



ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Πέψη με περιοριστικές
ενδονουκλεάσες

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Προέλευση: ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ

Φυσιολογικός ρόλος: προστασία των βακτηρίων από παθογόνους οργανισμούς, κυρίως βακτηριοφάγους

Μηχανισμός Δράσης: διασπών το δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, αφού αναγνωρίσουν μικρού μεγέθους χαρακτηριστικές αλληλουχίες.

Θέσεις αναγνώρισης: συνήθως 4 ή 6 bp σε μήκος και παλινδρομικές (π.χ. CTGCAG ή GGCC).

Ονοματολογία: ονομάζονται από το είδος του βακτηρίου από το οποίο απομονώθηκαν (π.χ. EcoRI από την *Escherichia coli*, Sau3A από τον *Staphylococcus aureus*)

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες = Εξειδικευμένα μοριακά ψαλίδια

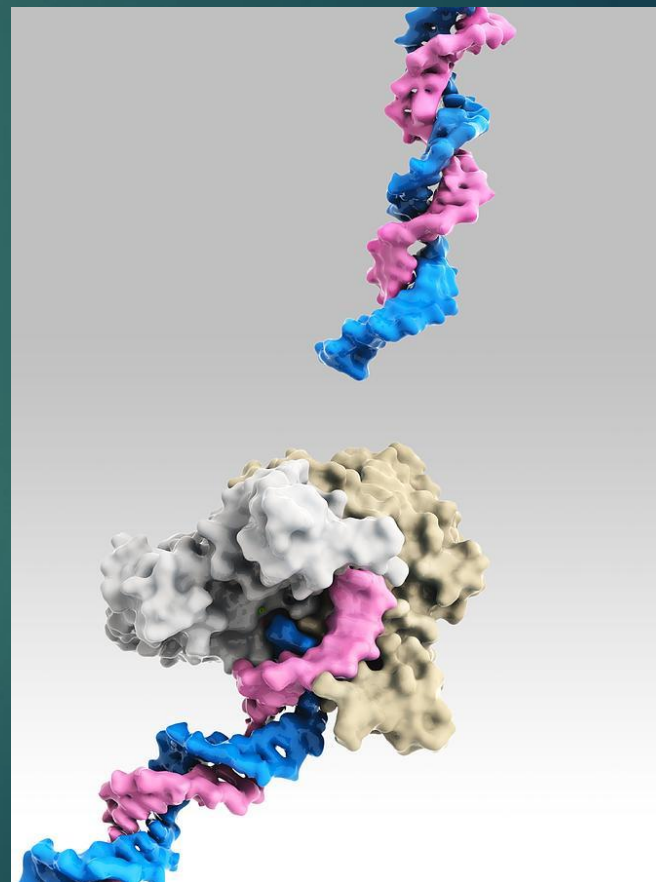
Η ανακάλυψη των περιοριστικών ενδονουκλεασών επέτρεψε την ανάπτυξη πολλών εφαρμογών in vitro χειρισμού του DNA μεταξύ των **οποίων η κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε φορείς και η δημιουργία βιβλιοθηκών**

Σήμερα, οι εμπορικά διαθέσιμες περιοριστικές ενδονουκλεάσες παράγονται σε μεγάλες ποσότητες σαν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που μπορούν να τροποποιηθούν κατάλληλα ώστε να εμφανίζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα.

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

- Η κλωνοποίηση DNA
- Η κατασκευή βιβλιοθηκών DNA
- Η ανίχνευση πολυμορφισμών
- Το αποτύπωμα DNA (DNA fingerprint)
- Η δημιουργία χαρτών του DNA
- Η μελέτη επιγενετικών τροποποιήσεων
- Η επεξεργασία του DNA

