

Практическая работа №6

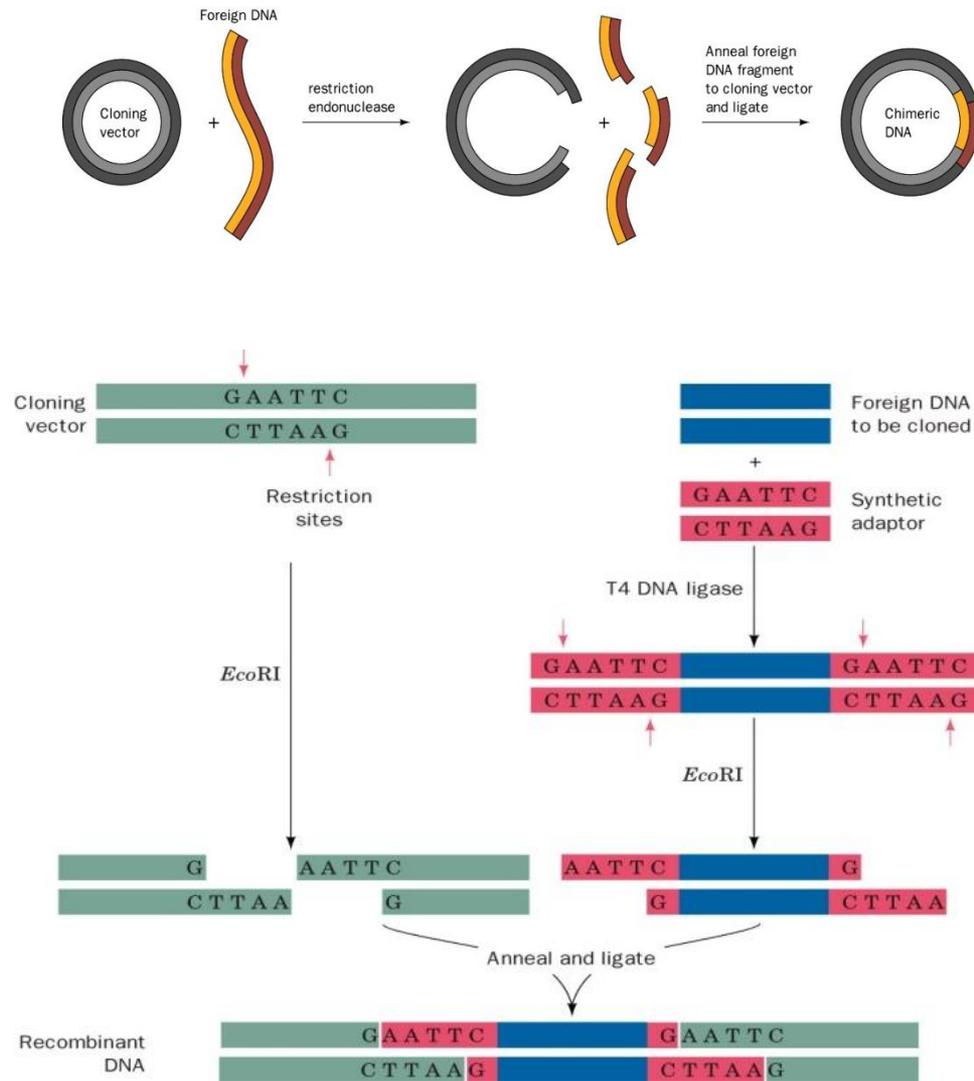
