

Основы генетической инженерии

Тема 2. Ферменты генетической инженерии

2016

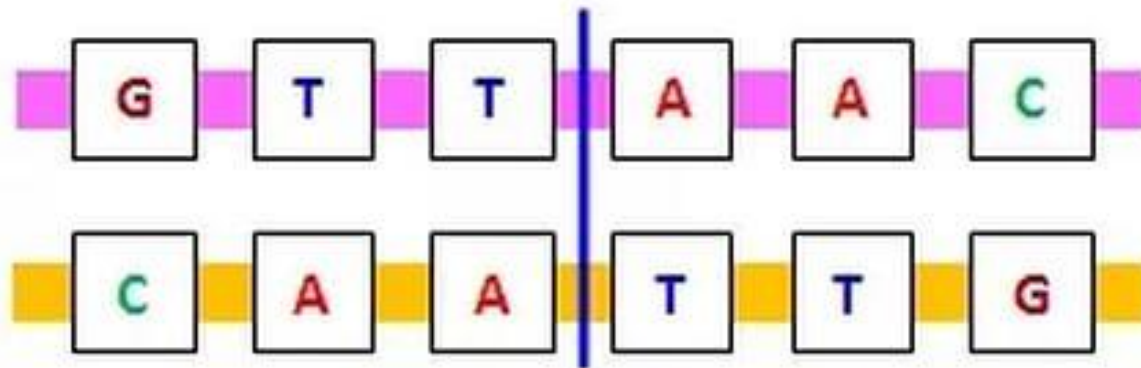
Группы ферментов, применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК:

- ферменты, с помощью которых получают фрагменты ДНК (**рестриктазы**);
- ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК (полимеразы) или РНК (**обратные транскриптазы**);
- ферменты, соединяющие фрагменты ДНК (**лигазы**);
- ферменты, позволяющие осуществить **изменение структуры концов фрагментов ДНК**.

Рестриктазы

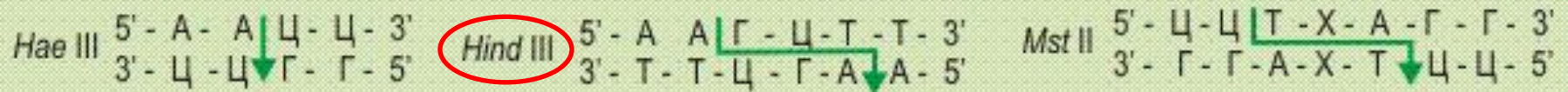
{рестрицирующие эндонуклеазы, эндонуклеазы рестрикции}

- это ферменты, узнающие и атакующие определенные последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК (**сайты рестрикции**)



Рестриктаза Hpa I

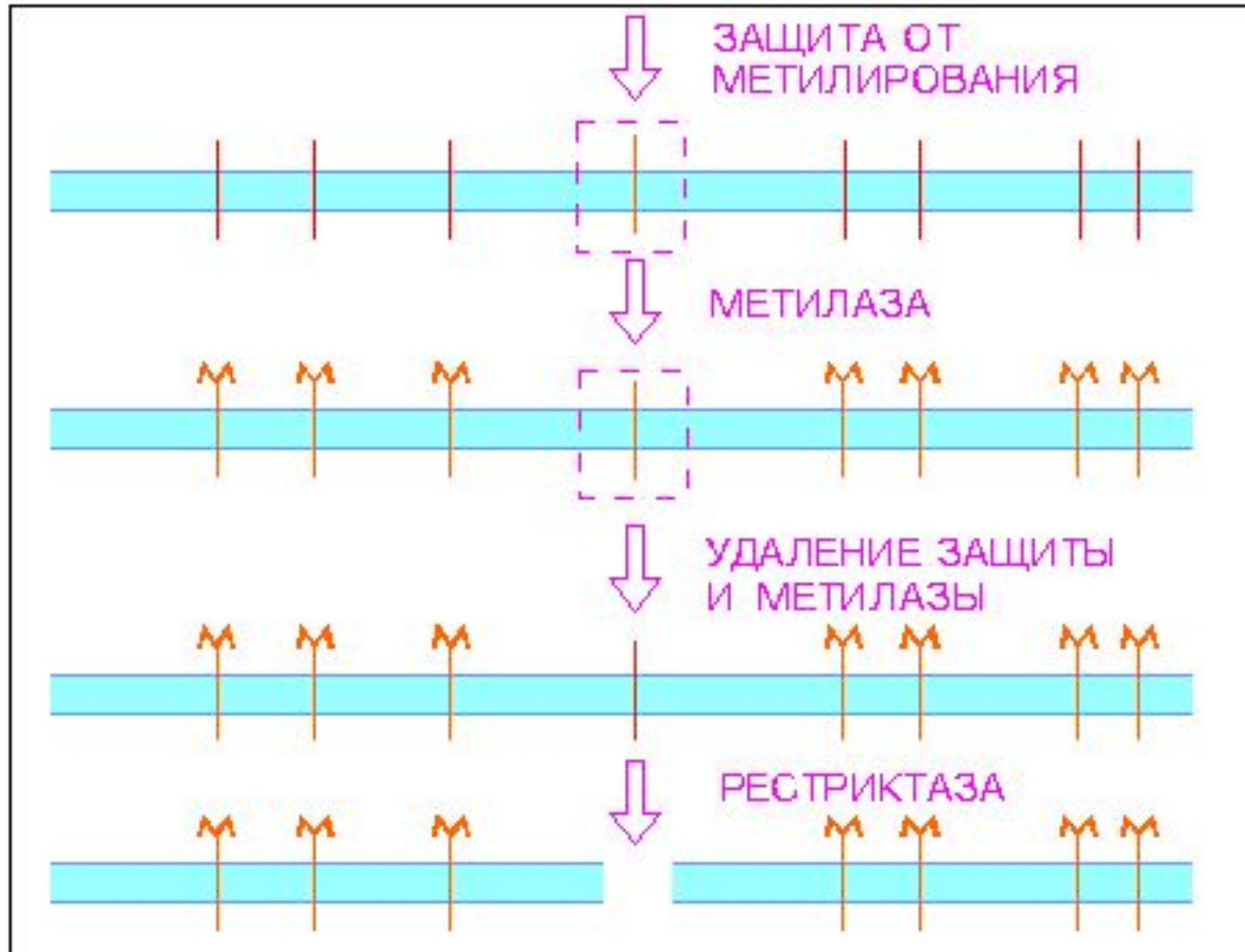
(бактерия *Haemophilus parainfluenzae*)