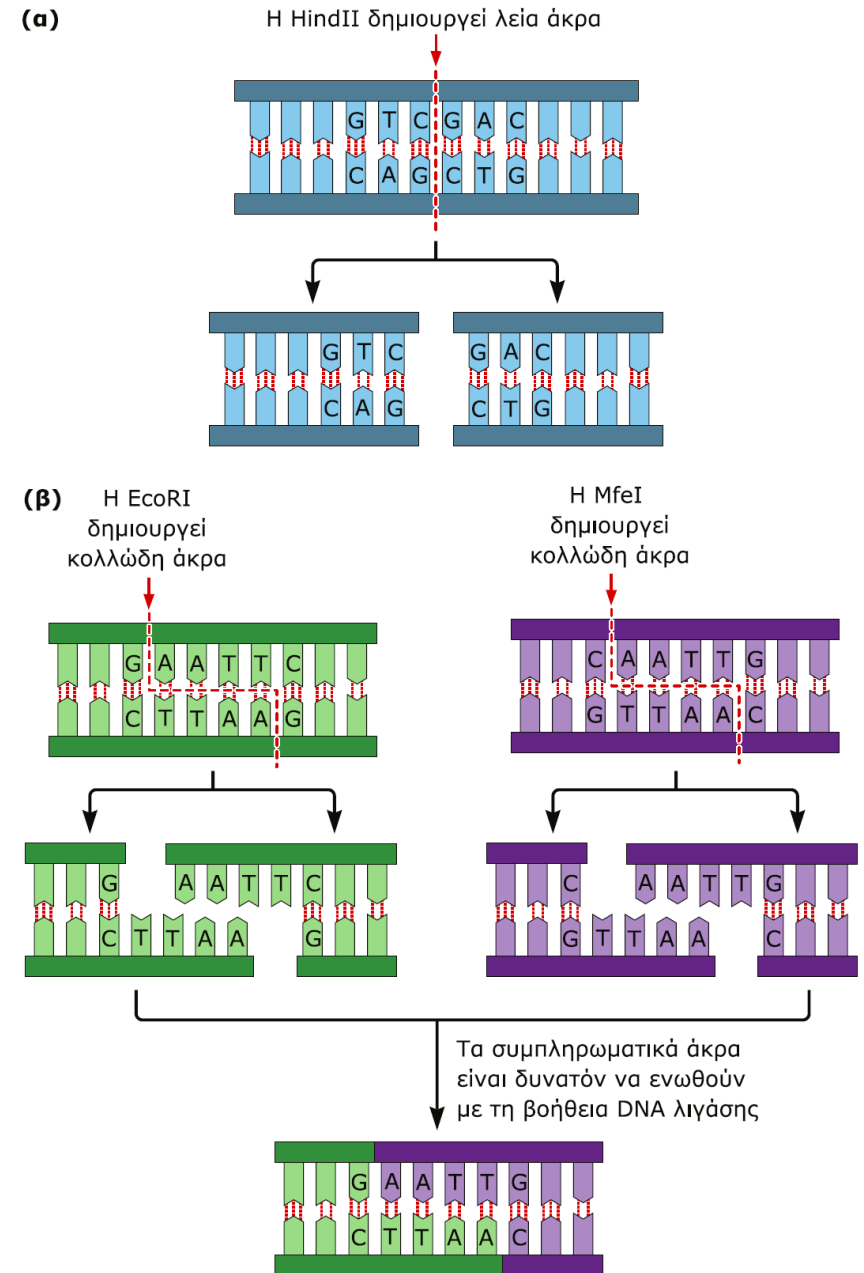


Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Τύποι

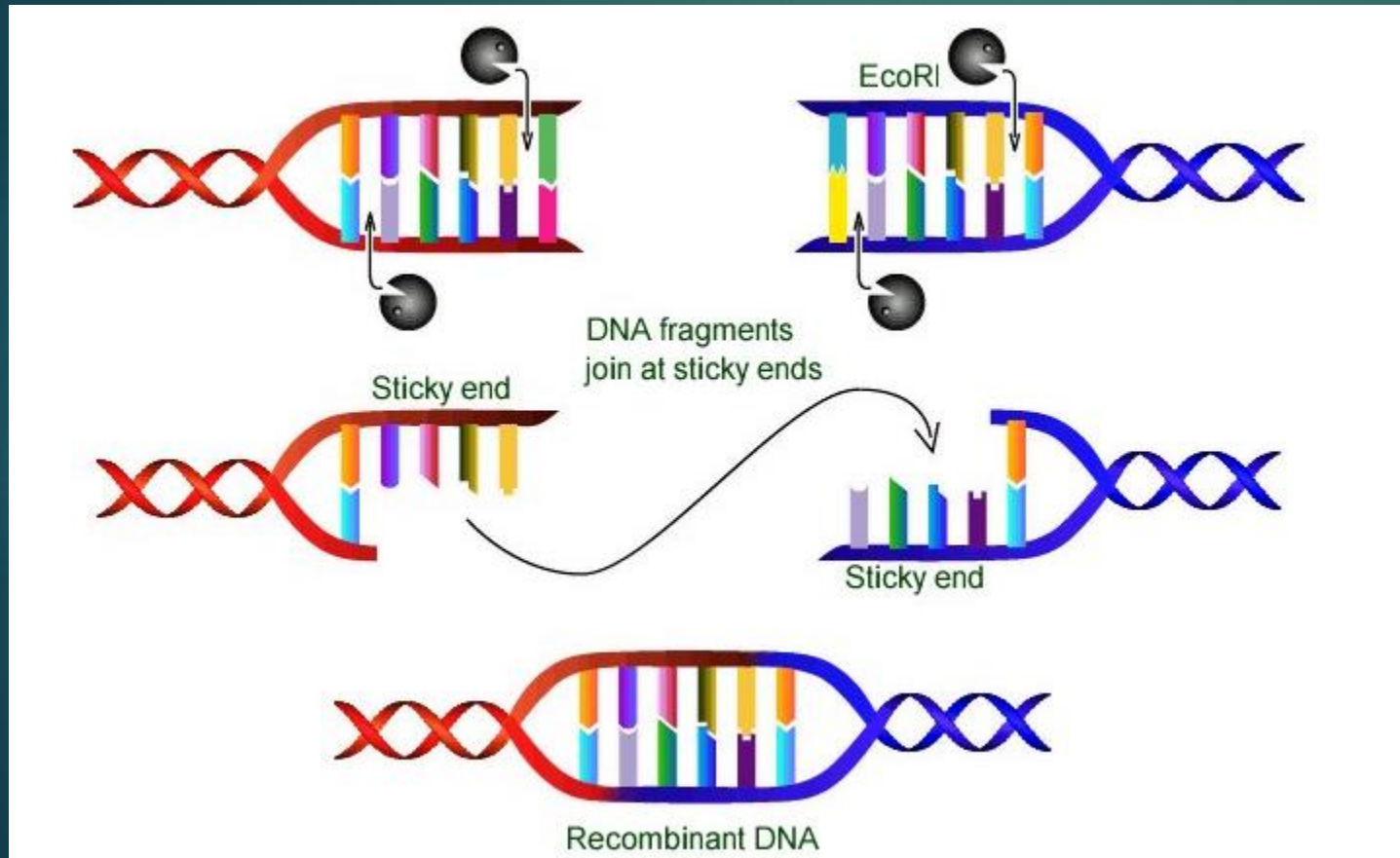
Τα σημεία τομής των περιοριστικών ενδονουκλεασών μπορεί να είναι ακριβώς απέναντι ή μετατοπισμένα κατά μερικά νουκλεοτίδια.