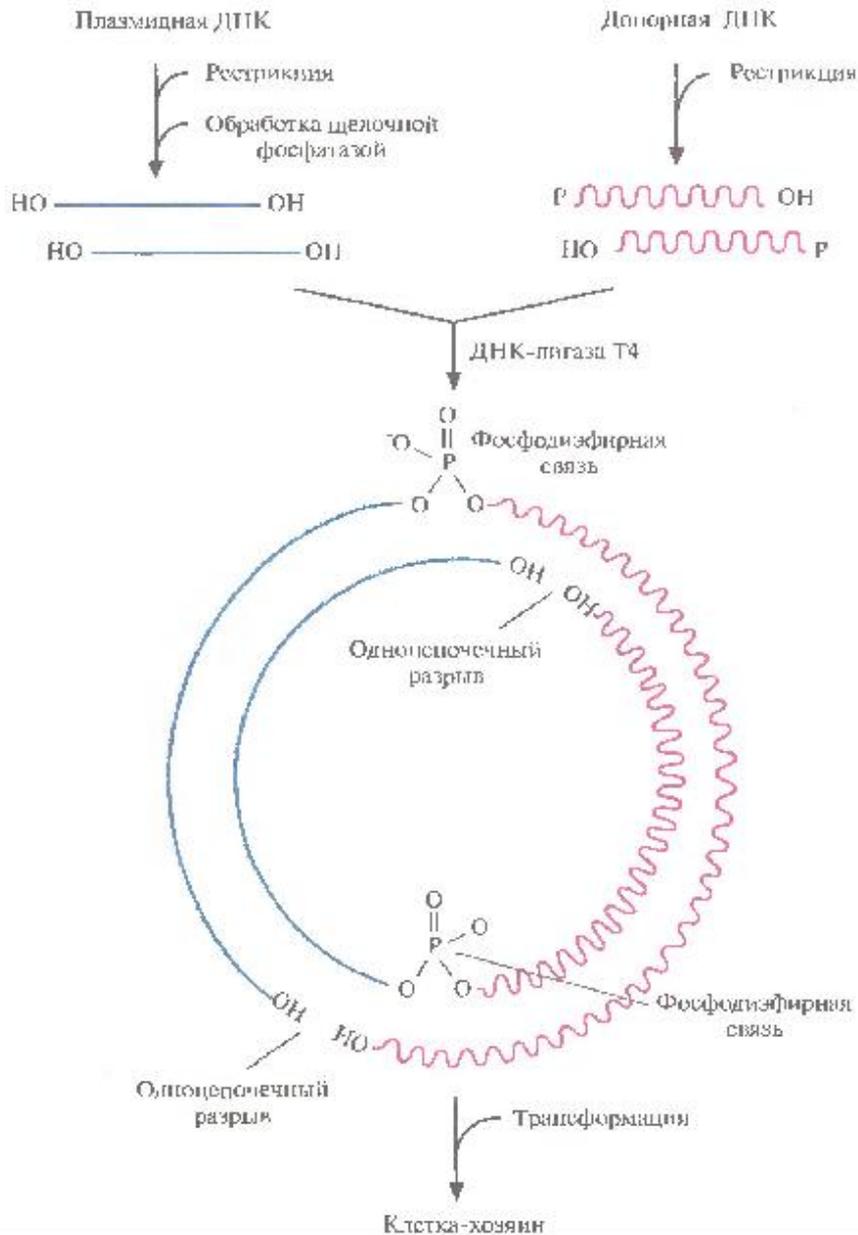
Эндонуклеазы рестрикции.

