

Основные ферменты, используемые в технологиях рекомбинации ДНК.

- ДНК-полимераза
- Рестриктаза
- Лигаза
- T4 ДНК полимераза
- Клёнов фрагмент

(Лекция 3)

**Лектор: Старший преподаватель,
Кафедры молекулярной
биологии и генетики,
PhD, Сметенов И.Т.
Предмет: Рекомбинация ДНК**

(Лекция 3)

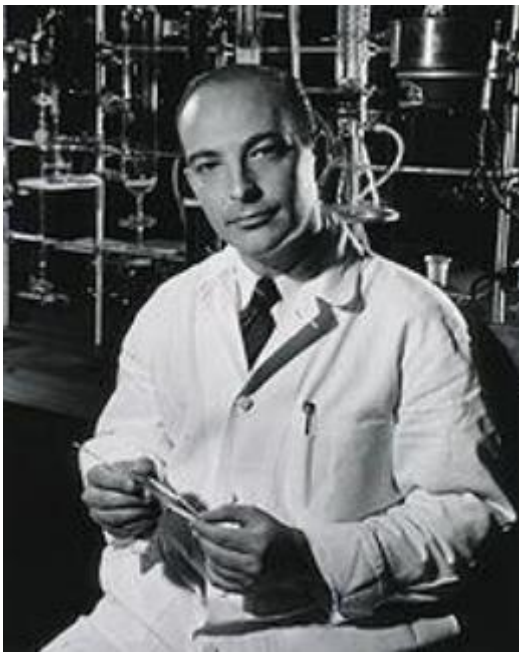
Цель лекции

Изучить основные ферменты, используемые в технологиях рекомбинации ДНК, их функции и значение в молекулярной биологии.

- **Задачи**

1. Рассмотреть функции и механизмы действия ДНК-полимеразы и её роль в репликации ДНК.
2. Изучить особенности работы рестриктаз и их применение для расщепления ДНК.
3. Объяснить функции лигазы и T4 ДНК-полимеразы, а также обсудить значение клёнового фрагмента в процессах рекомбинации.

- **Ключевые слова:** Ферменты рекомбинации ДНК, ДНК-полимераза, Рестриктаза, Лигаза, T4 ДНК-полимераза, Клёнов фрагмент



КОРНБЕРГ Артур
(р. 1918)

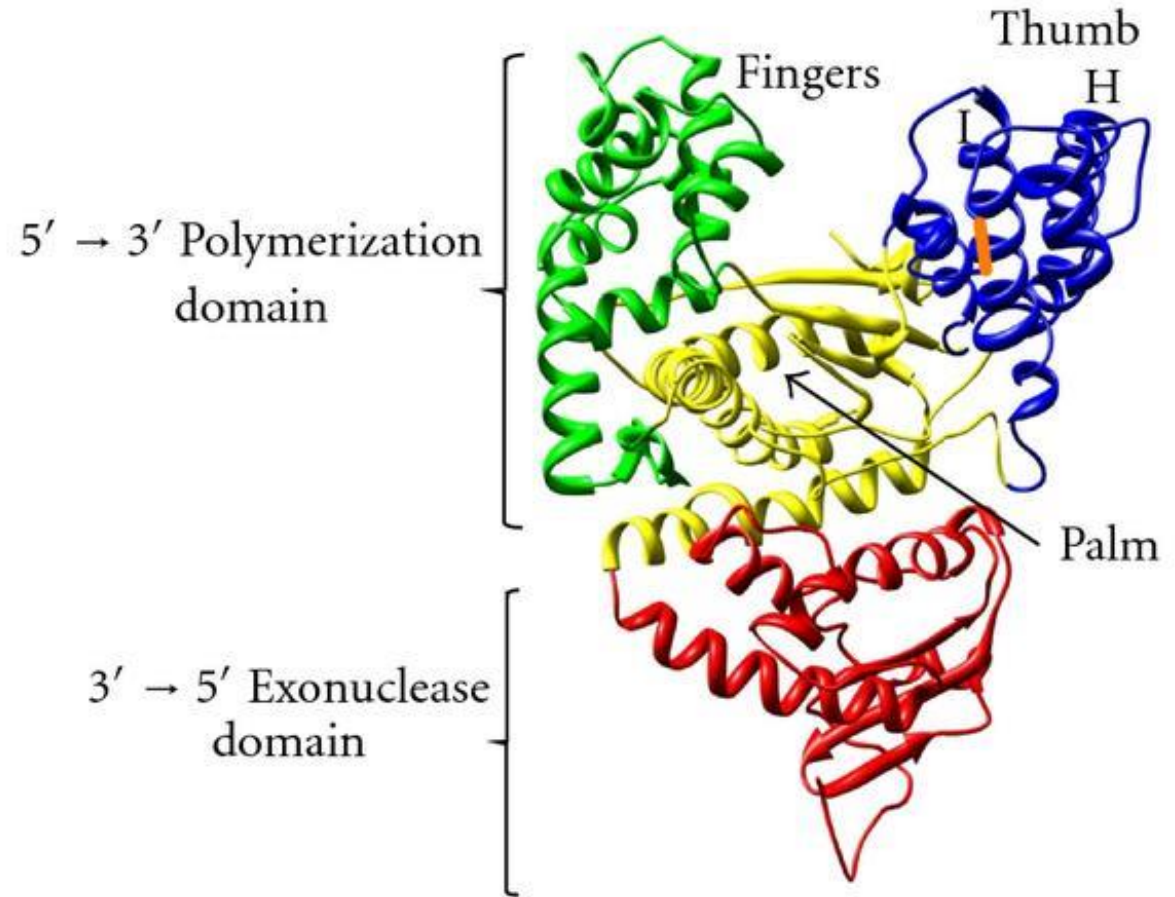
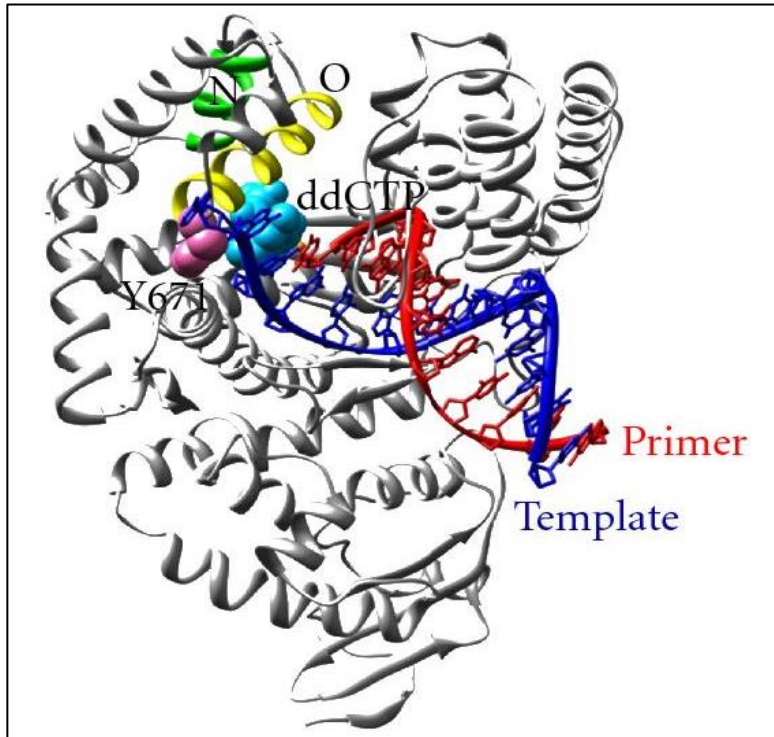
1958 г. Корнберг обнаружил
ДНК полимеразу в *E. coli*.