Στην πρώτη περίπτωση τα θραύσματα που παράγονται έχουν «τυφλά» άκρα ενώ στη δεύτερη είναι μονόκλωνα με προεξέχοντα, ή αλλιώς «κολλώδη» άκρα (sticky ends)



Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

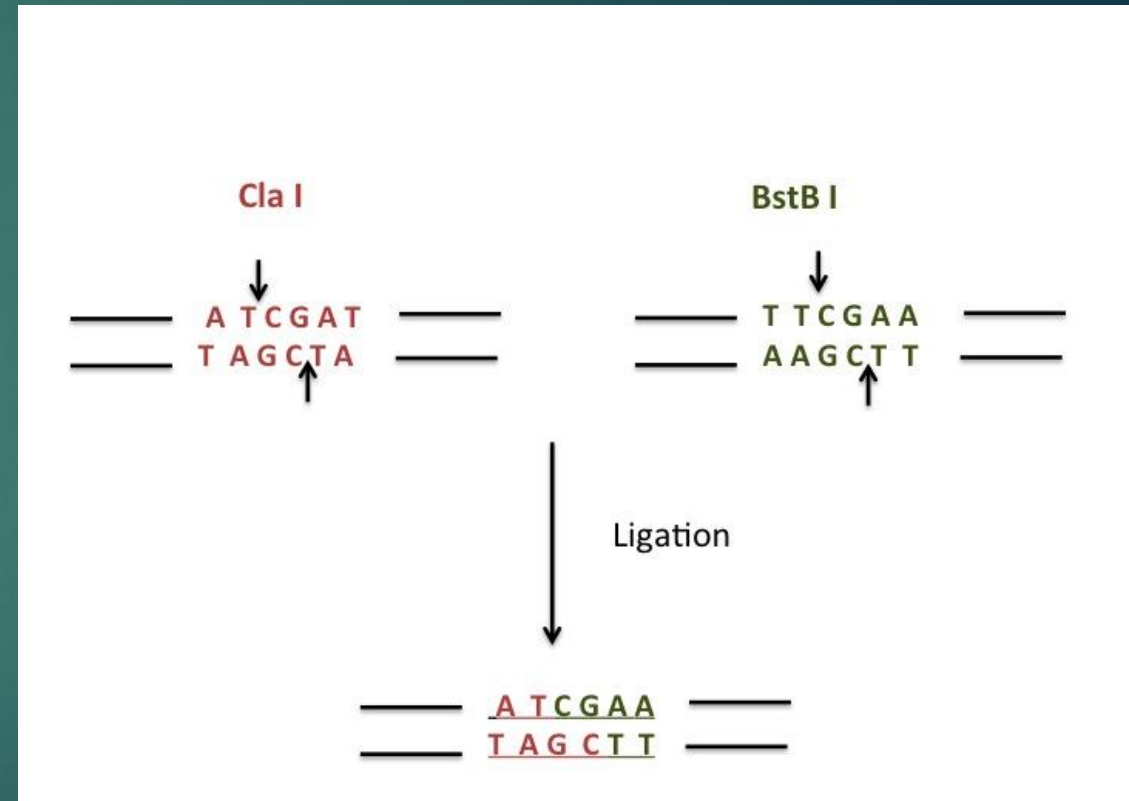
Τα μόρια του DNA που έχουν υποστεί πέψη με το ίδιο ένζυμο που δημιουργεί προεξέχοντα άκρα, μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους in vitro γιατί οι προεξοχές τους είναι συμπληρωματικές και με τη δράση του ενζύμου **λιγάση** του DNA **μπορεί να επανασχηματισθεί ο φωσφοδιεστερικός δεσμός του σκελετού κάθε αλυσίδας**



