

**Характеристика
ферментів
мікроорганізмів, які
використовують у генній
інженерії як інструмент**

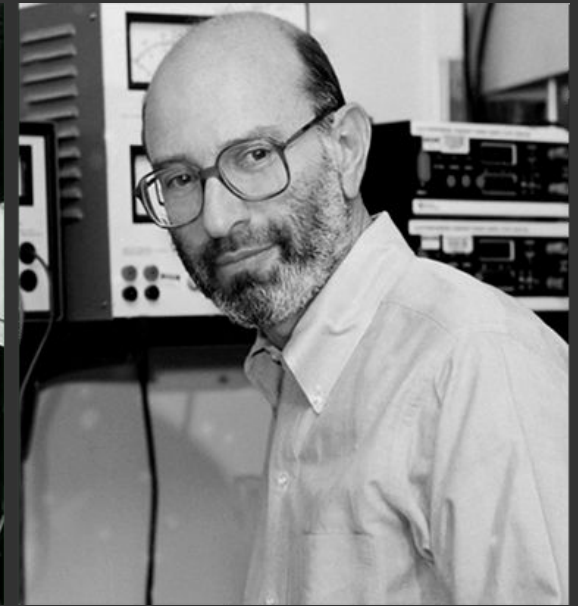
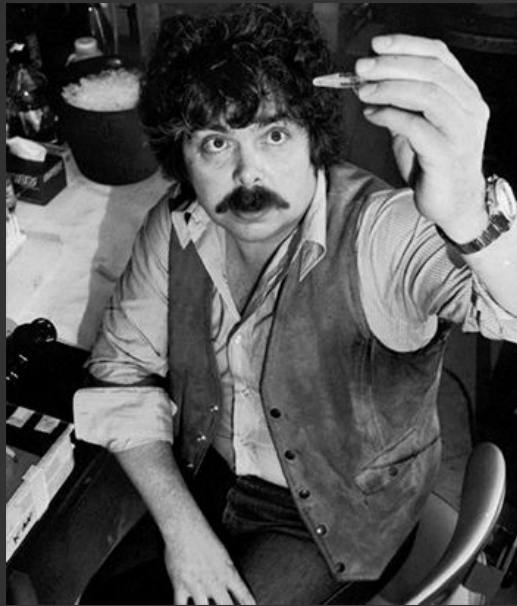


Виконала студентка групи БЛБ-13М

Дуда Ольга



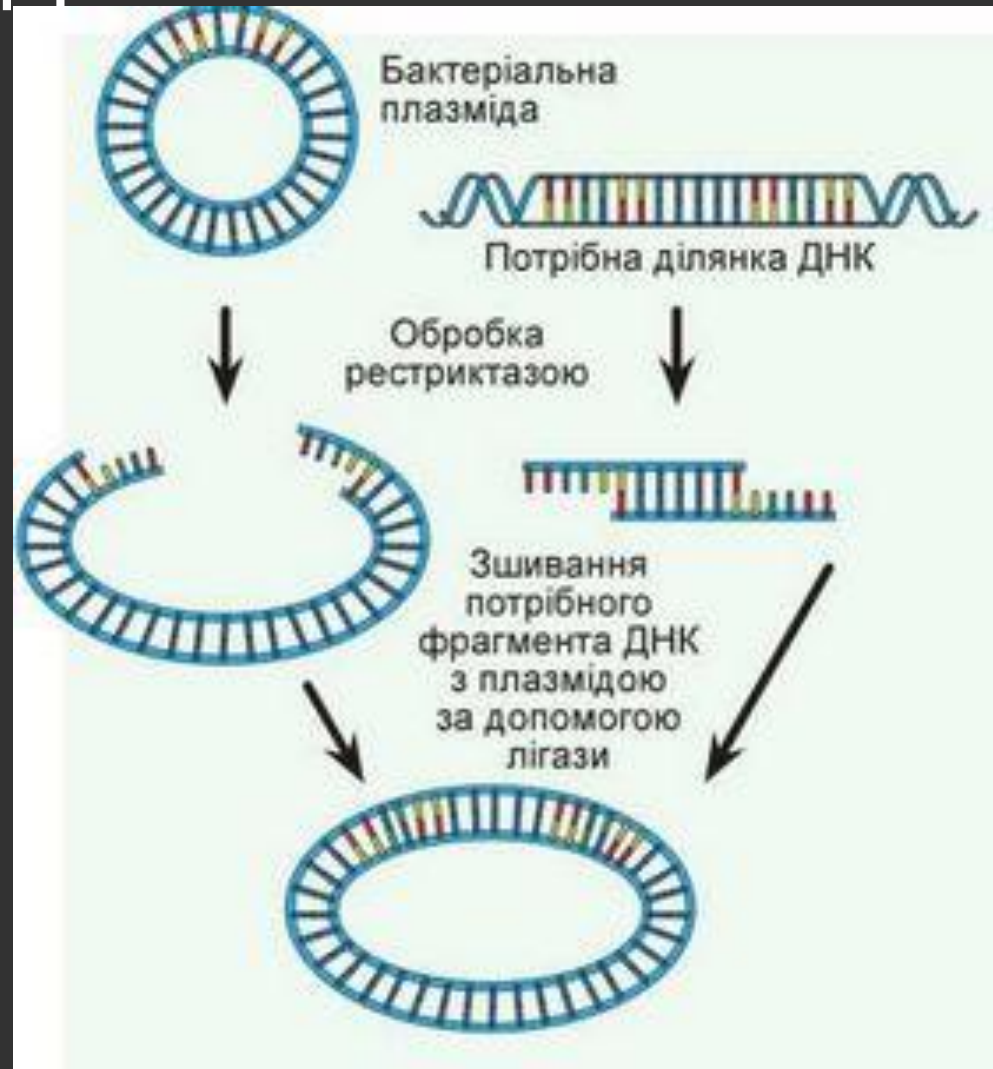
Пол Берг, 1972 – отримав
першу
рекомбінантну ДНК