- в **1970 г.** Смит и Вилькокс выделили из *Haemophilus influenzae* первую рестриктазу, которая расщепляла строго определенную последовательность ДНК (Hind III).

Метилаза добавляет метильные группы к адениновым или цитозиновым остаткам в том же сайте, в котором связывается рестрикционный фермент.

В результате метилирования сайт становится устойчивым к рестрикции, т.е. **метилирование защищает ДНК от разрезания.**



ДНК-метилазы

dam-метилазы

- осуществляет перенос метильных групп в N-положение аденина в последовательности GATC. В таком случае многие рестриктазы (например, *BclI*, *MboI* или *Clal*), в состав сайтов рестрикции которых входит данная метилированная последовательность, перестают расщеплять ДНК по этим сайтам.

dcm-метилазы

- Аналогичное действие на некоторые рестриктазы, например *EcoRII*, оказывает и dcm-метилаза, осуществляющая метилирование остатков цитозина по положению C5 в последовательностях CCAGG и CMe--CTGG.

Для того чтобы избежать нежелательного влияния этих метилаз на клонируемые ДНК, в качестве хозяев используют мутантные штаммы *E. coli*: dam и dcm. ДНК-метилазы бактериальных систем рестрикции и модификации применяют для блокирования in vitro соответствующих сайтов рестрикции на исследуемых фрагментах ДНК с целью получения под действием

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.
- **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.

- **Изошизомеры** - среди ферментов, выделенных из различных микроорганизмов, встречаются такие, которые узнают на ДНК одни и те же последовательности.
- **Гетерошизомеры** - ферменты, узнавая один и тот же сайт на ДНК, производят разрывы в разных точках в пределах того же сайта.

Номенклатура рестриктаз

- 1) Аббревиатура названия каждого фермента является производной от бинарного названия микроорганизма, содержащего данную метилазорестриктазную 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).

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.
- Размер сайта рестрикции различных рестриктаз составляет, как правило, 4-6 нуклеотидов.
- Сайты рестрикции в ДНК самой бактерии замаскированы посредством метилирования остатков А и С.
- Например, фермент рестрикции **EcoRI** распознаёт симметричную последовательность GAATTC и перерезает цепочку между нуклеотидами G и A, оставляя на концах перекрывающиеся участки AATT.

Механизм действия рестриктаз

Прямой

ATGC . . . ATGC
TACG . . . TACG

Симметричный:

← ATGC . . . CGTA →
TACG . . . GCAT

Инвертированный:

ATGC . . . GCAT
TACG . . . CGTA

Прямой
комплементарный:

