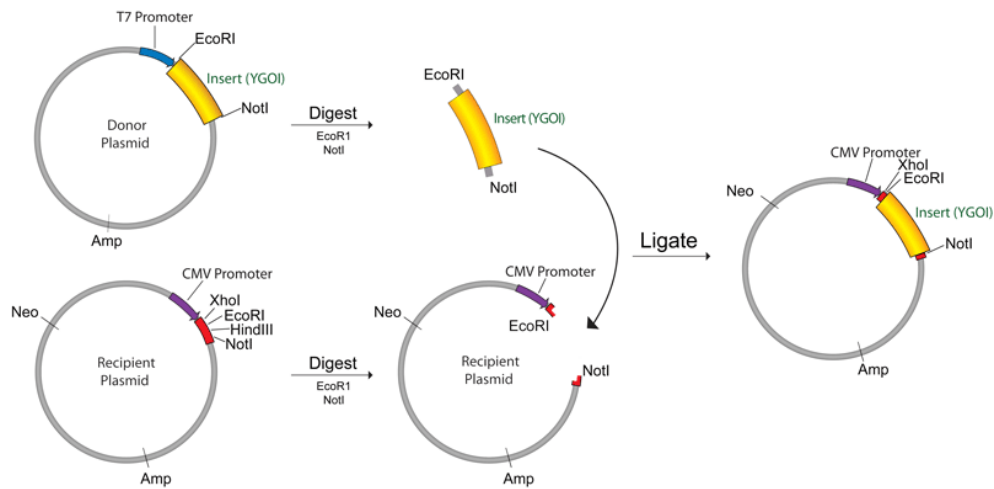


- *EcoRV*





Restrikční endonukleázy třídy II





Restrikční endonukleázy třídy II

Využití restrikčních endonukleáz

- štěpení DNA ve zcela konkrétních pozicích
- vytváření fragmentů DNA o přesně definované délce
- tyto fragmenty mohou být použity ke klonování, koncovému značení, konstrukci restrikčních map apod.
- polymorfismus délky restrikčních fragmentů - RFLP



Sickle Cell Anemia

	Normal RBC	Sickle RBC
RBC		
DNA		
mRNA		
AA	Glutamic acid HbA	Valine HbS

