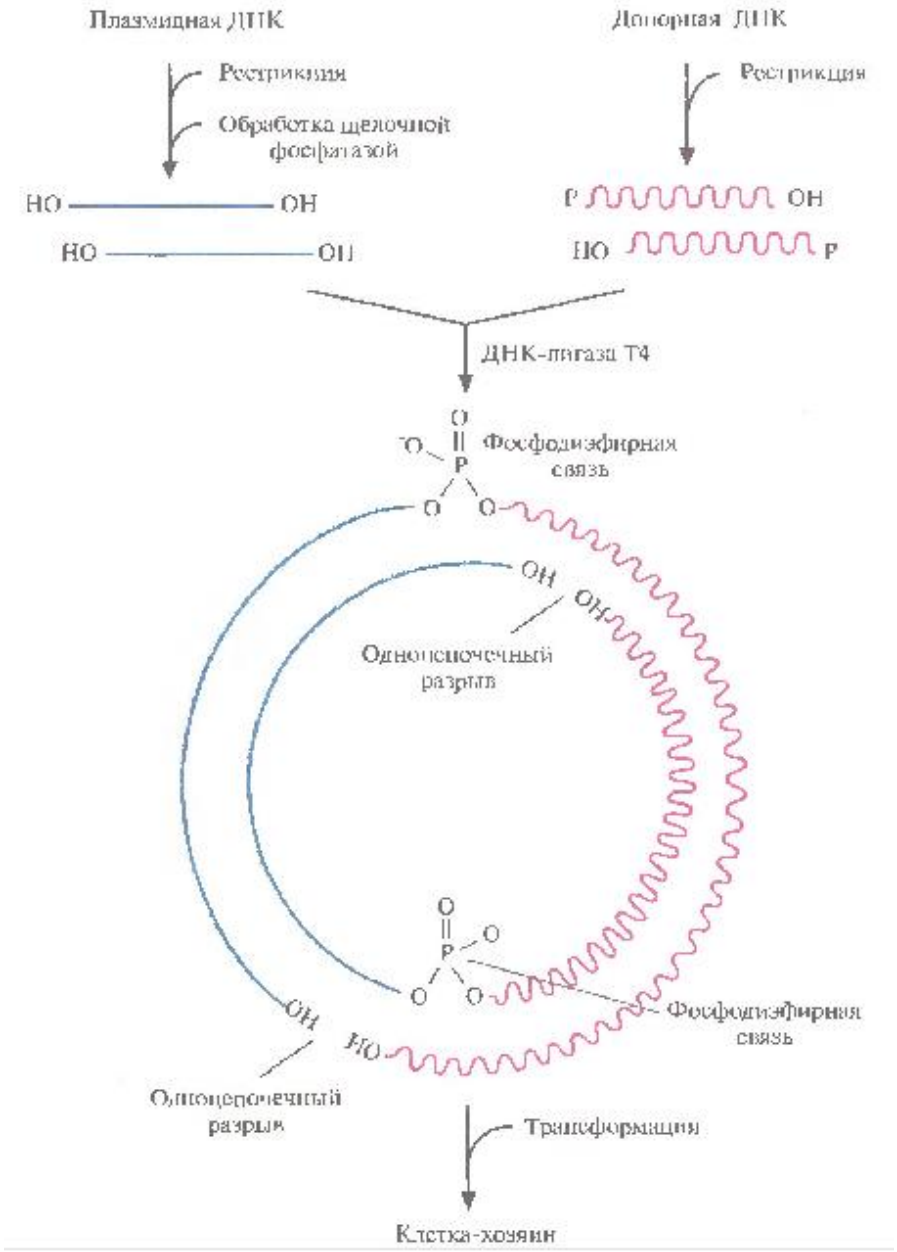
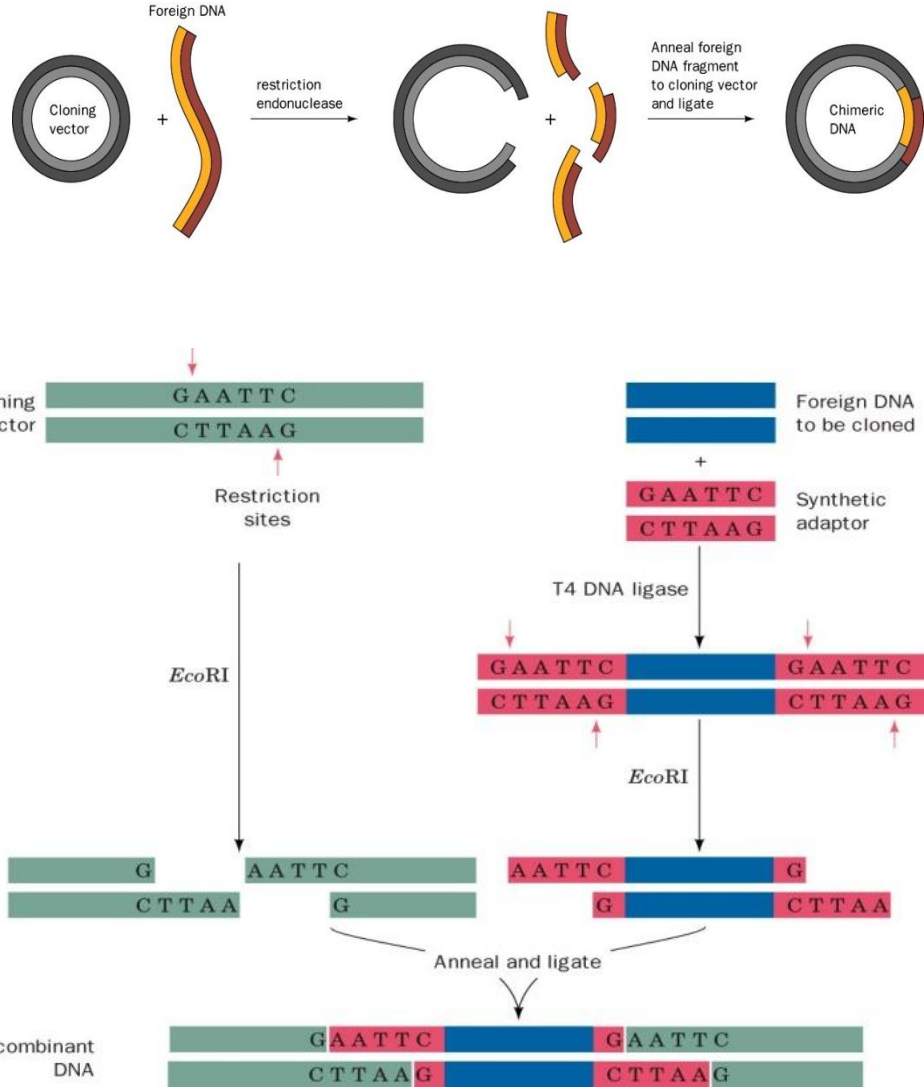
Практическая работа №6