ATGC . . . TACG
TACG . . . ATGC

ТААТ
АТТА

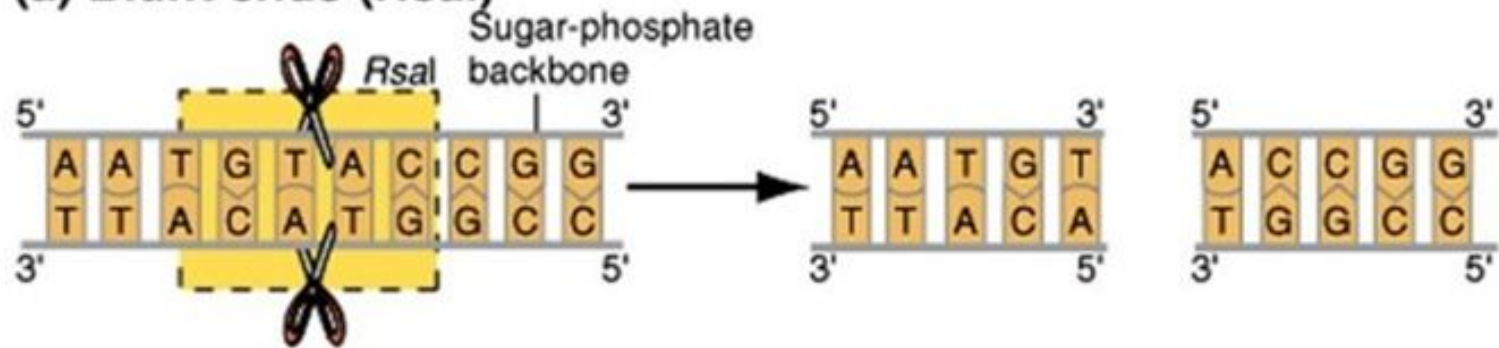
Палиндром

В качестве мишеней (сайт узнавания) часто выступают палиндромы из 46 пар оснований - сайты рестрикции.

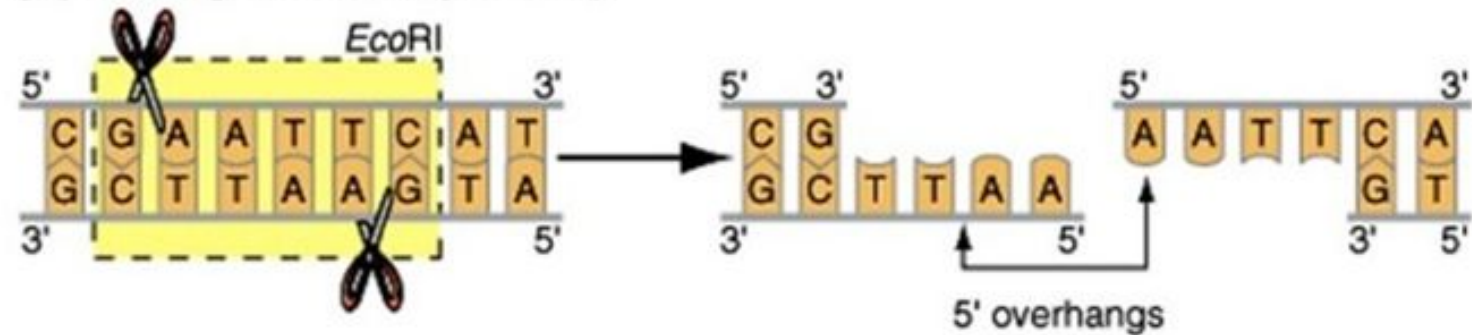
Сайт-мишень может быть полностью метилирован (обе цепи модифицированы), полуметилирован (только одна цепь метилирована) или не метилирован.

Реакция разрезания осуществляется в две ступени. Сначала разрезается одна цепь ДНК, а затем рядом разрезается другая. В областях, прилегающих с каждой стороны к сайту разрезания, может иметь место экзонуклеотическая деградация. Происходит эффективный гидролиз АТФ, роль которого еще не выяснена.

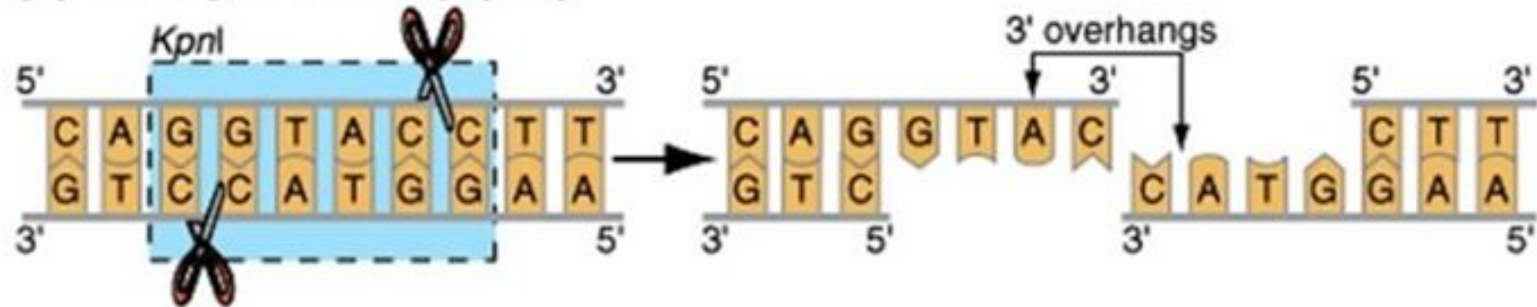
(a) Blunt ends (*RsaI*)



