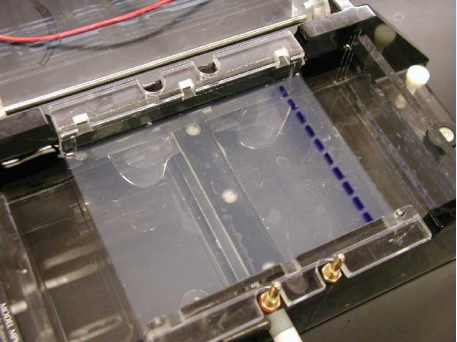


Электрофорез ДНК в агарозном геле

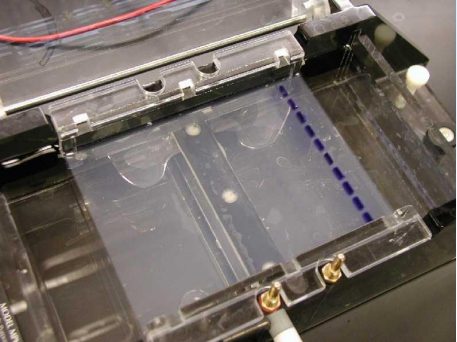




Электрофорез ДНК в агарозном геле



Катод?
Анод?



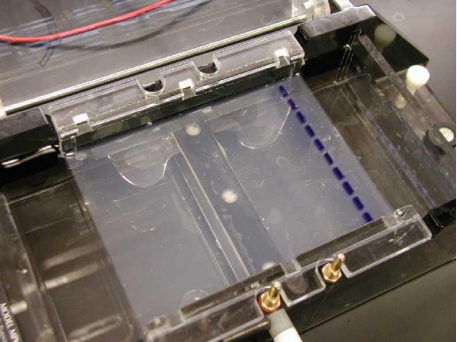
Электрофорез ДНК в агарозном геле



Катод?
Анод?

анод — электрически положительный
полюс

катод — электрически отрицательный
полюс



Электрофорез ДНК в агарозном геле

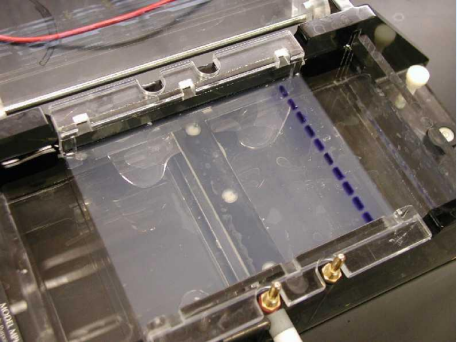


Катод?
Анод?

анод — электрически положительный
полюс

катод — электрически отрицательный
полюс

Куда движется ДНК? Как она заряжена?



Электрофорез ДНК в агарозном геле



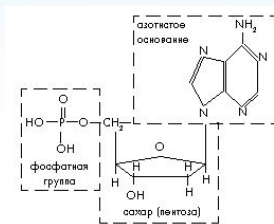
Катод?
Анод?

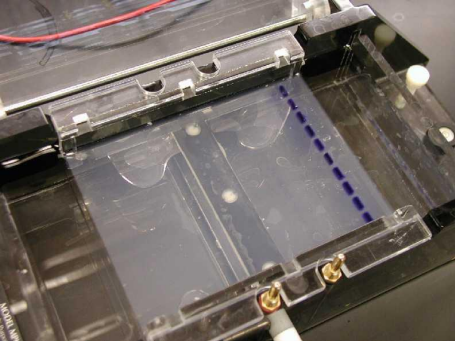
анод — электрически положительный
полюс

катод — электрически отрицательный
полюс

Куда движется ДНК? Как она заряжена?

Благодаря заряду фосфатных групп, **ДНК** имеет отрицательный заряд.





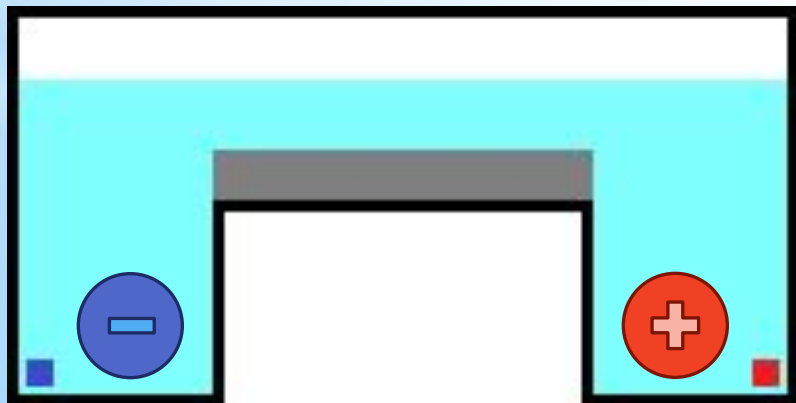
Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез (от электро- и др.-греч. φορέω — «переносу») — направленное движение коллоидных частиц или ионов под действием электрического тока



Куда движется ДНК? Как она заряжена?

Благодаря **заряду** фосфатн



анод — электрически положительный
полюс

Катод?

Анод?

катод — электрически отрицательный
полюс

Источник тока



Вольтаж

Сила тока – A
Напряжение – V
Сопротивление – R

закон Ома:

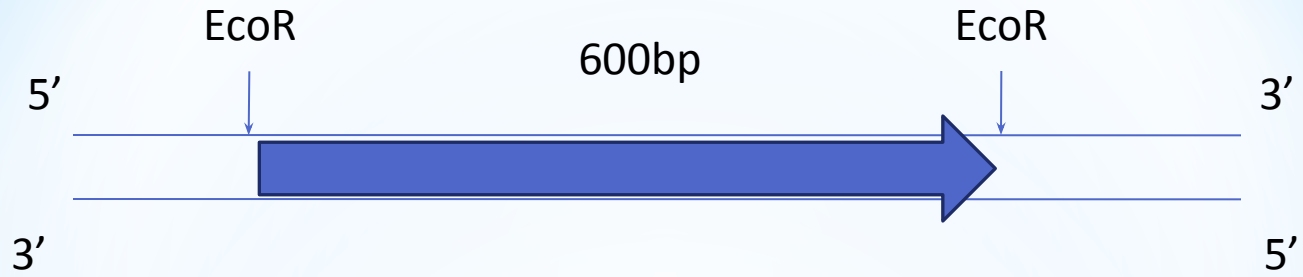
Enzyme		Cat#	Temp	Supplied NEBuffer	Supplements		% Activity in NEBuffer				
					BSA	SAM	1	2	3	4	EcoRI
BamHI*		R0136	37°C	NEBuffer 3	Yes	No	75	100	100	100	100
MluI		R0198	37°C	NEBuffer 3	No	No	25	75	100	50	100

Буферные растворы

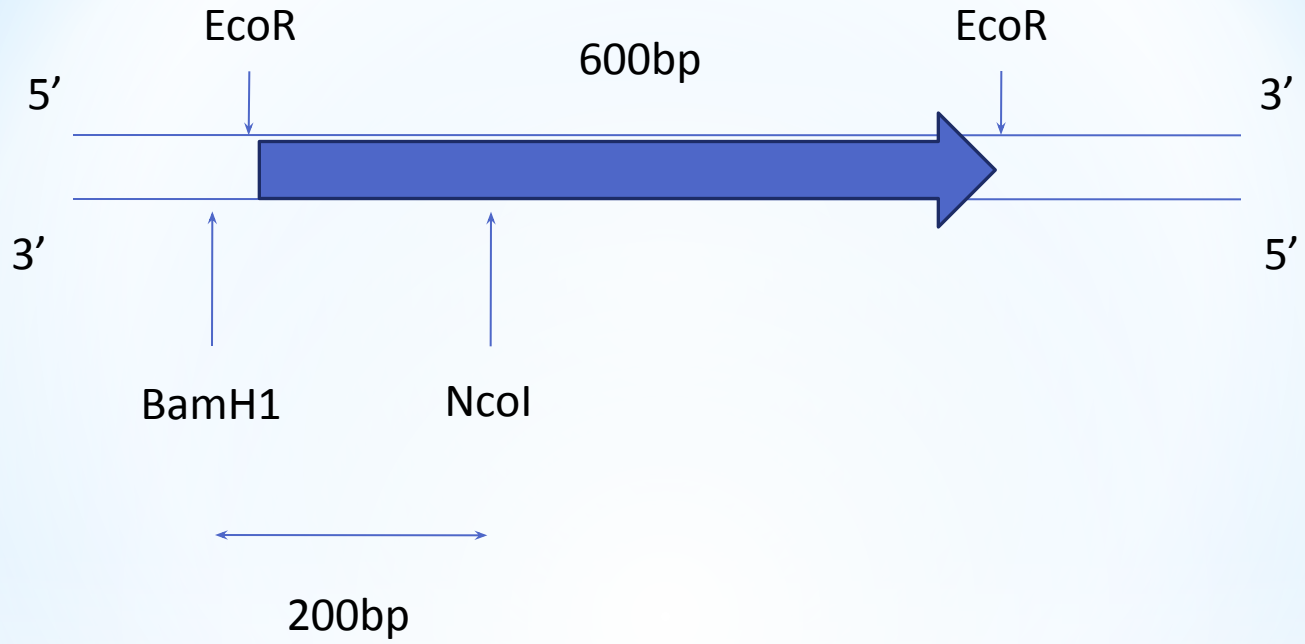
Enzyme		Cat#	Temp	Supplied NEBuffer	Supplements		% Activity in NEBuffer				
					BSA	SAM	1	2	3	4	EcoRI
AciI		R0551	37°C	NEBuffer 3	No	No	25	50	100	50	100
ApaI		R0114	25°C	NEBuffer 4	Yes	No	25	50	0	100	5

Aor13HI	T/CCGGA	<u>BspEI</u>	R0540	T/CCGGA	AccIII, BseAI, Bsp13I, BspEI, Kpn2I, MroI
---------	---------	--------------	-------	---------	---

