

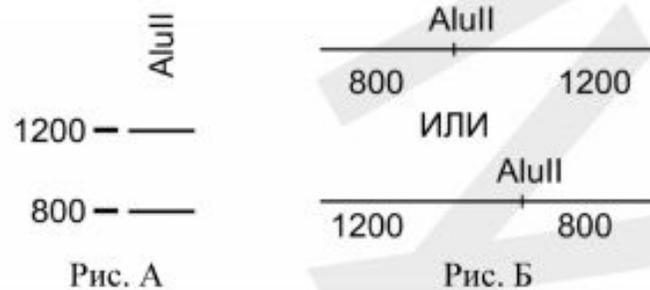
Составление карт рестрикции

Разбор задания

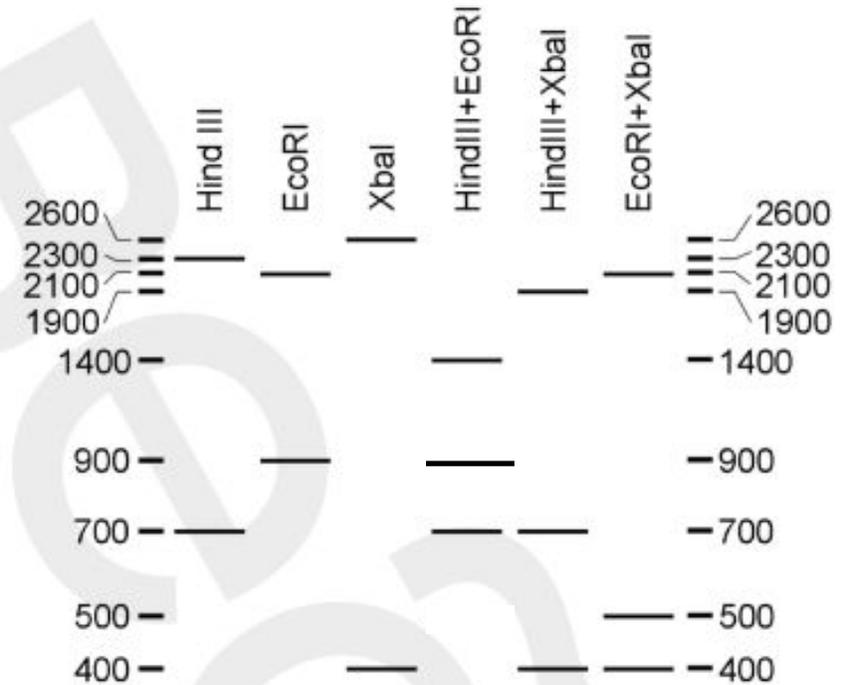
Задание

9

Рестрикционные эндонуклеазы (рестриктазы) – это ферменты, специфически разрезающие молекулу ДНК в определённом месте. Такие места называют сайтами рестрикции. Карты расположения сайтов рестрикции часто составляют генные инженеры, поскольку рестриктазы используются как природные ножницы, для того чтобы разрезать фрагмент ДНК в нужном учёному месте. Карты составляются на основе анализа результатов обработки ДНК соответствующими рестриктазами. Например, если фрагмент при обработке рестриктазой AluI дал фрагменты длиной 800 и 1200 пар нуклеотидов (рис. А), то карта фрагмента будет выглядеть следующим образом (рис. Б).

