



ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА КАФЕДРАСЫ

ДӘРІС 6. РЕСТРИКЦИЯЛЫҚ ФРАГМЕНТТЕР
ПОЛИМОРФИЗМІН ТАЛДАУ.
РЕСТРИКЦИЯЛЫҚ ЭНДОНУКЛЕАЗАЛАР

Лектор: PhD, қауымдастырылған
профессор Тайпақова С.М.

Дәріс жоспары:

- ***RFLP* -Рестрикциялық фрагменттер ұзындығының полиморфизмін талдау**
- **RFLP талдауы кезеңдері**
- **PRFLP талдауының қолданылуы**
- **Рестрикциялық эндонуклеазалар**
- **Генотиптеудің мысалы**

Рестрикциялық фрагменттер ұзындығының полиморфизмін талдау – ағлш. *Restriction fragment length polymorphism, RFLP*) – геномдық ДНҚ молекуласын рестрикциялық ферменттер көмегімен кесу арқылы және келесі реттегі гель-электрофорез әдісімен талдауды айтады.

Бұл тәсілмен геномдық ДНҚ молекуласын талдауға болады.

ДНҚ молекуласын секвенирлеу қымбат болғандықтан, бұл талдау әдісі арзан әрі жылдам болғандықтан, кейбір ғылыми-зерттеулерде қазіргі кезде де қолданылады.

Рестрикциялық фрагменттерінің ұзындығының полиморфизмі (RFLP талдауы) әдісі бойынша рестрикция фрагменттерінің полиморфизмін талдау келесі кезеңдерді қамтиды:

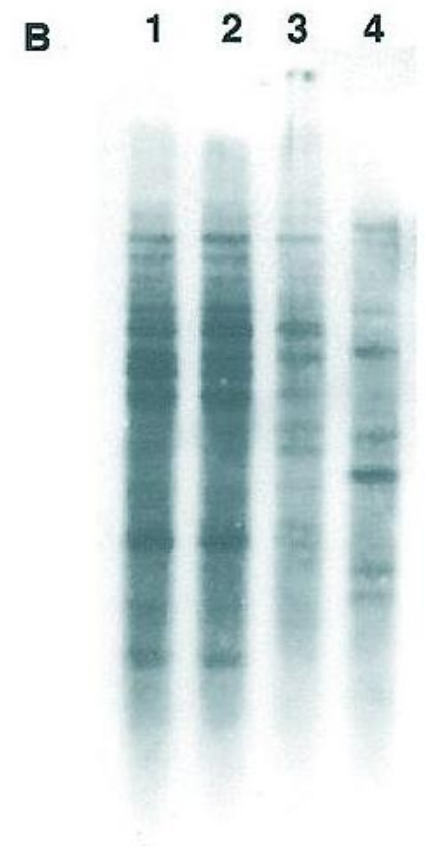
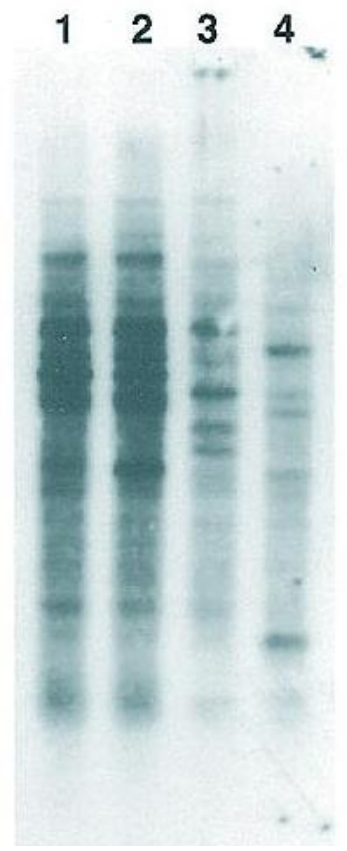
- Геномдық ДНҚ-ны оқшаулау,
- Геномдық ДНҚ-ны белгілі бір эндонуклеазамен рестрикциялау,
- ДНҚ фрагменттерін электрофоретикалық сұрыптау
- Полиморфты рестрикциялық сайты қамтитын ДНҚ фрагменттерін Саузерн блот арқылы анықтау.

Жеке рестрикциялық ферменттермен талданатын геномдық ДНҚ-ның толық бөлінуі белгілі бір ДНҚ фрагменттерінің жиынтығының пайда болуына әкеледі, олардың саны мен мөлшері рестрикциялық сайттардың орналасуына сәйкес келеді.

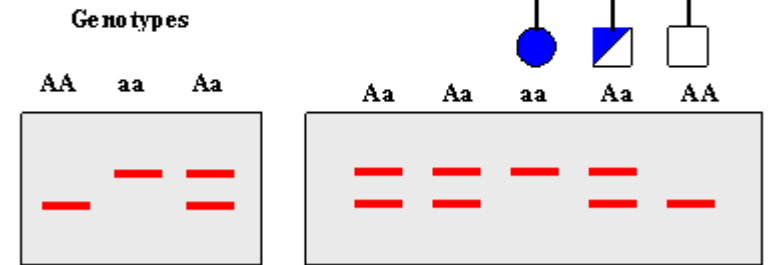
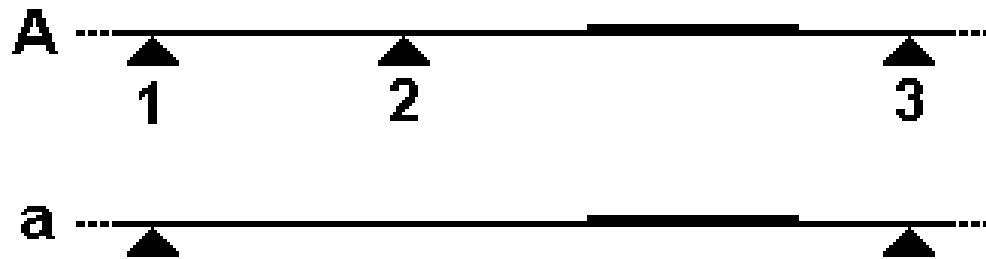
Саузерн блот гибридизация электрофоретикалық сұрыптаудан кейін рестрикцияланған ДНҚ фрагменттерінің мөлшері мен салыстырмалы орналасуын анықтауға мүмкіндік береді.

Рестрикциялық сайттардың мутациялық өзгерісін спецификалық ДНҚ зондтарымен будандастырылған рестрикциялық ДНҚ фрагменттерінің ұзындығының өзгерісі арқылы анықтауға болады. Егер рестрикция сайттарының бірінде мутация болса, рестрикция аяқталғаннан кейін бұл учаске кесілмеген күйінде қалады, бұл мутант учаскесімен бөлінген көршілес рестрикциялық ДНҚ фрагменттерінің бірігуіне және одан да үлкен ДНҚ фрагментінің пайда болуына әкеледі.

Нәтижесінде мутантты учаскелері бар рестрикциялық ДНҚ фрагменттерінің ұзындығы полиморфты болады, бұл әр түрлі көздерден ДНҚ-ны RFLP арқылы салыстыру кезінде анықталады.