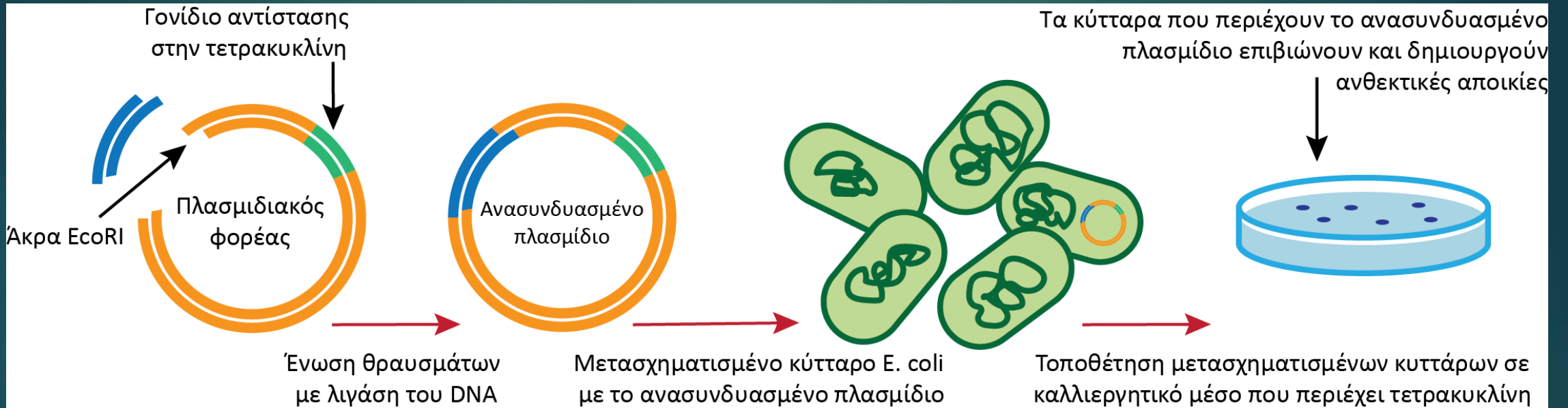
Η δυνατότητα αυτή
χρησιμοποιείται για την
κλωνοποίηση τμημάτων
DNA σε φορείς

Ένζυμα με συμβατά άκρα

Ένζυμο	Αλληλουχία	Προϊόν	Μονόκλωνα άκρα
BamHI	GGATCC	G GATCC CCTAG G	5'-GATC
BglII	AGATCT	A GATCT TCTAG A	5'-GATC
BclI	TGATCA	T GATCA ACTAG T	5'-GATC
Sau3AI	NGATCN	N GATCN NCTAG N	5'-GATC