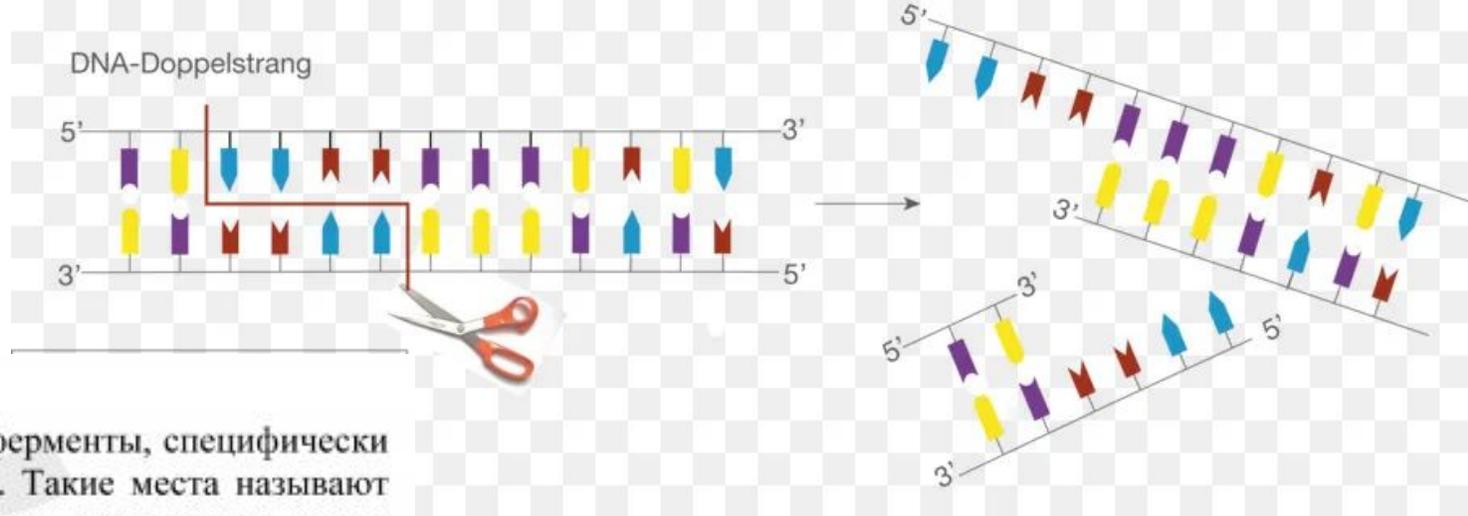


Ниже приведена схема результатов обработки интересующего учёного фрагмента ДНК тремя рестриктазами и сочетаниями из двух рестриктаз.



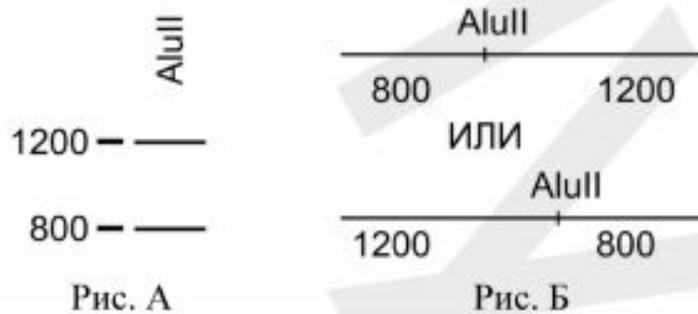
Постройте рестрикционную карту данного фрагмента ДНК, используя данные рисунка. Перерисуйте в бланк ответов схему фрагмента молекулы ДНК, как изображено на примере ниже.

Нанесите на неё рестриктазы в тех местах, где они расположены. Не забудьте указать расстояния между сайтами рестрикции.



9

Рестрикциионные эндонуклеазы (рестриктазы) – это ферменты, специфически разрезающие молекулу ДНК в определённом месте. Такие места называют сайтами рестрикции. Карты расположения сайтов рестрикции часто составляют генные инженеры, поскольку рестриктазы используются как природные ножницы, для того чтобы разрезать фрагмент ДНК в нужном учёному месте. Карты составляются на основе анализа результатов обработки ДНК соответствующими рестриктазами. Например, если фрагмент при обработке рестриктазой AluI дал фрагменты длиной 800 и 1200 пар нуклеотидов (рис. А), то карта фрагмента будет выглядеть следующим образом (рис. Б).

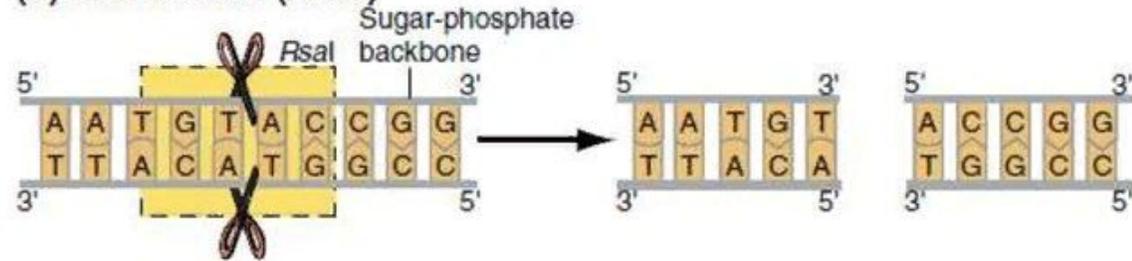


Ферменты-рестриктазы

Ниже приведена схема результатов обработки интересующего учёного фрагмента ДНК тремя рестриктазами и сочетаниями из двух рестриктаз.