РЕСТРИКЦИОННЫЕ КАРТЫ

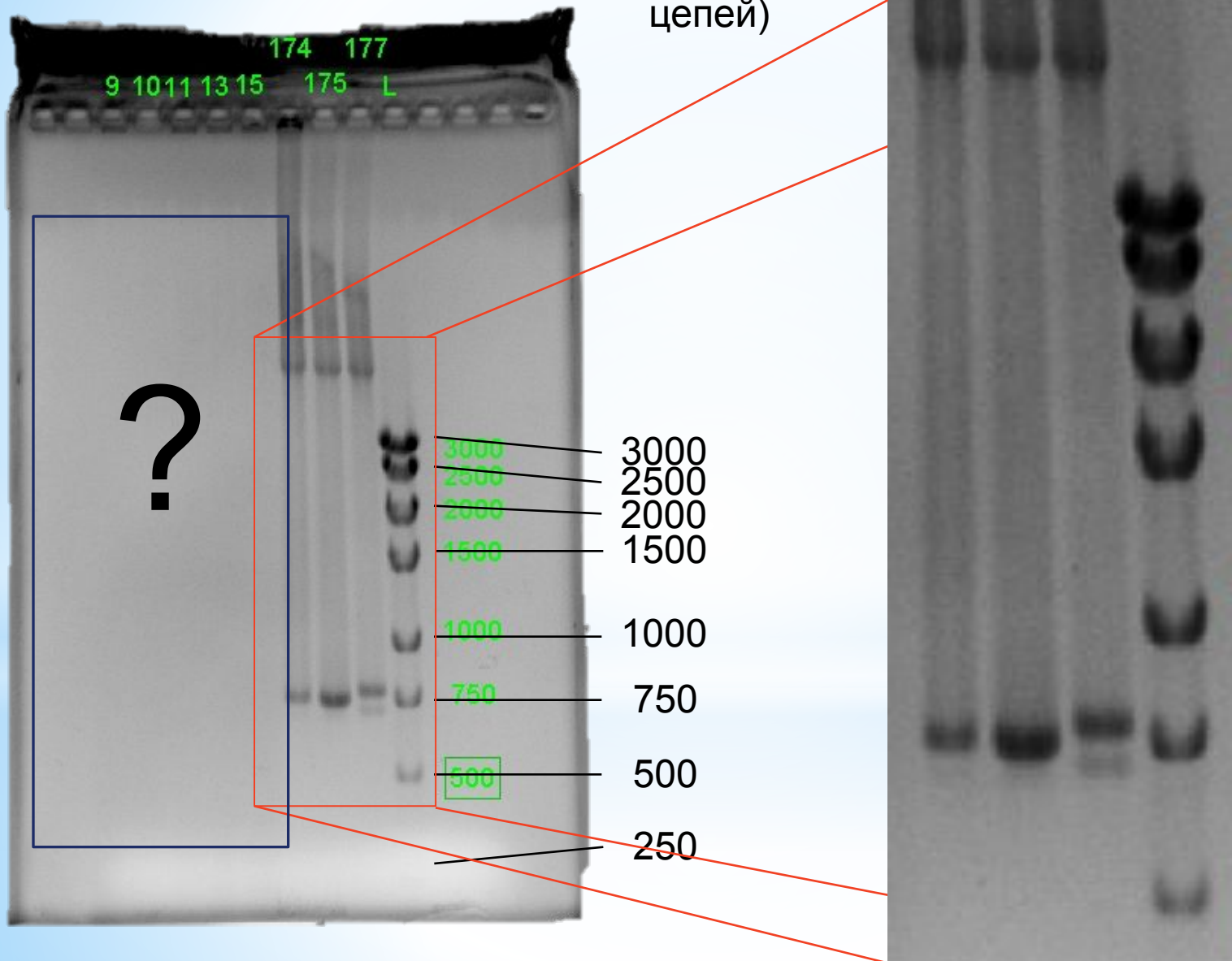


РЕСТРИКЦИОННЫЕ КАРТЫ



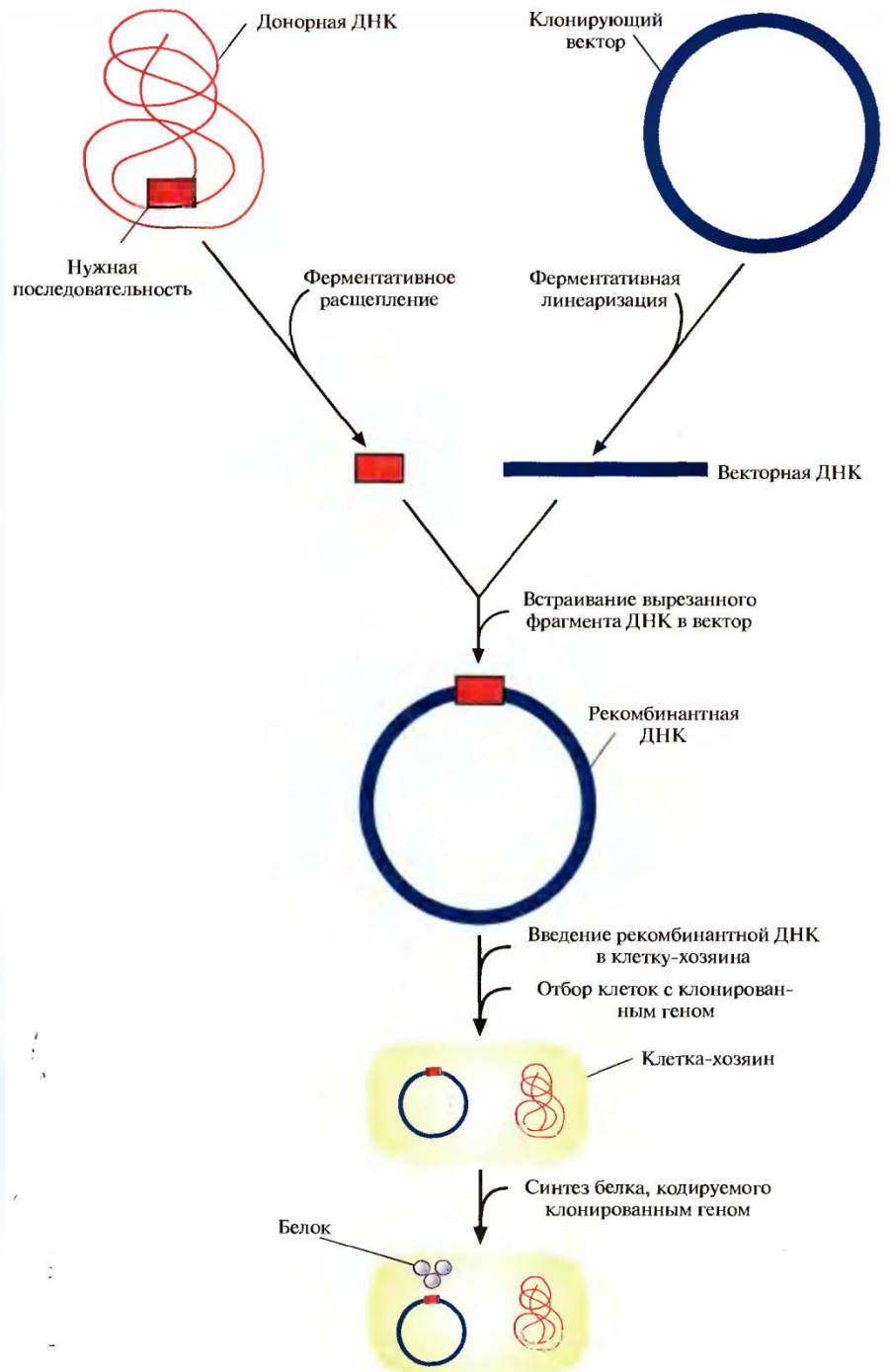
Результат ПЦР от 03.12.13

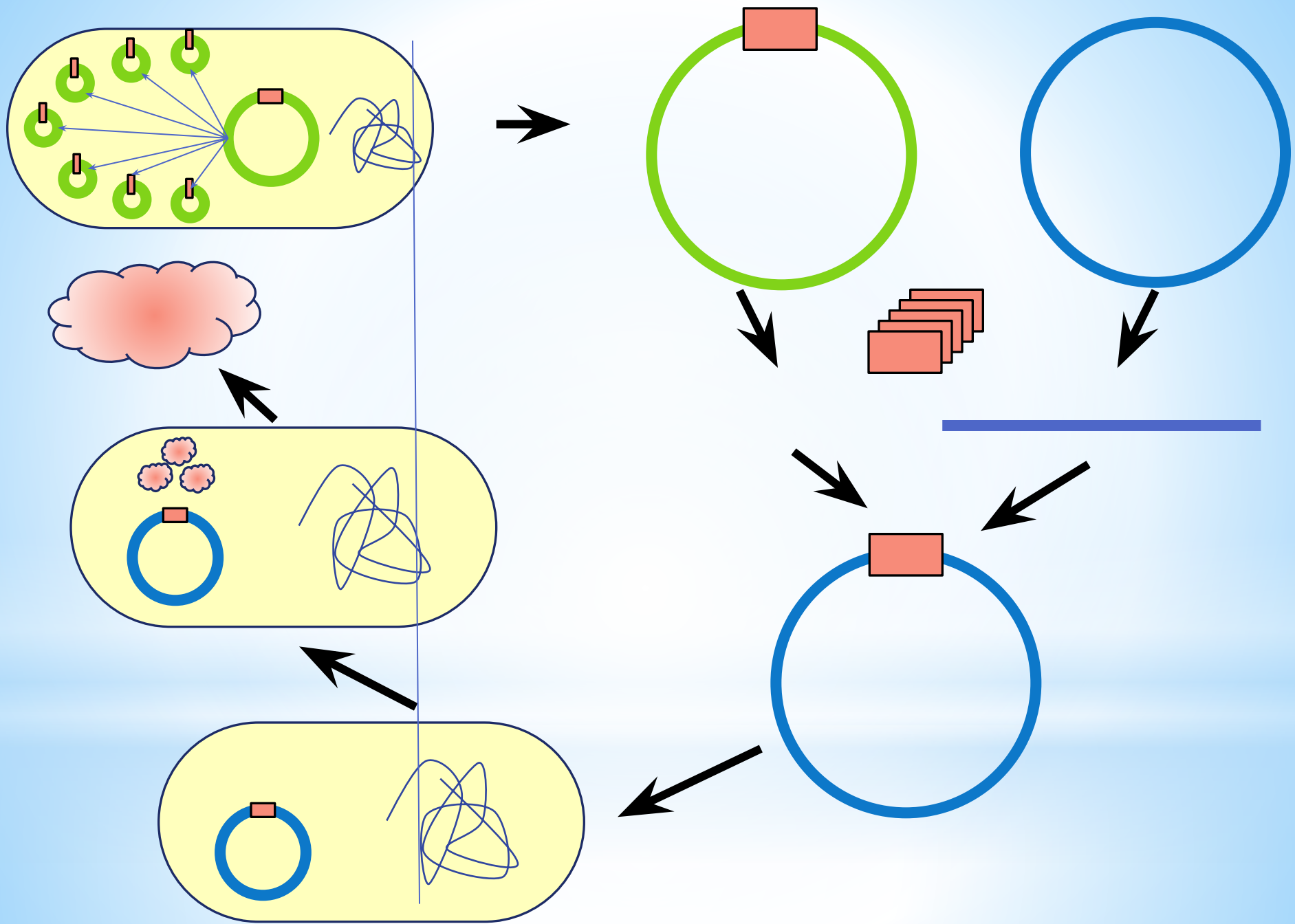
Аmplицировали кДНК одноцепочечного антитела при помощи ПЦР (одноцепочечное антитело состоит из переменных участков тяжелой и легкой цепей)



План работ

- ✓ 1. Получение (выделение) нужного нам гена
2. Линеаризация вектора
3. Лигирование (встраивание) гена в вектор
4. Приготовление компетентных клеток
5. Электропорация (внедрение) вектора с нашим геном в компетентные клетки
6. Синтез и выделение белка





ФГБУН Институт экологии человека
Сибирского отделения
Российской академии наук

Лаборатория биотехнологии

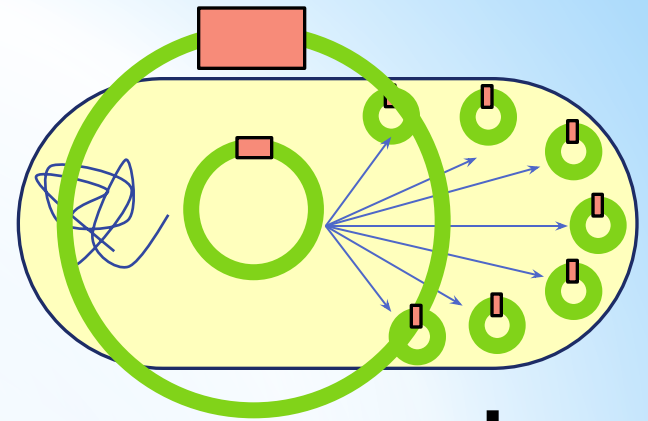


Кемерово
2014

План работ

1. Выделение и очистка ДНК ✓
2. ПЦР ✓
3. Рестрикция вектора ✓
4. Лигирование - сшивание гена с вектором ✓
5. Электропорация (внедрение) вектора с геном в компетентные клетки ✓
6. Экспрессия белка ✓
7. Выделение и очистка белка ✓

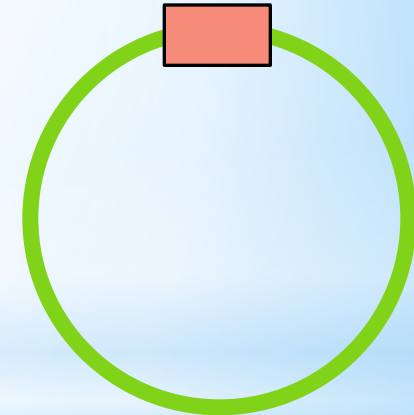
Вектор для наработки ДНК

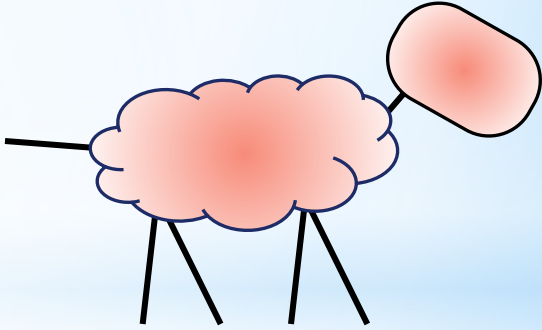
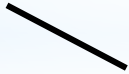


Выделение и очистка ДНК



ПЦР
ферментативное копирование
фрагмента ДНК





$$\lg m = \lg m_0 - Krt$$

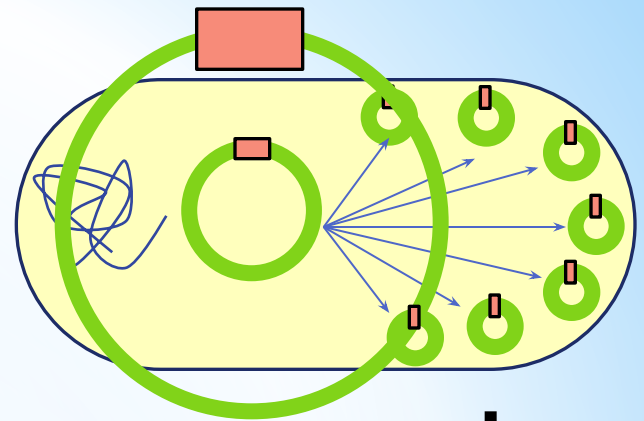
Зависимость концентрации агарозного геля от длины ДНК и вида буфера

AGAROZA Reakcyjna:		
Zakres masy rozdzielanych fragmentów	Końcowe stężenie żelu	
	Bufor 1x TAE	Bufor 1x TBE
500 pz – 1000 pz	2,50%	2,00%
150 pz – 700 pz	3,00%	2,50%
100 pz – 450 pz	3,50%	3,00%
70 pz- 200 pz	4,00%	3,50%
10 pz - 100 pz	4,50%	4,00%
8 pz – 50 pz	5,00%	4,50%

1. Выделение и очистка ДНК ✓
2. ПЦР ✓
3. Рестрикция вектора
4. Лигирование - сшивание гена с вектором
5. Электропорация (внедрение) вектора с геном в компетентные клетки
6. Экспрессия белка
7. Выделение и очистка белка

План работ

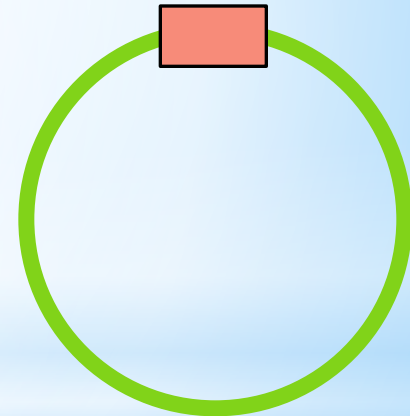
Вектор для наработки ДНК



Выделение и очистка ДНК

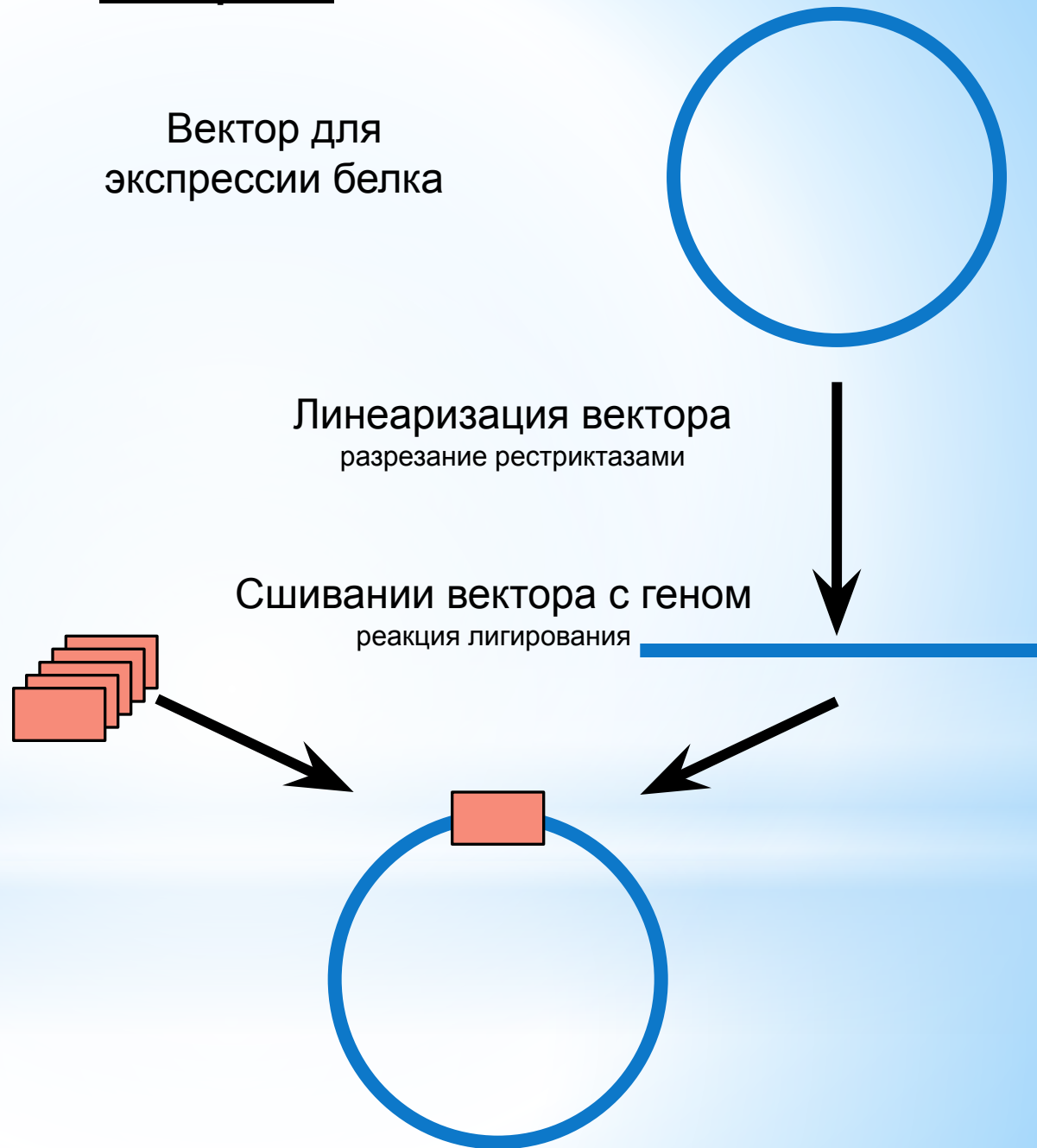


ПЦР
ферментативное копирование
фрагмента ДНК



План работ

1. Выделение и очистка ДНК ✓
2. ПЦР ✓
3. Рестрикция вектора ✓
4. Лигирование - сшивание гена с вектором ✓
5. Электропорация (внедрение) вектора с геном в компетентные клетки
6. Экспрессия белка
7. Выделение и очистка белка