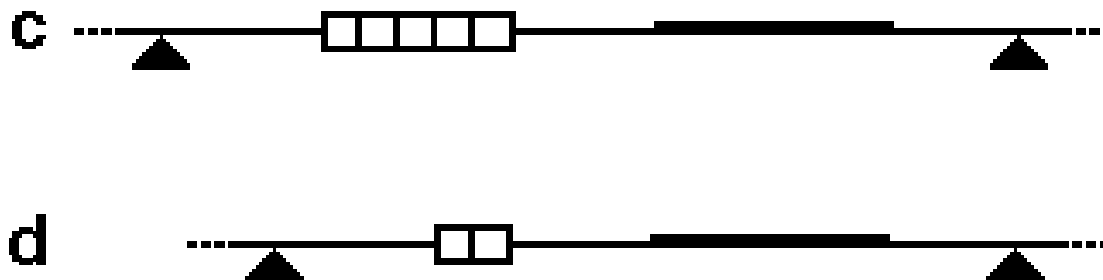
Inheritance of RFLP markers



Бірінші диаграммада геномның кішкене сегменті ДНҚ зондымен анықталады (қалың сызық). **А** Аллелінде, геном көршілес жатқан үш аймақта (үшбұрыштармен белгіленген) рестрикциялық фермент арқылы бөлінеді, бірақ зонд тек оң жақтағы фрагментті табып спецификалық байланысады.

А аллелінде мутацияға байланысты 2 рестрикциялық сайты жоғалып кетті, сондықтан зонд қазір 1-ден 3-ке дейінгі учаскелерди қамтитын созылған үлкен ДНҚ фрагментін анықтайды.

Екінші диаграмма рестрикциялық фрагменттің ұзындығының өзгеруі Саузерн блотта қалай көрінетінін және әрбір аллельдің (бір адамға екіден) отбасы мүшелерінен қалай мұраға алынатынын көрсетеді.



Схемалық диаграммада квадраттар түрінде белгіленген ауыспалы сандық тандемді қайталау (VNTR) сегментін қамтитын геномның аймағын анықтау үшін зонд пен рестрикциялық фермент таңдалады. С аллелі 5 VNTR қайталануға ие, нәтижесінде зонд екі рестрикция сайттары арасындағы ұзынырақ фрагментті анықтайды. D аллелінде тек 2 VNTR қайталануына ие, демек зонд сол екі рестрикция сайттары арасындағы қысқа фрагментті анықтайды.

Сонымен қатар басқа да генетикалық процестер, мысалы инсерция, делеция, транслокация және инверсия полиморфизмге әкелуі мүмкін.

Қолданыс аясы:

Рестрикциялық фрагменттерінің ұзындығының полиморфизмі (RFLP талдауы)

- геном картасын құруда,
- генетикалық ауруларға жауап беретін гендерді оқшаулауда,
- ауру қаупін анықтауда,
- генетикалық іздер алуда
- өзара туыстықты анықтауда маңызды құрал болып табылады.

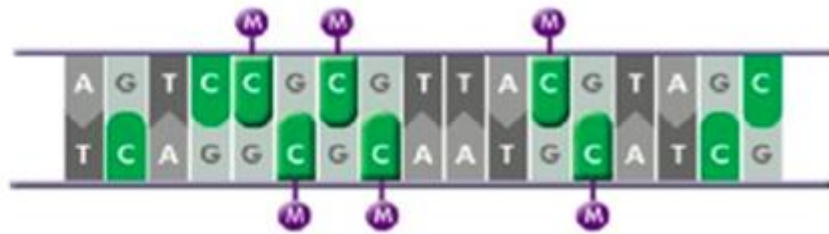
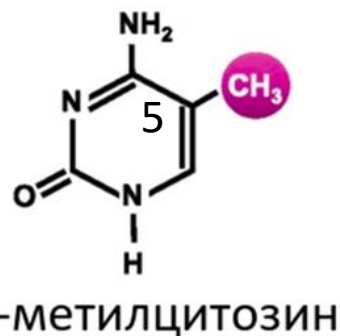
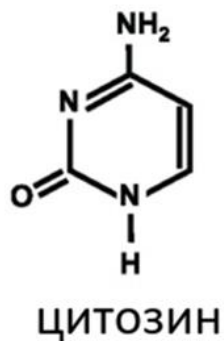
Рестриктазалар – гидролаза ферменттер класына жататын және нуклеин қышқылдарының гидролиз реакциясын катализдейтін ферменттер тобын айтады.

Рестрикция процесі бактерияларда өте кеңінен таралған: бактерияларда рестриктаза ферменттерінің болуы оларды бөгде ДНҚ молекулаларынан сақтайды, яғни бактериялар аталған ферменттер арқылы қорғанып отырады.

Бактерия өзінің геномын сол өзіндегі рестриктаза ферменттерінен аденин және цитозин нуклеотидтерін **метилдеу** арқылы, яғни «арнайы белгілеу» арқылы қорғайды.



ДНҚ молекуласының метильденуі



ДНҚ-ның төрт негізінің ішінен аденин мен цитозин метилденуі мүмкін. ДНҚ метильденуі кезінде цитозин негізін 5-метилцитозинге айналдыру үшін цитозин сақинасының 5-ші көміртегіне метил тобы қосылады. Бұл цитозиннің қалдық модификация процесі ДНҚ метилтрансфераза деп аталатын ферментпен катализденеді. Өзгертілген цитозин негізі гуанин негізінің жанында болады. Сондықтан ДНҚ қос спиральды құрылымында модификацияланған цитозин негіздері бір-біріне қарама-қарсы ДНҚ тізбегінде болады.

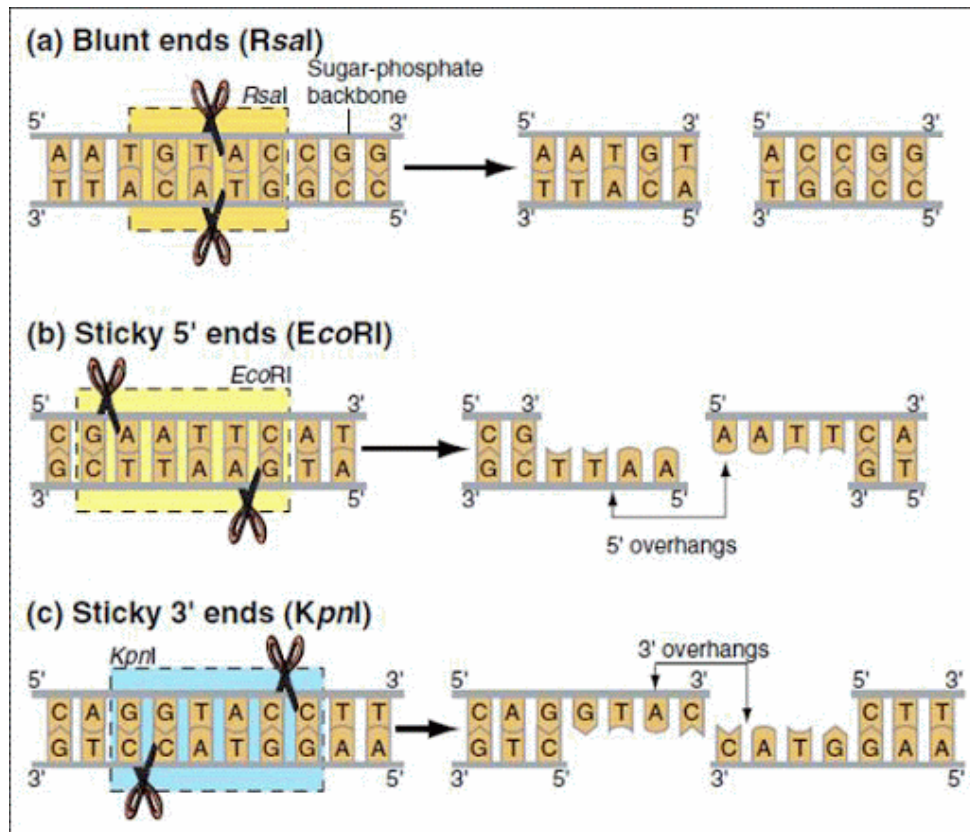
Аденин метильденуі - бұл өсімдіктерде, бактериялар мен сүтқоректілерде болатын процесс. Өсімдіктер мен басқа организмдердің ДНҚ метильденуі үш түрлі реттілік контекстінде кездеседі. Олар CG, CHH және CHG, мұнда H не Аденин, Тимин немесе Цитозинді білдіреді.