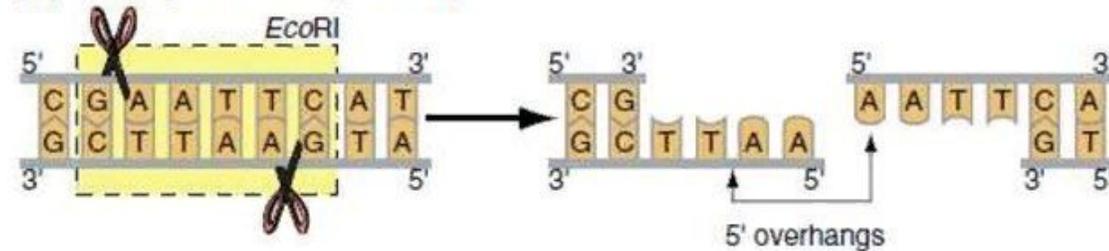
Формы разрывов ДНК, образующихся под действием рестриктаз класса II

(a) Blunt ends (*RsaI*)



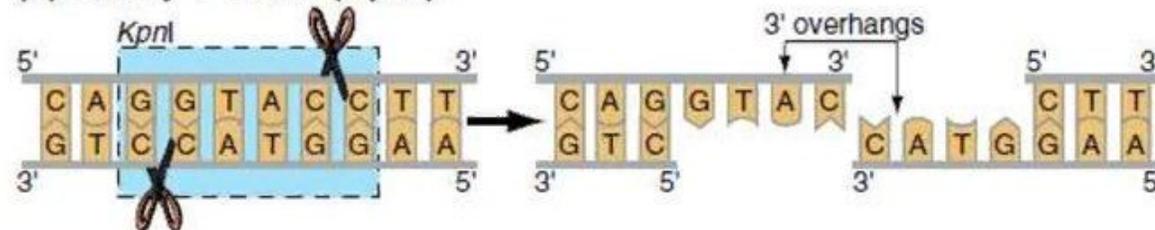
«Тупые» концы

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



5'-выступающие

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



3'-выступающие

Рестрикция ДНК

Сначала необходимо разобраться в том, что такое рестрикция ДНК. Рестрикция молекулы ДНК представляет собой разрезание молекулы ДНК при помощи эндонуклеаз рестрикции. Эндонуклеазы рестрикции – своеобразные молекулярные ножницы – это ферменты, которые разрезают фосфодиэфирную связь между соседними нуклеотидами в молекуле ДНК. Разные типы эндонуклеаз рестрикции различаются между собой по особенностям узнавания и разрезания молекул ДНК. И молекулярных биологов, работающих в лабораториях, и составителей олимпиадных заданий на построение карт рестрикции больше всего интересуют эндонуклеазы рестрикции II типа.

Эндонуклеазы рестрикции II типа (для сокращения молекулярные биологи зачастую называют их просто *рестриктазами*) - ферменты, которые распознают в молекулах ДНК короткие (4-14 пар нуклеотидов) зеркально симметричные участки (так называемые палиндромы) и разрезают обе цепи ДНК посередине этих участков либо со смещением. Эти участки называются сайтами рестрикции. Каждая эндонуклеаза рестрикции II типа характеризуется своим особым сайтом рестрикции и уникальным способом разрезания. В настоящее время для решения генно-инженерных задач используется несколько сотен эндонуклеаз рестрикции II типа. Название рестриктазы образуется путем сочетания первой буквы рода бактерии и двух первых букв вида бактерии, из которых они были выделены. За основу берется название бактерии на латинском языке. Например, фермент *EcoRI* (читаем «эко эр один») назван так, потому что выделен из бактерии *Escherichia coli* штамма RY13 первым по счету (I).

9

Рестрикционные эндонуклеазы (рестриктазы) – это ферменты, специфически разрезающие молекулу ДНК в определённом месте. Такие места называют сайтами рестрикции. Карты расположения сайтов рестрикции часто составляют генные инженеры, поскольку рестриктазы используются как природные ножницы, для того чтобы разрезать фрагмент ДНК в нужном учёному месте. Карты составляются на основе анализа результатов обработки ДНК соответствующими рестриктазами. Например, если фрагмент при обработке рестриктазой *AluI* дал фрагменты длиной 800 и 1200 пар

Карты рестрикции

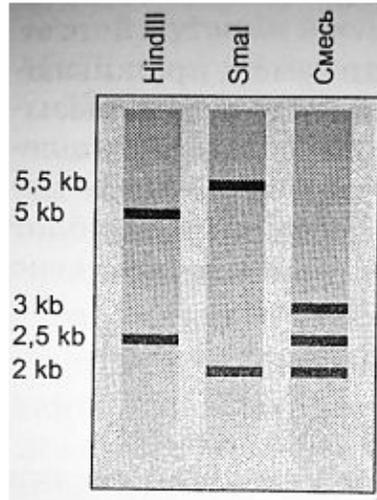
Разобравшись с основными понятиями рестрикции ДНК, можем переходить к решению задач на построение карт рестрикции. Карта рестрикции – это схематическое изображение фрагмента ДНК, на котором указаны сайты рестрикции упомянутых в задаче рестриктаз и длин образующихся фрагментов. Решим несколько задач, используя следующий алгоритм.