Герберт Бойер та Стенлі Коен, 1973 – творці
першого трансгенного організму

Схема отримання рекомбінантних ДНК

Конструювання рекомбінантних молекул можливе лише за умов використання ферментів, які є обов'язковими та незамінними інструментами у генній інженерії.



Основні ферменти генної інженерії

- Рестрикційні ендонуклеази (рестриктази) – бактерійні ферменти, які розщеплюють ДНК в чітко визначених сайтах (сайтах рестрикції) з утворенням липких або тупих кінців. Рестрикційна активність ендонуклеаз часто асоційована з метилазою.
- За відкриття рестриктаз та їх застосування в молекулярній генетиці В. Арберу, Х. Сміту та Д. Натансу в 1978 р. було присуджено Нобелівську премію.
- За основними характеристиками (кількість субодиниць, потреба кофакторів, специфічність сайтів розщеплення і їх розташування) рестриктази поділяють на 4 класи, але у технології рекомбінантних ДНК використовуються ER II типу.

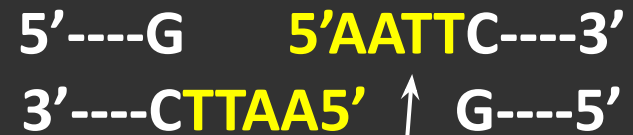
Системи рестрикції-модифікації II типу

- Системи рестрикції - модифікації типу II широко розповсюджені серед бактерій. Їх можуть кодувати геноми археобактерій, фагів та вірусів водоростей.
- Відомо більше 3500 EP Типу II, які впізнають понад 240 різних послідовностей ДНК
- Системи РМ II типу є простими і найкраще вивченими
- Рестрикційні ферменти, зазвичай, є гомодимерами і співіснують в клітинах з окремими білками-метилтрансферазами
- Для своєї активності EP потребують лише Mg^{2+}
- Відповідні МТ потребують для своєї активності як кофактор S-аденозилметіонін, метилують обидва ланцюги ДНК, формуючи залишки N6-метиладеніну, 5-метилцитозину або N4-метилцитозину
- Впізнають паліндромні послідовності по 4-8 п.н., паліндромні послідовності, які перервані неспецифічними нуклеотидами або частково паліндромні чи несиметричні послідовності

- Назва ферменту складається з першої літери родової і двох перших літер видової назви бактерій, з якої його було виділено, і римської цифри – порядкового номера ферменту в серії інших, виділених з цього ж виду мікроорганізмів. В назві може зазначатись тип ферменту R – рестриктаза, M – метилаза.
- **Наприклад:** *Hinc* – виділений з *Haemophilus influenzae* серотипу c, а *EcoR1* – перша з рестриктаз виділених з *E. coli*

Типи ендонуклеаз рестрикції			
Властивості ферменту	Клас ферменту		
	Тип I	Тип II	Тип III
Структура білка	Дифункціональний фермент з трьох субодиниць	Окремо ендонуклеаза і метилаза	Дифункціональний фермент з двох субодиниць
Сайт упізнання	Двостороння й асиметрична послідовність	Коротка послідовність (4-6 пар основ), часто паліндромна	Асиметрична послідовність (5-7 пар основ)
Сайт розщеплення	Неспецифічний, на відстані близько 1000 пар основ від сайту впізнання	Той же, що й сайт упізнання, чи близько нього	Відокремлений від сайту впізнання ділянкою 24-26 пар основ
Рестрикція і метилювання	Взаємовиключені	Окремі реакції	Одночасно
АТФ-залежність	Так	Ні	Так