ДНҚ метильденуі дегеніміз не?

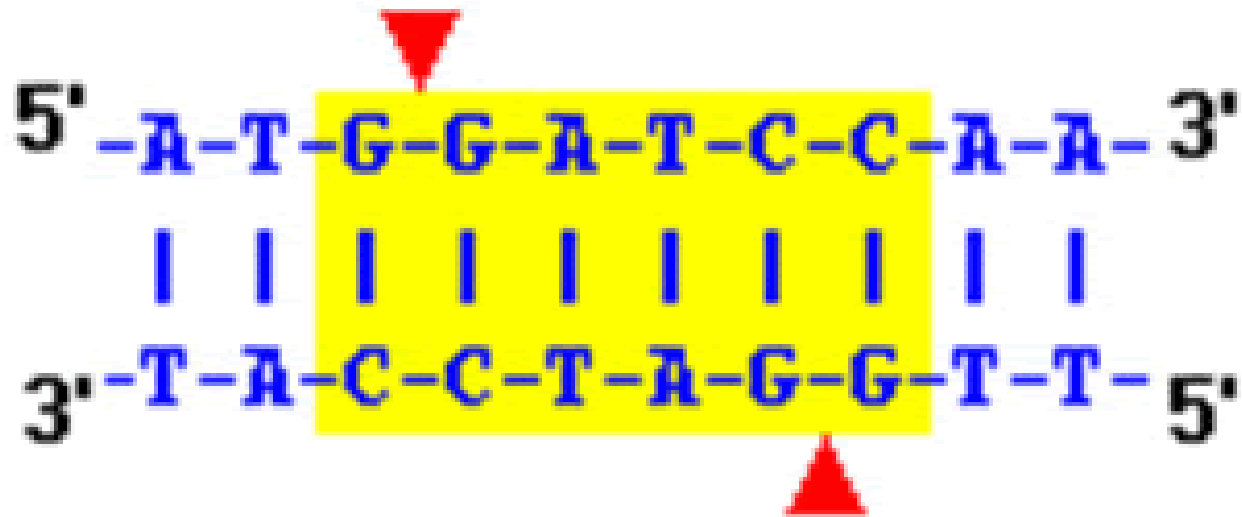
Гендердің экспрессиясын бақылау үшін ДНҚ молекуласына метил топтары қосылатын эпигенетикалық процесс ДНҚ метильденуі деп аталады. ДНҚ метильденуі ДНҚ тізбегін өзгертпейді, бірақ ДНҚ белсенділігіне әсер етеді. Бұл процесс ағзаның қалыпты дамуы үшін қажет және организмнің көптеген маңызды процестерімен байланысты, олар хромосоманың тұрақтылығын сақтау, эмбриональды даму, канцерогенез, қартаю, х-хромосомаларды инактивациялау және транспозитивті элементтердің репрессиясы. Метильдену процесі геннің промоторлы аймағында болған кезде, ол ген транскрипциясының репрессиясына қатысады.

ДНҚ метильденуі - ДНҚ нуклеотидтерінің бірізділігін өзгертпестен ДНҚ молекуласының модификациялануы. (СНЗ) метил тобы молекулаға қосылып, оның белсенділігін арттыруы немесе төмендетуі мүмкін. Ол гендердің транскрипция процесіне тікелей әсер етеді және гендердің экспрессиясын бақылайды

Рестриктазалар – ДНҚ молекуласында белгілі бір аймақтарын танып (рестрикция сайттары) және осы аймақты кесетін қабілетке ие ферменттер.



Рестрикция сайты – рестриктаза ферменті танитын және аталған фермент арқылы кесілетін ДНҚ молекуласындағы қысқа нуклеотидтік тізбектер (шамамен 4-8 жұп нуклеотидтен тұрады).



EcoRI

5' ...G A A T T C...3'
3' ...C T T A A G...5'

Available as a FastDigest enzyme for rapid DNA digestion



ThermoFisher
SCIENTIFIC

Search All

HindIII



Contact Us

Sign In

Quick Order



Popular

Shop All Products

Applications & Techniques

Services & Support

About Us

Connect Your Lab

Home > Shop All Products > PCR & Cloning Enzymes > Restriction Enzymes > HindIII (10 U/μL)

Thermo Scientific™

HindIII (10 U/μL)



Catalog number: ER0501

Related applications: [Restriction Enzyme Cloning](#)

Contact us for support

	Catalog number	Unit size	Price (EUR)
☆	ER0501	5,000 units	Contact Us
☆	ER0502	5 x 5,000 units	Contact Us
☆	ER0505	10,000 units	Contact Us

supplycenter
by Thermo Fisher Scientific

Product overview

Manuals

MSDS

FAQs

Description

5' A | A G C T T 3'
3' T T C G A | A 5'

Thermo Scientific HindIII restriction enzyme recognizes A⁺AGCTT sites and cuts best at 37°C in R buffer. See [Reaction Conditions for Restriction Enzymes](#) for a table of enzyme activity, conditions for double digestion, and heat inactivation for this and other restriction enzymes. Note: Also available as a [FastDigest](#)

Specifications

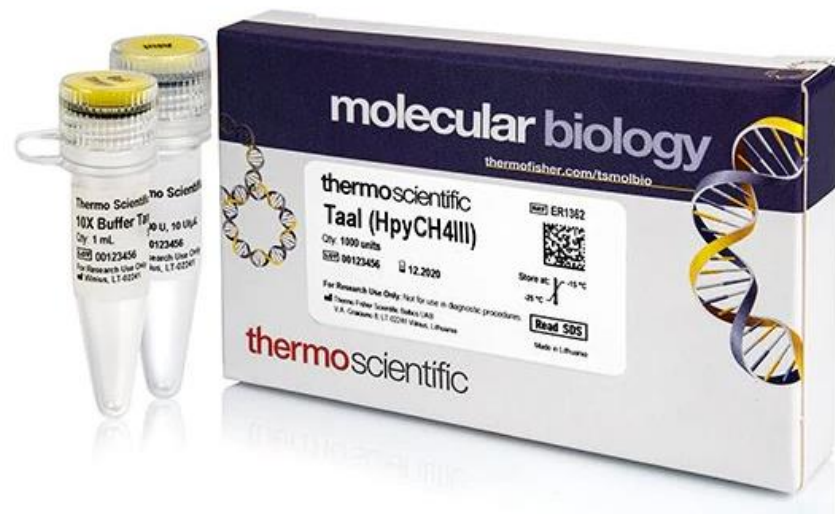
Compatible Buffer:	10x Buffer R
Enzyme:	Hind III
Methylation	Not CpG methylation-sensitive, Not dam

Рестриктаза ферменттері кез келген организмнің (адам, жануар, өсімдік, бактерия немесе вирус) ДНҚ тізбектерін кесуге қабілетті. Тек фермент танитын (комплементарлы) аймақ болса болғаны.