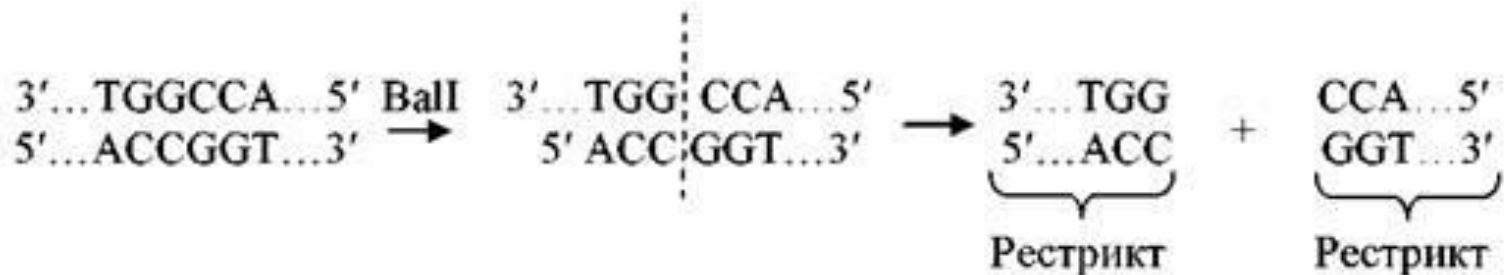
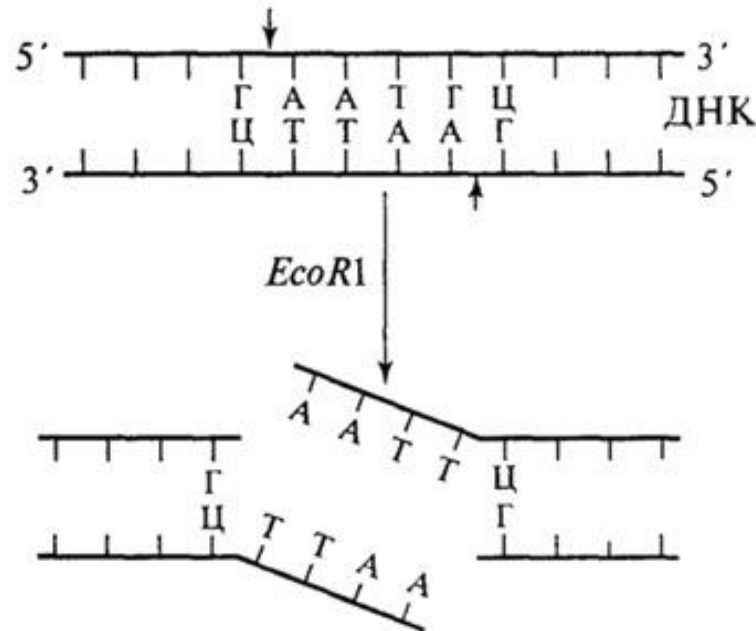
(b) Sticky 5' ends (*EcoRI*)



(c) Sticky 3' ends (*KpnI*)