ЕР *EcoRI* впізнає та розщеплює в ДНК
гексануклеотидну послідовність (GAATTC), утворюючи фрагменти з
тетрануклеотидними 5'-липкими кінцями



Липкі кінці

Специфічність ЕР змінюється залежно від умов

- *EcoRI* при рН 7,3, 100 мМ NaCl та MgCl₂ впізнає послідовність GAATTC
- При збільшенні рН до 8,3, заміні Mg²⁺ на Mn²⁺ впізнає послідовність AATT. Таку змінену активність позначають як *EcoRI** (*star*) - активність

- Є такі ендонуклеази, які розщеплюють ланцюги строго один напроти одного тоді утворюються фрагменти ДНК з «тупими кінцями».
- Назви для них складаються з літер роду та виду. Римські цифри – номер ендонуклеази, яку виділили з мікроорганізму.
- Наприклад: *Escherichia coli* - **EcoRI**, *Haemophilus parainfluenzae* – **HpaI**, **HpaII**
- Сайти впізнання можуть складатися з 4, 5, 6, 8 та більше пар нуклеотидів. Від довжини «сайта впізнання» залежить частота його розповсюдження у молекулі ДНК

BamH I – Bacillus amyloliquefaciens

Pst I – Providencia stuartii

Sau3A I – Staphylococcus auerus 3A

Pvu II – Proteus vulgaris

Hpa I – Haemophilus parainfluenzae

Hae III – Haemophilus aegypticus

ферменти	Сайт впізнання	Характер розщеплення
<i>EcoR I</i>	G AATTC CTTAA G	<i>Липкі кінці</i>
<i>BamH I</i>	G GATCC CCTAG G	<i>Липкі кінці</i>
<i>Pst I</i>	CTGCA G G ACGTC	<i>Липкі кінці</i>
<i>Sau3A I</i>	GATC CTAG	<i>Липкі кінці</i>
<i>Pvu II</i>	CAG CTG GTC GAC	<i>Тупі кінці</i>
<i>Hpa I</i>	GTT AAC CAA TTG	<i>Тупі кінці</i>
<i>Hae III</i>	GG CC CC GG	<i>Тупі кінці</i>

Використання ER II типу у генетичній інженерії

- Отримання певних фрагментів ДНК з певною структурою кінців
- Фрагменти фракціонують за розмірами за допомогою гель-електрофорезу та піддають іншим маніпуляціям, наприклад, з'єднують їх з іншими фрагментами
- Визначають розміри фрагментів ДНК, порівнюючи їхню електрофоретичну рухливість з рухливістю маркерних фрагментів, розміри яких відомі
- Розміщення сайтів розщеплення ER є постійною характеристикою молекули ДНК – її “молекулярним маркером”
- Це дає змогу будувати фізичні (рестрикційні) карти геномів – схеми розміщення сайтів розщеплення ER. Віддаль між сайтами на картах визначають у парах нуклеотидів. Побудова рестрикційних карт є важливим методом вивчення організації геномів і передумовою подальших генно-інженерних процедур

Інші нуклеази, які використовують у генетичній інженерії

Екзонуклеаза VII *E. coli* розщеплює одноланцюгову ДНК з 5'- та 3'- кінців



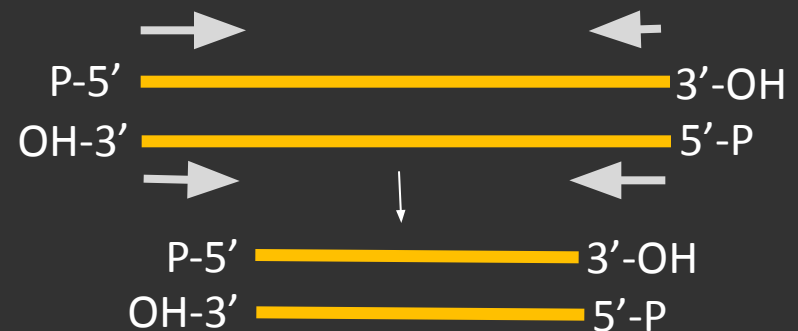
λ -екзонуклеаза *E. coli* розщеплює дволанцюгову ДНК з 5'- кінців