Алгоритм решения задач на построение карт рестрикции

- 1) Определяем, с какой ДНК мы имеем дело – линейной или кольцевой? Если не говорится специально, что ДНК кольцевая, плазмидная, митохондриальная либо хлоропластная, мы считаем, что она линейная.
- 2) Выписываем друг под другом рестриктазы (слева) и фрагменты, которые получаются после обработки ими ДНК (справа). Обязательно последней строкой указываем результаты совместного разрезания несколькими рестриктазами. Этот пункт очень важен для проверки правильности построения карты рестрикции.
- 3) Определяем общую длину разрезаемой ДНК. Либо находим готовое число, либо суммируем длины фрагментов.
- 4) Рисуем отрезок (для линейной ДНК) либо окружность (для кольцевой ДНК) для схематического обозначения молекулы ДНК, указанной в задаче.
- 5) Рисуем карту рестрикции для первой рестриктазы. Если в условиях есть рестриктазы с наименьшим числом сайтов рестрикции, то начинаем с них.
- 6) Наносим на эту карту один из возможных сайтов рестрикции для второй рестриктазы.
- 7) Указываем на карте рестрикции фрагменты ДНК, которые будут образовываться при разрезании сразу обоими ферментами.
- 8) Сравниваем размеры фрагментов при совместном разрезании, полученные при построении карты рестрикции (см. пункт №7) с данными, приведенными в условии задачи (см. пункт №2). Если все совпадает – оформляем финальную карту рестрикции.

Пример решения

(Гончаренко Г.Г. Основы генетической инженерии: учебное пособие / Г.Г. Гончаренко . - Минск: Высшэйшая школа, 2005 - 183 с.)



Линейный фрагмент ДНК разрезается ферментами *Hind*III и *Sma*I, а затем двумя ферментами вместе. В результате проведенного электрофореза в агарозном геле с последующим окрашиванием этидиум бромидом на электрофореграмме получена картина, представленная на рисунке. Постройте рестрикционную карту для исходной молекулы ДНК.

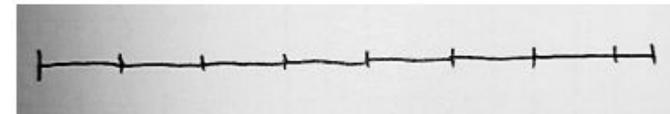
Решение

- 1) Линейная.
- 2) Размеры фрагментов определяем, глядя на рисунок. Анализируем первую дорожку, в которую нанесены фрагменты ДНК после обработки рестриктазой *Hind*III. Видим, что образуется два фрагмента размером 2,5 и 5 кб. На второй дорожке видны два фрагмента полученные при обработке рестриктазой *Sma*I. Их размеры – 2 и 5,5 кб. И, наконец, на третьей дорожке видны продукты совместного разрезания обеими рестриктазами. Их длины составляют 2, 2,5 и 3 кб.

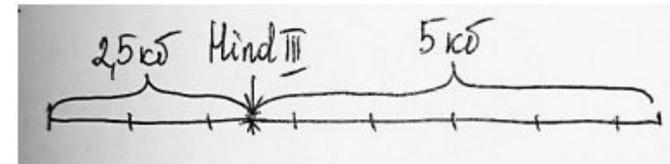
<i>Hind</i> III	2,5 и 5 кб
<i>Sma</i> I	2 и 5,5 кб
<i>Hind</i> III + <i>Sma</i> I	2, 2,5 и 3 кб

- 3) 7,5 кб ($2,5 + 5 = 7,5$; $2 + 5,5 = 7,5$; $2 + 2,5 + 3 = 7,5$).

4)

