



Restrikční mapování

Ildikó Németh, Marek Motola, Tomáš Merta

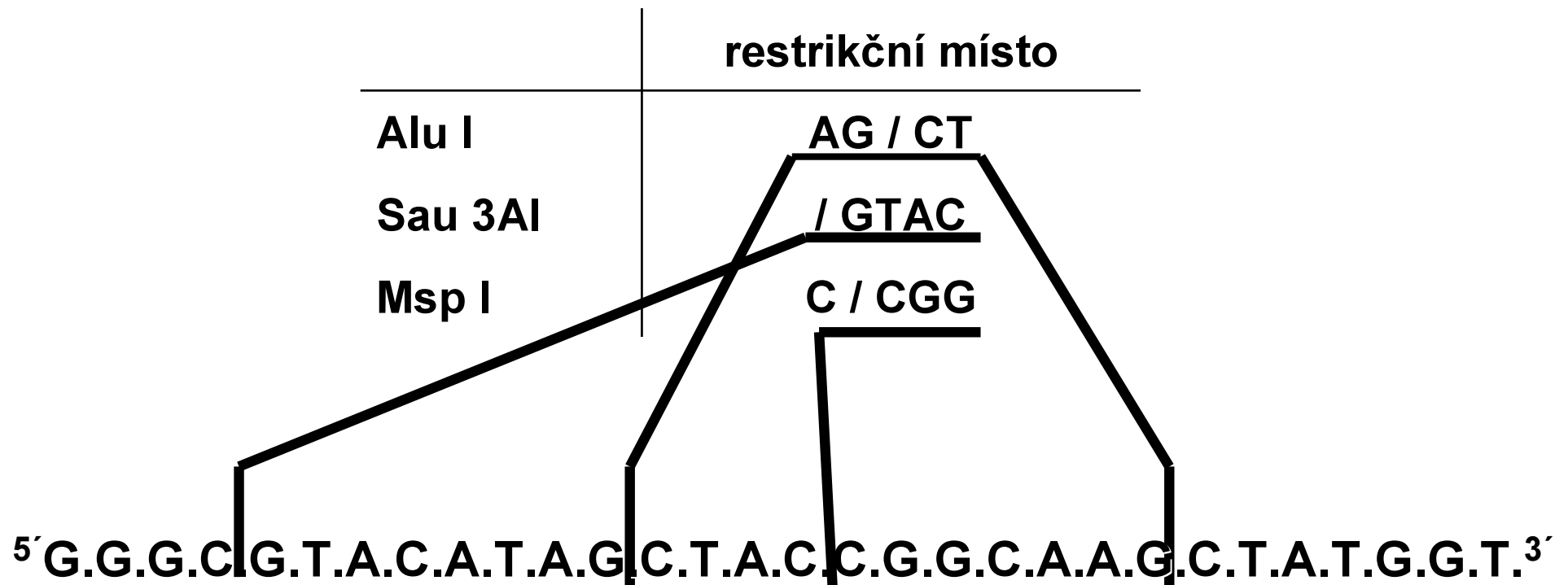
Co je to restriční štěpení?

- Rozštěpení DNA ve specifických restričních místech pomocí ENDONUKLEÁZ (restričních enzymů)

Restrikční endonukleázy

- Jsou enzymy bakteriálního původu
- Endonukleáza je enzym štěpící nukleovou kyselinu uvnitř řetězce na více kratších fragmentů
- Restrikční endonukleáza neštěpí DNA kdekoliv, ale rozpoznává specifickou dvouřetězcovou sekvenci bazí v molekule DNA
- Většina restrikčních enzymů má rozpoznávací místa, která se skládají ze čtyř nebo šesti párů bazí
- Při změně jediné báze dojde ke zrušení cílového místa a DNA zde tedy nebude štěpena
- Restrikčních endonukleáz je známo několik tisíc