Яғни, бір-біріне мүлде ұқсамайтын организмдердің ДНҚ тізбектерін бір рестриктаза ферментімен өңдеу арқылы, келесі ретте оларды құрастыруға немесе «тігуге» болады.

Рестриктазалар екі тізбекті ДНҚ молекуласында арнайы орындарға ғана жабыса алады, яғни әр рестриктаза ДНҚ молекуласында тек өзіне тән ғана орынды «таниды» және сол жерді «кеседі».

Қазіргі кезде шамамен 3500 астам рестрикциялық ферменттер анықталған және олардың 600-ден астамы коммерциялық түрде шығарылып, ғалымдар арқылы ғылыми-зерттеу жұмыстарында қолданылады.



Рестриктазаларды жіктеу

Рестриктазаларды негізінен 3 типке жіктейді:

1-ші тип рестриктазалары ДНҚ молекуласын белгілі бір тізбегін таниды және осы тізбектің жанында қос тізбекті ДНҚ молекуласын кез-келген нүктеде кеседі және кесудің өзі қатаң спецификалық тұрғыда жүрмейді. Мысалы, *Escherichia coli* K12 бактериясынан бөлінген **EcoK** рестриктазасы.

2-ші тип рестриктазалары ДНҚ тізбегінің 4-8 нуклеотидтер жұбынан тұратын полиндромды тізбектерді таниды және осы аймақта ғана кесуге қабілетті. Мысалы, **EcoRI**, **XbaI** рестриктазалары ДНҚ молекуласын белгілі-бір нүктелерде ғана кесе алады.

3-ші типке жататын рестриктазалар ұзындығы 5-6 нуклеотид жұптарын танып, ДНҚ молекуласының тану сайтынан 24-27 нуклеотидтік ара-қашықтықта кесуге қабілетті. (мысалы, EcoPI)

Рестриктазаларды белгілеу (номенклатура)

1968 жылы зерттеушілер М. Мезельсон және Р. Юань *Escherichia coli* бактериясының K12 штаммынан рестриктаза ферментін бөлгенін жариялады. Осыған ұқсас фермент басқа *Escherichia coli* бактериясының В штаммынан да бөлініп алынды.

1970 жылы зерттеушілер Х. Смит и К. Вилькокс *Haemophilus influenzae* бактериясынан *HindIII* рестриктазасын бөліп алады. Бұл бактерия ДНҚ молекуласының белгілі бір аймағын танып қоймай, сонымен бірге оны кесетіні анықталды.

1978 жылы Нобель сыйлығын алған

1978 Nobel Prize Winner in Physiology or Medicine



Werner Arber



Daniel Nathans



Hamilton Smith



1973 жылы зерттеушілер Хамилтон Смит және Даниел Натанс рестриктаза ферменттерін белгілеудің принциптерін ұсынды:

- Рестриктаза ферменттерін белгілеу оның бөлініп алынған микроорганизмінің туыс белгілеуінің бас әріпін және түр белгілеуінің екі әріпін қолдану (мысалы, *Streptomyces albus* - **Sal**, *Escherichia coli* - **Eco**)

- Туыс-түр белгілеуінен кейін қажет болған жағдайда штамм типі де белгіленеді, мысалы: *Haemophilus influenzae* d — Hind, *Escherichia coli* B — EcoB.

- Бір бактерия түрінен бөлініп алынған рестриктаза ферменттері бірнешеу болса, онда оларды рим санымен белгілейді.

Мысалы, *Haemophilus influenzae* d – HindI, HindII, HindIII.

Көптеген рестриктаза ферменттерінің ашылуына орай 1978 жылы ғалым Робертс осы белгілеулерге мынадай қосымша енгізді:

Егер де рестриктазаның атауын қысқартқанда бір-бірімен ұқсас болса, онда алғашқы екі әріпін өзгеріссіз қалдырады, ал үшінші әріп сол түр атауының екінші түр атауында кездеспеген әріпін алуға негізделген.

Haemophilus parainfluenzae - Hpa I

Haemophilus parahaemolyticus - Hph I.

ДНҚ молекуласын кесуі

Көптеген рестрикциялық сайттар симметриялы, яғни **палиндром** (*palindrome*) түрінде орналасқан болады. Палиндром – ДНҚ молекуласының 5'→3' бағытында екі тізбекте де бірдей оқылуын айтады. Әр рестрикциялық фермент өзінің арнайы нуклеотидтік тізбегін таниды және сол орыннан кеседі.

Палиндром

ДНҚ молекуласының 5'→3' бағытында екі тізбекте де бірдей оқылуын айтады.

