

[Akceptuję](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal](#) [Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

zapisz się



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

Enzymy restrykcyjne: wykorzystanie w biologii molekularnej do trawienia DNA

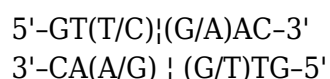


Enzymy restrykcyjne, określane także jako restryktazy czy endonukleazy restrykcyjne, są enzymami izolowanymi z bakterii lub sinic (rzadziej z promieniowców), które zdolne są do rozpoznawania specyficznych sekwencji w DNA, a także do przecinania dwuniciowej cząsteczki DNA [8].

Większość używanych enzymów restrykcyjnych rozpoznaje sekwencję składającą się z czterech lub sześciu nukleotydów. Są to tzw. sekwencje palindromowe, tj. sekwencje posiadające oś symetrii [8]. Palindromowość oznacza, że czytana sekwencja obydwu nici w kierunku 5' - 3' lub 3' - 5' jest taka sama.

Enzymy restrykcyjne związane są ze zjawiskiem restrykcji i modyfikacji, którego model zaproponował Arber i Dussoix w 1962 roku. Zaproponowany model zakłada, że w komórce istnieją 2 enzymy, z których jeden odpowiada za rozpoznawanie specyficznej sekwencji i przecięcia DNA, zaś drugi za jego modyfikację [4].

Pierwszy enzym restrykcyjny został wyizolowany ze szczepu bakterii *Escherichia coli*. Tego przełomowego odkrycia dokonali Meselson i Yuan w 1968 roku. Z kolei, w 1970r. Smith i jego współpracownicy, wyizolowali enzym restrykcyjny z bakterii *Haemophilus influenzae*, nazwany później jako *Hind II*. Ponadto, odkrywcy wykazali, że enzym ten tnie DNA w konkretnej, specyficznej sekwencji:



Dalej, w 1972 r. Hedgpeth, Goodman i Boyer wyizolowali i opisali inny enzym, tym razem z bakterii *Escherichia coli*- nazwany **EcoR I** [1], [2], [3], [5].

Rozróżnia się 3 klasy enzymów restrykcyjnych, z czego największe znaczenie w biologii molekularnej mają enzymy zaliczane do klasy II, tj. endonukleazy restrykcyjne (dokonujące trawienia cząsteczki DNA po rozpoznaniu specyficznej sekwencji), oraz metylazy (mające zdolność modyfikowania sekwencji rozpoznawanej przez endonukleazy). Jak wspomniano źródłem enzymów restrykcyjnych są bakterie, a obecnie wyizolowano ok. 300 restryktaz [7].

Podział na klasy enzymów restrykcyjnych

Enzymy klasy I:

- przecinają cząsteczkę DNA od wewnątrz, nie rozpoznając określonych sekwencji. Nie posiadają zdefiniowanych miejsc cięcia cząsteczki, przez co są enzymami mało specyficznymi. Oprócz jonów Mg^{2+} , do działania wymagają także S-adenozynometioniny (SAM) oraz ATP [6].

Enzymy klasy II:

- zdolne są do rozpoznawania specyficznych sekwencji w DNA, a także przecinania dwuniciowej cząsteczki DNA w dwóch miejscach w obrębie tej sekwencji, bądź w dokładnie zdefiniowanym miejscu w pewnej odległości od niej. Podobnie jak enzymy klasy I, do działania wymagają obecności jonów Mg^{2+} . Są enzymami, które mają największe znaczenie praktyczne w biologii molekularnej [6].

Enzymy klasy III:

- rozpoznają określone sekwencje w DNA, ale miejsce ich cięcia nie jest dokładnie zdefiniowane. Do działania wymagają zarówno ATP jak i jonów Mg^{2+} [6].

W wyniku trawienia określonej cząsteczki DNA danym enzymem restrykcyjnym powstaje zawsze taka sama liczba fragmentów określonej wielkości. Liczbę i wielkość uzyskiwanych fragmentów DNA ustala się poddając strawiony DNA elektroforezie w żelach agarozowych lub akryloamidowych. Analizując produkty trawienia różnymi enzymami restrykcyjnymi (stosowanymi pojedynczo, w kombinacjach, oraz w ilościach wystarczających lub niewystarczających do pełnego strawienia preparatu) możliwe jest ustalenie wzajemnego położenia i odległości pomiędzy sekwencjami rozpoznawanymi przez te enzymy. Tak więc możliwe jest sporządzenie mapy restrykcyjnej danej cząsteczki DNA [8], [4].