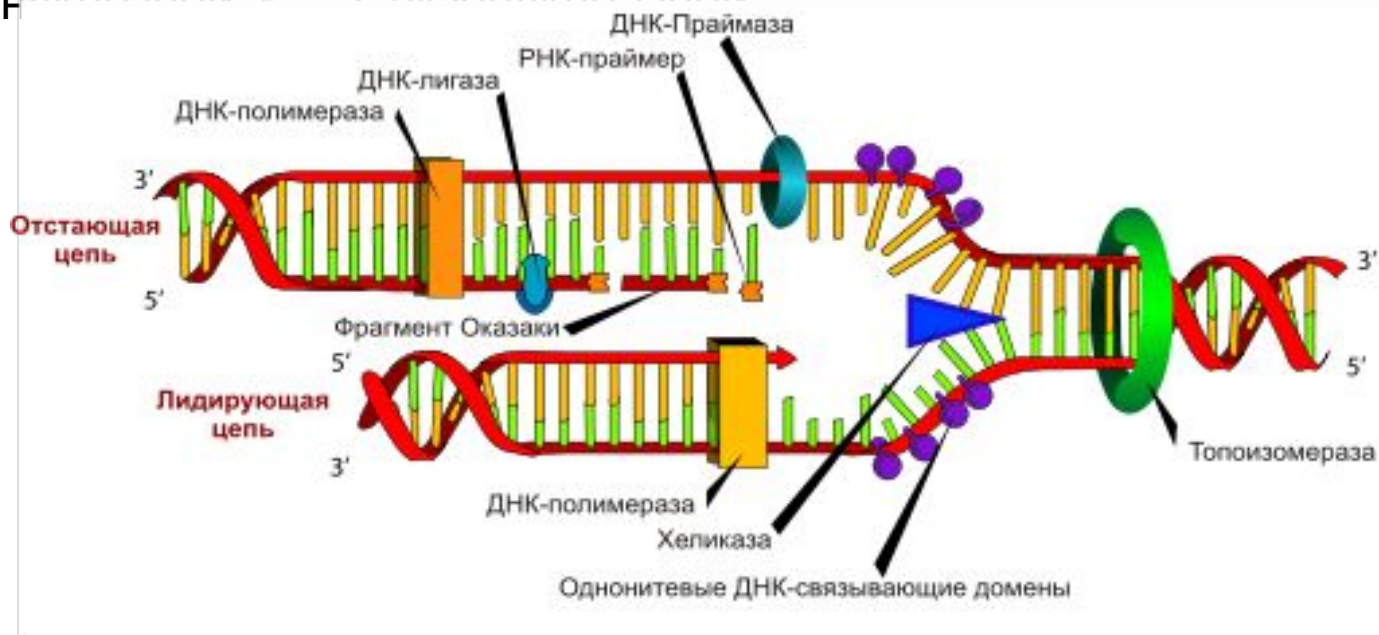


Механизм действия рестриктаз

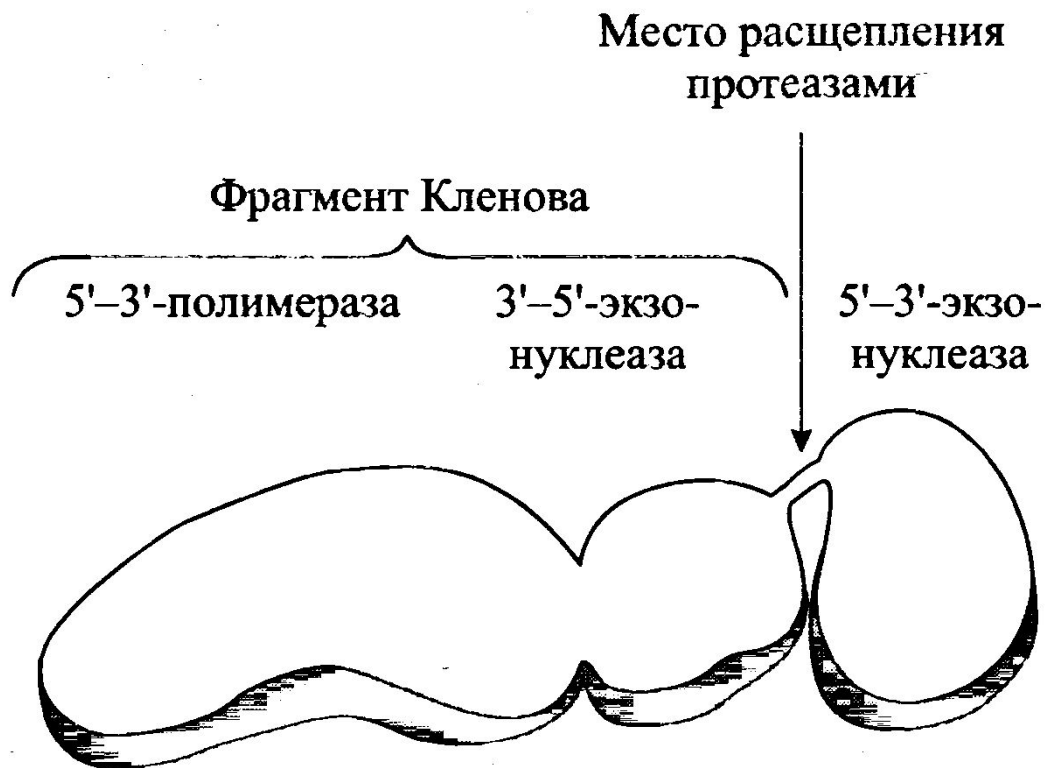


Полимеразы

- ферменты, катализирующие образование макромолекул из низкомолекулярных веществ.
- Фермент состоит из мономерной полипептидной цепи с молекулярной массой 109 кДа и имеет 3-х доменную структуру. Каждый домен обладает своей ферментативной активностью: 5' – 3' полимеразной, 3' – 5' экзонуклеазной, 5' – 3' оксиферментативной.



ДНК-полимераза I E. coli



а) структура



б) модель
взаимодействия
с молекулой ДНК

Функции ДНК-полимеразы

- 5'-3' полимеразная активность.

Для реакции необходимо наличие одноцепочечной ДНК-матрицы и комплементарного участку этой цепи фрагмента — праймера (затравки) с 3'-ОН концом.

- 3'-5' экзонуклеазная активность.