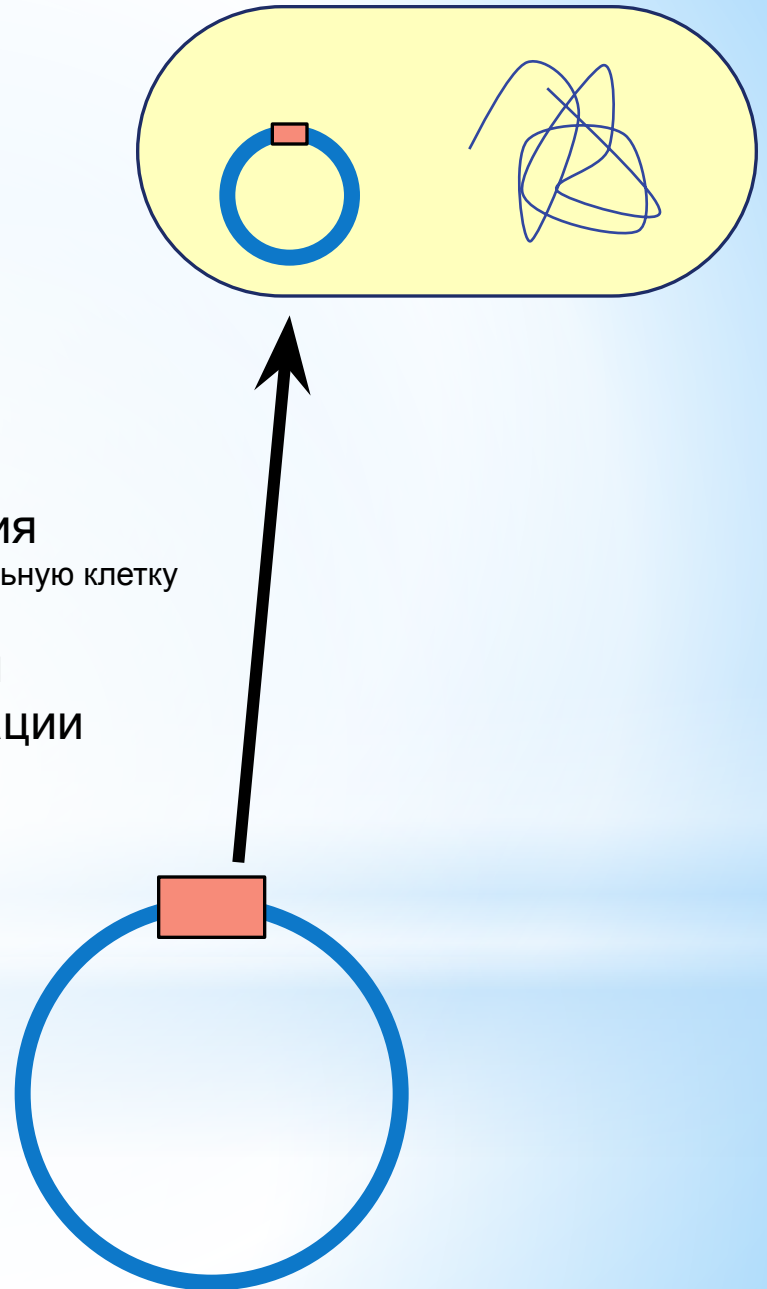


План работ

1. Выделение и очистка ДНК ✓
2. ПЦР ✓
3. Рестрикция вектора ✓
4. Лигирование - сшивание гена с вектором ✓
5. Электропорация (внедрение) вектора с геном в компетентные клетки ✓
6. Экспрессия белка
7. Выделение и очистка белка

Трансфекция
введения ДНК в бактериальную клетку

Методом
электропорации

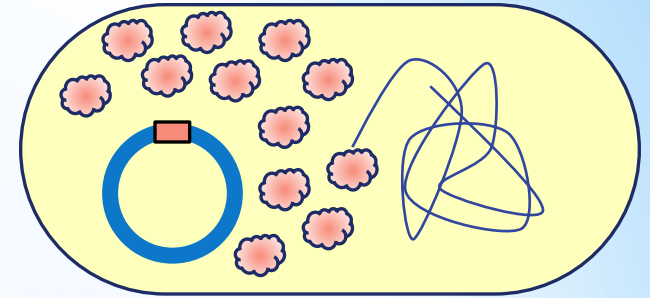


План работ

1. Выделение и очистка ДНК ✓
2. ПЦР ✓
3. Рестрикция вектора ✓
4. Лигирование - сшивание гена с вектором ✓
5. Электропорация (внедрение) вектора с геном в компетентные клетки ✓
6. Экспрессия белка ✓
7. Выделение и очистка белка ✓

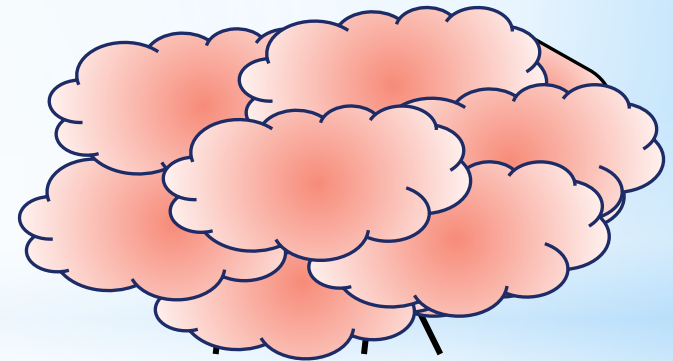
Экспрессия белка

Создание условий для наработки белка



Выделение и очистка белка

Готовый белковый продукт



21 октября

Измерение концентрации ДНК

ПЦР

Форез

- 10:00-11:00 – лекция
- 11:00-13:00 – определение концентрации выделенной ДНК
- 13:00-13:30 – обед
- 13:30-14:00 – ПЦР
- 14:00-15:00 – лекция
- 15:00-16:00 – форез

Спектрофотометрия препаратов днк, рнк и белков

Спектрофотометрия – физико-химический метод исследования растворов и твердых веществ, основанный на изучении поглощения в различных областях спектра.

С помощью спектрофотометра можно точно и быстро определить концентрацию ДНК, а также степень ее чистоты. Для этого измеряют оптическую плотность раствора ДНК при длине волны 260 нм.

А для оценки чистоты препарата ДНК, проводят измерения оптической плотности раствора еще и при 280 и 235 нм, т.е. на максимумах поглощения растворов белков и полисахаридов, соответственно.

Значение соотношения $A_{260}/280$ для чистой ДНК должно быть больше 1,8, значение $A_{260}/235$ должно быть больше, чем 2,2.

Одна (каждая) оптическая единица соответствует концентрации:

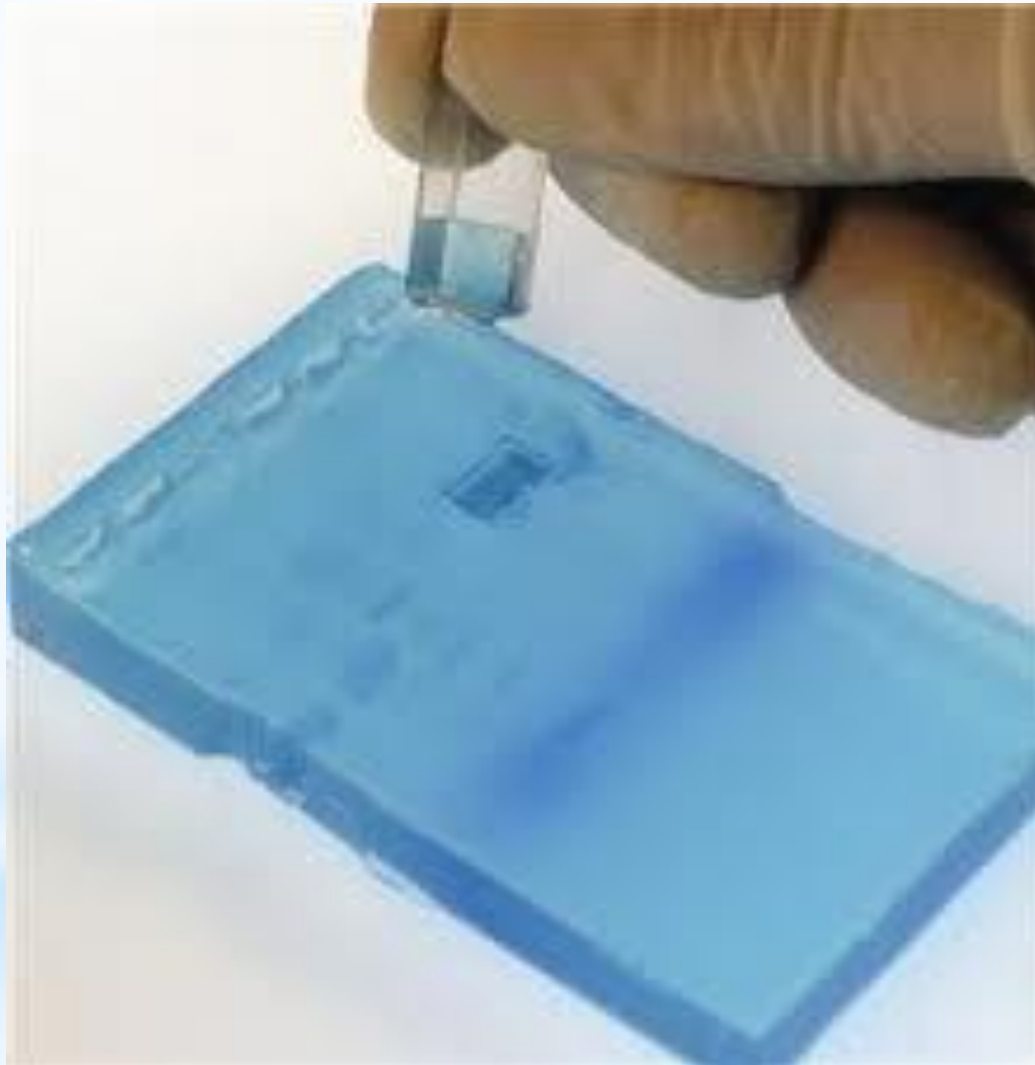
dsDNA (двуцепочечная ДНК) в 50 мкг/мл

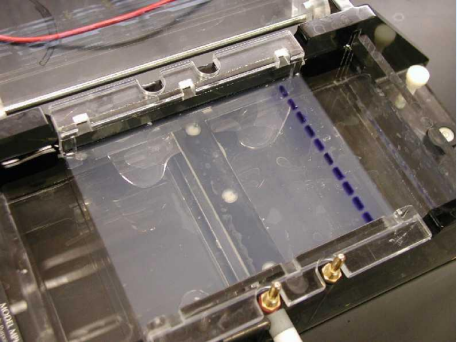
ssDNA (одноцепочечная ДНК) в 37 мкг/мл

ssRNA (одноцепочечная РНК) в 40 мкг/мл

Нижний предел концентрации ДНК, которую можно определить спектрофотометрически, составляет 0,1 мкг/мл.

Все о электрофорезе ДНК в агарозном геле





Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез (от электро- и др.-греч. φορέω — «переносу») — направленное движение коллоидных частиц или ионов в жидкой среде под действием электрического поля



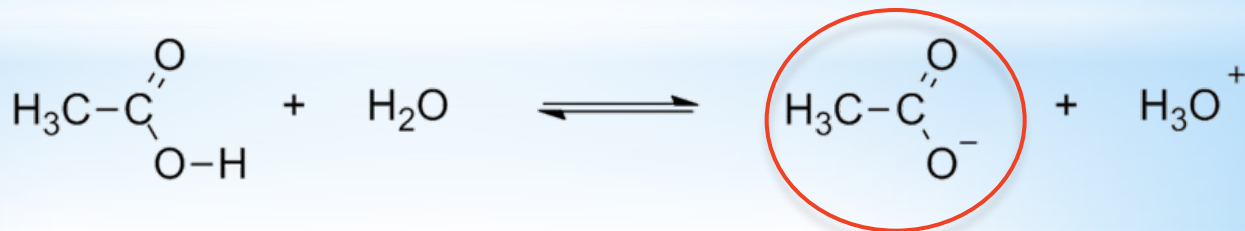
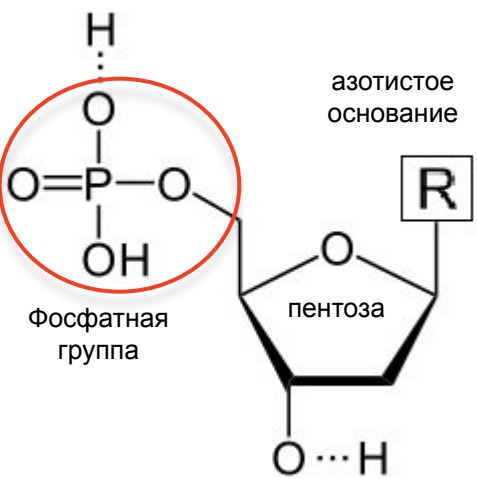
Впервые это явление было открыто профессором ~~Катод~~ ~~Аноды~~ ~~Московского университета~~ П.А. Страховым и Ф.Ф. Рейссом в 1809 году.



Куда движется ДНК?

Как она заряжена?

В протонной теории кислот и оснований Брэнстеда — Лоури, кислотой называется соединение или ион, способное отдавать протон другому химическому соединению — основанию.



Благодаря суммарному заряду всех **фосфатных** групп, **ДНК** имеет большой отрицательный **заряд**.