Wszystkie enzymy po trawieniu dwuniciowego DNA zostawiają grupę fosforanową na końcu 5', zaś grupę hydroksylową na końcu 3'. Aktywność enzymów restrykcyjnych zależy od stężenia soli (chlorku sodu - NaCl), która zawarta jest w buforze. W zależności od rodzaju, niektóre enzymy wykazują maksimum swojego działania przy wysokim stężeniu soli (150mM), zaś inne przy niskim [4].

Dane dotyczące wymaganego stężenia soli zamieszczają katalogi firm produkujących enzymy (np. New England Biolabs, Fermentas). Zawsze wskazane jest stosowanie buforów zalecanych przez producenta danego enzymu. W przypadku, gdy DNA ma być strawiony dwoma różnymi enzymami restrykcyjnymi, które wymagają różnych buforów, należy najpierw przeprowadzić trawienie w buforze o niższym stężeniu soli, a następnie podwyższyć stężenie soli w mieszaninie reakcyjnej poprzez dodanie odpowiedniej objętości stężonego roztworu NaCl. Jeżeli DNA ma być trawiony kilkoma enzymami restrykcyjnymi, możliwe jest przeprowadzenie jednoczesnej reakcji dla wszystkich enzymów, jednak pod warunkiem, że znajdzie się bufor, w którym wszystkie enzymy będą efektywnie działać [7], [8], [10].

Na ogół różne enzymy restrykcyjne rozpoznają różne sekwencje DNA. Znanych jest jednak wiele przykładów enzymów restrykcyjnych, które izolowane są z odrębnych organizmów, a mimo to rozpoznają takie same sekwencje DNA. Przykładem może być np. enzymy Sau3AI oraz MboI, które rozpoznają sekwencję 5'GATC3'. Enzymy cechujące się takimi właściwościami nazywamy izoschizomerami. Izoschizomery mogą ciąć rozpoznawaną sekwencję w różny sposób [np. MboI (G/TAC) i DpnI (GA/TC) [9], [10].

Bufory do trawienia

Bufory stosowane do trawienia przygotowane są w postaci 10-krotnie stężonych roztworów, zaś do trawienia nie należy dodawać więcej enzymu niż 1/10 objętości mieszaniny reakcyjnej. Stężone preparaty enzymów należy zawsze rozcieńczać w odpowiednim buforze- nigdy w wodzie ze względu na możliwość denaturacji [7].

Z dostępnych na rynku enzymów, niektóre mają dodatkowe aktywności, które pojawiają się w pewnych warunkach trawienia (zjawisko to określane jest jako aktywność „star”). Informacje o takiej aktywności zawsze podawane są przez producentów enzymów restrykcyjnych w dołączonych do opakowania ulotkach. Sporządzając mieszaninę reakcyjną, należy pamiętać, że enzym dodaje się zawsze na końcu, a dodawane enzymy bezwzględnie muszą być trzymane w temperaturze -20°C, wtedy też wykazują swoją stabilność. Najlepiej jak enzymy przechowywane są w niskiej temperaturze w buforze zawierającym 50% glicerol [7].