Лигирование.

Дефосфорилирование. Затупление

ЛИПКИХ КОНЦОВ

Рестриктазно-лигазный метод



Система рестрикции-модификации

1953 г. С. Лурия, Г. Бертани и Дж. Уэйгл – открытие системы R-M

Номенклатура эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз)

1. Род - первая буква – род, Вид - первые две или первая и любая другая (если уже занято)

Streptomyces albus - **Sal**, *Escherichia coli* - **Eco**

Haemophilus parainfluenzae - Hpa I

Haemophilus parahaemolyticus - Hph I.

2. Обозначение серотипа или номер музейного штамма

например, **Hind** (*Haemophilus influenzae*, серотип **D**).

Bsu1076 (*Bacillus subtilis* штамм 1076)

3. Порядковый номер обнаружения данной системы рестрикции-модификации у одного штамма (I, II, III)

Hind I, Hind II, Hind III

4. P, R (плазида или внехромосомный элемент)

EcoR - кодируется плазмидой R1, **EcoP** - кодируется фагом P1

5. Рестриктазы обозначают буквой R, метилазы – M

R.EcoB и **M.EcoB**.

RM.Eco57I – эндонуклеазная + метилтрансферазная активности в одном белке.

*N - ферменты, вносящие одноцепочечные разрывы в ДНК («nicking enzymes»).

Nt - инактивирована одна из субъединиц белка - вносит разрыв только в одной из цепей ДНК, t

(«top») соответствует гидролизу только «верхней» цепи участка узнавания,

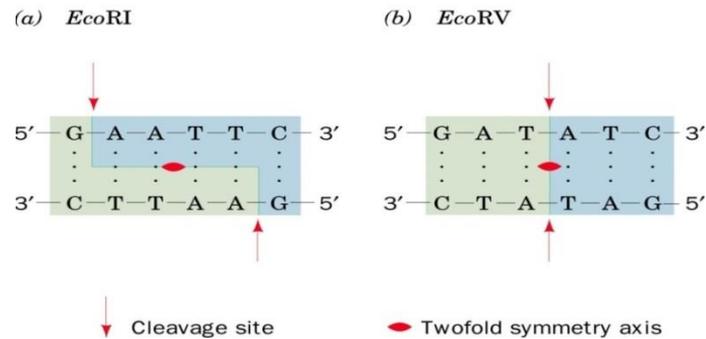
b («bottom») – «нижней»

Свойства рестриктаз Р-М систем разных классов

	Класс I	Класс II	Класс III
Распространенность	Реже, чем класс II	Наиболее распространенные	Редкие
Сайт узнавания	Ассиметричный из 2х участков (3-4 и 4-5 п.н.) разделенных спейсером (6-8 пн)	Сайт узнавания обычно палиндром (4-8 пн)	Ассиметричный сайт узнавания
Расщепление	Разрезают обе цепи в случайном месте на расстоянии более 1000 п.н. от сайта узнавания	Разрезают обе цепи специфическим образом внутри сайта узнавания	Разрезают на расстоянии 24-27 п.н. от сайта узнавания Для разрезания требуется 2 неметилированных сайта в противоположной ориентации
Структура белка	Мультифункциональный белок. Гетеродимер 3 субъединицы: эндонуклеаза, фермент узнавания, метилаза	2 отдельных фермента - гомодимера - эндонуклеаза и метилаза	Мультифункциональный белок. Гетероолигомер, 2 субъединицы: эндонуклеаза и метилаза
Кофакторы	АТФ, Mg ²⁺ , S-аденозилметионин (SAM)	Mg ²⁺	Mg ²⁺ (АТФ/SAM)
Пример сайта узнавания	SptSQI 5'-AAC(N) ₄ PuTAPyG-3'	BamHI 5'-G [^] GATCC-3'	PstII 5'-CTGATG(N) _{25-26/27-28} [^] -3'

*В классе II выделяют несколько подклассов (IIB, IIE, IIG, IIS, IIM, IIT), отличающихся некоторыми особенностями структуры, зависимости от кофакторов, структурой сайтов узнавания
 Класс IV – узнают модифицированную (метилированную) ДНК
 Класс V – CPISPRs – для узнавания сайта рестрикции используют gRNA

Класс II



Класс IIS

IIS – узнают ассиметричный сайт, разрезают ДНК в строго определенном месте не более чем на расстоянии 20 п.н. от сайта узнавания

Esp3I = BsmBI (пример изошизомеров)

- 5'-CGTCTCN[^]NNNNNNNNNN-3'
- 3'-GCAGAGNNNNNN[^]NNNNN-5'

Класс IIM

DpnI – узнает (5'-...Gm6ATC...-3') и гидролизует только метилированную ДНК

Метилирование

Работа рестриктаз может быть заблокирована метилированием ДНК

Непарные метилазы, не входят систему Р-М:

- *dam* метилирование: 5'-Gm6ATC-3' (N6 аденина)
- *dcm* метилирование: 5'- Cm5CAGG-3' и 5'- Cm5CTGG-3' (C5 цитозина)

Для генной инженерии используют штаммы *dam⁻ dcm⁻ E. coli*

Например: если ДНК выделена из штамм *dam⁺ E. coli*, то эта ДНК не будет разрезаться, например, рестриктазой MboI

У эукариот

- CpG метилирование (C5 цитозина)

Ферменты для рестриктазно-лигазного метода конструирования рекомбинантных ДНК

Лигаза – «сшивка» цепей ДНК.