Электрофорез

Электрофорез в агарозном геле является стандартным методом для разделения, идентификации и очистки молекул ДНК и их фрагментов

Электрофорез

Камера для проведения горизонтального фореза

Подложка для геля

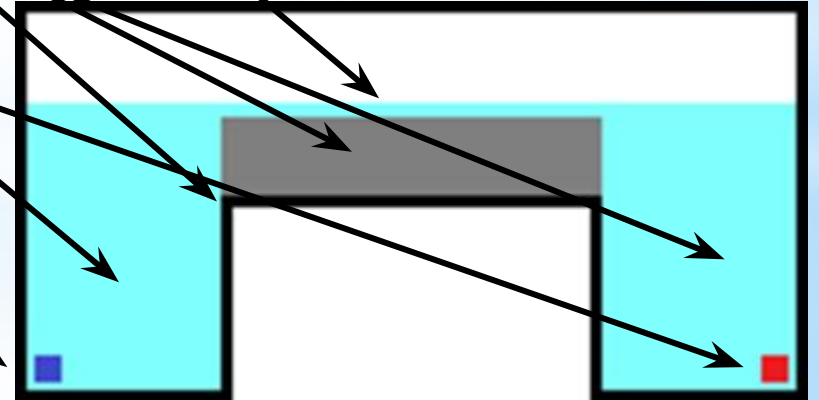
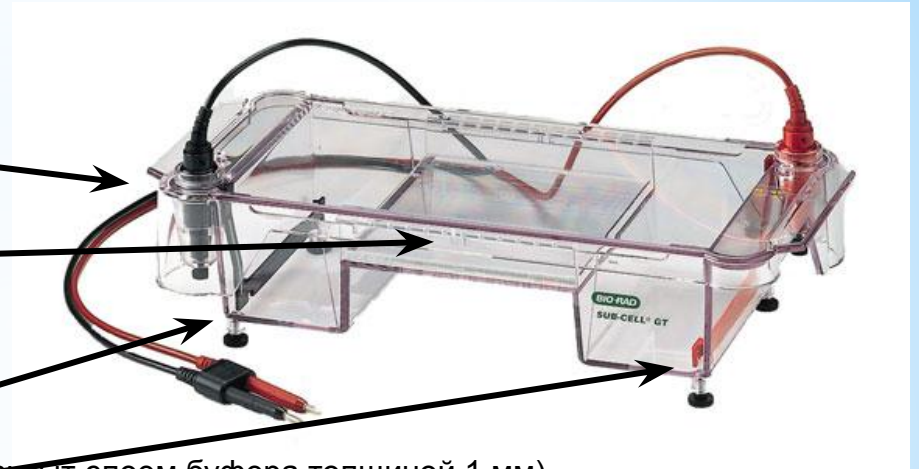
Агарозный гель

Буферный раствор

Электроды

Всегда помните, что ДНК бежит от «-» к «+»,
от черного электрода к красному

(гель должен быть закрыт слоем буфера толщиной 1 мм)



Электрофорез

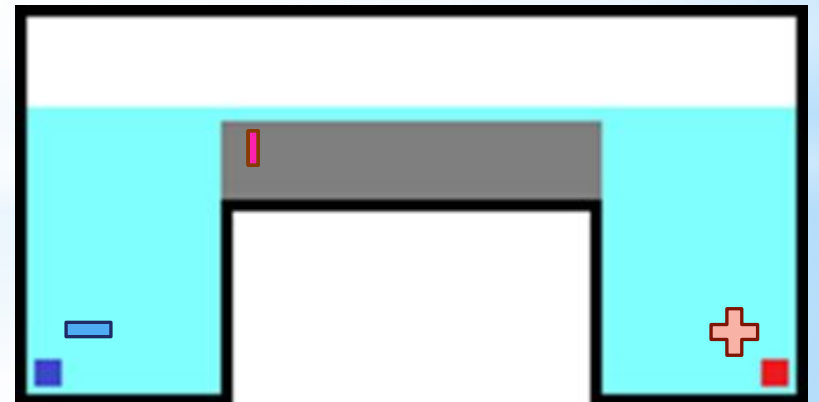
Камера для проведения горизонтального фореза

Подложка для геля

Агарозный гель

Буферный раствор

Электроды



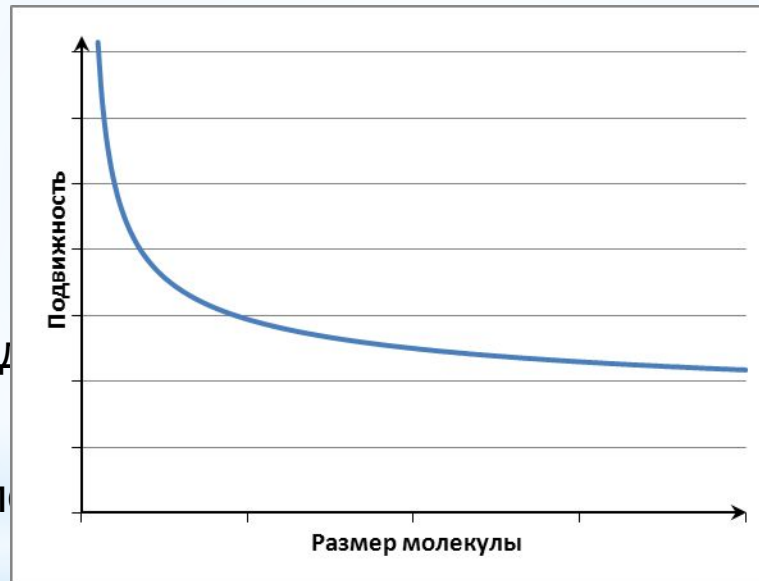
Электрофорез

Скорость миграции ДНК через поры агарозного геля называется **электрофоретической подвижностью** и определяется несколькими параметрами

Размер молекул ДНК

Чем больше размер, тем меньше электрофоретическая подвижность, крупные молекулы движутся медленнее из-за большего сопротивления

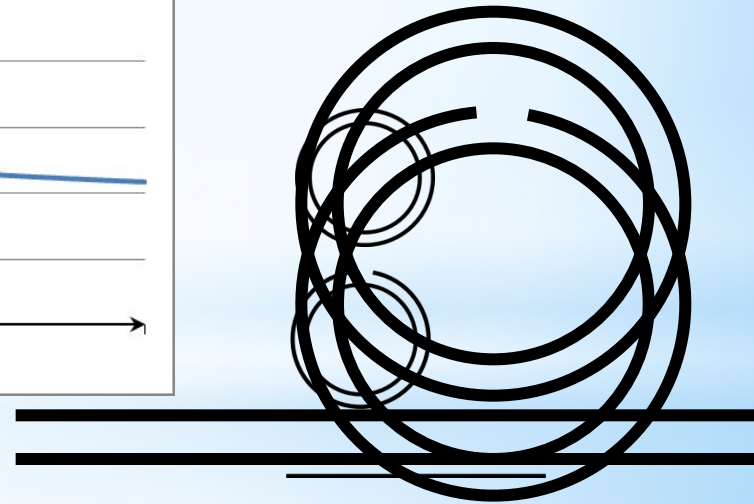
Скорость обратно пропорциональна десятичному логарифму молекулярной массы (M_w) ДНК



кольцевая неповрежденная

кольцевая с одноцепочечным участком

линейная – форма III



Состав оснований и температура

Электрофоретическая подвижность в **агарозном геле** практически **не зависит** от состава оснований

В области температур 4 – 30 °С изменения подвижности ДНК не наблюдаются

Напряженность электрического поля

Это сила, действующая на точечный заряд, помещенный в данную точку поля

Единицы измерения: В/см

Напряженность ЭП для электрофореза обычно составляет 1 – 8 В/см
наилучшее разделение при 5 В/см

При более высокой напряженности могут изогнуться полосы ДНК или расплавятся небольшие фрагменты ДНК

Напряженность электрического поля

Источник тока



Изменяемые параметры

Напряжение – U (Volt)

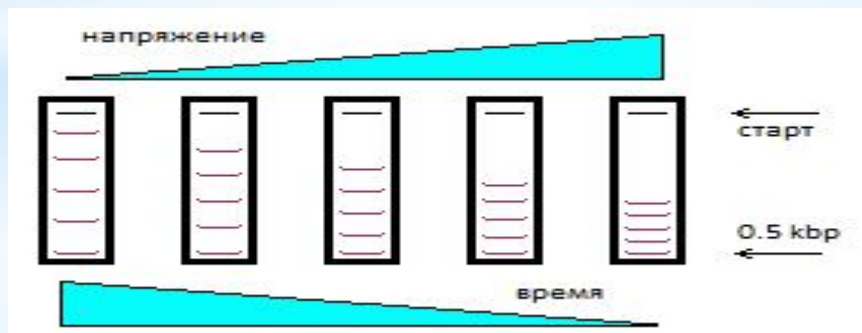
или

Сила тока – I (Amper)

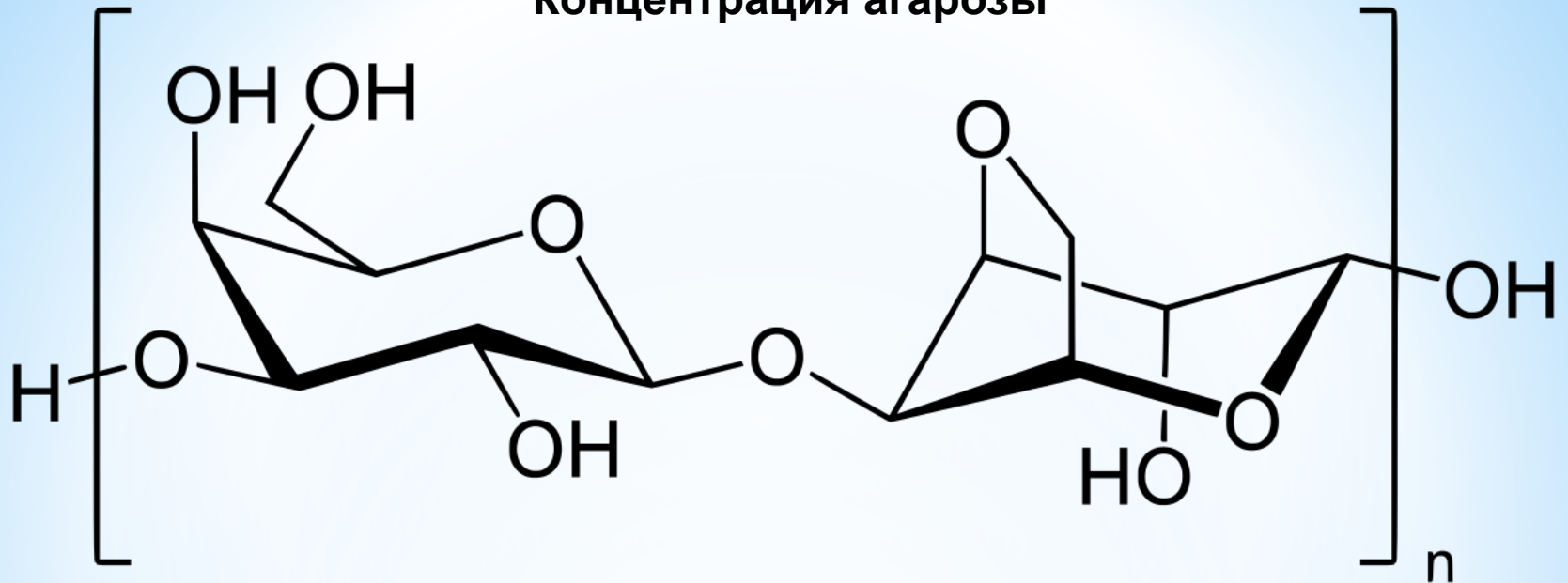
Закон Ома: $I = U / R$

Могут работать в двух режимах:

1. Постоянное напряжение
2. Постоянная сила тока



Концентрация агарозы



β-D-галактопираноза

3,6-ангидридо-α-1-галактопираноза

Агароза — линейный полисахарид, получаемый из агара, образованный из чередующихся остатков β-D-галактопиранозы и 3,6-ангидридо-α-1-галактопиранозы, объединённых 1→4 связью. Обладает ярко выраженным свойством к формированию гелей.

Точка плавления $\approx 95\text{ }^{\circ}\text{C}$

Точка образования геля $\approx 45\text{ }^{\circ}\text{C}$

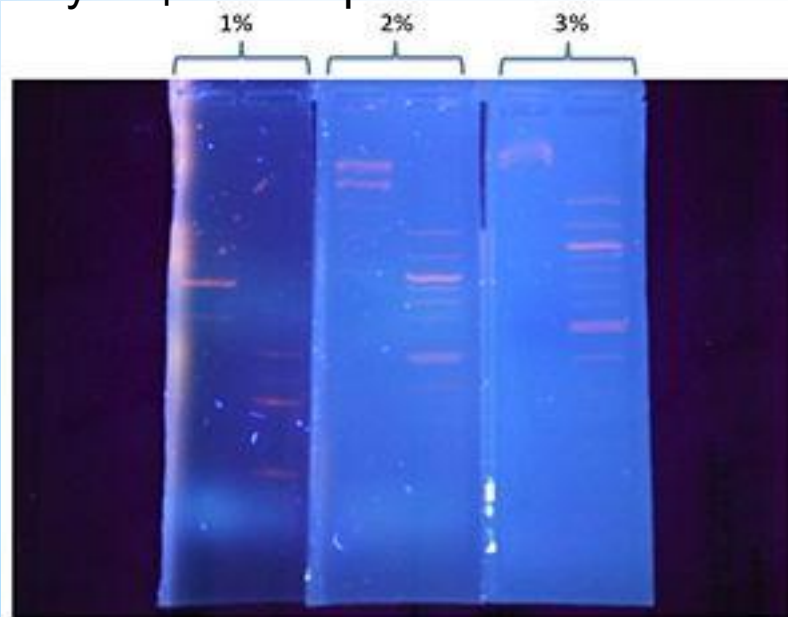
Гель является термообратимым

Зависимость концентрации агарозного геля от длины ДНК

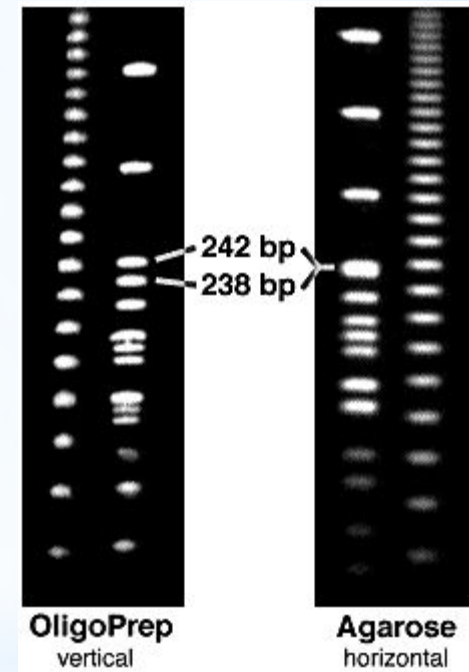
Зная размеры молекул ДНК в смеси, можно подбором концентрации добиться их наилучшего разделения

% агарозы	0.3	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.2	1.5	2.0	3.0	4.0
Размер DNA	5–60 kbp	1–30 kbp	1–20 kbp	800bp –12 kbp	600 bp –10 kbp	500 bp –8 kbp	500 bp –7 kbp	400bp –6 kbp	200bp –3 kbp	100 bp –2 kbp	40 bp –2 kbp	10 bp –400 bp

Манипуляция с агарозой менее 1% только при +6⁰C!!!!