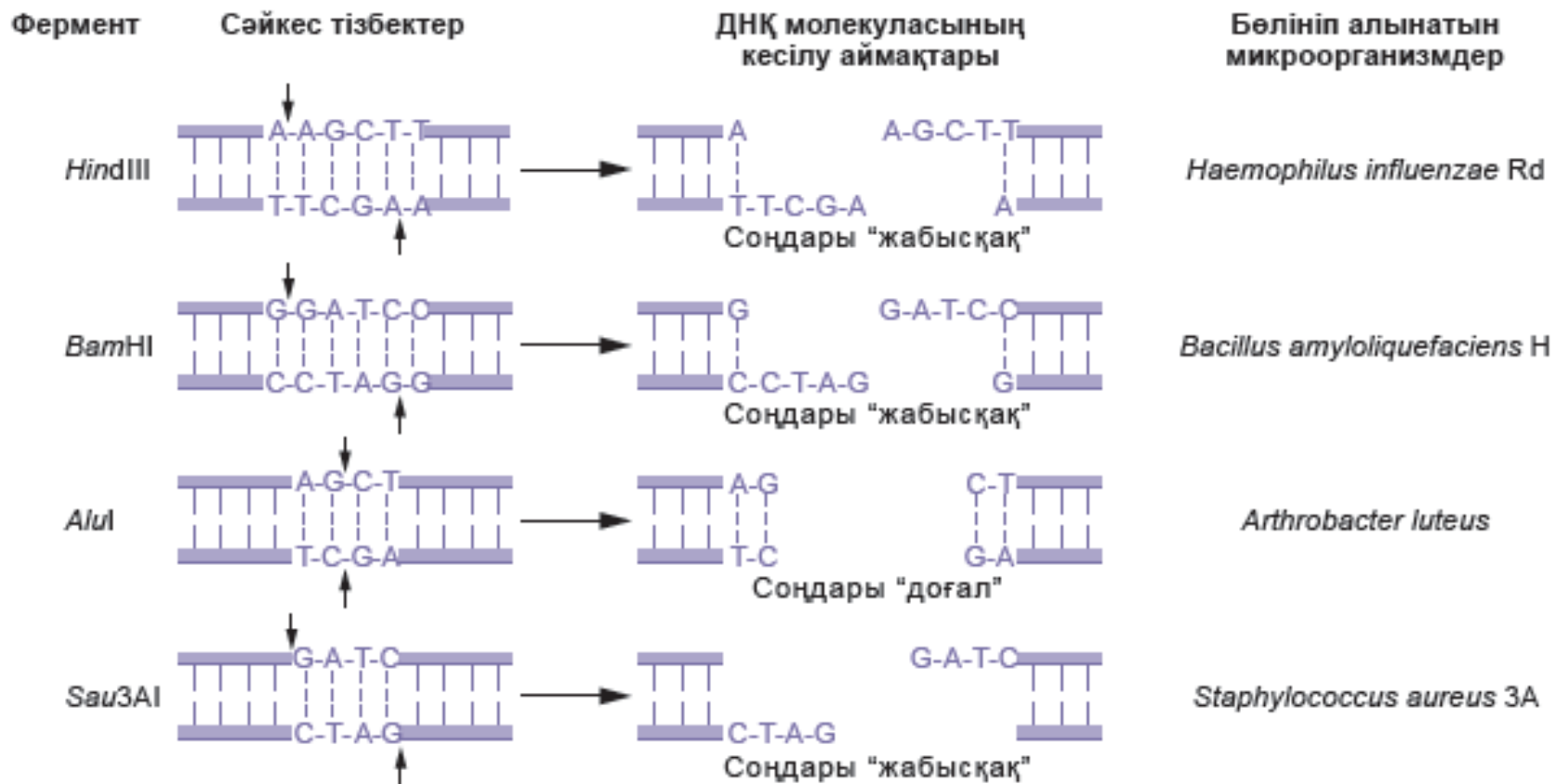


Көпшілік жағдайда рестрикция сайты төрт немесе алты нуклеотидтен тұрады, алайда кейбір сайттар сегіз немесе онан да көп нуклеотидтерден тұруы мүмкін.

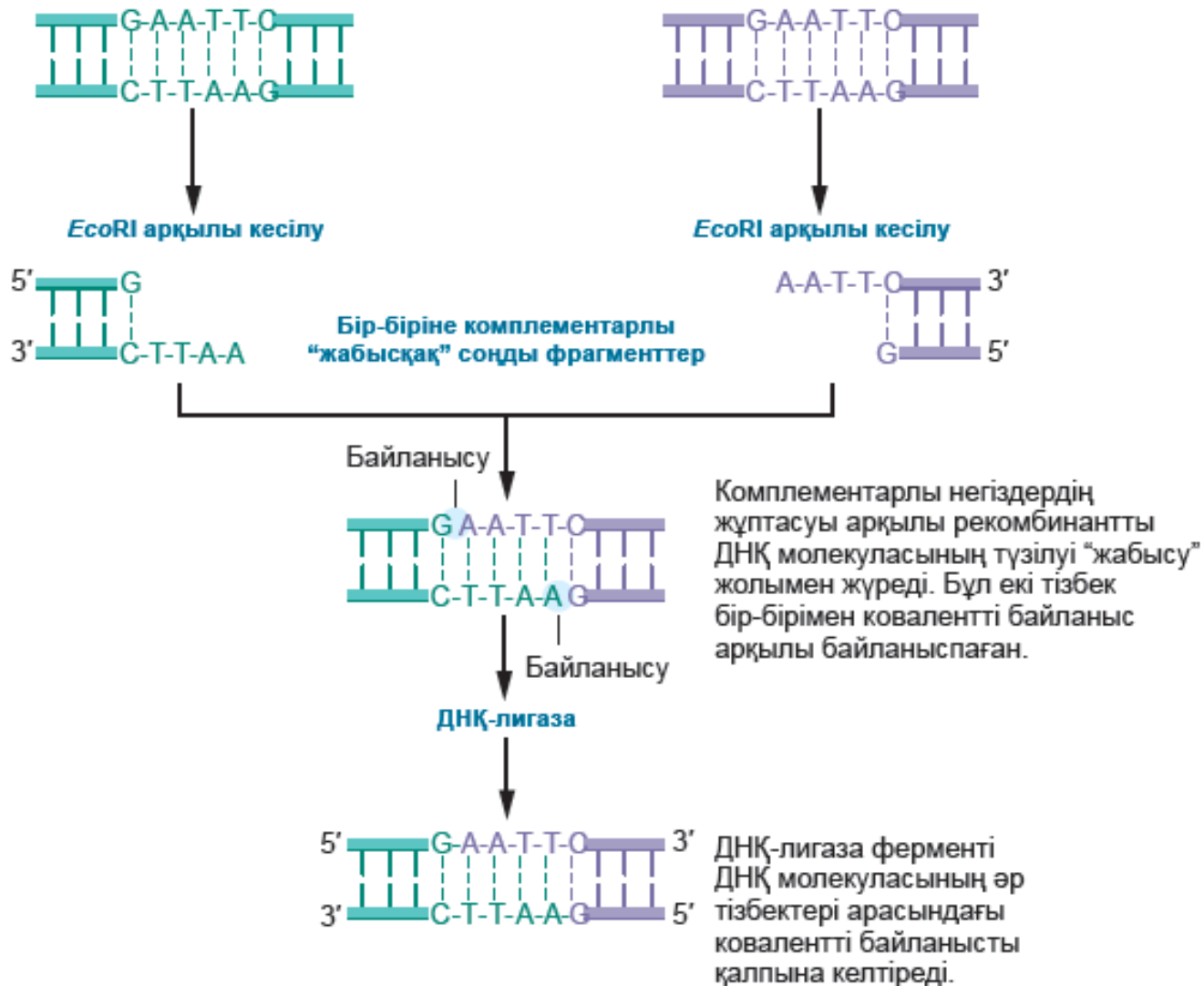
Мысалы, *EcoRI* және *HindIII* ферменттері ДНҚ тізбектерін кескенде олардың **соңдары когезивті** (немесе «**жабысқақ**» деп те аталады) (*cohesive*) болады.

Ал, басқа *AluI* және *BalI* ферменттері ДНҚ молекуласының екі тізбегін де бір нуклеотидтен, яғни «**шорт**» кеседі, нәтижесінде **доғал соңдар** пайда болады (*blunt*).