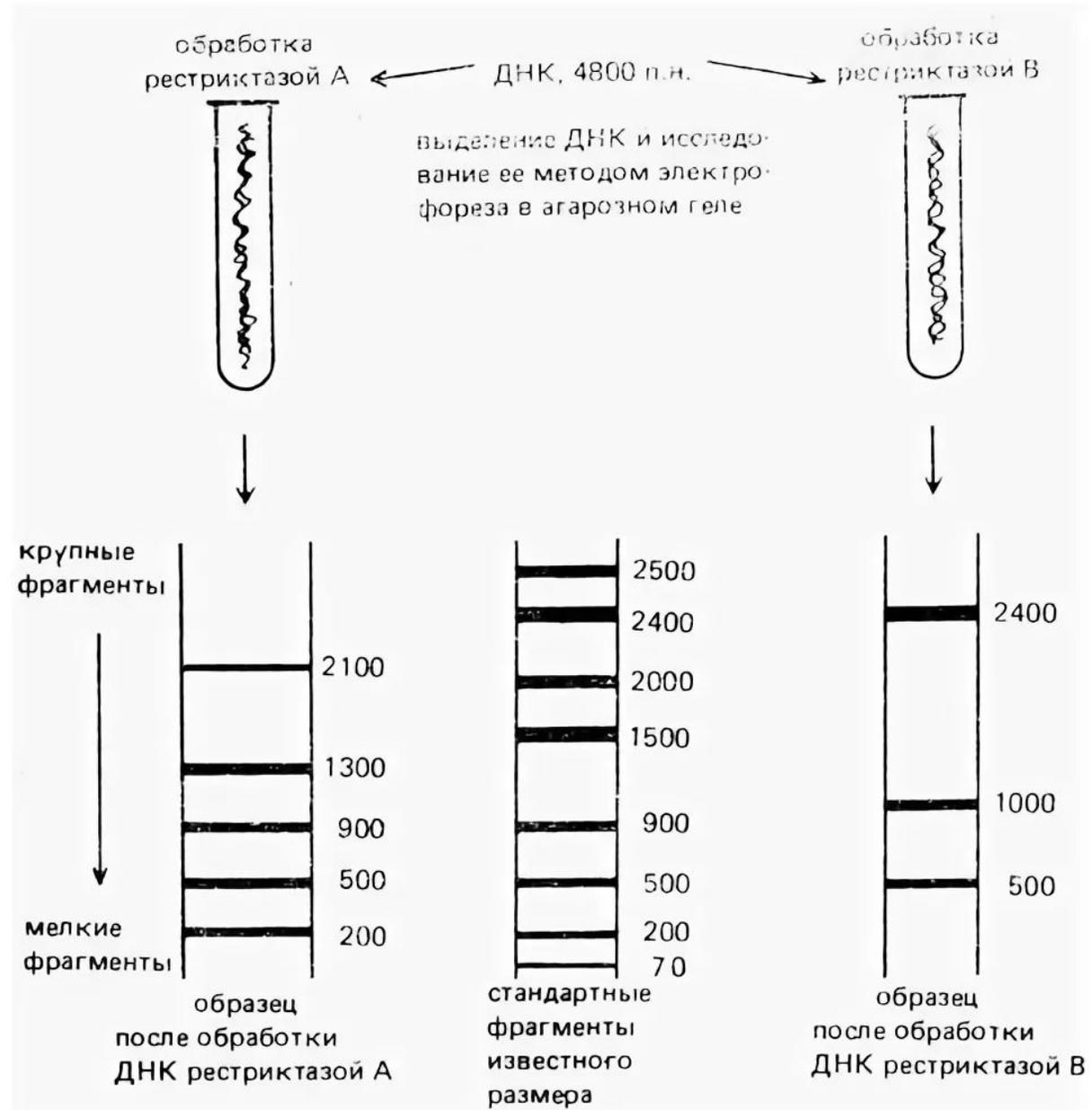
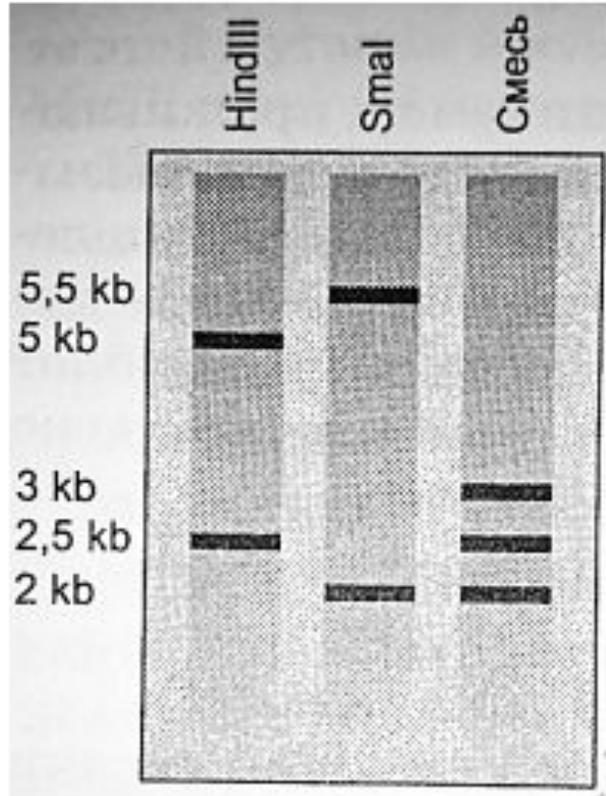


5)

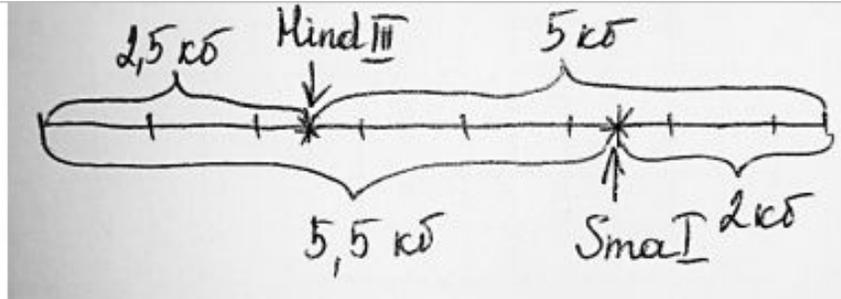


- 6) Попробуем подобрать место разреза, учитывая размеры фрагментов при совместном разрезании (смотрите пункт №2)