Эндонуклеазы рестрикции. Лигирование. Дефосфорилирование. Затупление липких концов

Рестриктазно-лигазный метод





Система рестрикции-модификации

1953 г. С. Луриа, Г. Бертани и Дж. Уэйгл – открытие системы Р-М

Номенклатура эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз)

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

***S**treptomyces **al**bus* - **Sal**, ***E**scherichia **co**li* - **Eco**

***H**aemophilus **pa**rainfluenzae* - Hpa I

***H**aemophilus **p**ara**h**aemolyticus* - 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 (плазмида 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

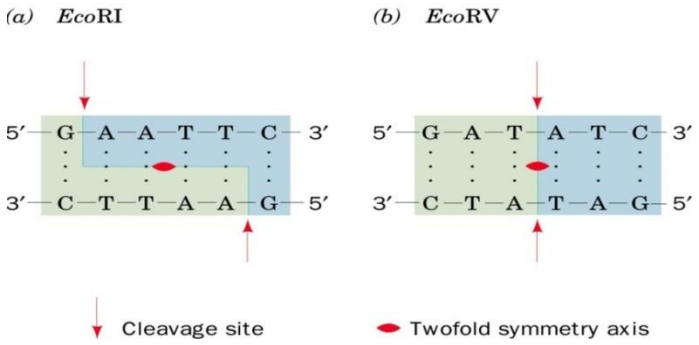
	Класс I	Класс II	Класс III
Распространенность	Реже, чем класс II	Наиболее распространенные	Редкие
Сайт узнавания	Ассиметричный из 2х участков (3-4 и 4-5 п.н.) разделенных спейсером (6-8 пн)	Сайт узнавания обычно палиндром (4-8 пн)	Ассиметричный сайт узнавания
Расщепление	Разрезают обе цепи в случайном 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
Кофаторы	ATP, Mg2+, S-аденозилметионин (SAM)	Mg2+	Mg2+ (ATP/SAM)
Пример сайта узнавания	SptSQI 5’-AAC$(N)_4$PuTAPyG-3’	BamHI 5’-G^GATCC-3’	PstII 5’-CTGATG$(N)_{25\text{-}26/27\text{-}28}$^-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^NNNNNNNNNNN-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 P-M:

- 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

<u>У эукариот</u>

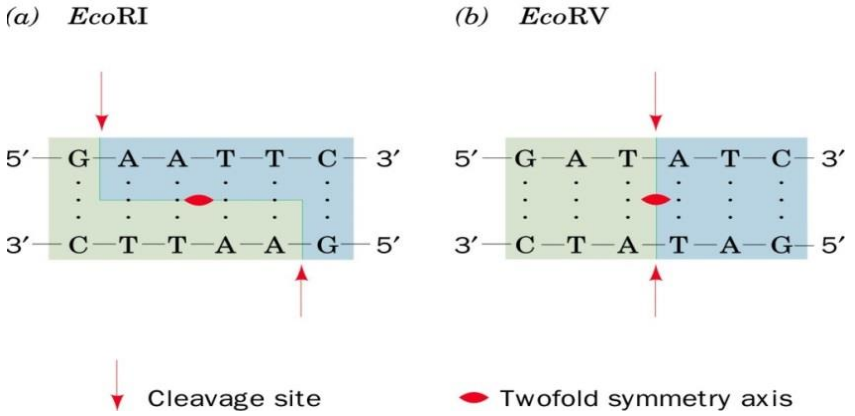
- CpG метилирование (C5 цитозина)

Ферменты для рестриктазно-лигазного метода конструирования рекомбинантных ДНК

Лигаза – «сшивка» цепей ДНК.
Т4 лигаза – сшивает и липеи и тупые концы

Щелочная фосфатаза - дефосфорилирование

Затупление липких концов
Т4 ДНК-полимераза
Фрагмент Кленова (ДНК полимразы 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

- 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 длинны)

4. Рестриктазу, имеющую уникальный сайт рестиркции, для клонирования в данный плзмидный вектор

- http://heimanlab.com/cut2.html
- http://tools.neb.com/NEBcutter2/

Vector	amp^R	kan^R	T7	T7*lac*	His•Tag®	T7•Tag®	S•Tag™	Trx•Tag™	KSI	HSV•Tag®	PKA	Dsb•Tag™	GST•Tag™	Nus•Tag™	Strep•Tag® II	protease	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	