- В *Escherichia coli* имеется пять ДНК-полимераз
- Основная репликативная полимеразы - **Pol III**.
- **Pol I** играет роль в обработке фрагментов Окадзаки, а также в заполнении пробелов во время процессов эксцизионной репарации.
- **Pol II** - точная ДНК-полимераза, потому что, как и Pol I, она имеет 3'-экзонуклеазный домен для редактирования или корректуры, который может разрушить неправильно спаренный конец праймера и таким образом удалить неправильно вставленные основания. Было показано, что он играет роль в репликации ДНК преимущественно в отстающей цепи, где он может редактировать ошибки, сделанные Pol III.
- **Pol IV** и **Pol V** необходимы для стресс-индуцированного мутагенеза.

ДНК полимераза I (103 kDa) - polI

Домены:

- N-конец: 5'-3' – экзонулеазная активность
- C-конец: 5'-3' – полимеразная активность
- Средний домен: - 3'-5' – экзонулеазная активность



Общая структура полимераз напоминает структуру правой руки человека, образуя области ладони (желтый), пальцев (зеленый) и большого пальца (синий).

- **Taq ДНК-полимераза** - это высокотермостабильная ДНК-полимераза термофильной бактерии *Thermus aquaticus*, который синтезирует ДНК из одноцепочечных матриц в присутствии дНТФ и праймера. Является *Холоферментом*.
- **Определение единицы.** Одна единица ДНК-полимеразы Taq - это количество фермента, необходимое для включения 10 нмоль дезоксирибонуклеотида в ДНК за 30 минут при 74°C.

| | |
|-------------------------------|----------------------|
| Свес: | 3'-А |
| Метод ПЦР: | ОТ-ПЦР |
| Полимераза: | ДНК-полимераза Taq |
| Характеристики типа продукта: | ДНК-полимераза |
| Формат реакции: | Отдельные компоненты |
| Скорость реакции: | Стандарт |
| Размер (конечный продукт): | 5 кб или меньше |

Применения

- Обычная ПЦР-амплификация фрагментов ДНК размером до 5 т.п.н.
- ПЦР с высокой пропускной способностью
- Мечение ДНК

Примечание

- Частота ошибок ДНК-полимеразы Taq в ПЦР составляет $2,2 \times 10^{-5}$ ошибок на нт за цикл. Соответственно, точность ПЦР составляет $4,5 \times 10^4$. Точность обратно пропорциональна частоте ошибок и показывает среднее количество правильных нуклеотидов, включенных до того, как произойдет ошибка.

10X Taq Buffer with KCl: 100 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 500 mM KCl, 0.8% (v/v) Nonidet P40.

10X Taq Buffer with (NH₄)₂SO₄: 750 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20.

- Высококачественные **ДНК-полимеразы** Thermo Scientific **Phusion** устанавливают золотой стандарт высокопроизводительной ПЦР. Обладая частотой ошибок в 50 раз ниже, чем у **Taq** , и в 6 раз ниже, чем у **Pfu** , высокоточная ДНК-полимераза **Phusion** является отличным выбором для клонирования и других приложений, требующих высокой точности. ДНК-полимеразы **Phusion** обеспечивают надежную работу при коротком времени выполнения протокола даже в присутствии ингибиторов ПЦР и обеспечивают более высокий выход при меньших количествах фермента, чем другие ДНК-полимеразы.
- Быстрая ПЦР благодаря короткому времени расширения (15-30 с / кб)

| | |
|-------------------------------|---|
| Свес: | Тупой |
| Полимераза: | ДНК-полимераза высокой точности Phusion |
| Характеристики типа продукта: | ДНК-полимераза высокой точности |
| Формат реакции: | Автономный |
| Скорость реакции: | Быстрый |



T4 ДНК-полимераза

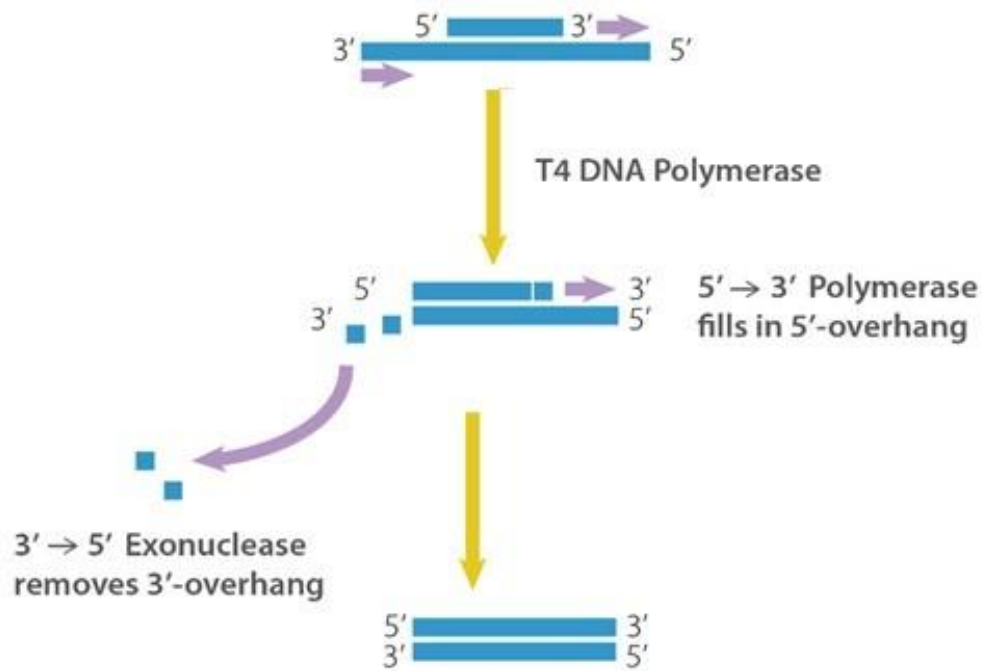
- **T4 ДНК-полимераза** - это ДНК-полимераза, обладающая 3'-экзодезоксирибонуклеазной активностью, но лишенная 5'-3' экзодезоксирибонуклеазной активности.