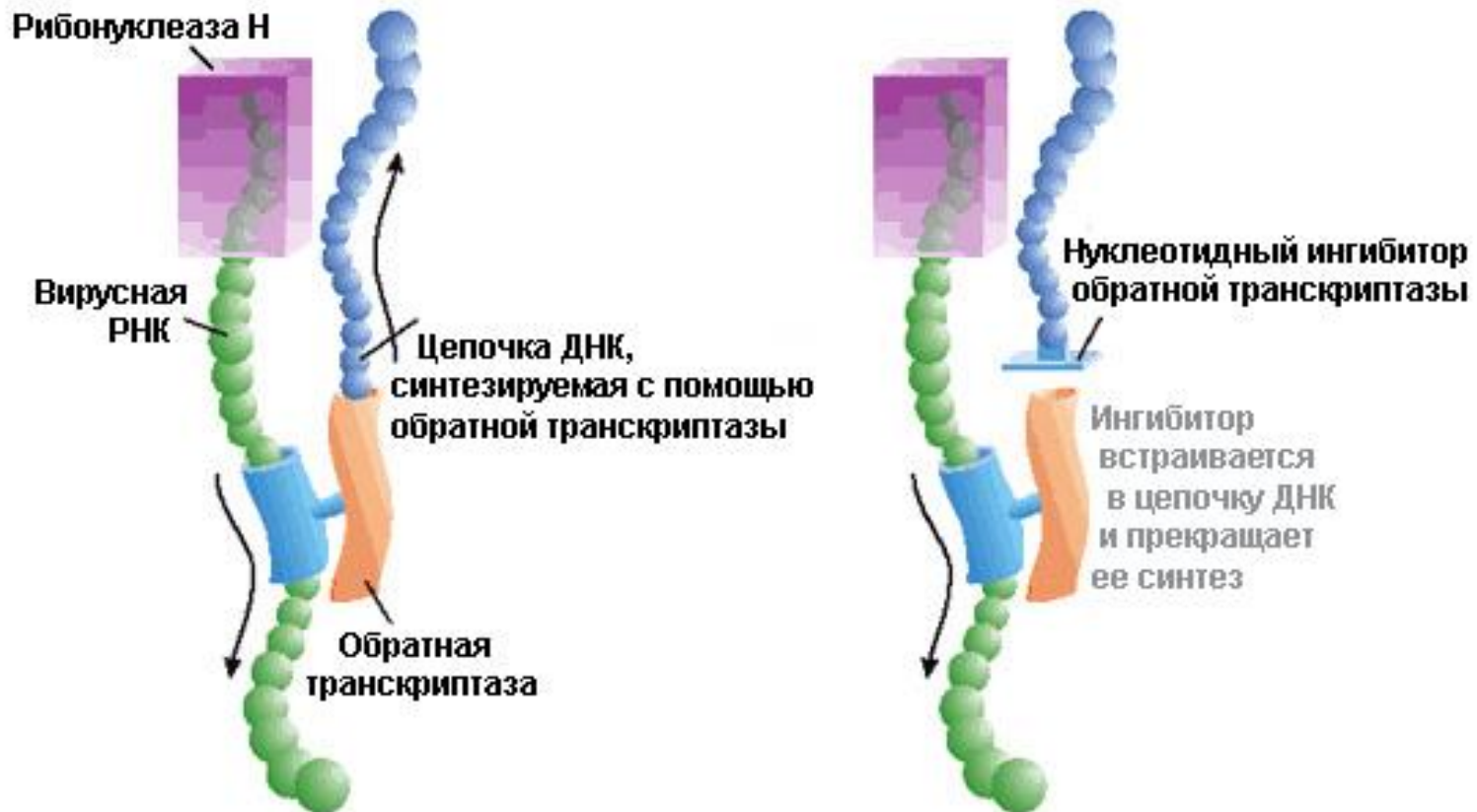
Гидролизует одноцепочечную или двухцепочечную ДНК с 3'-ОН конца. 3'-5' нуклеаза расщепляет диэфирную связь только в неспаренных участках ДНК.

- 5'-3' экзонуклеазная активность.

Деградирует одну цепь двухцепочечной ДНК, начиная со свободного 5'-конца. В отличие от 3'—5' экзонуклеазы 5'—3' экзонуклеаза расщепляет диэфирную связь только в спаренных участках двухцепочечной молекулы ДНК.

Обратная транскриптаза (ревертаза, РНК-зависимая ДНК-полимераза)