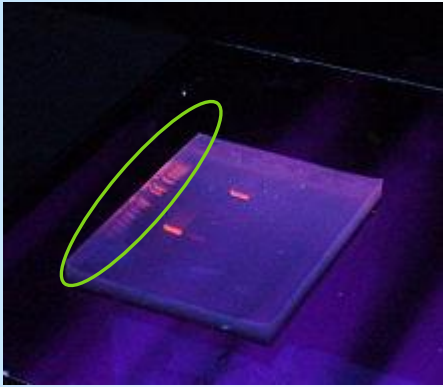
Типы агароз



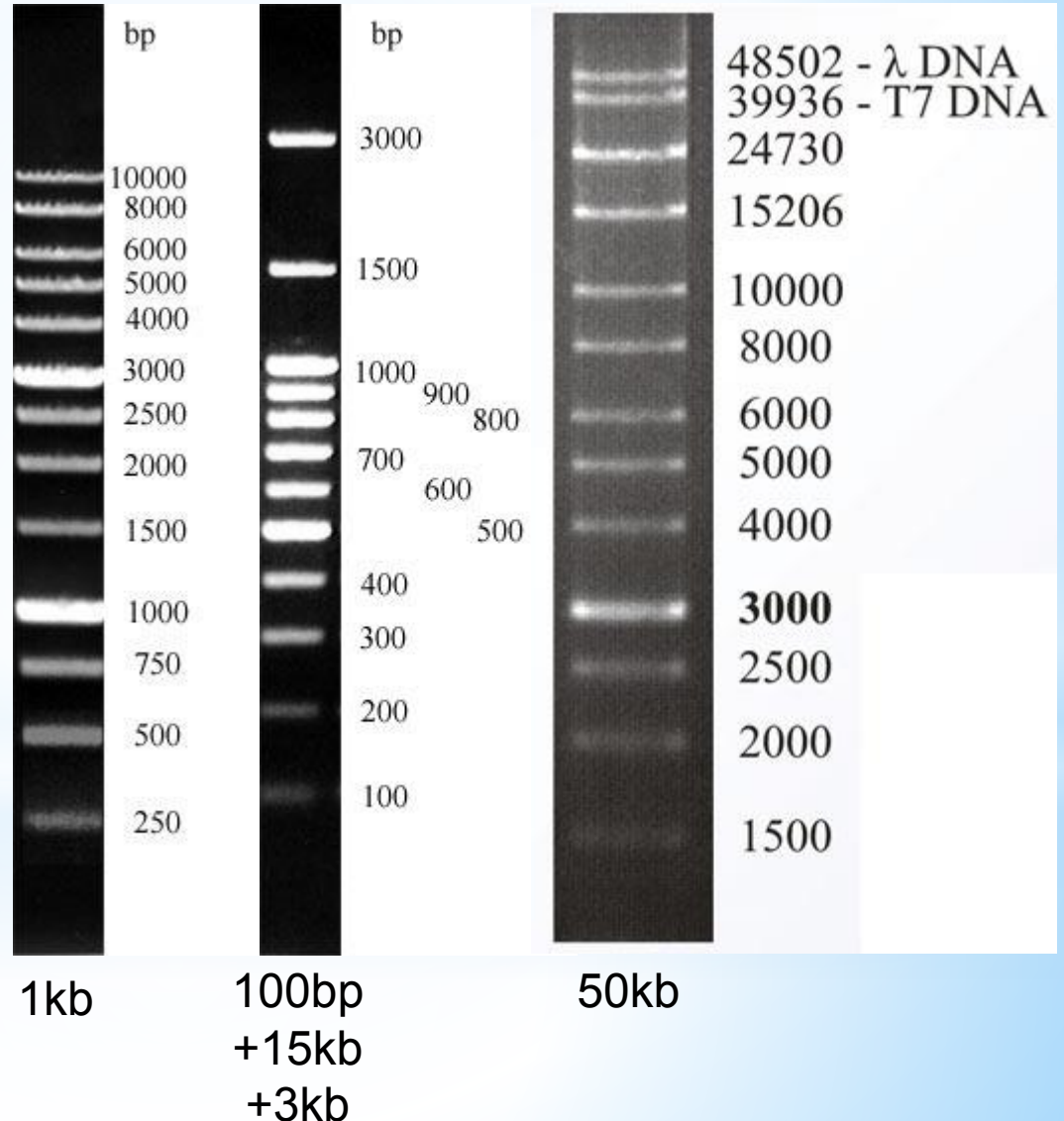
Легкоплавкая агароза: плавится при 60⁰С. Форез ведут при +6⁰С.

Маркеры

Представляет собой смесь ДНК фрагментов известной длины (молекулярного веса) пригодных для использования в качестве стандарта молекулярных весов в электрофорезе.

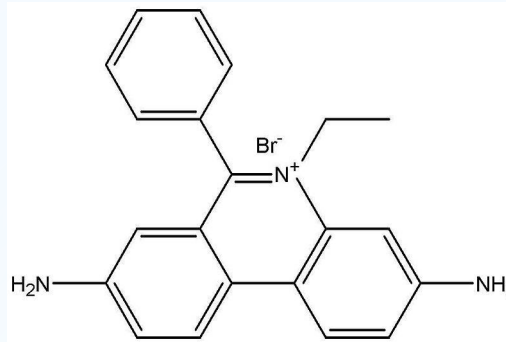


ДНК маркер не предназначен для определения количества ДНК, однако может быть использован для приблизительной оценки путем сравнения интенсивности окрашивания фрагментов одинаковой длины.



Окраска ДНК в агарозных гелях

Для визуализации ДНК применяют флюоресцирующий интеркалирующий краситель – **бромистый этидий (EtBr)**



3,8-диамино-5-этил-6-фенил-фенантридиум бромид

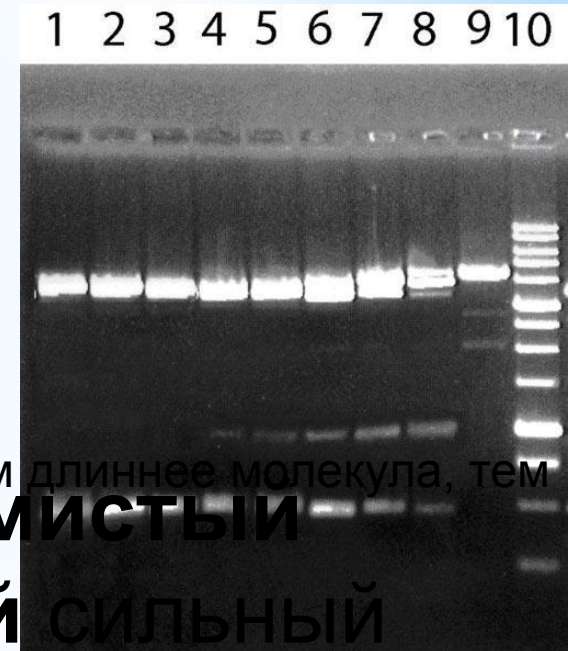
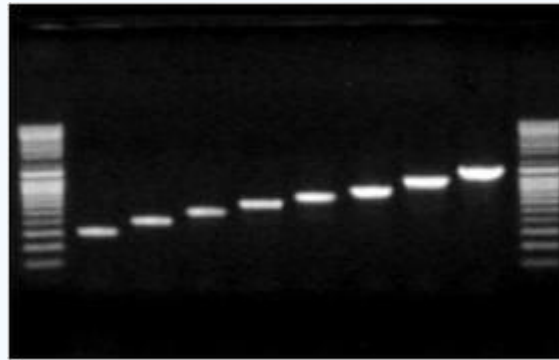
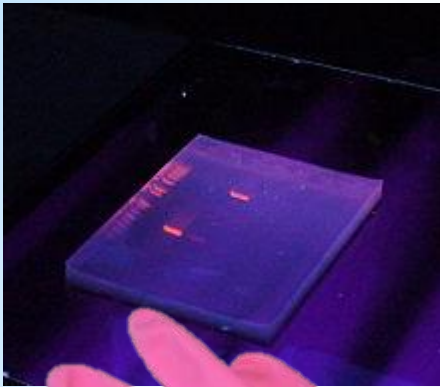
Молекулы красителя интеркалируют (встраиваются) между соседними парами нуклеотидов ДНК.

Максимум поглощения EtBr наблюдается при длинах волн 300 и 360 нм (УФ-излучение), а эмиссия происходит в красно-оранжевой области видимого спектра при 590 нм



Окраска бромистым этидием (EtBr)

При связывании с ДНК интенсивность флюоресценции EtBr увеличивается в 20 раз и обеспечивает высокую чувствительность: от 10 нг ДНК



Интенсивность флуоресценции зависит от размера ДНК: чем длиннее молекула, тем интенсивнее окраска.

**Бромистый
этидий** — СИЛЬНЫЙ

канцероген, поэтому все операции с ним следует проводить в перчатках!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!



Окраска бромистым этидием (EtBr)

Два способа окрашивания бромистым этидием:

1. Сразу добавлять в расплавленную агарозу.
 - EtBr заряжен положительно, мигрирует к катоду – тем самым несколько замедляя продвижение ДНК
 - необходимость добавления и в электродный буфер
 - больше «грязи»
 - + лучше разрешение
 - + в целом, электрофорез проходит быстрее
2. Гель окрашивают после электрофореза в растворе содержащим EtBr.
 - дольше, так как часто требуется еще и отмывка от этидия
 - хуже разрешение
 - + меньше «грязи» – менее ядовито ☺

Рабочая концентрация бромистого этидия – 0,1-0.5 мкг/мл

Везде одинаковая и в геле и в буфере и в красящем растворе

Обычно готовят стандартный (стоковый) 20000х кратный раствор

1 г EtBr разводят в 100 мл дистиллированной воды.

Стоковая концентрация 10 мг/мл.

Буфер для образцов

Состав буфер для образцов:

10x кратный стоковый раствор

1. 50% глицерин или 70% сахароза или 25% фикол
2. 0.25% бромфеноловый синий и/или 0.25% ксилен цианол
3. 1x TAE буфер

1. “Утежелитель” – в увеличивает плотность раствора, для того чтобы образцы сразу опускаются на дно лунки

Рабочая концентрация “утежелителя”:

- глицерин: 6-10 %
- сахароза: 6-7 %
- фикол: 2,5 %



Буфер для образцов

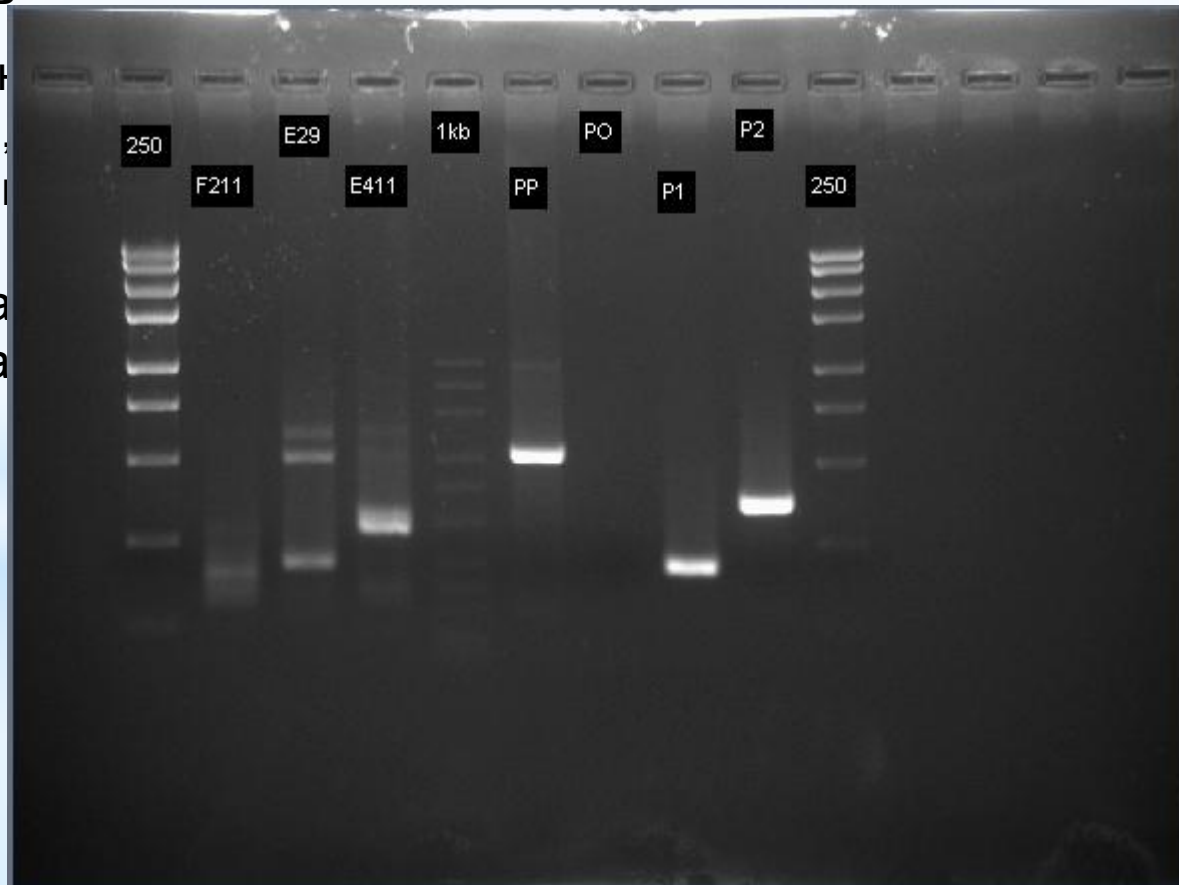
Состав буфер для образцов:

10x кратный стоковый раствор

1. 50% глицерин и/или 70% сахароза и/или 25% фикол
2. 0.25% бромфеноловый синий и/или 0.25% ксилен цианол
3. 1x TAE буфер

2. Краситель

- * облегчает видение
- * Заряжен “-”
- * позволяет идентифицировать
- * может мешать
- * может оказывать

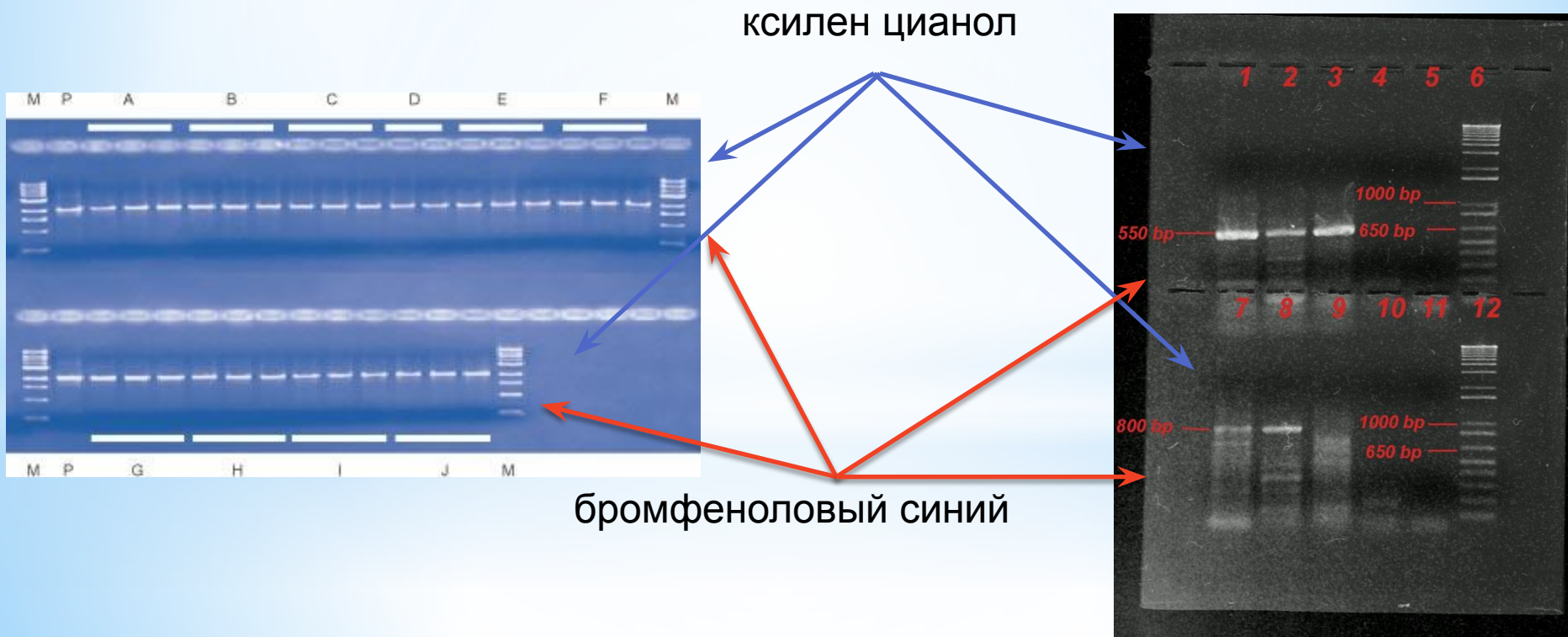


порез;

та из геля.