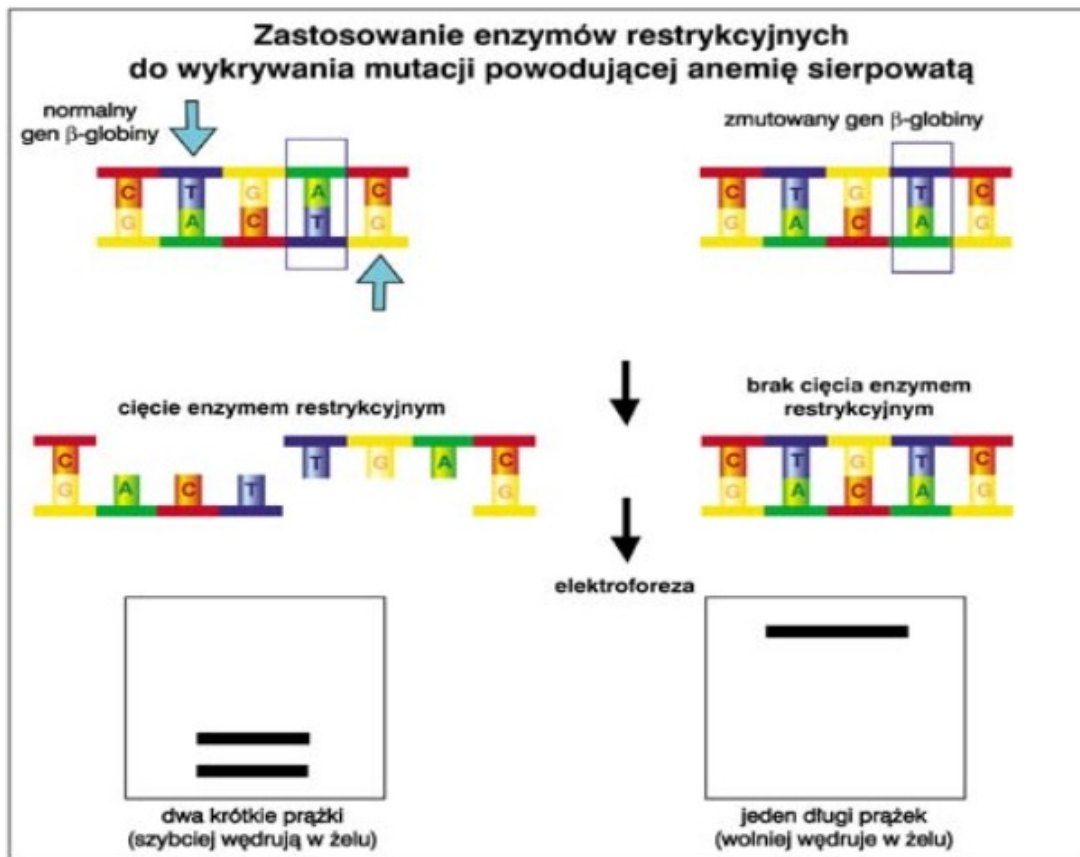
Warunki trawienia muszą być takie same jak zalecane w katalogach producentach. Trawienie enzymami restrykcyjnymi można zatrzymać przez dodanie roztworu EDTA, a następnie grzanie mieszaniny przez 10 do 15 minut w temperaturze sięgającej 65-70°C lub ekstrakcję fenolem. Co ważne, należy pamiętać, że niektóre z dostępnych enzymów są termo stabilne - tj. nie ulegają termicznej inaktywacji [8].

Enzym:	Rozpoznawana sekwencja:
AluI	5' - AG_CT-3' 3' - TC_GA-5'
Asu3AI	5' - _GATC-3' 3' - CTAG_-5'
BamHI	5' - G_GATCC-3' 3' - CTAA_G-5'
BsrBI	5' - G_GATCC-3' 3' - CCTAG_G-5'
EcoRI	5' - G_AATTC-3' 3' - CTAA_G-5'
NotI	5' - GC_GGCCGC-3' 3' - CGCCGG_CG-5'

Zdjęcie: Przykłady enzymów restrykcyjnych (według Brown T.A. i <http://rebase.neb.com/rebase/>), <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/Mapowanie-genomow/>

Zastosowanie enzymów restrykcyjnych:

- sporządzanie map genów
- izolacja oraz identyfikacja genów
- sekwencjonowanie DNA
- porównywanie DNA (pochodzących z różnych organizmów)
- rekombinowanie i klonowanie genów (lub fragmentów genów)
- diagnostyka (chorób genetycznych, niektórych chorób nowotworowych, chorób infekcyjnych)
- zastosowanie w medycynie : ustalanie zgodności tkankowej - niezbędnej w transplantologii, do ustalania pokrewieństwa [4].



Zdjęcie: http://microbio.gumed.edu.pl/materialy/biol_mol/Enzymy_restrykcyjne.pdf

Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi [10].