- фермент, катализирующий синтез ДНК на матрице РНК в процессе обратной



Обратную транскриптазу используют для транскрипции мРНК в кДНК

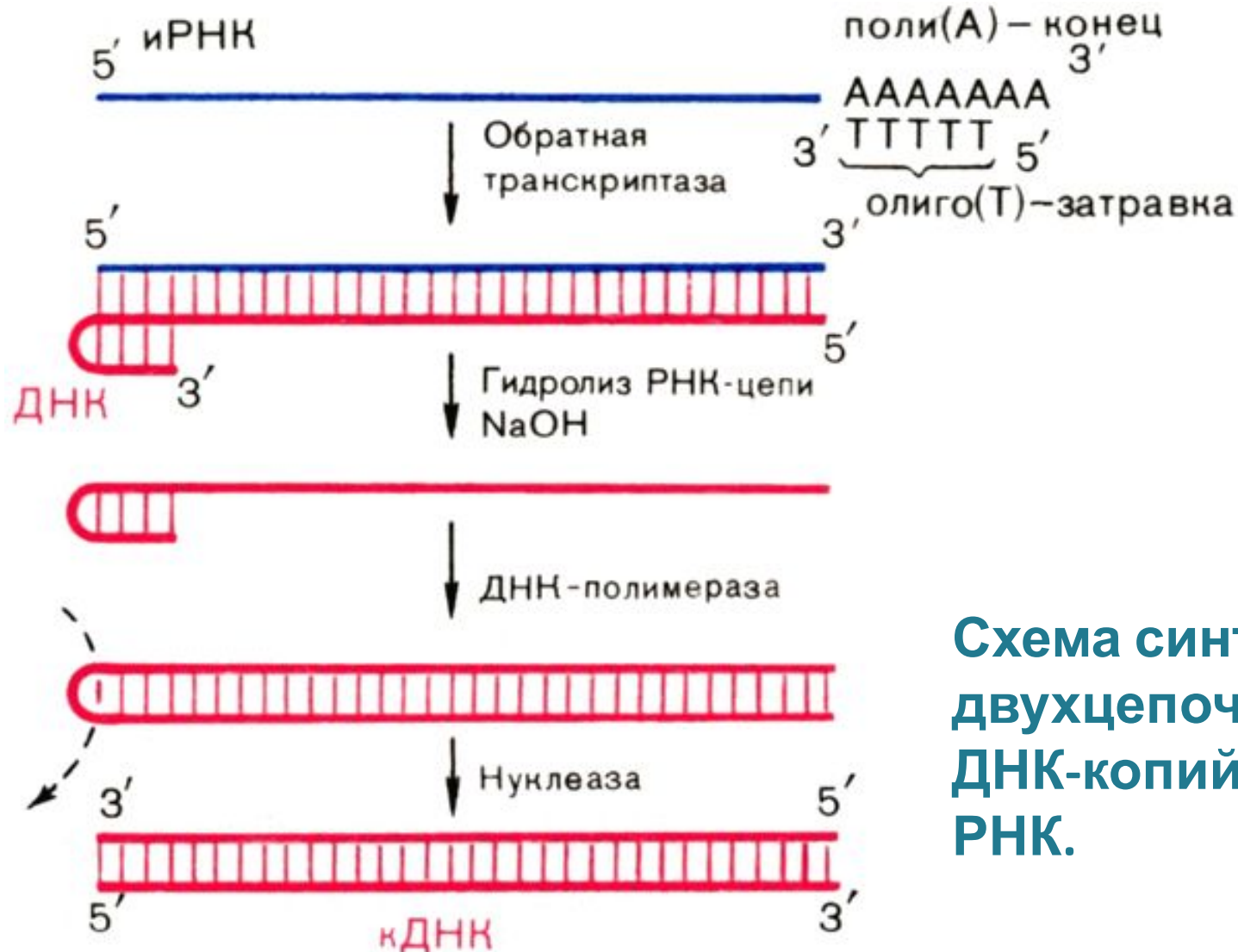
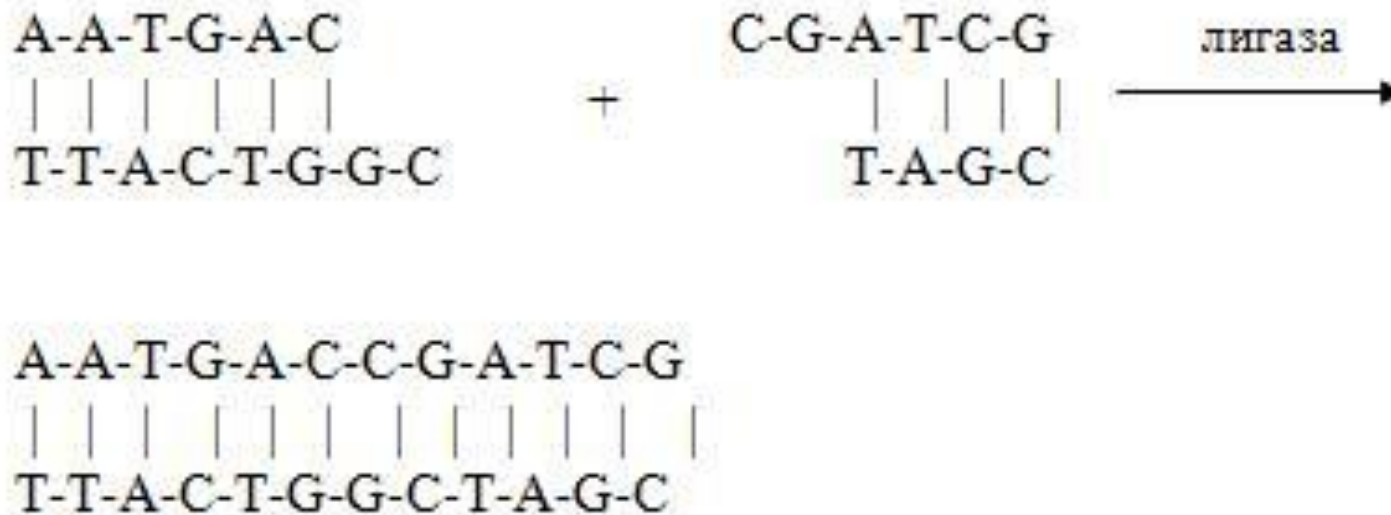


Схема синтеза
двухцепочечных
ДНК-копий молекул
РНК.