Применение:

- Маркировка двухцепочечной линейной ДНК путем синтеза замещения (1).
- Олигонуклеотид-направленный сайт-специфический мутагенез (2).
- 3'-концевое мечение двухцепочечной ДНК (3).
- Тупирование выступов 5' или 3 до тупых концов (4).
- **Источник:** очищено от *E. coli*, экспрессирующей ген ДНК-полимеразы T4 на плазмиде.

Определение единицы: Одна единица включает 10 нмоль общего дезоксирибонуклеотида в осаждаемый кислотой материал за 30 мин при 37 ° С с использованием ДНК, расщепленной ДНКазой I в качестве праймера • матрицы.

- **Стандартные условия реакции:** 50 mM глицин-NaOH (pH 8,8), 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 mM MgCl_2 , 6,5 мкМ ЭДТА, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 0,165 мг / мл БСА, 1,6 мг / мл ДНКазы. I-разрезанная ДНК семенников лосося, 0,33 mM dCTP, 0,33 mM dATP, 0,33 mM dGTP, 0,33 mM dTTP, 76 нМ [^3H] dTTP и фермент в 0,1 мл в течение 30 мин. при 37 ° С.



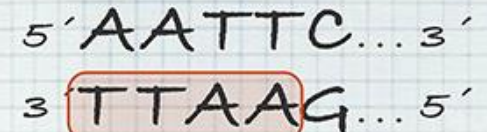
BLUNTING WITH DNA POLYMERASES

Examples:

- T4 DNA Polymerase
- DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment

EcoRI-HF®

Fill in 5' → 3'



Fill in 5' → 3'

PacI

Degrade 3' → 5'



Degrade 3' → 5'

Фрагмент Кленова, экзо-

Фрагмент Кленова компании Thermo Scientific, экзо-, представляет собой большой фрагмент ДНК-полимеразы I. Он проявляет 5' → 3' полимеразную активность, но лишен экзонуклеазной активности 3' → 5' и 5' → 3' ДНК-полимеразы I. Экзонуклеазная активность 3' → 5' фермента устраняется мутациями в 3' → Активный сайт 5'-экзонуклеазы.

Основные особенности

- Отсутствует активность экзонуклеазы 3' → 5'
- Включает модифицированные нуклеотиды (например, Су3-, Су5-, флуоресцеин-, родамин-, аминоаллил-, биотин-меченые нуклеотиды)
- Активен в рестрикционных ферментах, буферах для ПЦР и RT

Используется:

- Мечение ДНК с произвольным праймированием
- Мечение путем заполнения 5'
- Секвенирование ДНК по методу Сэнгера.

Фрагмент Кленова, экзо- не рекомендуется для реакций притупления ДНК перед лигированием ДНК, поскольку он часто добавляет один или несколько дополнительных нуклеотидов к 3'-концу субстратов ДНК с притупленным концом без направленной матрицы.