Zazwyczaj, inkubację preparatów DNA z enzymami restrykcyjnymi prowadzi się w temperaturze 37°C, w czasie 1 godziny lub dłużej. Przerwanie reakcji (trawienia) można przeprowadzić przez termiczną inaktywację danego enzymu, którą to przeprowadza się w 65°C przez 15 minut. Innym sposobem przerwania trawienia jest dodanie do próbki EDTA o pH=8.0 do końcowego stężenia równego 10 mM (chelatacja jonów magnezu) [6], [10].

Jednostkę enzymu definiuje się jako taką ilość enzymu, która jest w stanie kompletnie strawić 1 μ g DNA w odpowiednim buforze i optymalnej temperaturze w objętości 20 μ l w czasie 1 godziny.

Wykonanie:

Roztwór zawierający ok. 1,2 do 1 μ g DNA należy umieścić w probówce z dodatkiem wody (do objętości równej 18 μ l). Następnie, do próbki dodać 2 μ l odpowiedniego buforu do trawienia (10x stężonego). Jako bufor trawiący można zastosować 2x stężony bufor KGB (kalium glutamate buffer: 200 mM glutaminian potasu - 50 mM Tris/octan (o pH=7.5) - 20 mM (CH₃COO)₂Mg - 100 μ g/ml albumina z surowicy cieląt - 1 mM 2-merkaptoetanol). Całość delikatnie wymieszać (przez uderzanie probówki palcem).

Po wymieszaniu do próbki dodać 1-2 jednostki enzymu restrykcyjnego, wymieszać, inkubować w optymalnej temperaturze przez czas zalecany przez producenta. Reakcję trawienia zatrzymać przez dodanie EDTA (0,5 M roztwór EDTA o pH=8.0) [7], [10].

Analiza strawionego DNA:

Strawiony enzymami restrykcyjnymi DNA można poddać analizie wieloma sposobami, choć najbardziej znana i najczęściej wykorzystywana jest elektroforeza w żelach agarozowych.

Stosując DNA prokariotyczne wraz z odpowiednio dobranym enzymem, w wyniku trawienia i po rozdzielaniu otrzymuje się kilka pasm odpowiadających fragmentom restrykcyjnym. Preparat kontrolny, tj. taki, który nie jest potraktowany enzymem daje tylko jedno pasmo. W przypadku DNA eukariotycznego w wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym otrzymuje się zazwyczaj przesunięcie całego pasma odpowiadającego danemu DNA w stronę odpowiadającą mniejszej ruchliwości elektroforetycznej [7].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

- [1]. Lewiński W., "Genetyka" (Wydawnictwo Operon, 2001);
- [2]. Brown T.A., "Genomy" (Wydawnictwo Naukowe PWN, 2001);
- [3]. "Genetyka molekularna" praca zbiorowa pod red. Piotra Węgleńskiego (Wydawnictwo Naukowe PWN, 2000).
- [4]. http://microbio.gumed.edu.pl/materialy/biol_mol/Enzymy_restrykcyjne.pdf
- [5]. http://www.genowo.website.pl/enzymy_restrykcyjne.php
- [6]. http://biotechnologia.pl/biotechnologia-portal/info/biotechnologia/32_opracowania/229373,enzymy_restrykcyjne.html
- [7]. Kłyszajko-Stefanowicz L., 2003. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s. 435 - 437
- [8]. Genetyka Molekularna, materiały do zajęć laboratoryjnych, 2003. Skrypt przygotowany przez pracowników Zakładu Genetyki UW.
- [9]. https://mailattachment.googleusercontent.com/attachment/?ui=2&ik=6bef97507a&view=att&th=13f8768ee45d3012&attid=0.3&disp=inline&realattid=f_higffffw2&safe=1&zw&saduie=AG9B_P8OSj svMs-ZXGQd5UvJTKLx&sadet=1372666515503&sads=JXJ5sRu8hm0R7oC_e7nmfbpem1k
- [10]. Sambrook J i wsp., 1989. Molecular cloning. A laboratory manual . Book 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 5.31 - 5.32

<http://laboratoria.net/artukul/18520.html>

Informacje dnia: [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedziny na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki](#) [Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych](#) [87% internautów uważa](#)

[hejt za poważny problem społeczny Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedziny na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedziny na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#)

Partnerzy