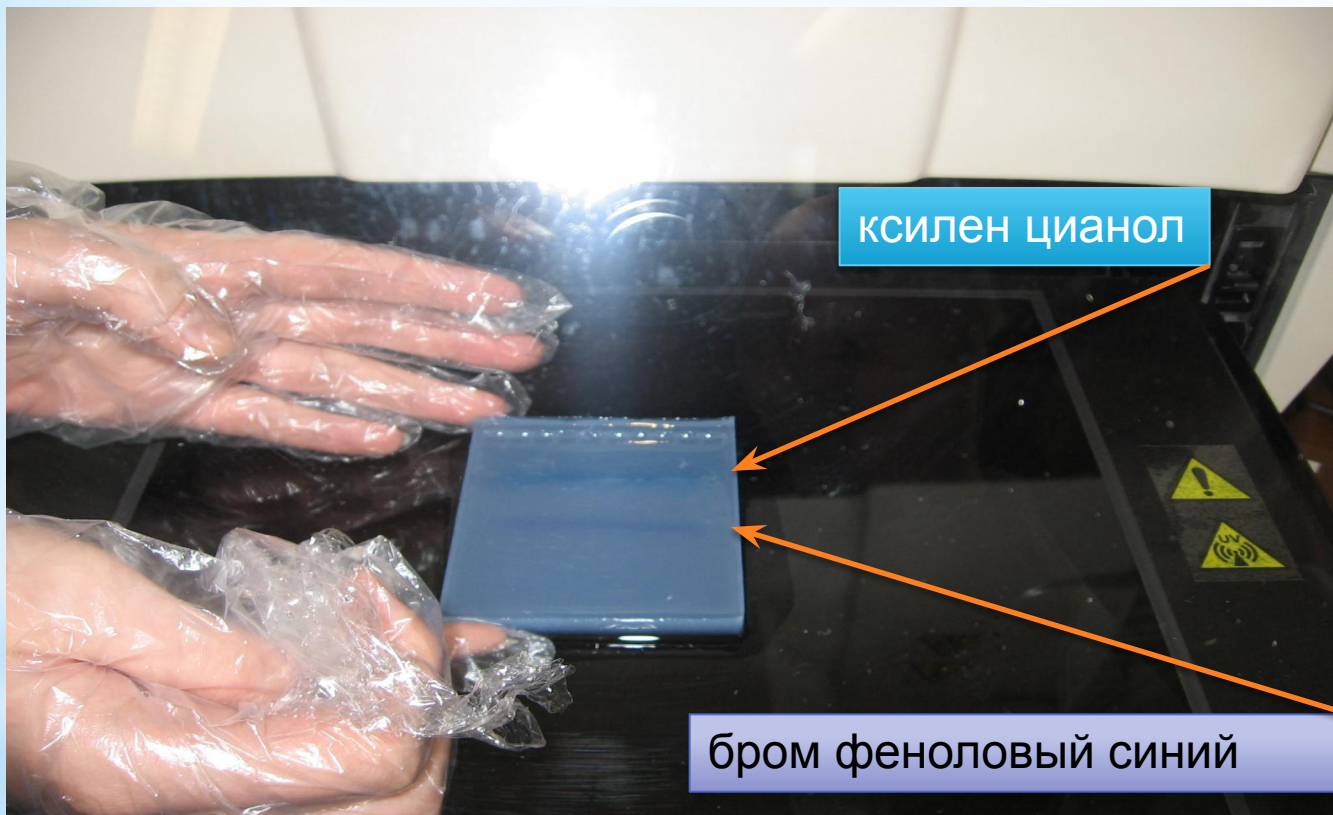
Буфер для образцов

Красители тоже имеют различную электрофоретическую подвижность



Буфер для образцов

Красители тоже имеют различную электрофоретическую подвижность



Электродный буферный раствор

ТАЕ:

1x Трис-ацетат-ЭДТА

40 mM Трис (pH 7,6), 20 mM уксусной кислоты и 1 mM ЭДТА

50x стоковый (1 литр) - растворить в 600 мл дистиллированной воды:

242 г Трис основной (FW = 121)

57,1 мл ледяной уксусной кислоты

100 мл 0,5 M EDTA (pH 8,0).

Довести до конечного объема 1 л дистиллированной водой.

ТВЕ:

1. 1x Трис-борат-ЭДТА (ТВЕ)

2. 89 mM Трис (pH 7,6), 89 mM борной кислоты, 2 mM ЭДТА

3. 5x стоковый (1 литр) - растворить в 600 мл дистиллированной воды:

4. 54 г Трис основной (FW = 121)

5. 27,5 г борной кислоты (FW = 61,8)

6. 20 мл 0,5 M EDTA (pH 8,0)

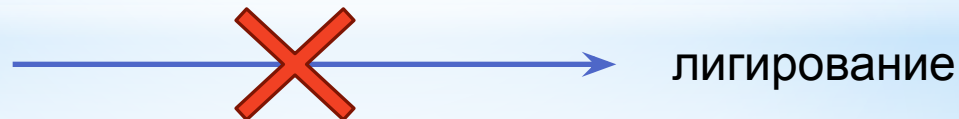
7. Довести до конечного объема 1 л дистиллированной водой.

Электродный буферный раствор

Исторически сложилось так, что ТАЕ используют чаще других буферных р-рв

Минусы:

- ТАЕ:**
1. Хуже разрешение
 2. Низкая буферная емкость – при длительных эл.форезах происходит истощение буфера
- ТВЕ:**
1. Невозможно дальше выделять и использовать образцы, т.к. борная кислота ингибирует многие ферментативные реакции



Видео

Casting an Agarose Gel

Biotechnology Explorer™

BIO-RAD

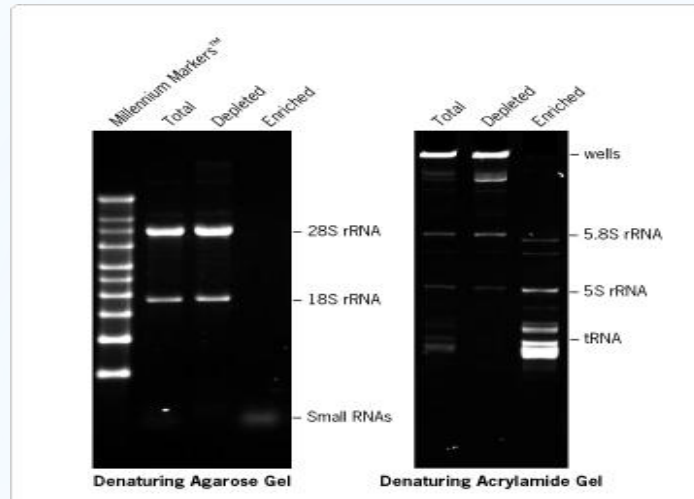
Видео

Agarose Gel Electrophoresis

Biotechnology Explorer™

BIO-RAD

Электрофорез ДНК в акриламиде





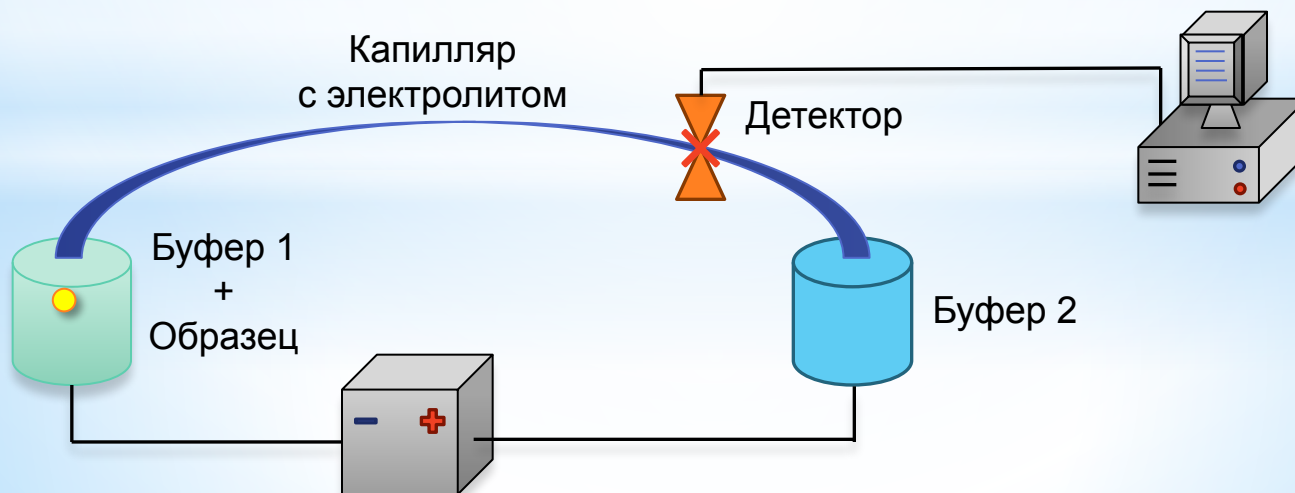
Капиллярный электрофорез

В 1960х годах была предложена методика капиллярного электрофореза для разделения молекул по заряду и размеру в тонком капилляре, заполненном электролитом.

Основное отличие от классического электрофореза: используется специальный электролит, а не гель

Используется при секвенировании ДНК

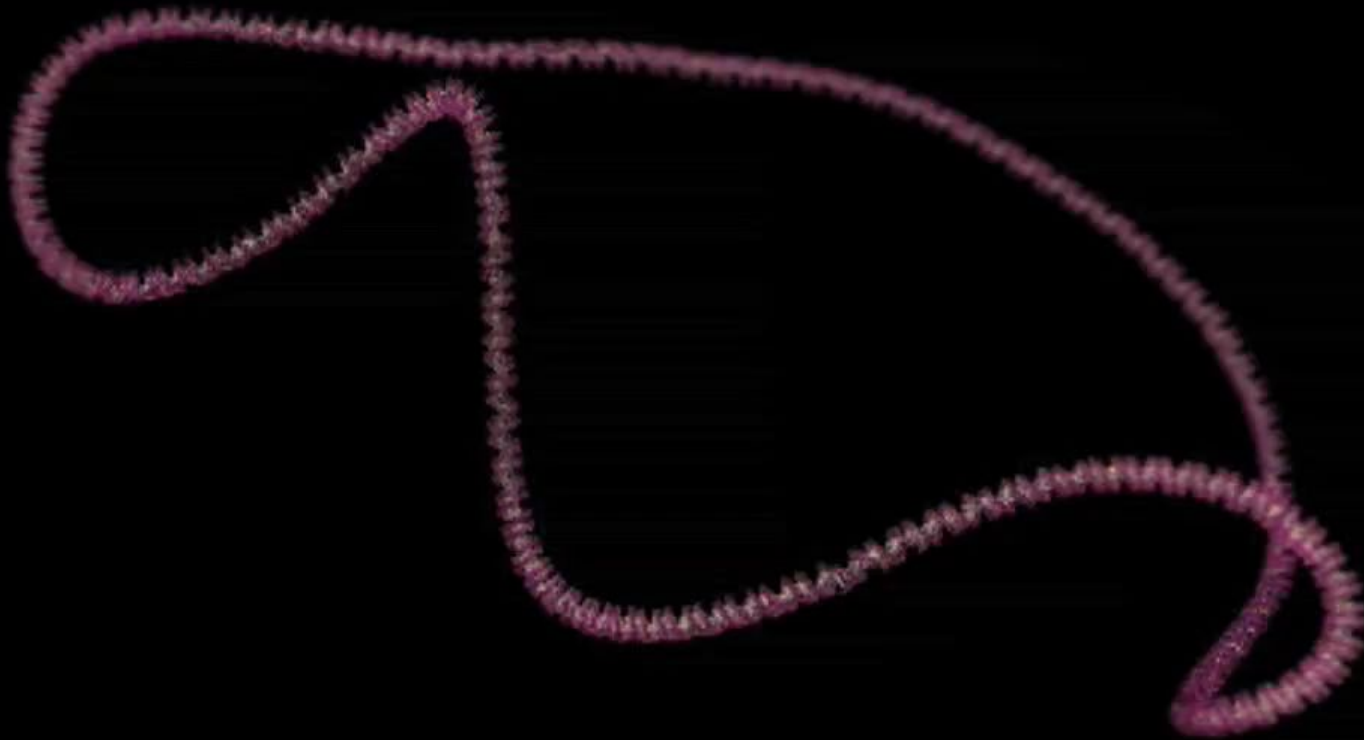
Детектирование разделившихся молекул при капиллярном электрофорезе осуществляется специальными устройствами



Все о рестриктазах

Видео

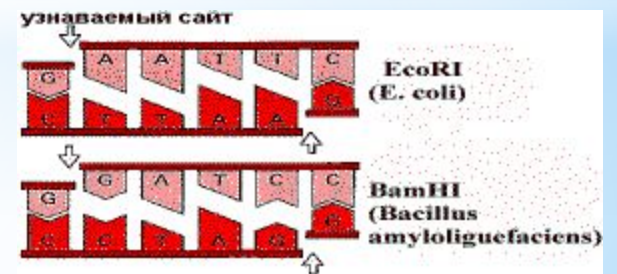
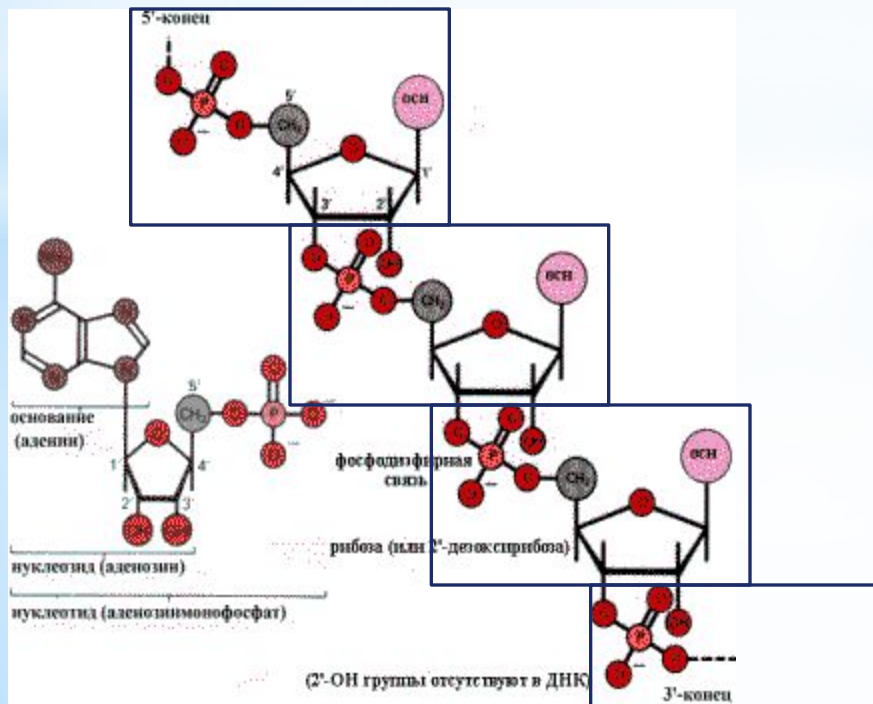
wehi.edu.au



РЕСТРИКЦИЯ

Рестриктазы (рестрицирующие эндонуклеазы, эндонуклеазы рестрикции)

Класс гидролаз, катализирующих реакцию гидролиза нуклеиновых кислот.



Система рестрикции-модификации

ферментативная система бактерий, разрушающая попавшую в клетку чужеродную ДНК.

Основная её функция — защита клетки от чужеродного генетического материала, например, бактериофагов и плазмид.