Екзонуклеаза III *E. coli* розщеплює дволанцюгову ДНК з 3'- кінців



Нуклеаза Val *Alteromonas espejana* розщеплює дволанцюгову ДНК з 5'- та 3'- кінців

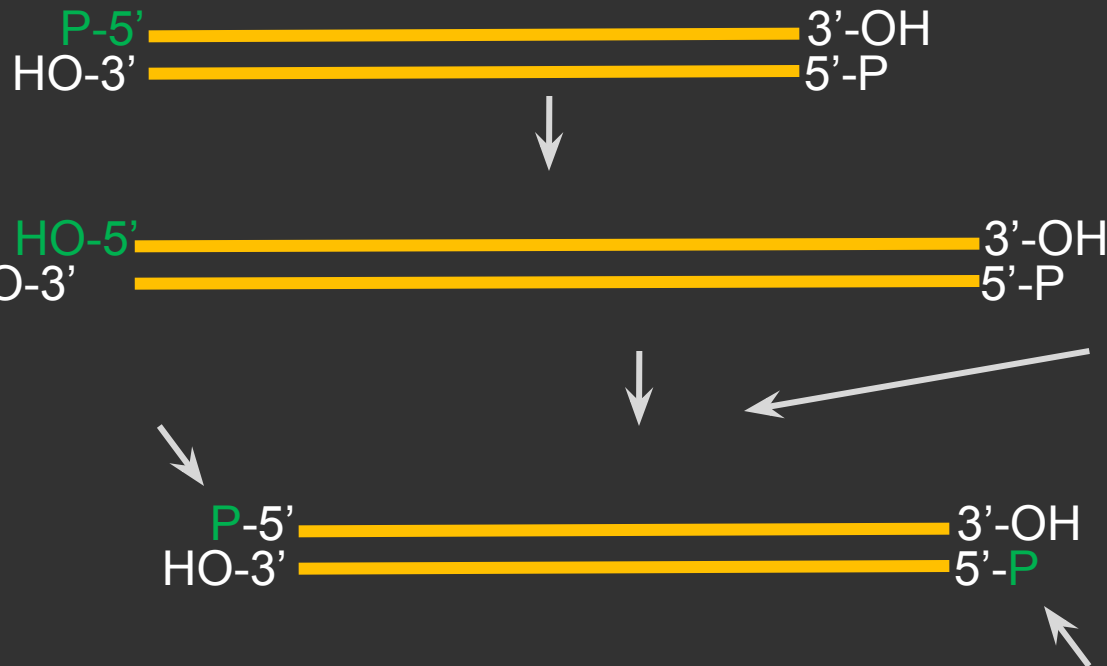


Інші ферменти, що застосовують у генній інженерії

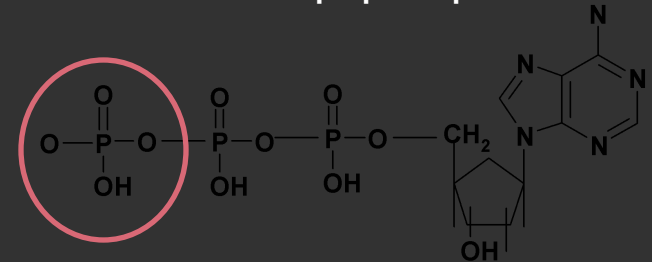
- Полімерази – ферменти, що здійснюють матричний синтез нуклеїнових кислот у напрямку 5' – 3'. Серед полімераз найчастіше використовують:
 1. ДНК–полімераза I *E. coli* – полімеразна активність у напрямку 5' – 3' та екзонуклеазна активність в обох напрямках
 2. Кленов-фрагмент ДНК-полімерази I *E. coli*
 3. ДНК-полімеразу бактеріофага T4 *E. coli*
 4. ДНК-полімеразу бактеріофага T7 *E. coli*
 5. ДНК-полімеразу з термофільних бактерій (Taq-, Pwo- та інші)
 6. РНК-залежну ДНК-полімеразу (зворотну транскриптазу)
 7. Термінальну дезоксирибонуклеотидил-трансферазу
 8. РНК-полімерази фагів T3, T7
 9. Полі(А)-полімераза
 10. РНК-залежна-ДНК-полімераза (зворотна транскриптаза)

Інші ферменти, що застосовують у генній інженерії

- Лужна фосфатаза – відщеплює залишки фосфату на 5'-кінцях ланцюгів ДНК.
- Полінуклеотидкіназа – переносить мічений фосфат з АТФ на 5'-кінці ланцюгів ДНК.



Мічений ^{32}P γ -фосфат





Дякую за увагу!