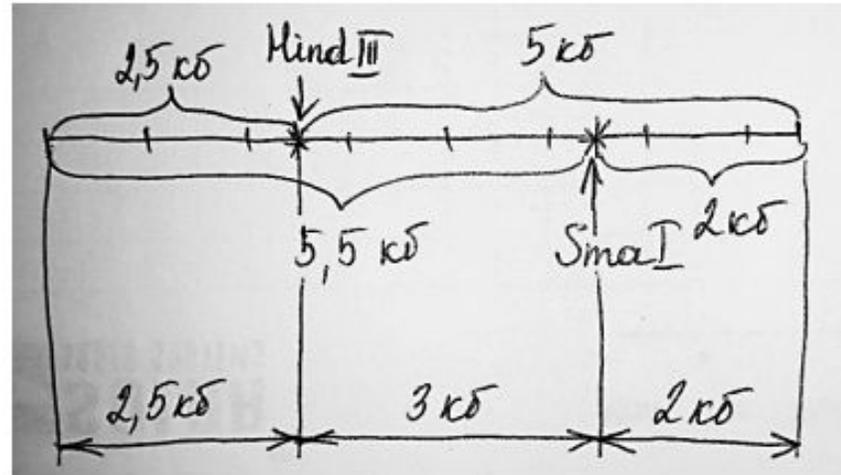
Пример решения



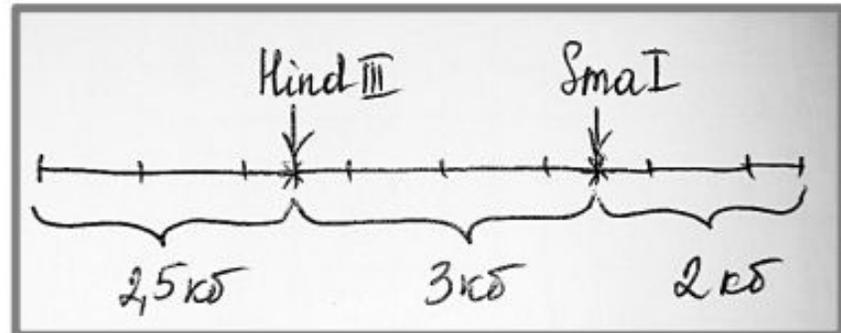
6) Попробуем подобрать место разреза, учитывая размеры фрагментов при совместном разрезании (смотрите пункт №2)



7)



8) В данном случае все совпадает. Карта рестрикции построена верно.