Для компонентов системы характерны два типа активности — метилтрансферазная (метилязная) и эндонуклеазная. За каждую из них могут отвечать как отдельные белки, так и один белок, сочетающий в себе обе функции.

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

В 1978 году Вернер Арбер, Даниел Натанс и Хамилтон Смит были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине «За обнаружение рестрикционных ферментов и их применение в молекулярной генетике».

Одной из первой открытой рестриктазой была **HindII**.

К 2007 году выделено более трех тысяч эндонуклеаз рестрикции

Классификация рестриктаз

Рестриктазы первого типа (EcoK из *Escherichia coli* K12) 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 удаленной областью ДНК или передвигается вдоль цепи ДНК).

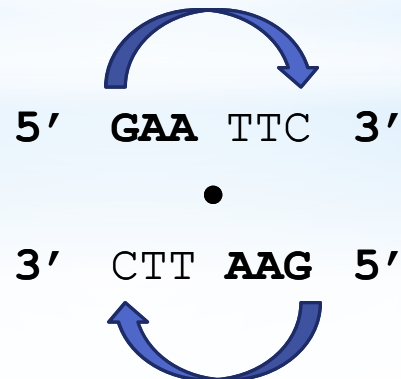
Рестриктазы второго типа (например, EcoRI) узнают **определённую** последовательность и разрезают двойную спираль ДНК в **определённой** фиксированной точке **внутри** этой последовательности. Рестриктазы этого типа узнают палиндромальные последовательности, которые обладают центральной осью и считываются 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). Эти рестриктазы узнают асимметричные сайты, с которыми образуются фрагменты ДНК либо с ровными (тупыми) концами, либо с выступающими (липкими) 5'- или 3'-концами.

В практической молекулярной биологии чаще всего используются рестриктазы II типа, сайт узнавания для которых в большинстве случаев представляет собой **палиндром**.

Палиндром

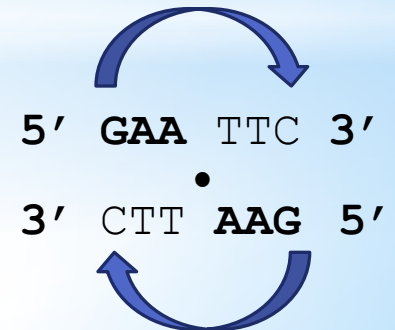
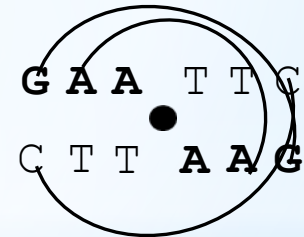
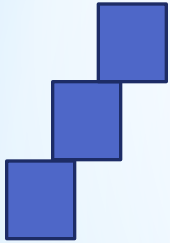
Палиндром буквосочетание, слово или текст, одинаково читающееся в обоих направлениях. Иногда палиндромом неформально называют любой симметричный относительно своей середины набор символов.





5' **GAA** TTC 3'

3' CTT **AAG** 5'



5'

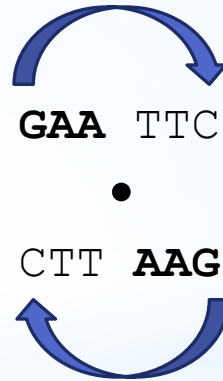
3'



5' **GAA** TTC 3'



3' CTT **AAG** 5'



Палиндрóм (от греч. πάλιν — «назад, снова» и греч. δρόμος — «бег»), иногда также палиндромон, от гр. palindromos *бегающий обратно*)

число (например, 404),

слово (например, *топот* или ротор

текст (например, *а роза упала на лапу Азора*)

одинаково читающееся в обоих направлениях

Отдельные палиндромические словосочетания и фразы известны с глубокой древности, когда им зачастую придавался магически-сакральный смысл

Примеры полиндромов

Яд, яд,
дядя!

Яд ем как мед
я!

Ох и
тихо!

И лежу.
Ужели?

Гори, печурка, - круче
пирог!

Тут хорош сыр, крыс шорох
тут.

Магический квадрат с фразой
SATOR AREPO TENET OPERA ROTAS
(лат. Сеятель Арепо с трудом держит
колеса), читаемой во всех направлениях

S	A	T	O	R
A	R	E	P	O
T	E	N	E	T
O	P	E	R	A
R	O	T	A	S

Примеры полиндромов

Музыкальные произведения:

"Путь Мира" - Игнац Мошелес

"Застольная мелодия для двоих" - Моцарт

Der Spiegel (The Mirror) Duet
VIOLINI *Allegro* ♩=120 attrib. to W.A. Mozart

mf

Public Domain. Sequenced by Fred Nachbaur using NoteWorthy
Confused? Try playing this from opposite sides of a table.

Allegro

Названия рестриктазам даются по следующему принципу:

род микроорганизма обозначается первой прописной буквой

EcoR I – *Escherichia*

BamH I – *Bacillus*

ВИД — двумя строчными

EcoR I – *coli*

BamH I – *amyloliquefaciens*

иногда указывают **штамм** в виде заглавной буквы

EcoR I – RY13

BamH I – H1

Римские цифры — это **порядковый номер** данной эндонуклеазы в ряду прочих рестриктаз, выделенных из данного микроорганизма

EcoR I

BamH I

Например, Hpa I и Hpa II — соответственно первая и вторая рестрицирующие эндонуклеазы II типа, выделенные из *Haemophilus parainfluenzae*.

Буферные растворы

Рестриктазы являются ферментами, активность которых зависит от состава реакционной смеси и температуры проведения реакции.

Фермент	Сайт узнавания	Оптим. буфер	BSA	Активность (в % от максимальной)						Оптимальная температура, °C	Инактивация, °C
				B	G	O	W	Y	R		
BamH I *	G↑GATCC	G	+	25 - 50	100	75 - 100	75 - 100	25 - 50	100	37	65
	CCTAG↓G										
Bsp19 I	C↑CATGG	2W	+	0 - 10	10 - 25	50 - 75	75 - 100	10 - 25	5	37	65
	GGTAC↓C										
EcoR I	G↑AATTC	*	+	50 - 75	75 - 100	75 - 100	75 - 100	50 - 75	50	37	65
	CTTAA↓G										
Hind III	A↑AGCTT	W	+	10 - 25	25 - 50	0 - 10	100	0 - 10	100	37	80
	TTCGA↓A										
Kpn I	GGTAC↑C	B	+	100	25 - 50	25 - 50	25 - 50	75 - 100	50	37	80
	C↓CATGG										
Pst I	CTGCA↑G	O	+	10 - 25	25 - 50	100	25 - 50	25 - 50	50	37	80
	G↓ACGTC										
Sma I	CCC↑GGG	Y	-	0 - 10	0 - 10	0 - 10	0 - 10	100	50	25	65
	GGG↓CCC										

SE-буфер B	10 mM Tris-HCl (pH 7.6 при 25 °C); 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT.
SE-буфер G	10 mM Tris-HCl (pH 7.6 при 25 °C); 10 mM MgCl ₂ ; 50 mM NaCl; 1 mM DTT.
SE-буфер O	50 mM Tris-HCl (pH 7.6 при 25 °C); 10 mM MgCl ₂ ; 100 mM NaCl; 1 mM DTT.
SE-буфер W	10 mM Tris-HCl (pH 8.5 при 25 °C); 10 mM MgCl ₂ ; 100 mM NaCl; 1 mM DTT.
SE-буфер 2W	20 mM Tris-HCl (pH 8,5 при 25 °C); 10 mM MgCl ₂ ; 200 mM NaCl; 1 mM DTT
SE-буфер Y	33 mM Tris-ацетат (pH 7.9 при 25 °C); 10 mM магний-ацетат; 66 mM калий-ацетат; 1 mM DTT.
SE-буфер EcoRI	100 mM Tris-HCl (pH 7.6 при 25 °C); 10 mM MgCl ₂ ; 50 mM NaCl; 1 mM DTT.

Условия работы рестриктаз

Фермент	Сайт узнавания	Оптим. буфер	BSA	Активность (в % от максимальной)						Оптимальная температура, °C	Инактивация, °C
				B	G	O	W	Y	R		
BamH I *	G↑GATCC	G	+	25 - 50	100	75 - 100	75 - 100	25 - 50	100	37	65
	CCTAG↓G										
Bsp19 I	C↑CATGG	2W	+	0 - 10	10 - 25	50 - 75	75 - 100	10 - 25	5	37	65
	GGTAC↓C										
EcoR I	G↑AATTC	*	+	50 - 75	75 - 100	75 - 100	75 - 100	50 - 75	50	37	65
	CTTAA↓G										
Hind III	A↑AGCTT	W	+	10 - 25	25 - 50	0 - 10	100	0 - 10	100	37	80
	TTCGA↓A										
Kpn I	GGTAC↑C	B	+	100	25 - 50	25 - 50	25 - 50	75 - 100	50	37	80
	C↓CATGG										
Pst I	CTGCA↑G	O	+	10 - 25	25 - 50	100	25 - 50	25 - 50	50	37	80
	G↓ACGTC										
Sma I	CCC↑GGG	Y	-	0 - 10	0 - 10	0 - 10	0 - 10	100	50	25	65
	GGG↓CCC										

Длительность работы:
От 1 часа до 12 часов

Оптимальная температура различная, чаще всего 37 ° C, но бывают и исключения:

Sma I +25° C
 Bcl I +50° C
 BsaB I +60° C
 Bsm I +65° C

Инактивация

Длительность и температура тоже различные, но не ниже 65 ° C

Условия работы рестриктаз

Все рестриктазы — Mg^{2+} -зависимы. Буферные растворы должны содержать этот ион.

За единицу активности принимается количество фермента, необходимое для гидролиза 1 мкг ДНК фага лямбда за 1 час при $37^{\circ}C$ (оптимальной температуре для данного фермента рестрикции) в 50 мкл реакционной смеси.

**Общий объем рестриктазы не более
1/10 объёма реакционной смеси**

глицерин, входящий в состав буфера для хранения фермента, может ингибировать реакцию

Star-активность *

Некоторые рестриктазы при работе в неоптимальных условиях могут менять свою специфичность. Это называется Star-активностью и отмечается звёздочкой (*).

Например, EcoRI при повышении pH и уменьшении ионной силы буфера вместо последовательности 5'- **G** AATTC -3' узнаёт последовательность 5'- **N** AATTN -3'.

Классификации рестриктаз

Изомер

ы

1. Изошизомеры
2. Гетерошизомеры
(неошизомеры)
3. Изокаудомеры

Изошизомеры

— это пары эндонуклеаз рестрикции, имеющих специфичность к распознаванию одинаковых последовательностей, разрезающих эти последовательности в одинаковых местах.

Первый выделенный фермент для узнавания и специфического разрезания заданной последовательности, называют **прототипом**, а все остальные подобные рестриктазы называют **изошизомерами**.

Примеры:

Sph I CGTAC^G	NcoI C^CATGG	XapI Y^GGCCR	NdeI ^GATC
Bbu I CGTAC^G	Bsp19I C^CATGG	AclI Y^GGCCR	BstKTI^ ^GATC
			BstMBI ^GATC
			Kzo9I ^GATC

Гетерошизомеры (неошизомеры)

Фермент, узнающий такую же последовательность, но разрезающий её по-другому, называют **гетерошизомером (неошизомером)**. Изошизомеры, таким образом, являются частным случаем гетерошизомеров

Примеры:

Sma I
GGG[^]CCC

GGGCCC

Xma I
G[^]GGCCC

Изокаудомеры

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

Примеры:

Mbo I	N*GATC N
	N CTAG*N
BamH I	G*GATC C
	C CTAG*G

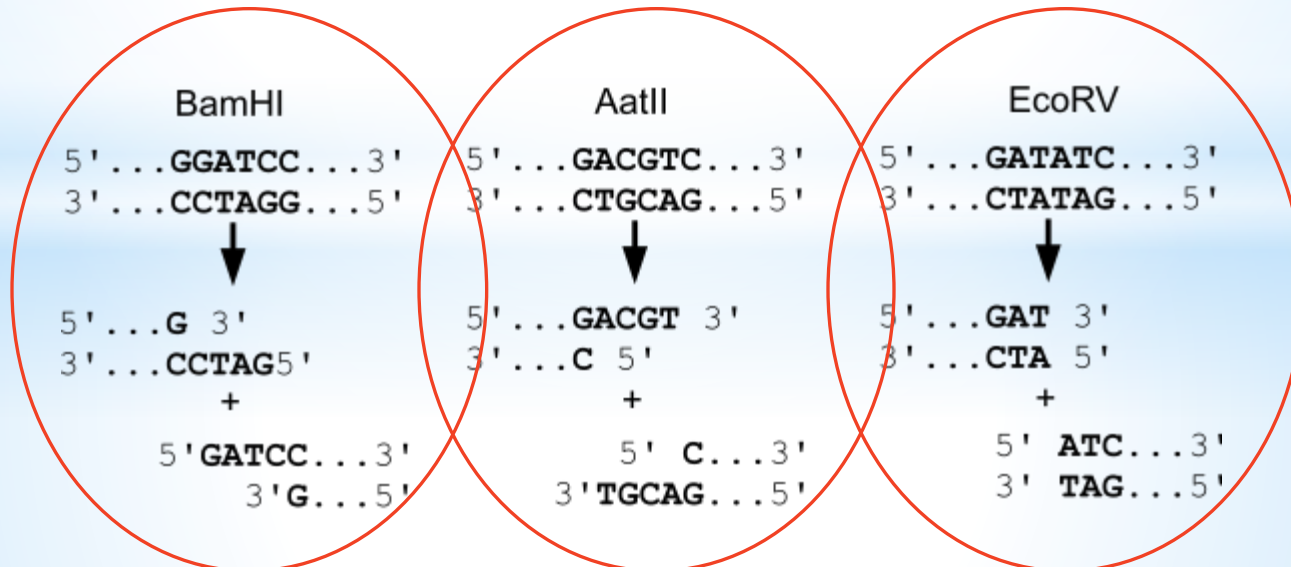
Тупые и липкие концы

- **Липкие концы** имеют выступающие одноцепочечные участки. При этом выступающие участки двух образующихся фрагментов комплементарны друг другу.

могут образовываться липкие концы с **5'** – выступающими нуклеотидами (например такие продукты образует эндонуклеаза рестрикции **BamHI**).

и **3'** – выступающие липкие концы, когда неспаренные нуклеотиды заканчиваются 3'-концом (например такие продукты образует эндонуклеаза рестрикции **AatII**).

- **Тупые концы** образуются, в случае, когда разрезание ДНК происходит строго по оси симметрии узнаваемой последовательности (пример эндонуклеазы рестрикции с такой специфичность — **EcoRV**).



Тупые и липкие концы

- **Липкие** концы имеют выступающие одноцепочечные участки. При этом выступающие участки двух образующихся фрагментов комплементарны друг другу.

могут образовываться липкие концы с **5'** – выступающими нуклеотидами (например такие продукты образует эндонуклеаза рестрикции **BamHI**).

и **3'** – выступающие липкие концы, когда неспаренные нуклеотиды заканчиваются 3'-концом (например такие продукты образует эндонуклеаза рестрикции **AatII**).

- **Тупые** концы образуются, в случае, когда разрезание ДНК происходит строго по оси симметрии узнаваемой последовательности (пример эндонуклеазы рестрикции с такой специфичность — **EcoRV**).

GGA TCC

Крупно- и мелкощепящие рестриктазы.

Встречаемость тетра- и гексануклеотидов в ДНК.

Большинство рестриктаз II-класса узнают последовательности, содержащие от 4 до 6 нуклеотидных пар, поэтому рестриктазы делят на мелко- и крупнощепящие.