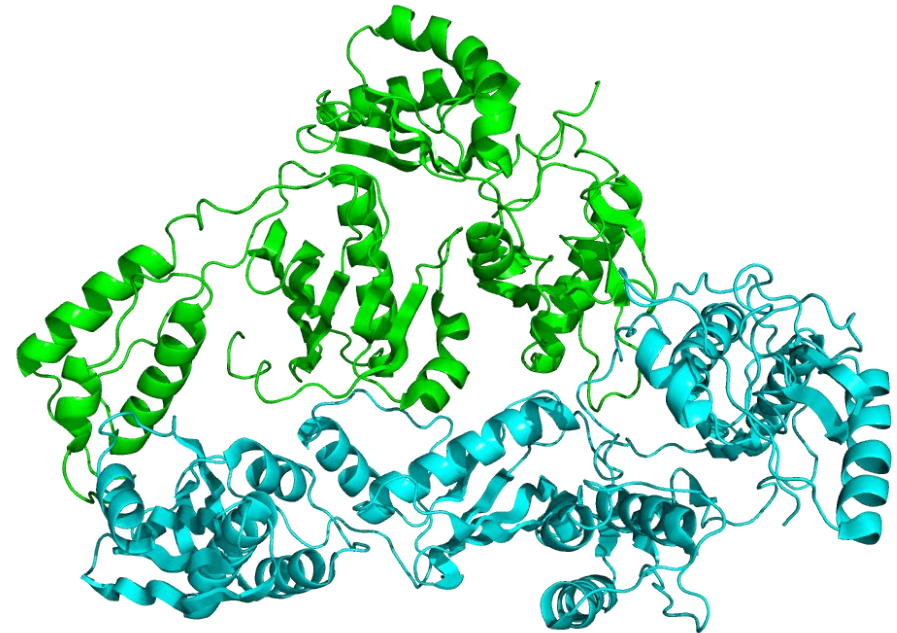
Обратная транскриптаза

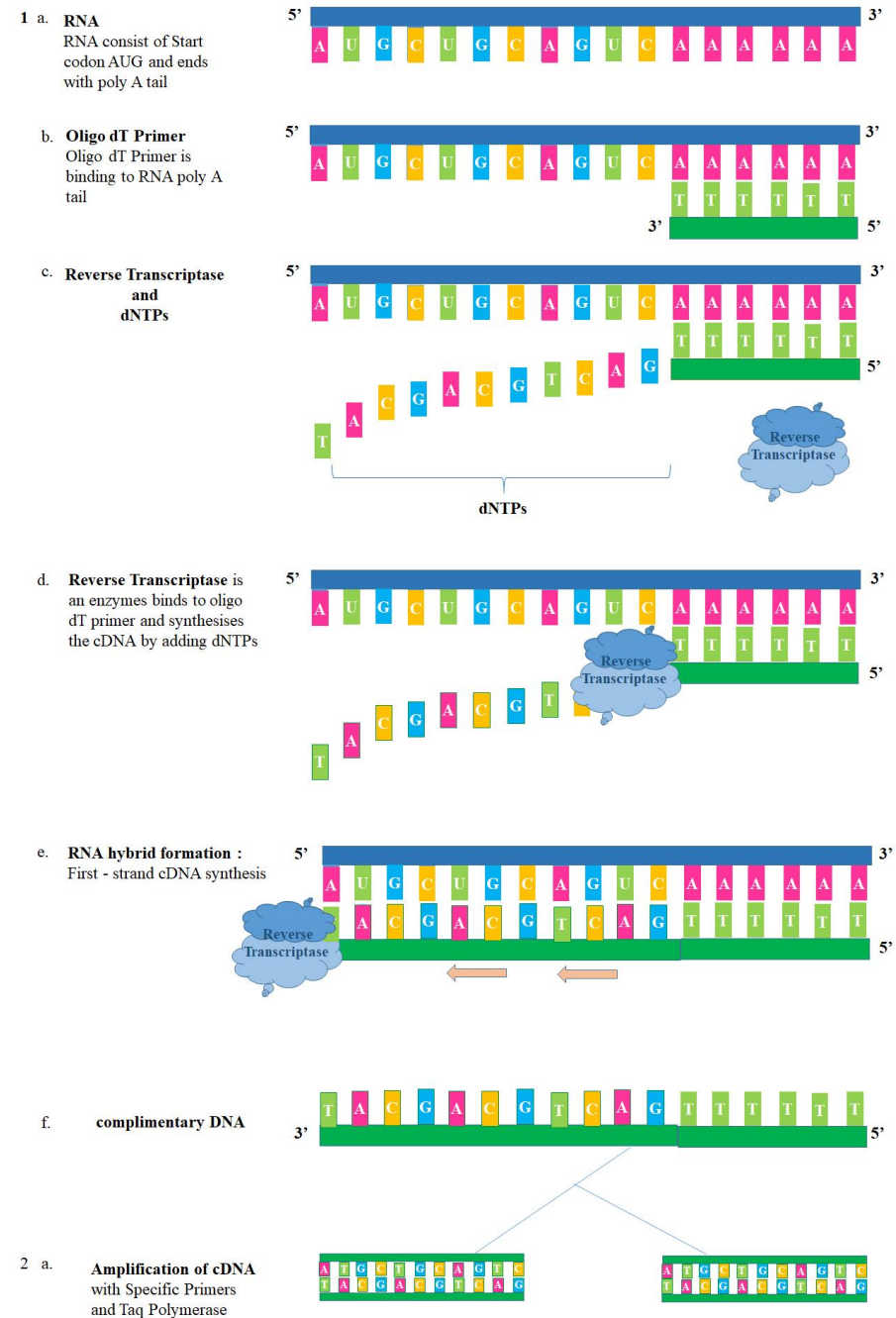
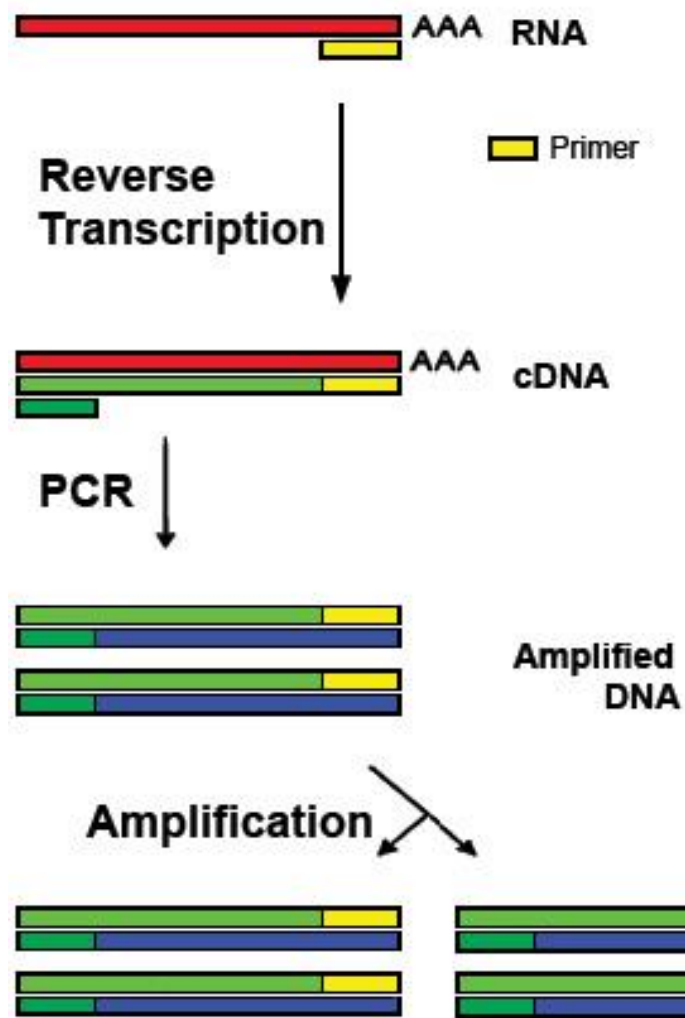
- **Описание**
- Обратная транскриптаза **RevertAid (RT)**, имеет более низкую активность РНКазы Н по сравнению с обратной транскриптазой AMV.
- Фермент сохраняет активность при 42-50°C и подходит для синтеза кДНК размером до 13 т.п.н.