Identifikace restričních míst



**např. Eco R1 – restriktáza izolovaná z
Escherichia coli, která specificky štípe v
sekvenci G^AAATTC**



AATGCTAATGCCTAGTCAAGCTTTCATCGAGAATTCCAGTCGAA
TTAGCTTTACGGATCAGTTCGAAAGTAGCTCTTAAGGTCAGCTT



AATGCTAATGCCTAGTCAAGCTTTCATCGAG
TTAGCTTTACGGATCAGTTCGAAAGTAGCTCTTAA

AATTCCAGTCGAA
GGTCAGCTT

- Štěpení vzorku genomové DNA enzymem EcoRI vytvoří soubor přibližně jednoho milionu fragmentů, z nichž každý má svůj konkrétní lokus v genomu
- Specifickou sekvenci tedy můžeme vyšetřit přibližně u jednoho milionu míst v genomu

Všechny molekuly DNA štěpené enzymem EcoRI mají identické jednořetězcové kohezní konce.

Ty jsou nezávislé na povaze sekvencí sousedících se specifickým místem enzymu EcoRI.

Prostřednictvím enzymu DNA-ligázy lze fragmenty vzniklé rozštěpením enzymem EcoRI spojovat dohromady *in vitro*

Vzniká tzv. rekombinantní molekula DNA

AATGCTAATGCCTAGTCAAGCTTTCATCGAG
TTAGCTTTACGGATCAGTTCGAAAGTAGCTCTTAA

AATTCCAGTCGAA
GGTCAGCTT

Restrikční enzym	Zdroj	Rozpoznávací sekvence*
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5'-G ^ GATC C-3' 3'-C CTAG ^ G-5'
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY 13	G ^ AATT C C TTAA ^ G
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GG ^ CC CC ^ GG
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d	A ^ AGCT T T TCGA ^ A
<i>Not</i> I	<i>Nocardia otitidis-cavarium</i>	GC ^ GGCC GC CG CCGG ^ CG
<i>Sau</i> 3A	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A	^ GATC CTAG ^
<i>Sst</i> II	<i>Streptomyces stanford</i>	CC GC ^ GG GG ^ CG CC