Т4 лигаза – сшивает и липкие и тупые концы

Щелочная фосфатаза - дефосфорилирование

Затупление липких концов

Т4 ДНК-полимераза

Фрагмент Кленова (ДНК полимераза I E.coli)

Blunt ends (e.g. Afe I AGC/GCT)

5'-AGCTAGC-3'

3'-TCGATCG-5'

5'-overhangs (e.g. BamHI G/GATCC) "filled-in"

5'-AGCTAG-3'

3'-TCGATCCTAGG-5'

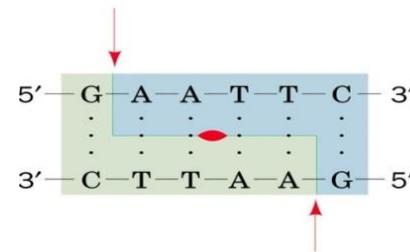
3'-overhangs (e.g. KpnI GGTAC/C) "chewed back"

5'-AGCTGGTAC-3'

3'-TCGAC-5'

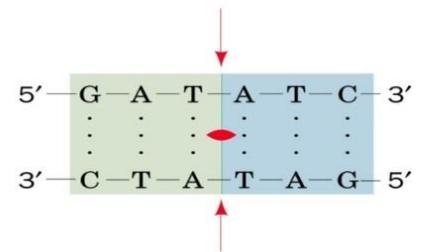
Pfu-полимераза – полировка 3'-концов ПЦР продуктов

(a) *EcoRI*



↓ Cleavage site

(b) *EcoRV*



● Twofold symmetry axis

- 1. Найти сиквенс плазмиды-вектора
- <https://www.addgene.org/vector-database/>
- 2. Найти рестриктазу, которая режет с образованием:
 - тупых концов
 - 5'-overhangs,
 - 3'-overhangs
- 3. Рестриктазу, дающую «красивый» набор фрагментов (~4 фрагмента разной длины)
- 4. Рестриктазу, имеющую уникальный сайт рестрикции, для клонирования в данный плазмидный вектор
- <http://heimanlab.com/cut2.html>
- <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

Vector	kan ^r amp ^r	T7loc T7	T7•Tag® His•Tag®	T7•Tag® S•Tag™	Trx•Tag™	HSV•Tag® KSI	Dsb•Tag™ PKA	Nus•Tag™ GST•Tag™	protease Strep•Tag® II	signal seq.
pET-3a-d	●	●		N						
pET-9a-d	●	●		N						
pET-11a-d	●	●		N						
pET-14b	●	●	N						T	
pET-15b	●	●	N						T	
pET-16b	●	●	N						X	
pET-17b	●	●		N						
pET-19b	●	●	N						E	
pET-20b(+)	●	●	C							●
pET-21a-d(+)	●	●	C	N						
pET-22b(+)	●	●	C							●
pET-23a-d(+)	●	●	C	N						
pET-24a-d(+)	●	●	C	N						
pET-25b(+)	●	●	C			C				●
pET-26b(+)	●	●	C							●
pET-27b(+)	●	●	C			C				●
pET-28a-c(+)	●	●	N,C	I					T	
pET-29a-c(+)	●	●	C		N				T	
pET-30a-c(+)	●	●	N,C	I					T, E	
pET-30 Ek/LIC	●	●	N,C	I					T, E	
pET-30 Xa/LIC	●	●	N,C	I					T, X	
pET-31b(+)	●	●	C			N				
pET-32a-c(+)	●	●	I,C	I	N				T, E	
pET-32 Ek/LIC	●	●	I,C	I	N				T, E	
pET-32 Xa/LIC	●	●	I,C	I	N				T, X	
pET-33b(+)	●	●	N,C	I			I		T	
pET-39b(+)	●	●	I,C	I			N		T, E	●
pET-40b(+)	●	●	I,C	I			N		T, E	●
pET-41a-c(+)	●	●	I,C	I				N	T, E	