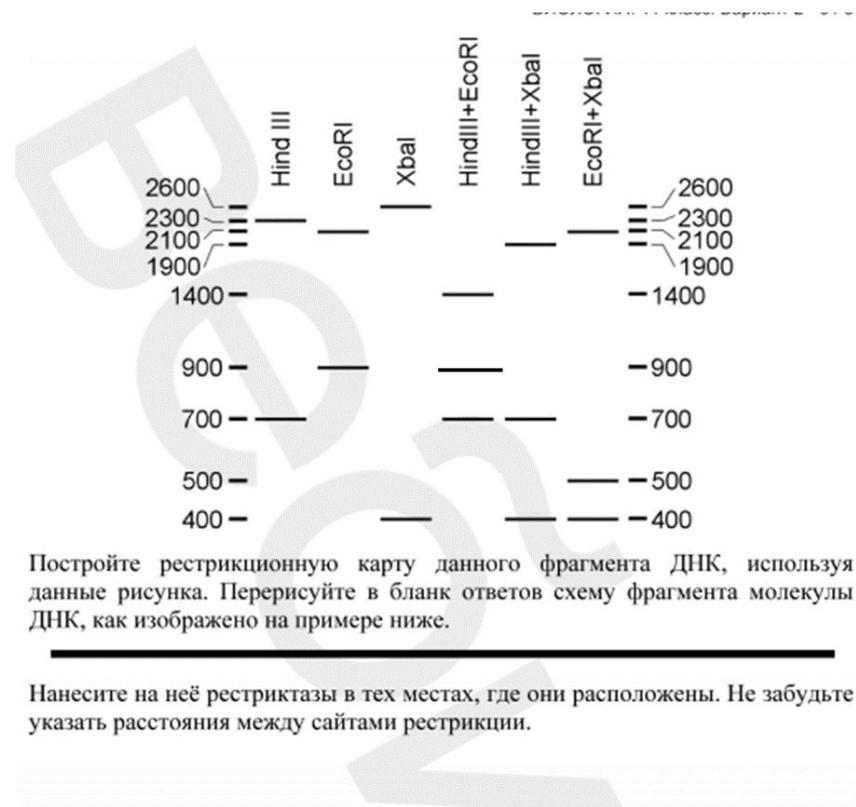
Карты рестрикции

Разобравшись с основными понятиями рестрикции ДНК, можем переходить к решению задач на построение карт рестрикции. Карта рестрикции – это схематическое изображение фрагмента ДНК, на котором указаны сайты рестрикции упомянутых в задаче рестриктаз и длин образующихся фрагментов. Решим несколько задач, используя следующий алгоритм.

Алгоритм решения задач на построение карт рестрикции

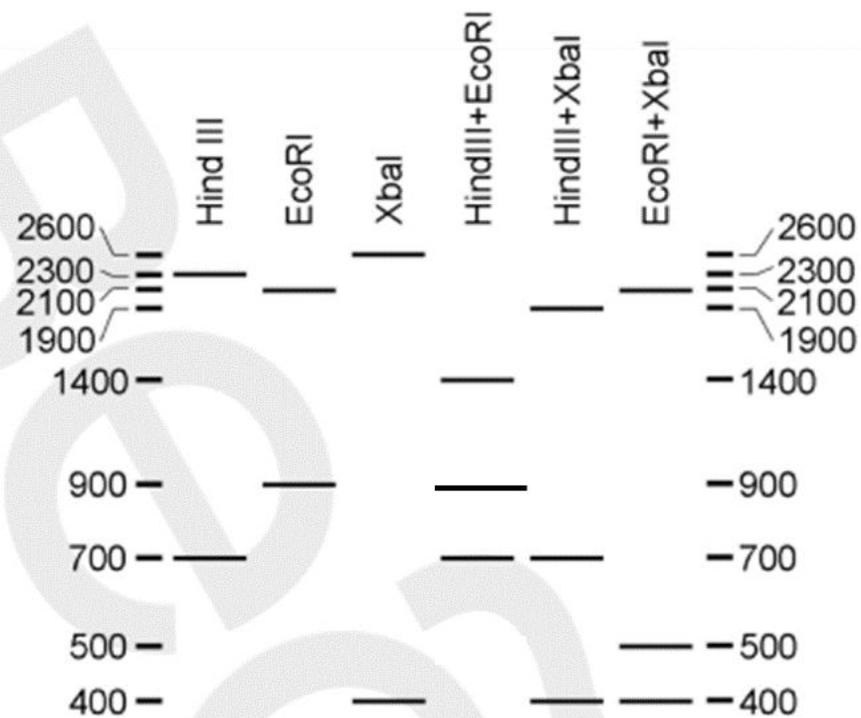
- 1) Определяем, с какой ДНК мы имеем дело – линейной или кольцевой? Если не говорится специально, что ДНК кольцевая, плазмидная, митохондриальная либо хлоропластная, мы считаем, что она линейная.
- 2) Выписываем друг под другом рестриктазы (слева) и фрагменты, которые получаются после обработки ими ДНК (справа). Обязательно последней строкой указываем результаты совместного разрезания несколькими рестриктазами. Этот пункт очень важен для проверки правильности построения карты рестрикции.
- 3) Определяем общую длину разрезаемой ДНК. Либо находим готовое число, либо суммируем длины фрагментов.
- 4) Рисуем отрезок (для линейной ДНК) либо окружность (для кольцевой ДНК) для схематического обозначения молекулы ДНК, указанной в задаче.
- 5) Рисуем карту рестрикции для первой рестриктазы. Если в условиях есть рестриктазы с наименьшим числом сайтов рестрикции, то начинаем с них.
- 6) Наносим на эту карту один из возможных сайтов рестрикции для второй рестриктазы.
- 7) Указываем на карте рестрикции фрагменты ДНК, которые будут образовываться при разрезании сразу обоими ферментами.
- 8) Сравниваем размеры фрагментов при совместном разрезании, полученные при построении карты рестрикции (см. пункт №7) с данными, приведенными в условии задачи (см. пункт №2). Если все совпадает – оформляем финальную карту рестрикции.