Kohezní konec



Zarovnaný konec

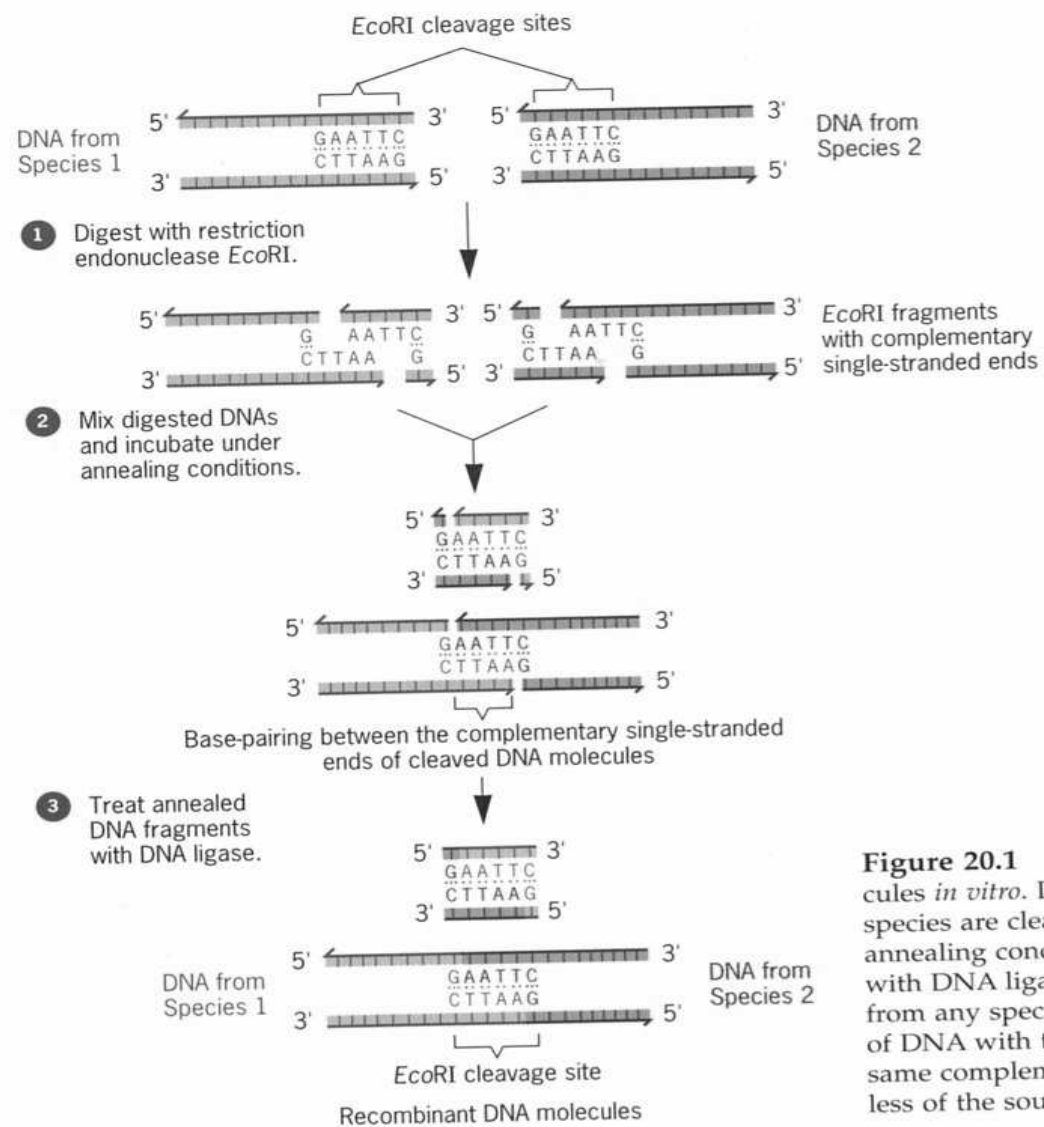


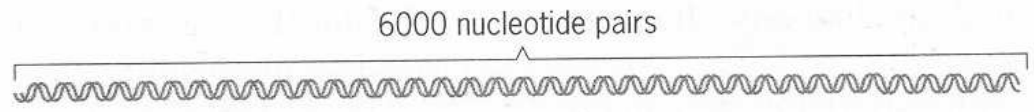
Figure 20.1 *in vitro*. DNA molecules from any species are cleaved with DNA ligase from any species of DNA with the same complementary ends of the source.

Vektory

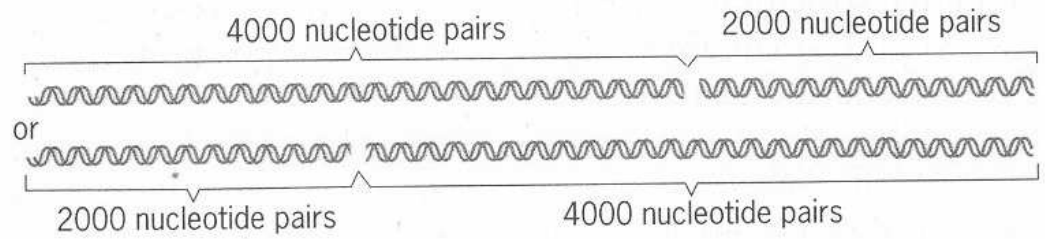
- Deriváty virových chromosomů a plasmidů
- Vystřižnutá nukleotidová sekvence se vkládá do vektoru za účelem její replikace
- Plazmidový vektor-dvouřetězcová molekula DNA od 1kb do 200kb
- Obsahují pouze jedno restrikční místo pro danou endonukleázu

