Лекция: **Рестрикционный анализ**

Слайд 2

Рестриктазы ( рестрицирующие эндонуклеазы, эндонуклеазы рестрикции) - это ферменты, узнающие и атакующие определенные последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК (сайты рестрикции ). Эндонуклеазы рестрикции, рестриктазы (от лат. restrictio — ограничение) — группа ферментов, относящихся к классу гидролаз, катализирующих реакцию гидролиза нуклеиновых кислот.

Слайд 3

Сайт рестрикции ( restriction site ) [англ. site — участок, местоположение; лат. restrictio — ограничение] — короткая нуклеотидная последовательность в молекуле ДНК (обычно 4—8 п.н.), узнаваемая рестриктазой, которая определяет место расщепления данным ферментом;

Слайд 4: История открытия

Еще в 1953 году было обнаружено, что ДНК определенного штамма E. coli, введенная в клетки другого штамма (например, ДНК штамма В - в клетки штамма С) не проявляет, как правило, генетической активности, так как быстро расщепляется на мелкие фрагменты. В 1966 году было показано, что это явление связано со специфической модификацией хозяйской ДНК - она содержит несколько метилированных оснований, отсутствующих в немодифицированной ДНК, причем метилирование (добавление к основанию метильной группы) происходит уже после завершения репликации. Бактерия способна отличить свою собственную ДНК от любой вторгающейся «чужеродной» именно по типу ее модификации. За «метку» отвечают метилирующие ферменты модификации, так называемые ДНК- метилазы. Различие в модификации делает чужеродную ДНК чувствительной к действию рестрицирующих ферментов, которые узнают отсутствие метильных групп в соответствующих сайтах.

Слайд 5

Рестриктаза, которая расщепляла неметилированную ДНК была выделена в 1968 г. Мезельсоном и Юанем. Этот фермент был высокоспецифичен по отношению к определенной последовательности ДНК, но расщеплял молекулы неспецифически, в другом месте, на некотором удалении от участка узнавания. Вскоре, в 1970 г. Смит и Вилькокс выделили из Haemophilus influenzae первую рестриктазу, которая расщепляла строго определенную последовательность ДНК ( Hind III). Поскольку разные бактерии по-разному метят свою ДНК, то и рестриктазы должны узнавать разные последовательности. И действительно, с тех пор выделены рестриктазы, узнающие более 150 сайтов рестрикции (мест расщепления ДНК ).

Слайд 6: Функция рестриктаз

Защита бактериального генома от собственной рестриктазы осуществляется с помощью метилирования нуклеотидных остатков аденина и цитозина (маскированием ). Системы рестрикции и модификации широко распространены у бактерий; их существование играет важную роль в защите резидентной ДНК от загрязнения последовательностями чужеродного происхождения.

Слайд 7

Большинство рестриктаз класса 2 узнают последовательности, содержащие от 4 до 6 нуклеотидных пар, поэтому рестриктазы делят на мелко- и крупнощепящие. Мелкощепящие рестриктазы узнают тетрануклеотид и вносят в молекулы гораздо больше разрывов, чем крупнощепящие, узнающие последовательность из шести нуклеотидных пар. Это связано с тем, что вероятность встречаемости определенной последовательности из четырех нуклеотидов гораздо выше, чем последовательности из шести нуклеотидов. К мелкощепящим относятся рестриктазы Hpa II и Alu ( из Arthrobacter luteus ), к крупнощепящим - Eco R I ( из Escherichia coli) и Hind III.

Слайд 8

Если предположить, что участки узнавания рестриктаз распределены вдоль цепи ДНК случайно, то мишень для ферментов, узнающих последовательность (сайт) из четырех нуклеотидов, должна встречаться в среднем 1 раз через каждые 256 пар оснований, а для ферментов, узнающих шесть нуклеотидов, - через 4096 пар оснований. Если сайт рестрикции окажется внутри гена, то обработка ДНК- рестриктазой приведет к его инактивации. Вероятность такого события очень велика при обработке мелкощепящими рестриктазами и незначительна при применении крупнощепящих эндонуклеаз.

Слайд 11: Построение рестрикционных карт

Ферменты рестрикции стали эффективным инструментом исследования. Они позволяют превращать молекулы ДНК очень большого размера в набор фрагментов длиной от нескольких сотен до нескольких тысяч оснований. С помощью метода электрофореза в агарозном геле фрагменты ДНК, различающиеся по размеру, можно легко разделить, а затем исследовать каждый фрагмент отдельно.

Слайд 12

Рестрикционное картирование ( restriction mapping ) [лат. restrictio — ограничение; лат. charta — бумага] — техника определения положения определенной нуклеотидной последовательности (чаще всего гена) на генетической (физической) карте с помощью рестриктаз типа 2 в линейном масштабе.

Слайд 14: Условия задачи

Молекулу ДНК длиной 5000 пар нуклеотидов (п. н.). обрабатывают отдельно рестриктазами А и В. Фрагменты разделяют электрофорезом. Фермент А разрезал ДНК на 4 фрагмента размером 2100, 1400, 1000 и 500 п. н. Обработка рестриктазой В дала 3 фрагмента: 2500, 1300 и 1200 п. н. (рис. 37). Для определения расположения сайтов рестрикции этих ферментов на следующем этапе применяют процедуру двойного расщепления – обрабатывают ДНК двумя эндонуклеазами. Обработка изучаемого фрагмента одновременно двумя рестриктазами дала 6 фрагментов: 1900, 1000, 800, 600, 500, 200 п. н.

Слайд 16

Наиболее полный вариант – элюировать каждый фрагмент, образующийся в результате расщепления одной рестриктазой, а затем обработать его второй. Смесь фрагментов, полученных после такой обработки, также анализируют с помощью электрофореза. В нашем примере были получены следующие результаты: Обработка каждого из 4-х А-фрагментов рестриктазой В 2100 - 1900 и 200, 1400 - 800 и 600, 1000 - 1000 (изменений нет) 500 - 500 (изменений нет) Обработка каждого из 3-х В-фрагментов рестриктазой А 2500 - 1900 и 600 1300 - 800 и 500 1200 - 1000 и 200 Анализ полученных результатов показывает, что каждый из ферментов, полученный при расщеплении А-фрагментов рестриктазой В можно обнаружить в образцах, полученных при расщеплении В-фрагментов рестриктазой А. Ключом к рестрикционному картированию являются перекрывающиеся фрагменты. Такими в рассматриваемом примере являются В-фрагмент 2100 и А-фрагмент 2500. При обработке другой рестриктазой они дают фрагмент 1900. Из данных о расщеплении этих фрагментов мы предполагаем, что с одной стороны на расстоянии 200 п. н. от фрагмента 1900 находится следующий А-сайт, а с другого конца, на расстоянии 600 п. н. – следующий В-сайт (рис. 38). При обработке двумя эндонуклеазами фрагмент 200 п. н. образуется 1 раз, при обработке рестриктазой А из В-фрагмента 1200, т. е. фрагмент 1200 лежит слева. Остается определить, как продолжается карта вправо. Очевидно, это А-фрагмент 1400, так как он рассечен рестриктазой В на фрагменты 600 и 800. Вправо от фрагмента 2500 следует отложить, очевидно, фрагмент 1300. Тогда логично наличие А-фрагмента 500 и деления В-фрагмента 1300 рестриктазой А на 800 и 500.