Применение

- Синтез первой цепи кДНК для ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени
- Синтез кДНК для клонирования и экспрессии
- Создание меченых зондов кДНК для микрочипов
- Мечение ДНК
- Анализ РНК путем удлинения праймера

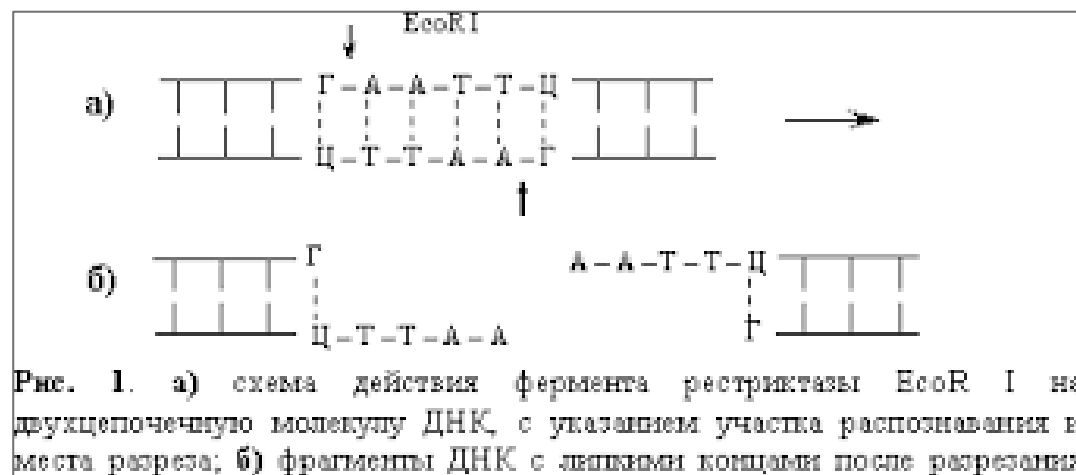
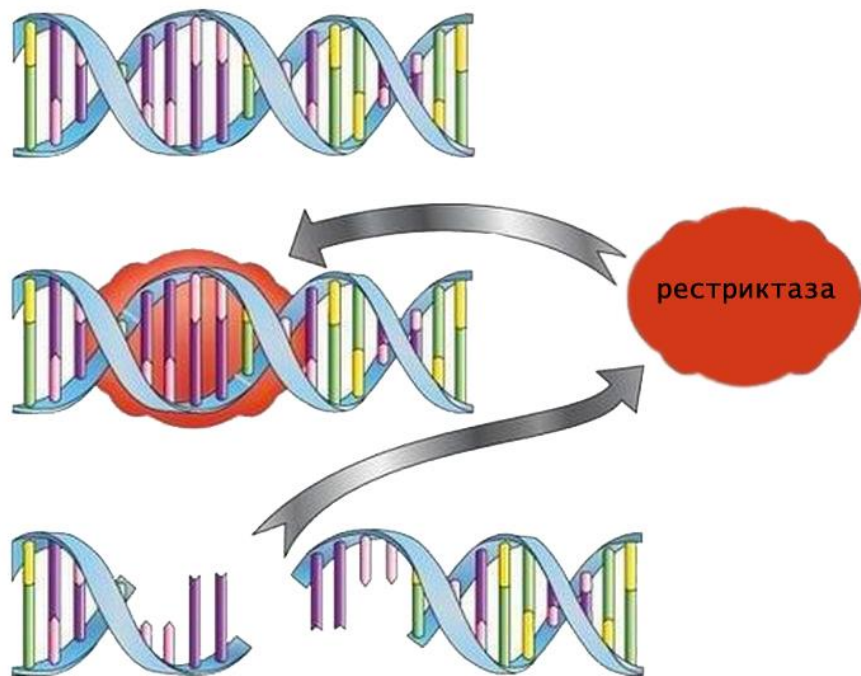
криптаза состоит из двух субъединиц — α (65 кДа) и β (95 кДа), присутствующих в эквимолярном количестве. α -Субъединица представляет собой N-концевую часть (две трети) β -субъединицы.





Рестриктазы

- **Эндонуклеазы рестрикции**, рестриктазы (от лат. restrictio — ограничение) — группа ферментов, относящихся к классу гидролаз, катализирующих реакцию гидролиза нуклеиновых кислот.
- - 1968 году М. Мезольсон и Р. Юань впервые выделили фермент рестриктазы из штамма *E. coli* K12 (*EcoK* и *EcoB*).
- - 1970 году Х. Смит и К. Вильвокс впервые выделили фермент *HindII* специфически узнающий и разрезающий ДНК.



- 1970 году Х. Смит и Д. Натанс открыли *EcoRI* и *EcoRII*

Номенклатура рестриктаз

В 1973 году Смит и Натанс предложили номенклатуру рестриктаз, включающую следующие пункты:

1. Аббревиатура названия каждого фермента является производной от бинарного названия микроорганизма, содержащего данную метилазно-рестриктазную систему. Составляют по правилу: к первой прописной букве названия рода добавляют две первые строчные буквы вида.

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

2. В случае необходимости добавляют обозначение серотипа или штамма, например, Eco B.

3. Различные системы рестрикции - модификации, кодируемые одной бактериальной клеткой, обозначают римскими цифрами: Hind II, Hind I, Hind III (*Haemophilus influenzae*).

4. Рестриктазы обозначают буквой R (R Hind III), метилазы - M (M Hind III).

Открытие новых рестриктаз заставило Робертса в 1978 году внести дополнения в систему рациональных обозначений ферментов: если сокращенное название совпадает для нескольких ферментов, то 2 первые буквы аббревиатуры остаются неизменными, а третья берется из последующих букв видового названия:

Haemophilus parainfluenzae - Hpa I *Haemophilus parahaemolyticus* - Hph I.