Restrikční mapy

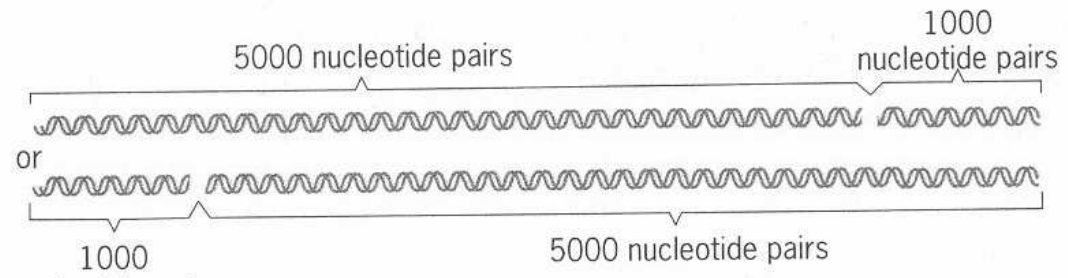
- Při použití více endonulkeáz zostříháme molekulu DNA na kratší fragmenty - jejich délka 10^2 - 10^3 bází
- Vzniklé fragmenty je možno rozdělit podle jejich délky gelovou elektroforézou
- Nejkratší úseky dojedou nejdál