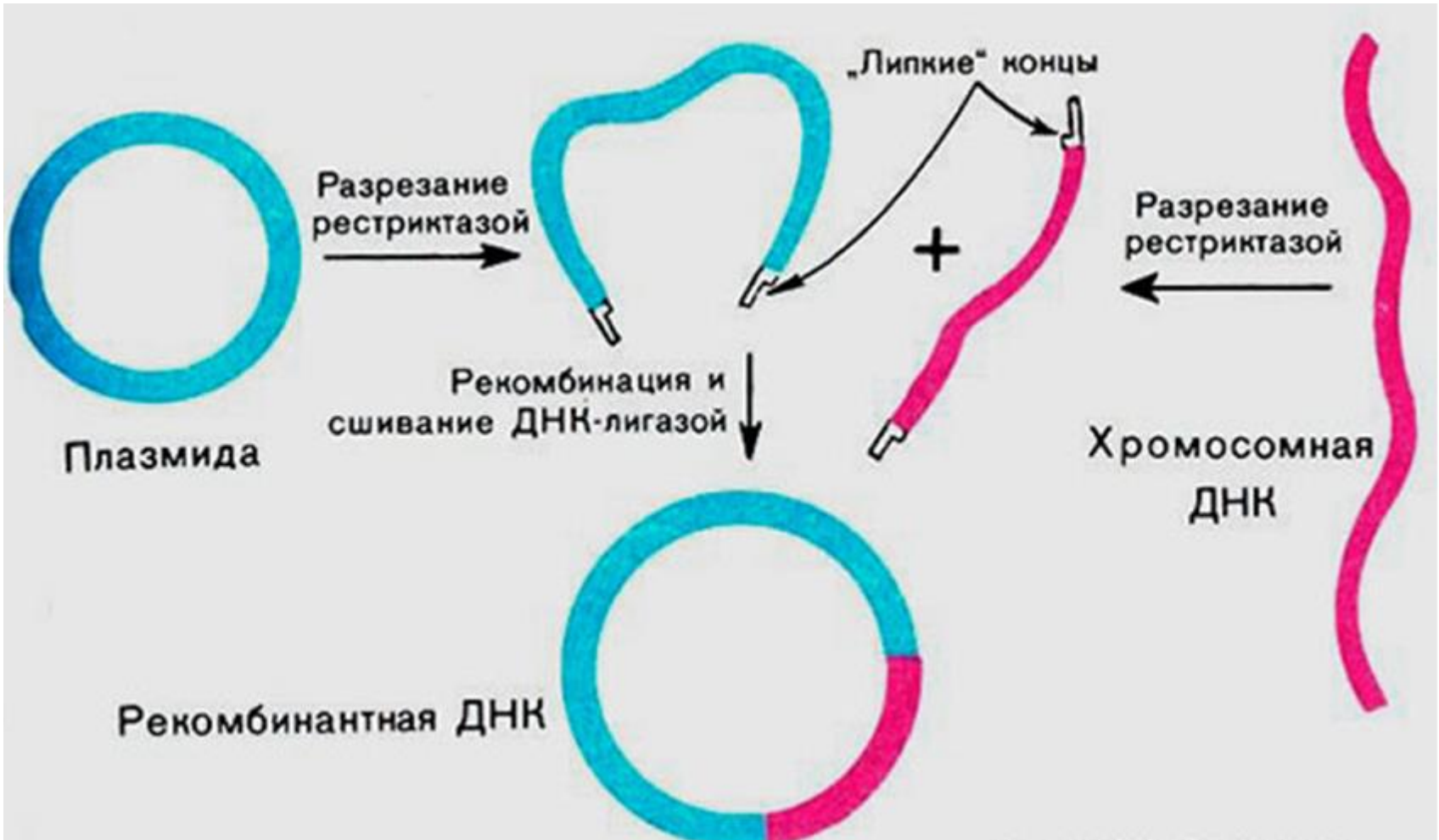
Рестрикциялық ферменттер және тізбектегі олардың танитын аймақтары



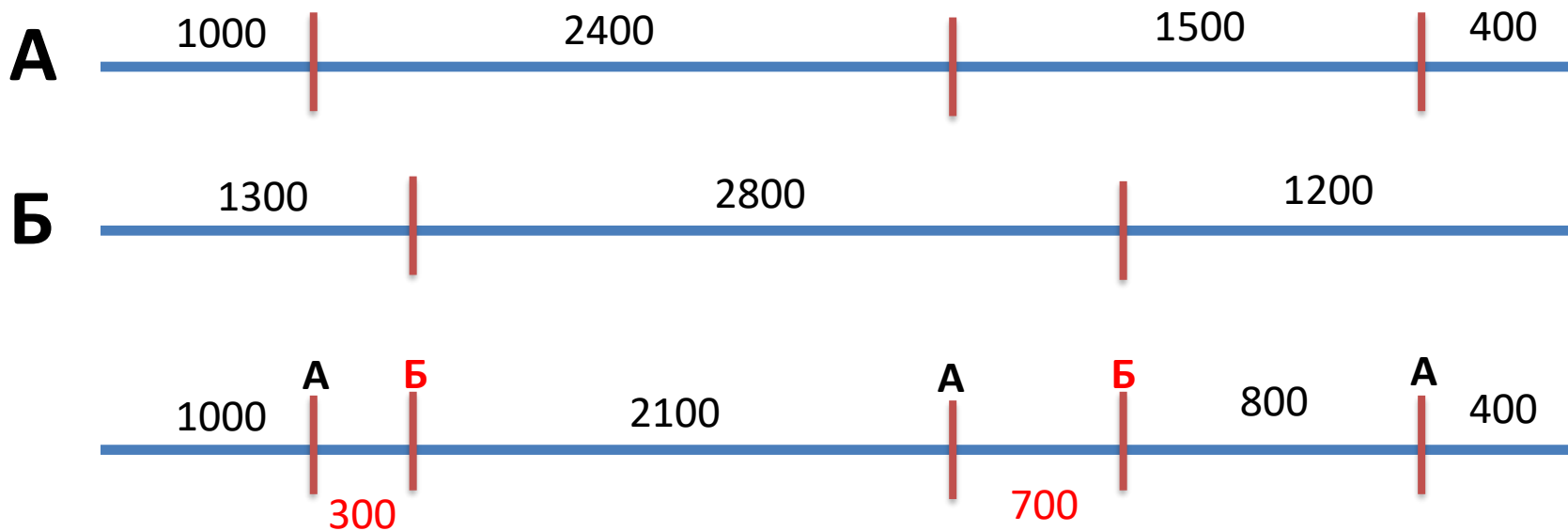
Табиғаты әртүрлі ДНҚ молекуласын *EcoRI* ферменті арқылы өңдеу және жабысу үшін араластыру

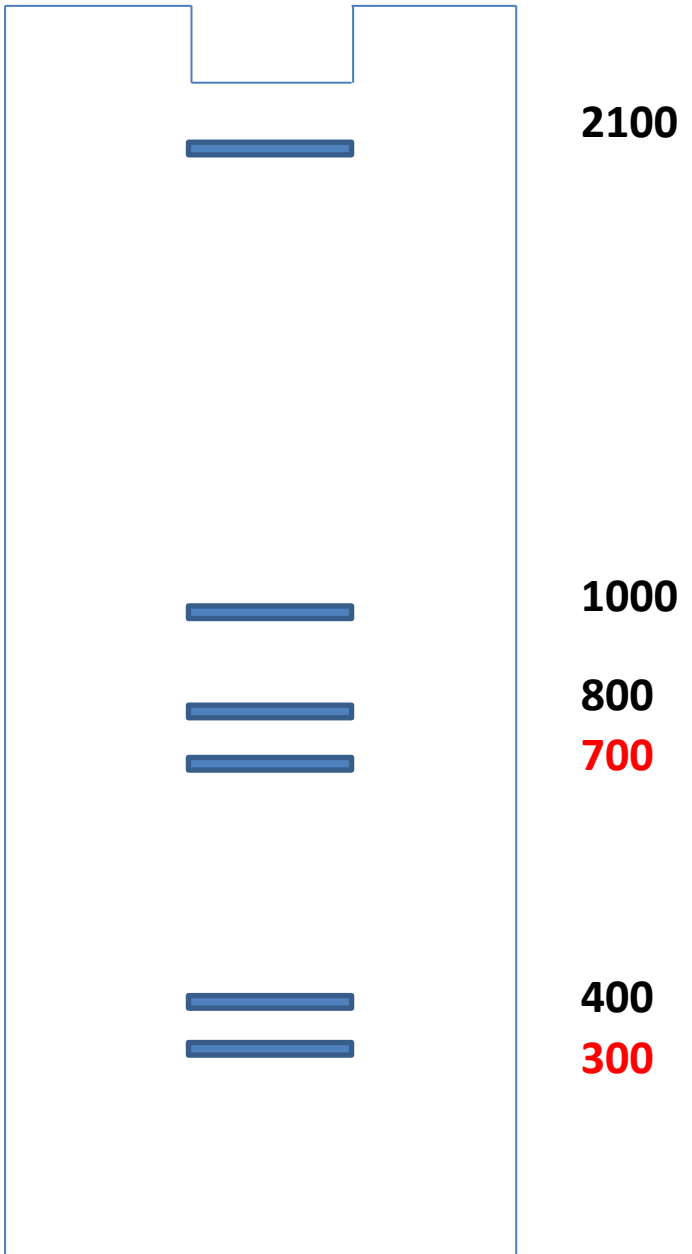
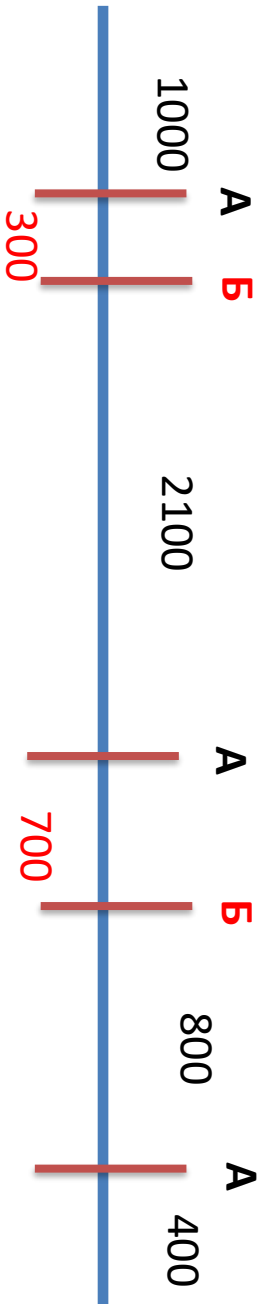