Derivation of the EcoRI name

| Abbreviation | Meaning | Description |
|--------------|--------------------|-------------------------|
| E | <i>Escherichia</i> | Genus |
| CO | <i>Coli</i> | species |
| R | RY13 | Strain |
| I | First identified | order of identification |

Классификация рестриктаз

Все рестриктазы узнают на двуспиральной ДНК строго определенные последовательности

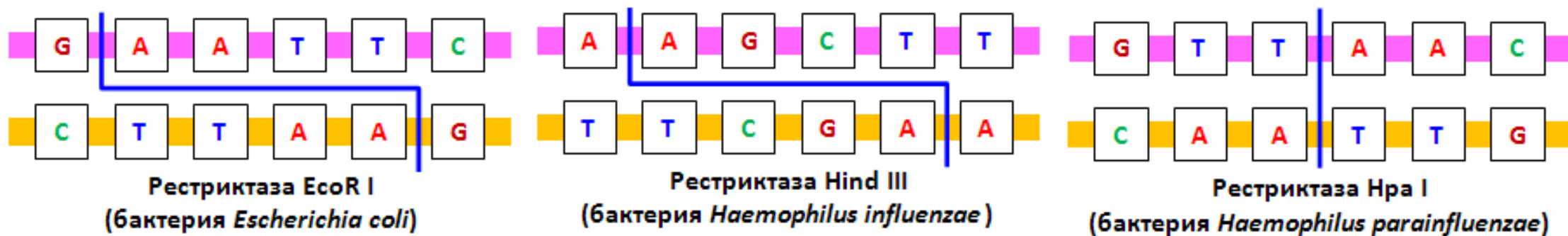
- **1 класс.** Осуществляют разрывы в произвольных точках молекулы ДНК. Имеют сложную субъединичную структуру и обладают двумя типами активностей - модифицирующей (метилирующей) и АТФ-зависимой эндонуклеазной. (400-7000 пн)
- **2 класс.** Узнают и расщепляют ДНК в строго определенных точках внутри сайтов узнавания или на фиксированном от них расстоянии. состоят из 2 отдельных белков: рестрицирующей эндонуклеазы и модифицирующей метилазы, поэтому в генной инженерии используются исключительно ферменты 2-го класса. Они нуждаются в ионах Mg в качестве кофакторов.
- **3 класс.** Узнают и расщепляют ДНК в строго определенных точках внутри сайтов узнавания или на фиксированном от них расстоянии. имеют сложную субъединичную структуру и обладают двумя типами активностей - модифицирующей (метилирующей) и АТФ-зависимой эндонуклеазной. (24-27 пн)

| Microorganism | Restriction Enzyme Name | Restriction Site |
|--|-------------------------|--------------------------------|
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H | BamHI | G G A T C C C C T A G G |
| <i>Brevibacterium albidum</i> | BalI | T G G C C A A C C G G T |
| <i>Escherichia coli</i> RY13 | EcoRI | G A A T T C C T T A A G |
| <i>Haemophilus aegyptius</i> | HaeII | Pu G C G C Py Py C G G C Pu |
| <i>Haemophilus aegyptius</i> | HaeIII | G G C C C C G G |
| <i>Haemophilus influenzae</i> R _d | HindII | G T Py Pu A C C A Pu Py T G |
| <i>Haemophilus influenzae</i> R _d | HindIII | A A G C T T T T C G A A |
| <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | HpaI | G T T A A C G A A T T G |
| <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | HpaII | C C G G G G C C |
| <i>Providencia stuartii</i> 164 | PstI | C T G C A G G A C G T C |
| <i>Streptomyces albus</i> G | SalI | G T C G A C C A G C T G |

Table 2.1: Restriction enzymes

Сайт рестрикции (участок узнавания) — короткая последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК, которая распознаётся ферментом эндонуклеазой рестрикции-модификации (рестриктазой).

Рестриктаза связывается с молекулой ДНК в точке расположения сайта рестрикции и перерезает цепочку нуклеотидов внутри сайта или в непосредственной близости от него.



Палиндром рестриктаз

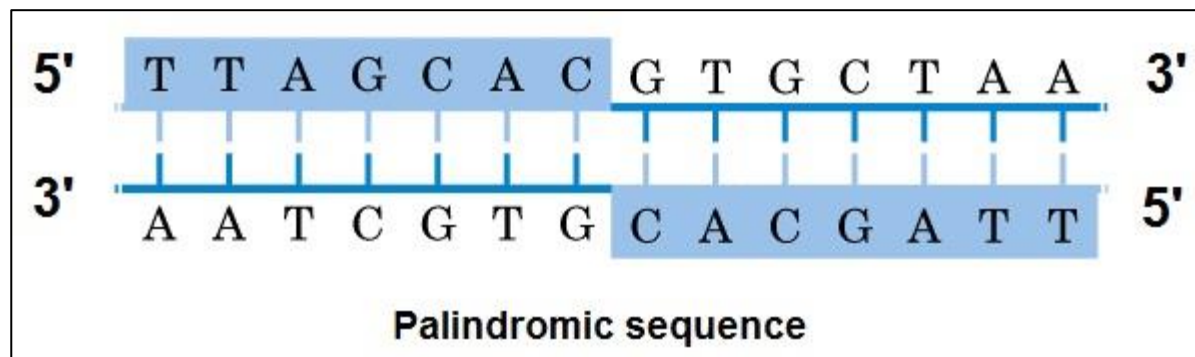
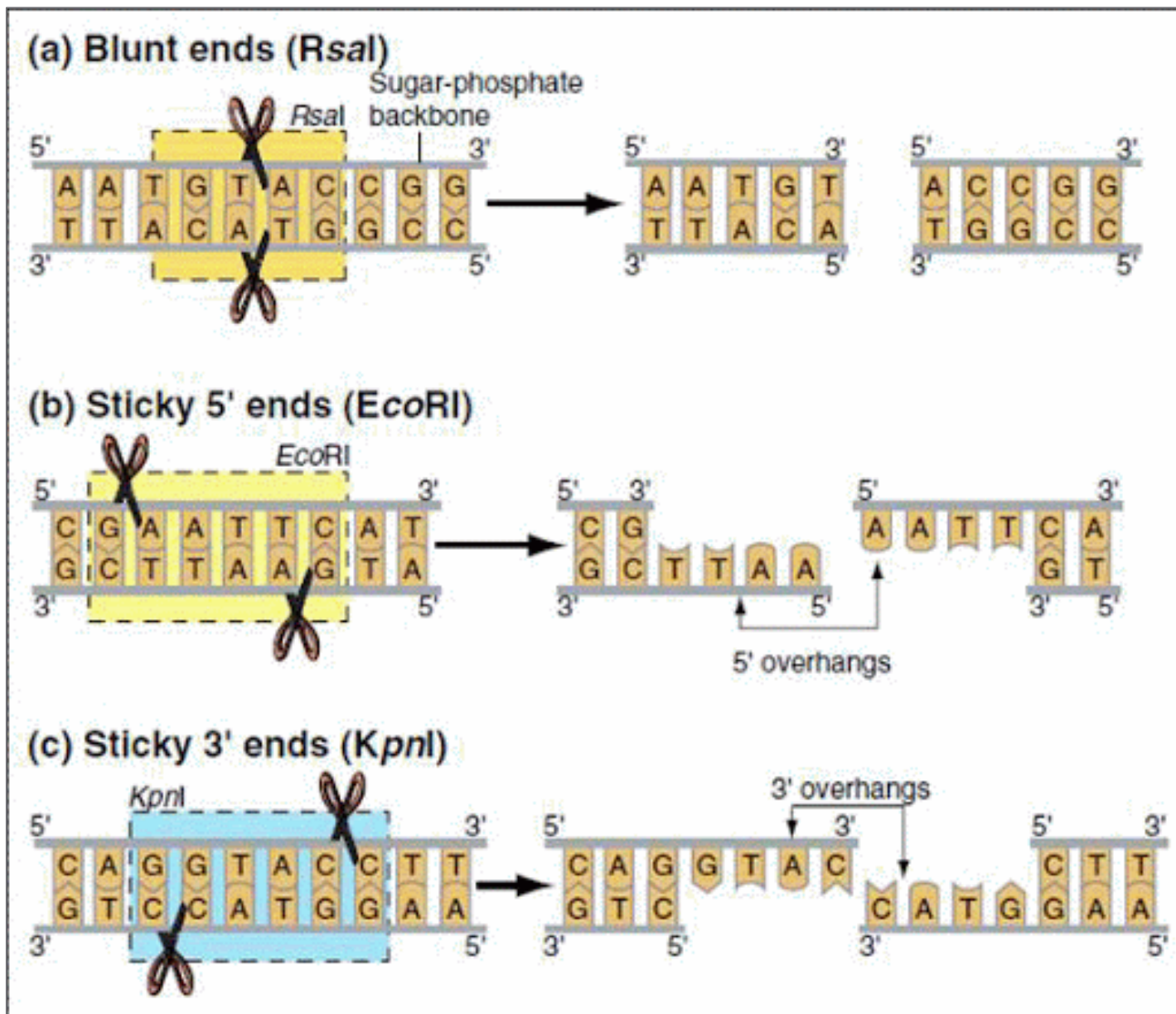


