**Тема: Рестрикционный анализ ДНК.**

**Основные вопросы, выносимые на обсуждение семинара.**

1. Классификация эндонуклеаз рестрикции.
2. Сайты рестрикции.
3. Изошизомеры.
4. Искусственные рестриктазы.

**Краткое содержание занятия:**

Эндонуклеазы рестрикции, рестриктазы (от лат. restrictio — ограничение) — группа ферментов, относящихся к классу гидролаз, катализирующих реакцию гидролиза нуклеиновых кислот.

В отличие от экзонуклеаз, рестриктазы расщепляют нуклеиновые кислоты не с конца молекулы, а в середине. При этом каждая рестриктаза узнаёт определённый участок ДНК длиной от четырёх пар нуклеотидов и расщепляет нуклеотидную цепь внутри участка узнавания или вне его.

Защита бактериального генома от собственной рестриктазы осуществляется с помощью метилирования нуклеотидных остатков аденина и цитозина (маскированием).

Выделяют три основных типа (или класса) ферментов рестрикции, сайты узнавания для которых могут быть симметричными (палиндромными) и несимметричными:

Рестриктазы первого типа (например, ЕсоК из *Escherichia coli* К12) узнают определённую последовательность нуклеотидов и разрезают двухцепочную молекулу ДНК неподалёку от этой последовательности в произвольной точке и само место разреза не строго специально (по-видимому, после образования комплекса с ДНК фермент неспецифически взаимодействует с удалённой областью ДНК или передвигается вдоль цепи ДНК).

Рестриктазы второго типа (например, EcoRI) узнают определённую последовательность и разрезают двойную спираль ДНК в определённой фиксированной точке внутри этой последовательности. Рестриктазы этого типа узнают палиндромные последовательности, которые обладают центральной осью и считываются одинаково в обе стороны от оси симметрии.

Рестриктазы третьего промежуточного типа (например, EcoPI) узнают нужную последовательность и разрезают двухцепочную молекулу ДНК, отступив определённое число нуклеотидных пар от её конца (или в нескольких точках на разном удалении от сайта узнавания). При этом образуются фрагменты ДНК либо с ровными (тупыми) концами, либо с выступающими (липкими) 5'- или 3'-концами. Эти рестриктазы узнают асимметричные сайты.

К 2007 году выделено более трёх тысяч эндонуклеаз рестрикции. Более шестисот рестриктаз доступны в виде коммерческих препаратов и повседневно используются в лабораториях для модификации ДНК и решения генно-инженерных задач.

Изошизомеры – это пары эндонуклеаз рестрикции, имеющих специфичность к распознаванию одинаковых последовательностей, но иногда отличающихся по наличию метилированных нуклеотидных остатков, и разрезающих эти последовательности в одинаковых местах. Например, изошизомерами являются рестриктазы Sph I (CGTAC^G) и Bbu I (CGTAC^G). Первый выделенный фермент для узнавания и специфического разрезания заданной последовательности, называют прототипом, а все остальные подобные рестриктазы называют изошизомерами.

Изошизомеры выделяют из разных штаммов бактерий и поэтому разные изошизомеры могут требовать разных условий реакции.

Фермент, узнающий такую же последовательность, но разрезающий её по-другому, называют гетерошизомером (неошизомером). Изошизомеры, таким образом, являются частным случаем гетерошизомеров. Например, рестриктазы Sma I (GGG^CCC) и Xma I (G^GGCCC) являются гетерошизомерами, но не изошизомерами друг для друга.

Рестриктазы, распознающие совершенно разные последовательности, но образующие одинаковые концы, называют изокаудомерами.

В генной инженерии широко используются искусственные рестриктазы, получаемые путем слияния ДНК-связывающего домена цинкового пальца с ДНК-разрезающим доменом нуклеазы. Домен цинкового пальца может быть спроектирован так чтобы узнавать и связываться с желаемой последовательностью ДНК. Альтернативой нуклеазам с цинковым пальцем являются искусственные ферменты рестрикции TALEN получаемые путем слияния ДНК-связывающего домена TAL эффектора с доменом расщепления ДНК.