Рекомбинантты ДНҚ молекуласын алу

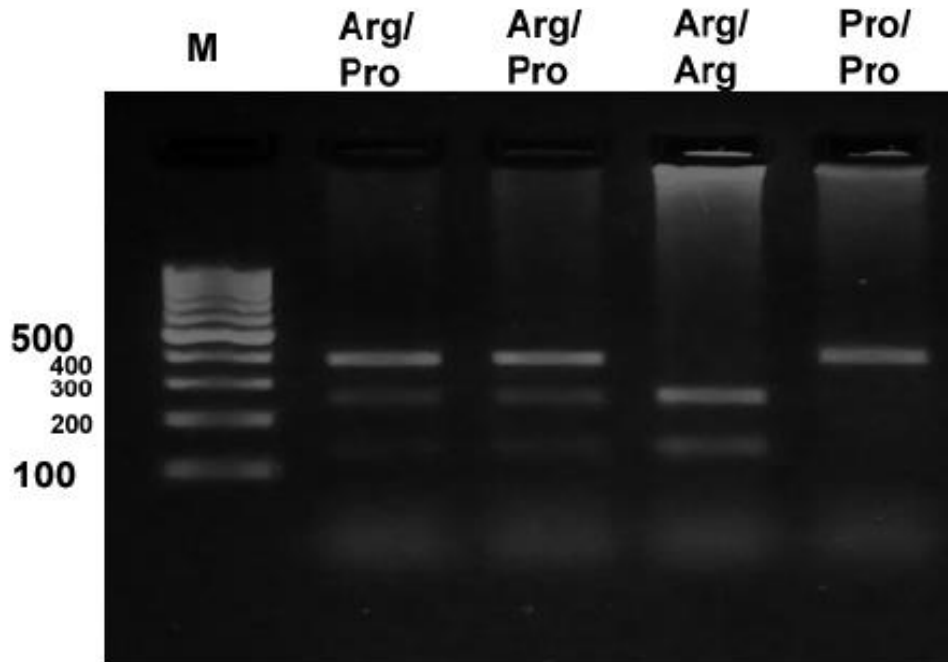


Рестрикциялық карта





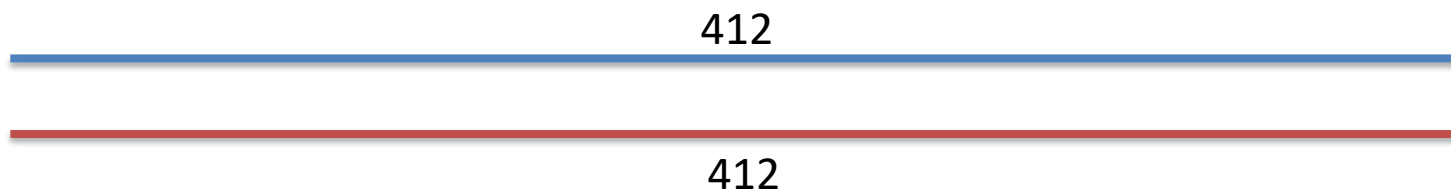
TP53 генінің 72 аймағында кесілген өнімдер электрофореграммасы



p53 - ісіктердің
дамуын
болдырмайтын ісікті
басатын ақуыз, ал
TP53 - p53 ісік
ақуызын кодтайтын
ген

M – маркер 100 bp DNA ladder (*ThermoScientific, USA*);
гомозиготный по 72Pro аллелюгенотип *TP53 72Pro/Pro* (412 п.н.);
гомозиготный по 72Arg аллелюгенотип *TP53 72 Arg/Arg* (252/160 п.н.);
гетерозиготный генотип *TP53 72 Arg/Pro* (412/252/160 п.н.).

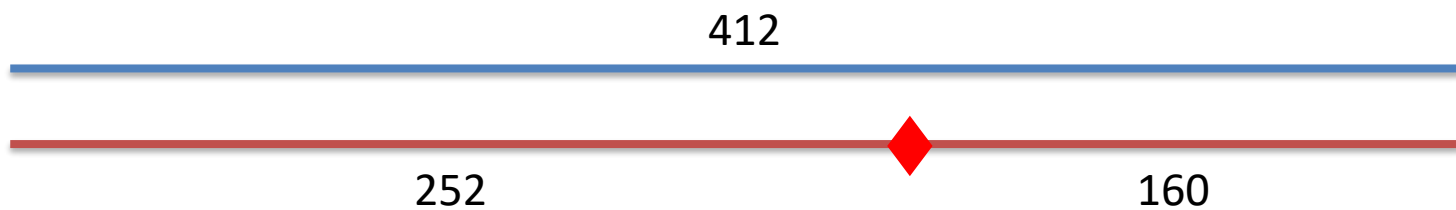
Pro72Pro (TP53) – 412ж.н.