Таблица 1.3. Сводные данные об открытии рестриктаз

| Год | Рестриктазы | Прототипы |
|------|-------------|-----------|
| 1976 | 84 | 22 |
| 1980 | 227 | 54 |
| 1984 | 503 | 103 |
| 1986 | 710 | 126 |
| 1988 | 839 | 152 |
| 2002 | 3516 | 211 |

Виды концов фрагментов



Прототип – впервые открытый фермент, узнающий новую последовательность.

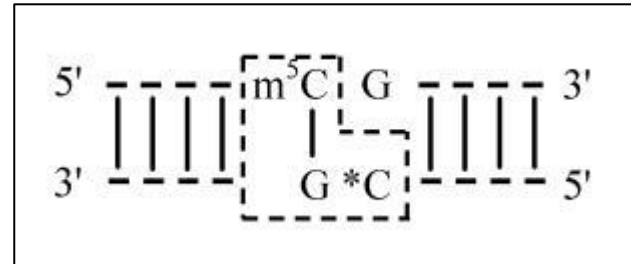
Изошизомеры — это пары эндонуклеаз рестрикции, имеющих специфичность к распознаванию одинаковых последовательностей, но иногда отличающихся по наличию метилированных нуклеотидных остатков, и разрезающих эти последовательности в одинаковых местах.

ДНК-метилтрансферазы - группа ферментов, катализирующих метилирование нуклеотидных остатков в составе ДНК.

Активность метилтрансфераз, заключающаяся в переносе метильных (CH₃-) групп на азотистое основание цитозин в составе ДНК, ведет к изменению свойств ДНК, при этом изменяется активность, функции соответствующих генов, а также пространственная структура нуклеиновой кислоты (конформация).