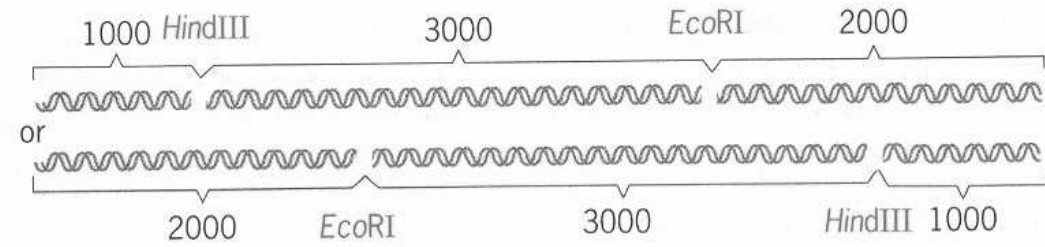
(a) Not cut



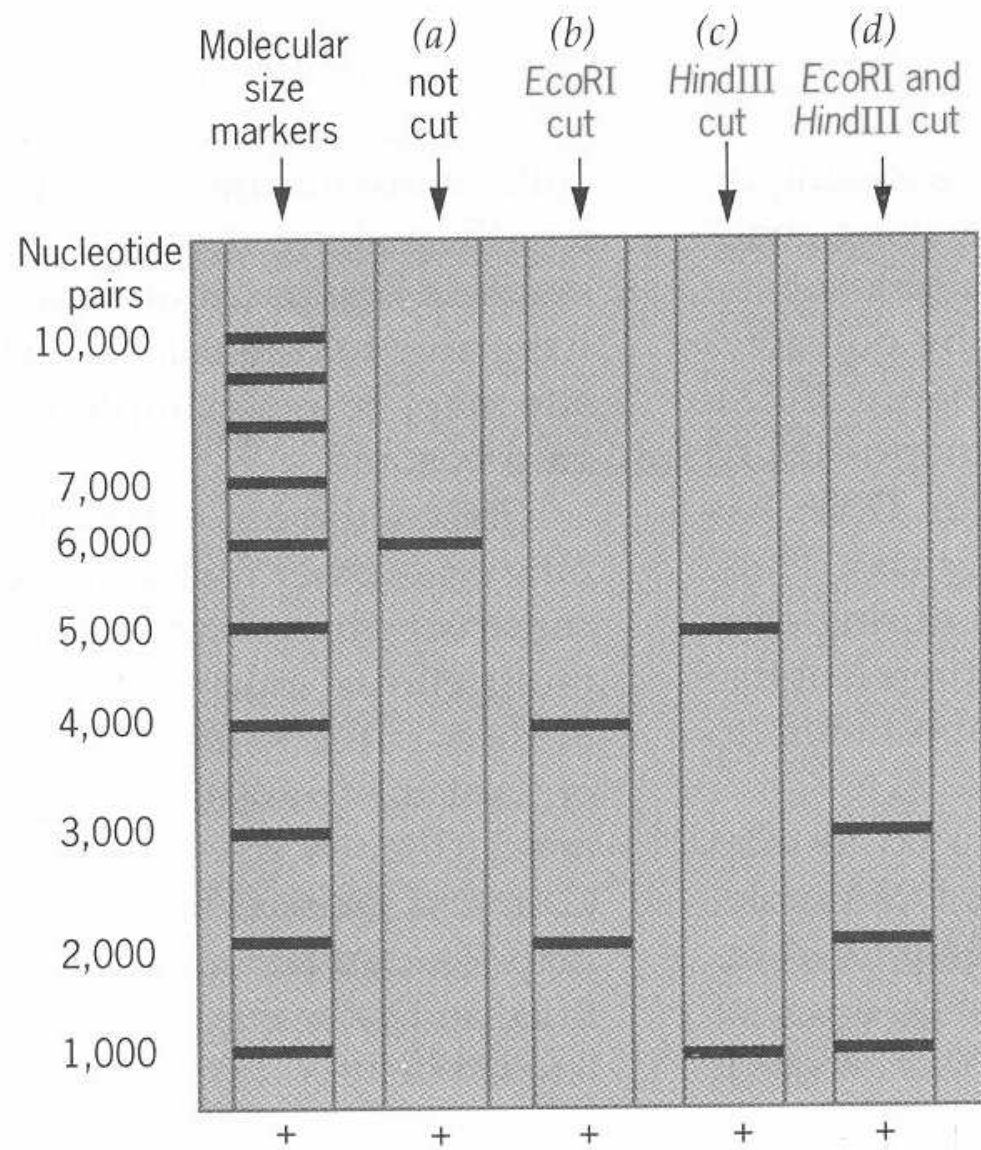
(b) *EcoRI* cut



(c) *HindIII* cut



(d) *EcoRI* and *HindIII* double cut



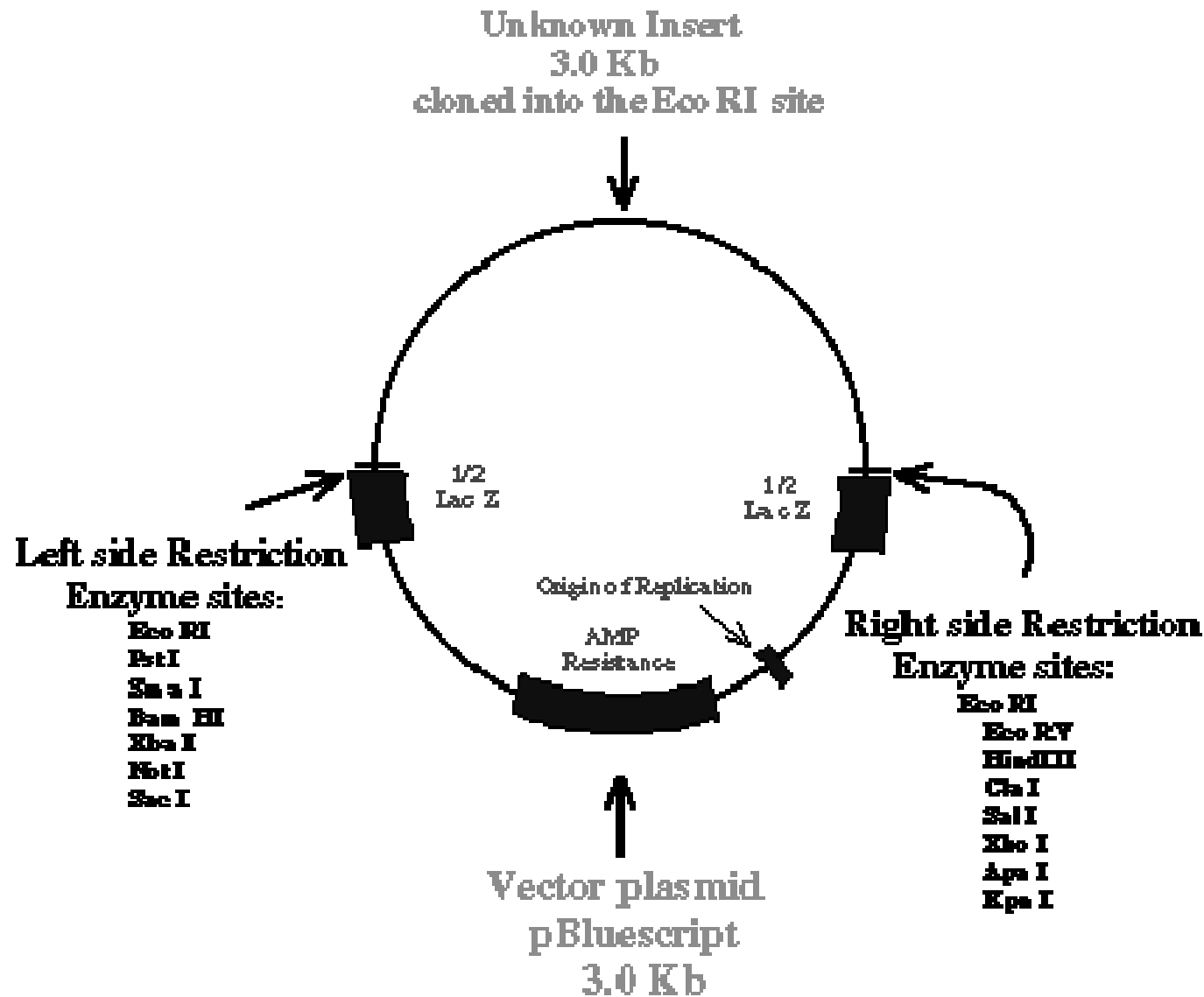
(e)

Jako na to?

- 1.krok: Odhadneme veľkosť zotrihnanej DNA v bp (párů bází) pomocí markrů
- 2.krok: Zistíme priemernú veľkosť DNA-víme totiž, že DNA je stále rovnaká i když se štěpí více restriktázami
- 3.krok: Postupne na DNA působíme nejdříve jednou restriktázou, následně 2 a potom můžeme pokračovat případně i s vícerymi pro lepší šecifickost'
- 4.krok: Elektroforeticky zistíme velikosti sekvencí, na které nám restriktázy rozstihali molekulu DNA
- 5.krok: Vytvoríme logickou kombináciu údajů z elektroforézy a zakreslíme mapu

- Pře vytvoření restrikční mapy DNA sa používajú špeciálne restriktázy a taky sa nepracuje s cirkulárnou molekulou DNA-ktorá sa často objavuje vo výskumných prácach pre svoju „lehkú“ skúmatelnost-ale precujeme s lineárnou molekulou na ktorej je tento proces namáhavější

I takhle vyzerá restriční mapa:



Při mutaci na restrikčním místě

- Endonukleáza nenalezne restrikční místo tudíž nemůže DNA v daném místě rozštěpit
- Vzniklé fragmenty mají jiné délky než fragmenty DNA která nepodlehla mutaci
- Porovnáním těchto fragmentů lze zjistit případné mutace

Využití

- Jeden z prvních kroků při charakterizaci DNA o neznámé sekvenci
- Využití v lékařské genetice v technologii rekombinantní DNA
- Vyšetření specifické sekvence nukleotidů v rámci restričních míst pro danou endonukleázu v genomu
- Tvorba rekombinantní molekuly DNA, jejíž jeden konec pochází z jednoho a druhý konec z druhého zdroje DNA (např. výroba lidského inzulinu in vitro)