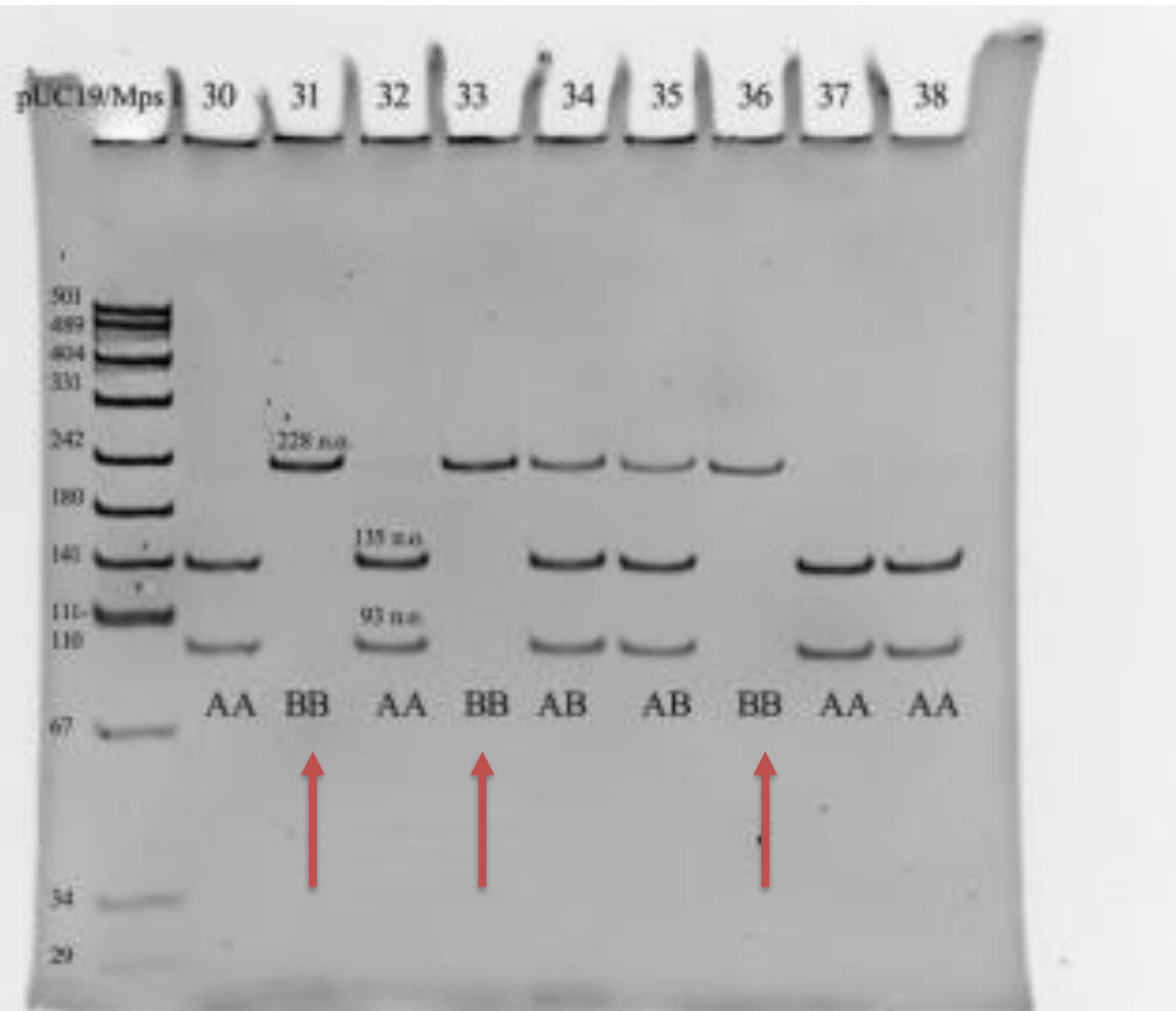
Arg72Arg (TP53) – 252/160 ж.н.



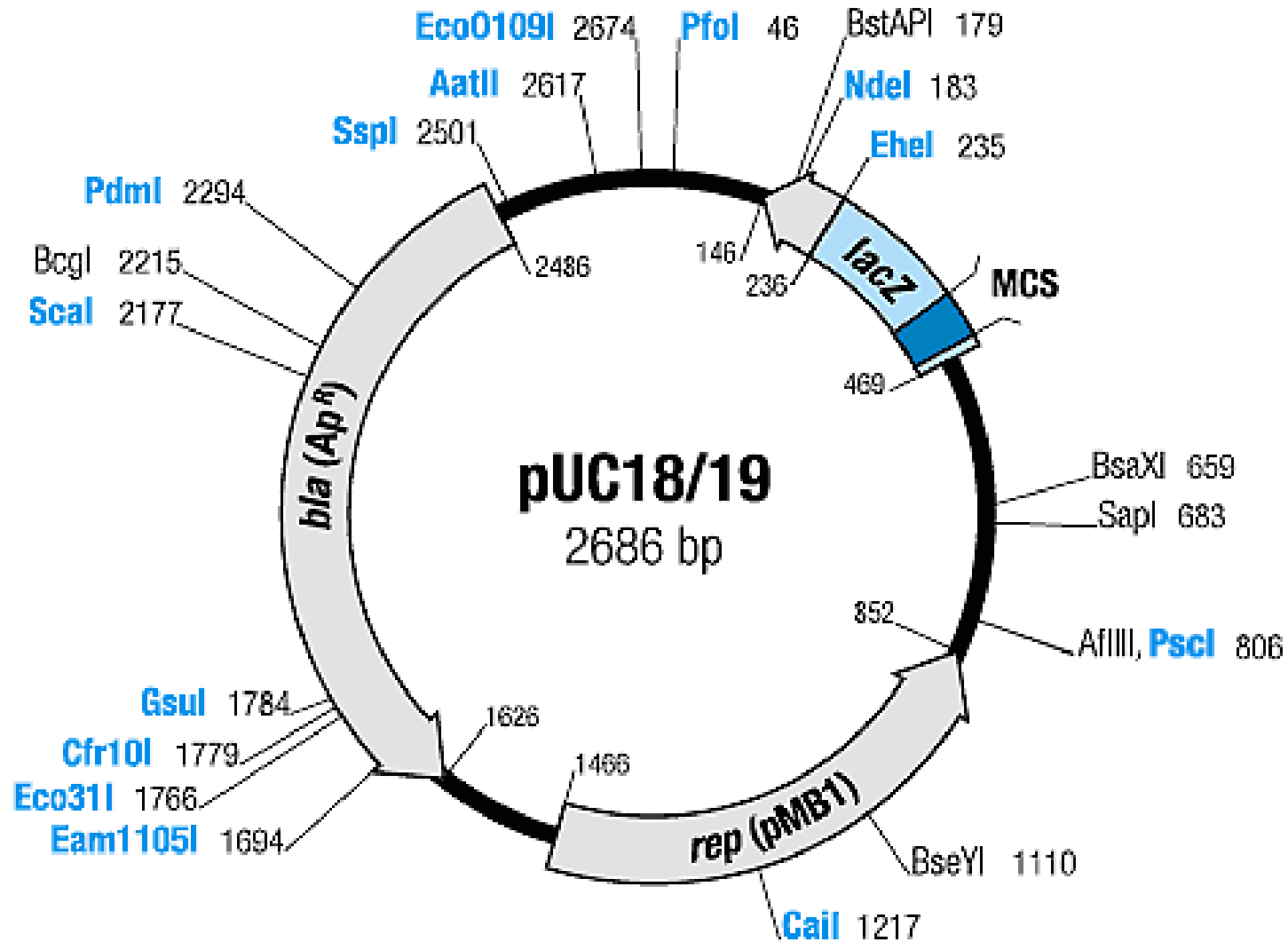
Arg72Pro (TP53) – 412/252/160 ж.н.



Генотиптеудің мысалы



pUC18/19 плазмидасы



5078 нуклеотидтен тұратын плазмидалық ДНҚ