Лигаза

- фермент, катализирующий соединение двух молекул с образованием новой химической связи (лигирование).
- При этом обычно происходит отщепление (гидролиз) небольшой химической группы от одной из:



ДНК-лигазы разделяют на два семейства в зависимости от используемого ими кофактора в качестве донора АМР:

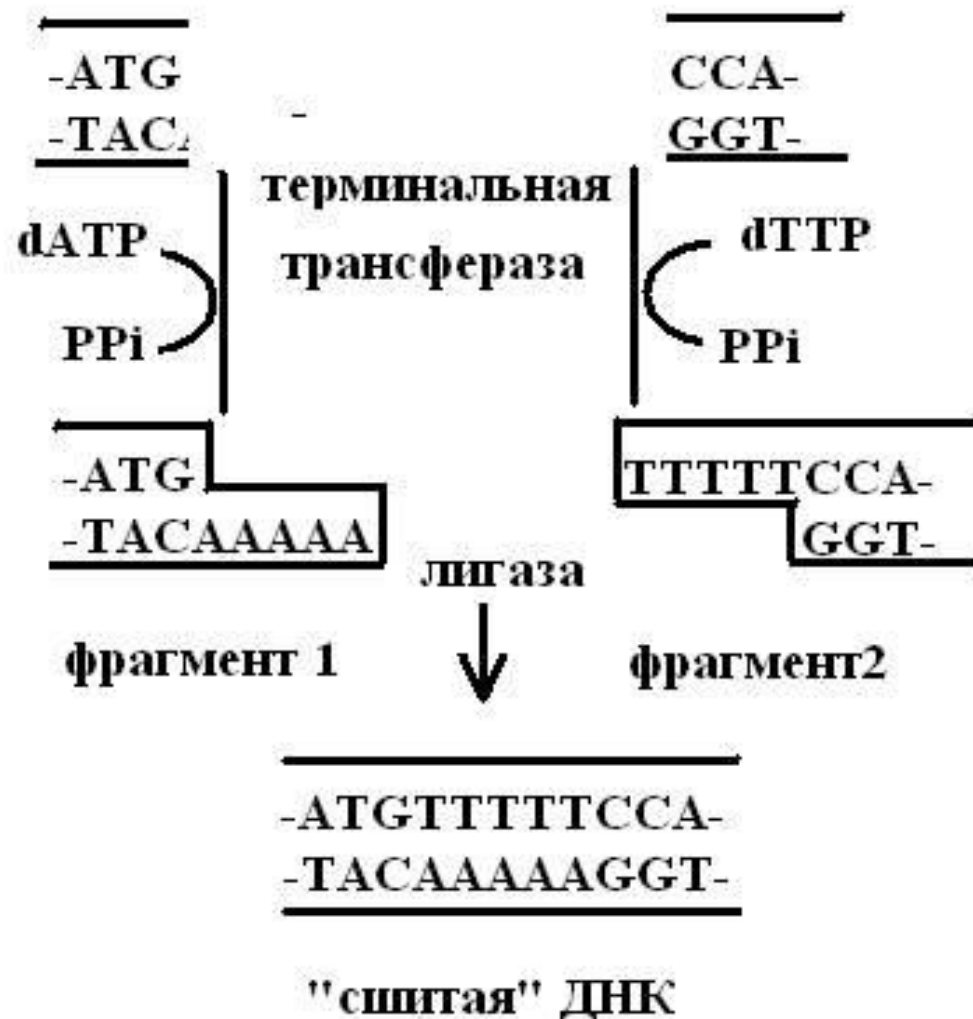
- АТР-зависимые лигазы обнаруживают у бактериальных и эукариотических вирусов, архей, дрожжей, млекопитающих и эубактерий.
- NAD-зависимые ДНК-лигазы имеются почти исключительно у эубактерий. Единственное известное исключение в этом отношении составляют энтомопоксвирусы насекомых *Melanoplus sanguinipes* и *Amsacta moorei*.

Полинуклеотидкиназы

- осуществляют перенос γ -фосфатных групп АТР на 5'-ОН группы ДНК или РНК.

Полинуклеотидкиназа бактериофага T4
используется для введения радиоактивной метки в ДНК или РНК с целью получения радиоактивно меченых зондов или секвенирования нуклеиновых кислот.

Терминальная трансфераза



- Осуществляет последовательное присоединение АМР из пула дезокси-рибонуклеозидтрифосфатов к 3'-ОН-группам молекул ДНК

Щелочные фосфатазы.

- Катализируют удаление 5'-фосфатных групп ДНК или РНК, а также расщепление макроэргических связей рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов

.

Нуклеазы в генной инженерии.

- Экзонуклеаза III *E. coli*
- Экзонуклеаза фага λ
- Нуклеаза S1 из *Aspergillus orizae*
- Панкреатическая рибонуклеаза А (РНКаза А)
- Панкреатическая дезоксирибонуклеаза I (ДНКаза I)