Сайт из четырех (тетра-) нуклеотидов встречается в среднем 1 раз через каждые 256 пар оснований, а из шести (гекса-) нуклеотидов - через 4096 пар оснований.

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.

Например, в ДНК бактериофага T7, состоящей из 40000 п. о., отсутствует последовательность, узнаваемая рестриктазой EcoR I. (G↑AATTC)

К мелкощепящим относятся рестриктазы Hpa II и Alu (из *Arthrobacter luteus*), к крупнощепящим - EcoR I (из *Escherichia coli*) и Hind III.

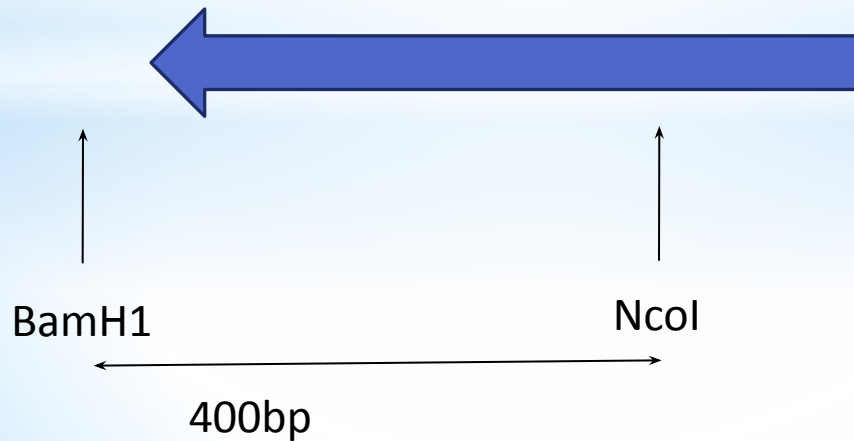
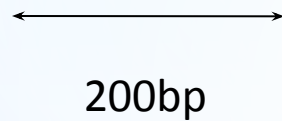
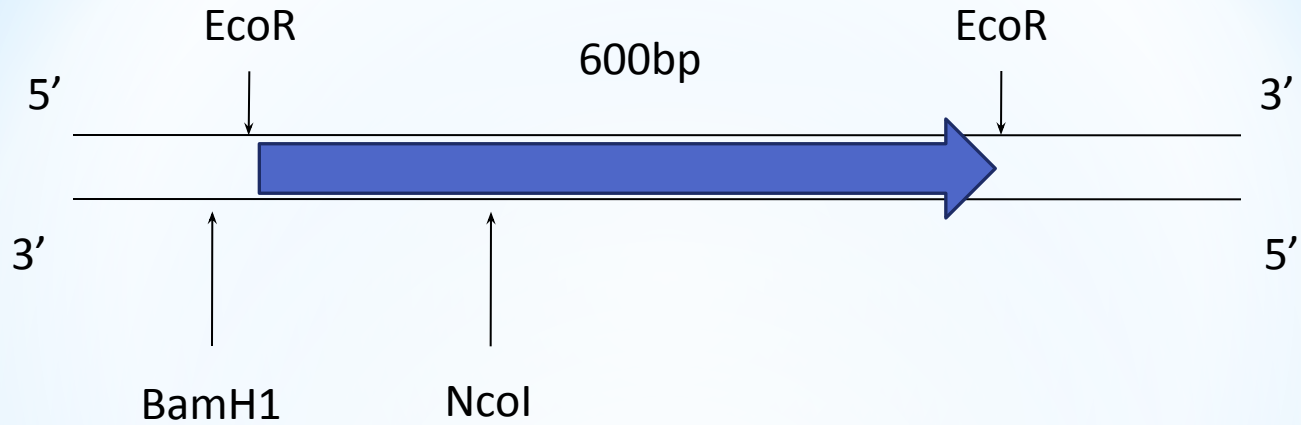
Единицы активности рестриктазы.

– это количество фермента, необходимое для гидролиза 1 мкг ДНК в реакционной смеси 50 мкл при оптимальных условиях (обычно при 37° С) за час.

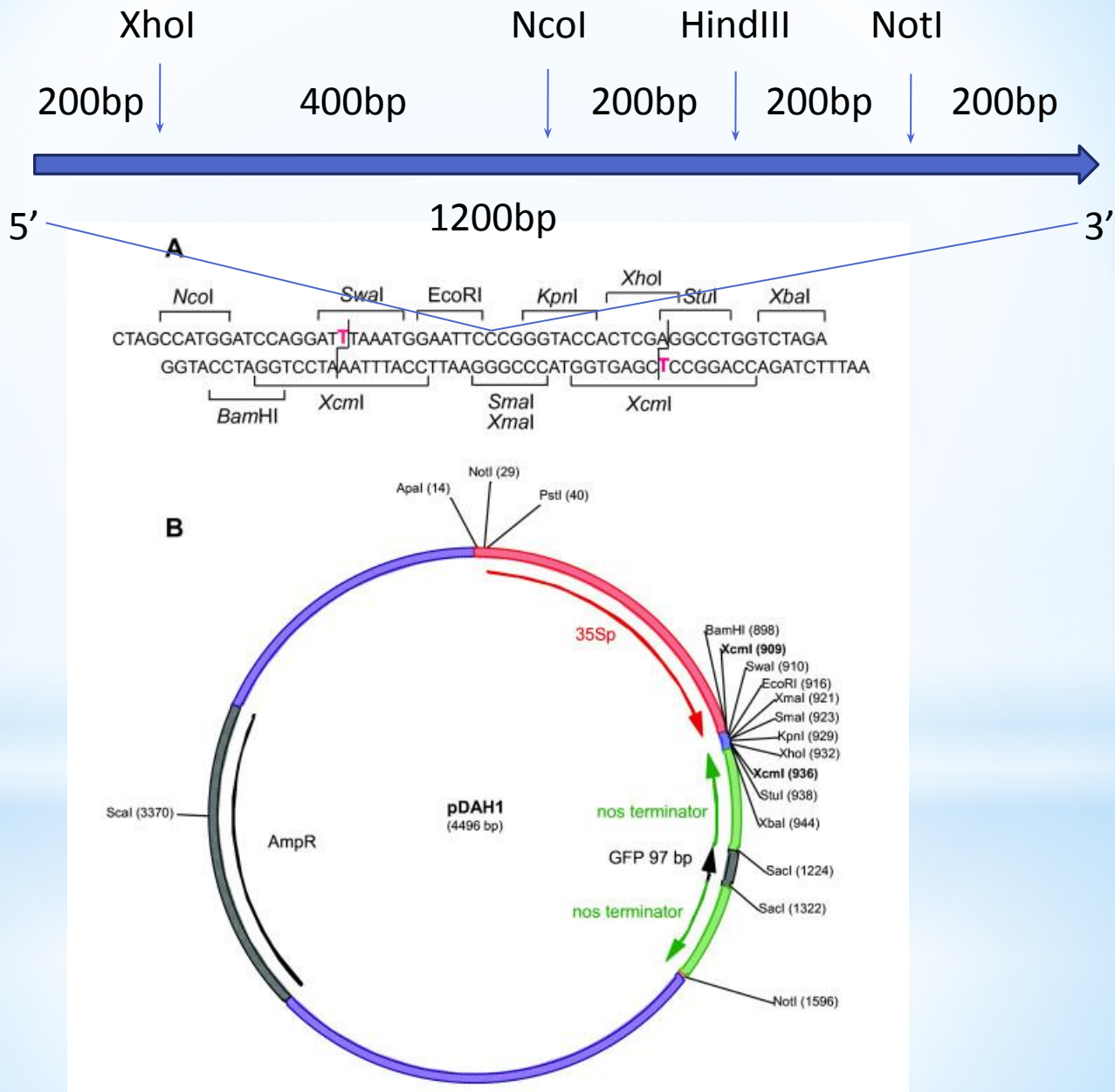
Хранение

Рестриктазы хранятся при -20° С в буфере с 50% глицерина.

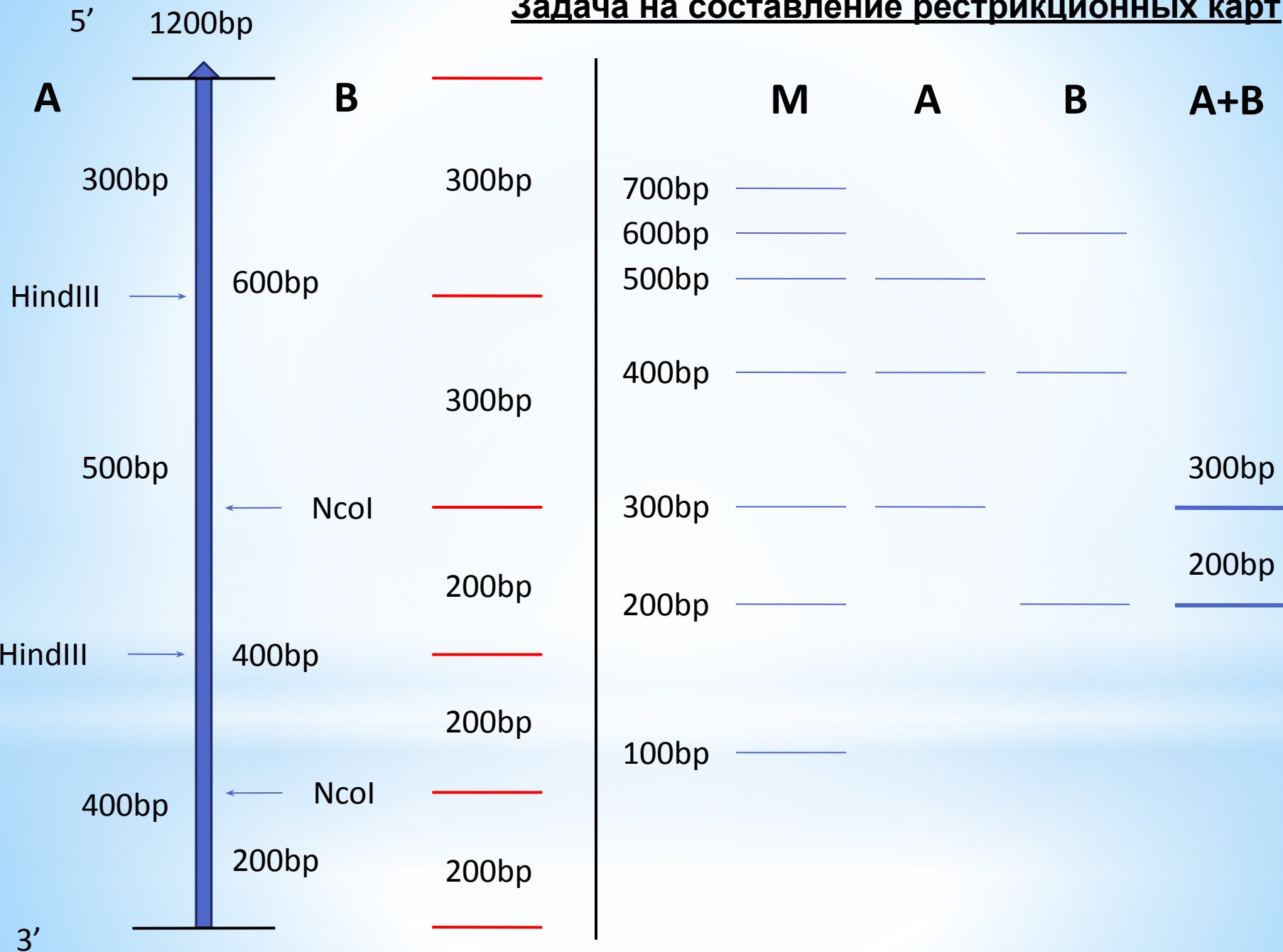
РЕСТРИКЦИОННЫЕ КАРТЫ



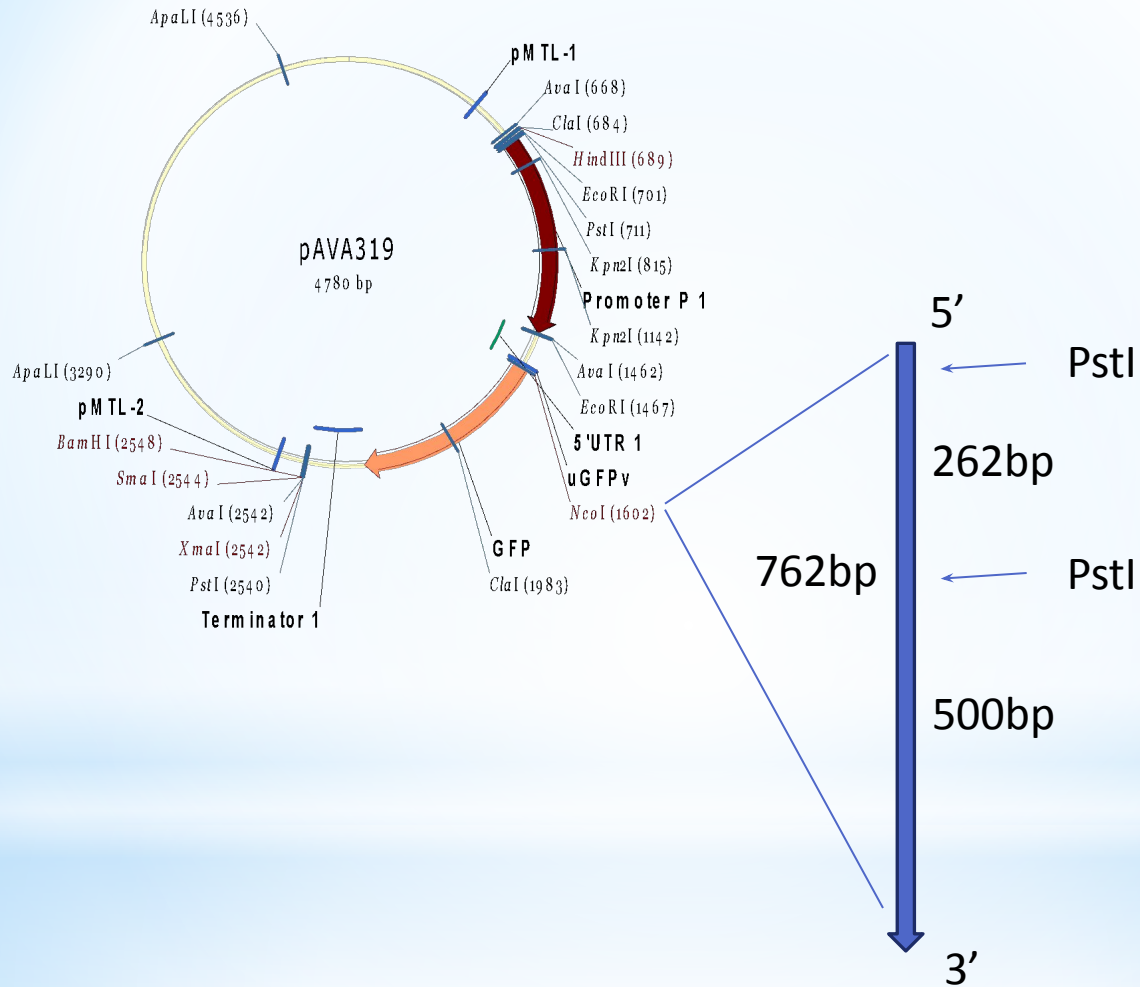
Задача на составление рестрикционных карт



Задача на составление рестриционных карт



Задача на составление рестрикционных карт



Спасибо за внимание