Использовать эти данные



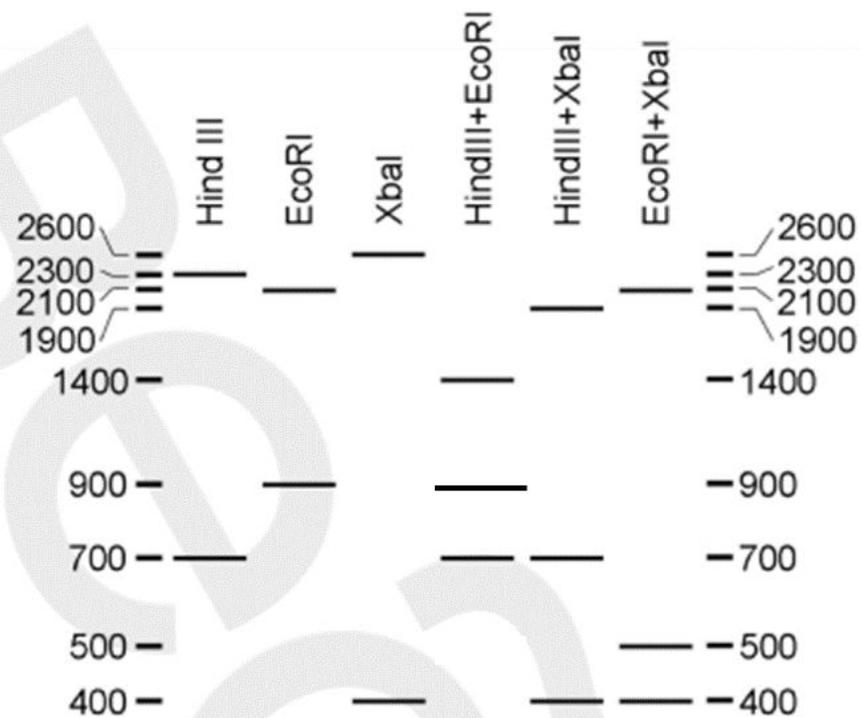
Постройте рестрикционную карту данного фрагмента ДНК, используя данные рисунка. Перерисуйте в бланк ответов схему фрагмента молекулы ДНК, как изображено на примере ниже.

Нанесите на неё рестриктазы в тех местах, где они расположены. Не забудьте указать расстояния между сайтами рестрикции.



Постройте рестрикционную карту данного фрагмента ДНК, используя данные рисунка. Перерисуйте в бланк ответов схему фрагмента молекулы ДНК, как изображено на примере ниже.

Нанесите на неё рестриктазы в тех местах, где они расположены. Не забудьте указать расстояния между сайтами рестрикции.



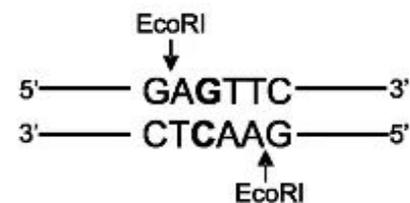
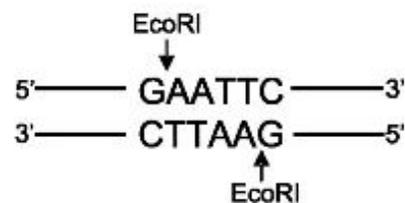
Постройте рестрикционную карту данного фрагмента ДНК, используя данные рисунка. Перерисуйте в бланк ответов схему фрагмента молекулы ДНК, как изображено на примере ниже.

Нанесите на неё рестриктазы в тех местах, где они расположены. Не забудьте указать расстояния между сайтами рестрикции.

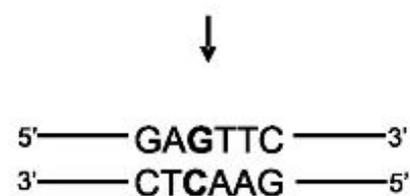
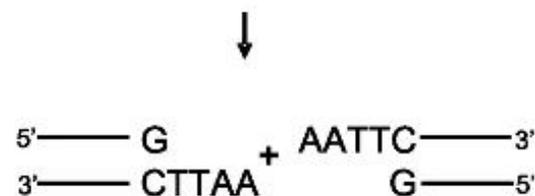
Нормальная ДНК

Мутантная ДНК

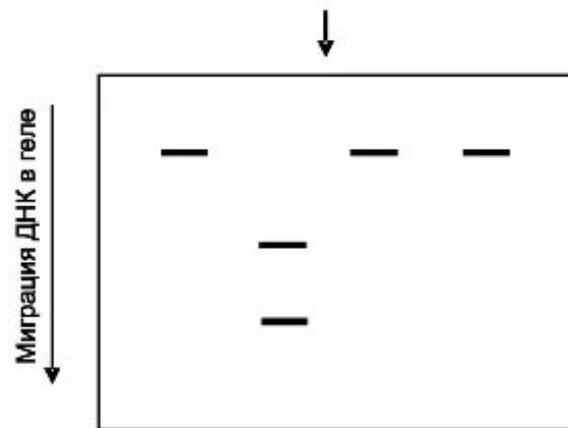
Обработка рестриктазой



Полученные фрагменты



Электрофорез ДНК



EcoRI: - + - +
Норма Мутация