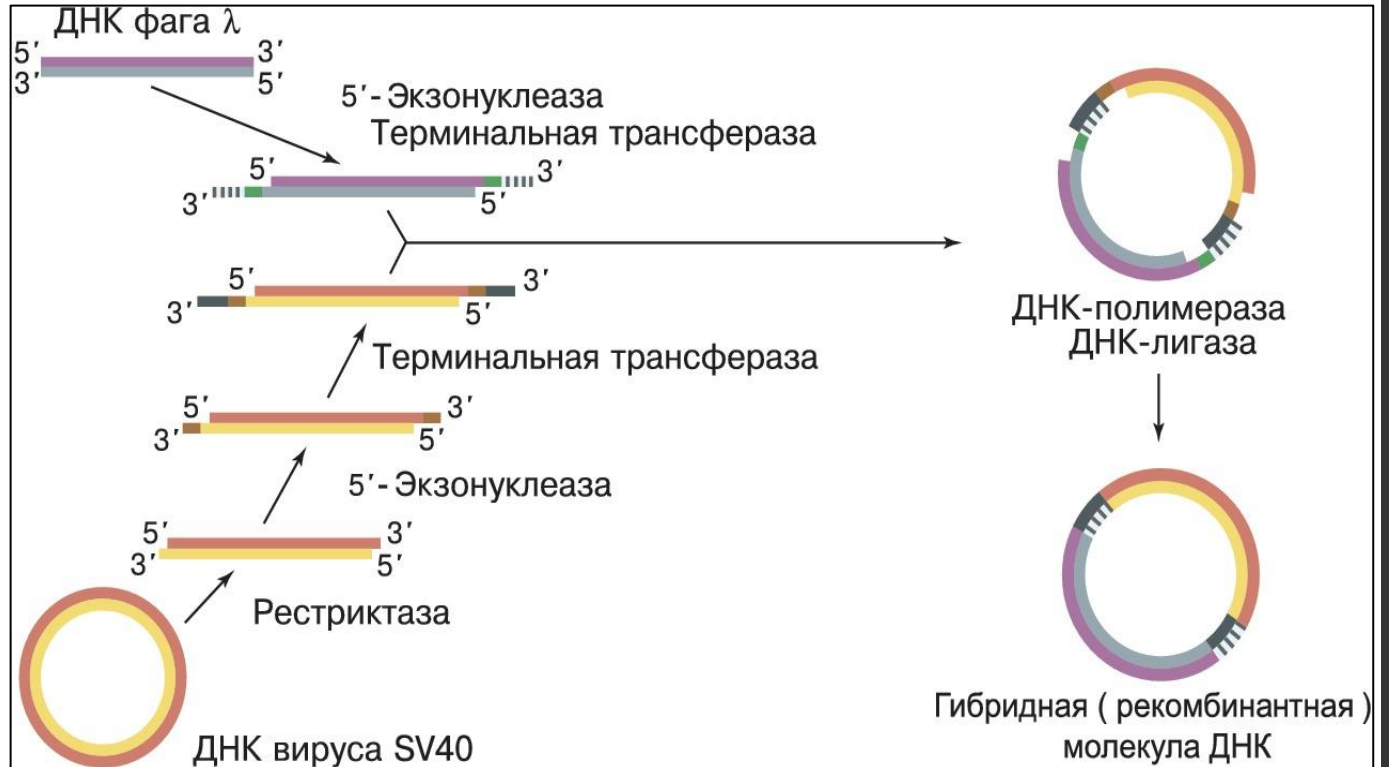
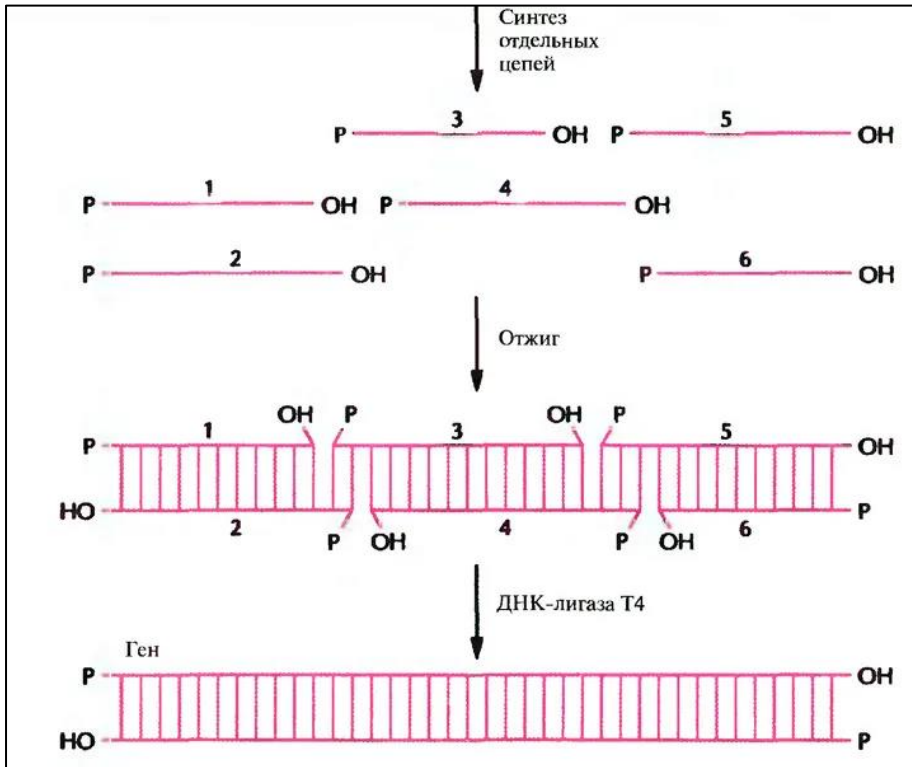
A quick review of relevant DNA methylation restriction enzymes.

| Product | DNA Methylation Application | Recognition Site |
|---------|--------------------------------|--|
| MspJI | Identify 5-hmC and 5-mC | 5'... ^m CNNR(n) ₉ ▼...3' 3'... GNNY(N) ₁₁ ▲...5' |
| LpnPI | Identify 5-hmC and 5-mC | 5'... C ^m CDG(N) ₁₀ ▼...3' 3'... GGHC(N) ₁₄ ▲...5' |
| FspEI | Identify 5-hmC and 5-mC | 5'... C ^m C(N) ₁₂ ▼...3' 3'... GG(N) ₁₆ ▲...5' |
| Dpnl | Identify 5-mA; used with DpnII | $ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ 5' \dots \text{GA} \downarrow \text{TC} \dots 3' \\ 3' \dots \text{CT} \text{AG} \dots 5' \\ \uparrow \\ \text{CH}_3 \end{array} $ |
| DpnII | Identify 5-mA; used with Dpnl | 5'... ▼GATC ...3' 3'... CTAG ▲...5' |
| McrBC | Identify 5-mC | 5'...Pu ^m C(N ₄₀₋₃₀₀₀)Pu ^m C...3' |
| MspI | Identify 5-mC; used with HpaII | 5'... C▼CGG ...3' 3'... GGC▲C...5' |
| HpaII | Identify 5-mC; used with MspI | 5'... C▼CGG ...3' 3'... GGC▲C...5' |



ДНК-лигаза

ДНК-лигазы (68 kDa) — ферменты (ЕС 6.5.1.1), катализирующие ковалентное сшивание цепей ДНК в дуплексе при репликации, репарации и рекомбинации. Они образуют фосфодиэфирные мостики между 5'-фосфорильной и 3'-гидроксильной группами соседних дезоксирибонуклеотидов в местах разрыва ДНК или между двумя молекулами ДНК (открыли в 1967 г.).



Дополнительные ферменты

- **Фосфатаза** — фермент, который катализирует дефосфорилирование субстрата (как правило другого белка) в результате гидролиза сложноэфирной связи фосфорной кислоты. При этом образуется фосфатный анион и молекула продукта с гидроксильной группой. По своему каталитическому и физиологическому действию фосфатаза является антагонистом **фосфорилазы** и **киназы**, которые присоединяют фосфатную группу к субстрату.
- **Протеинкиназы** — подкласс ферментов киназ (фосфотрансфераз). Протеинкиназы модифицируют другие белки путём фосфорилирования остатков аминокислот, имеющих гидроксильные группы (серин, треонин и тирозин) или гетероциклической аминокислоты гистидина.
- **Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза (ТдТ)**, также известная как ДНК нуклеотидилэкзотрансфераза (ДНЭТ) или терминальная трансфераза, это специализированная ДНК полимераза экспрессируемая в незрелых, пре-В, пре-Т лимфоцитах, и при остром лимфобластном лейкозе.
- **Т4 ДНК полимераза** и **Клёнов фрагмент** – ферменты тупирования ДНК.