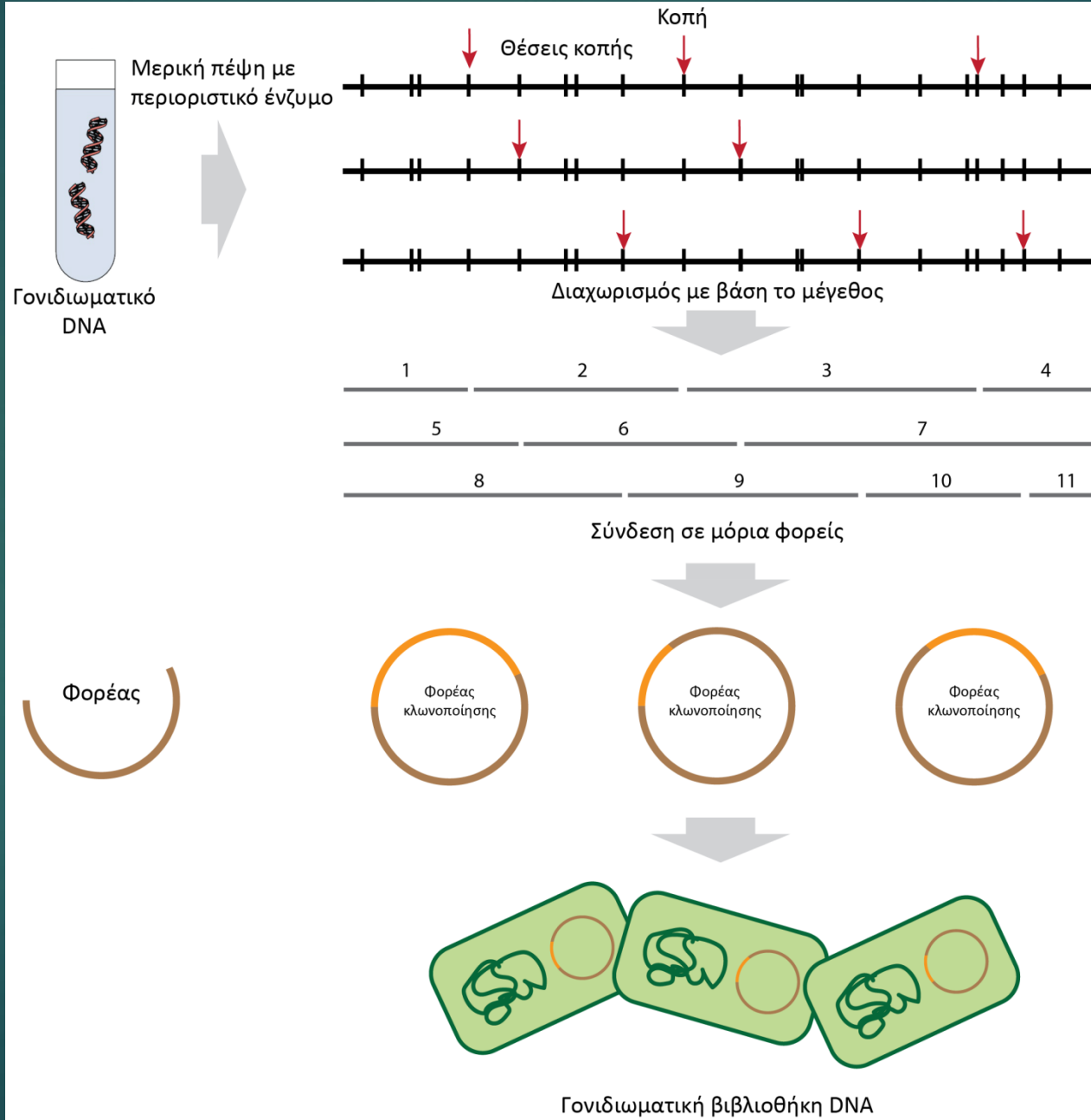


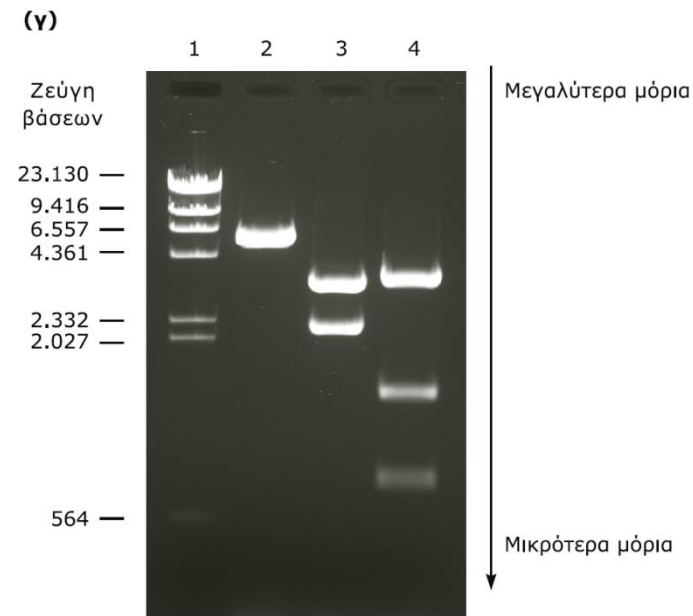
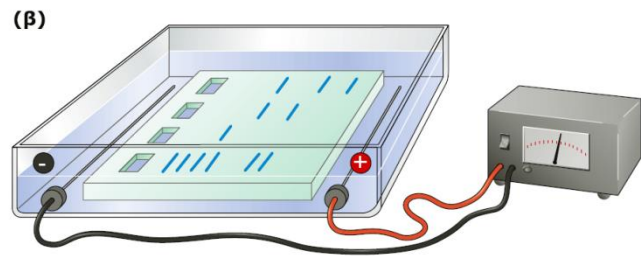
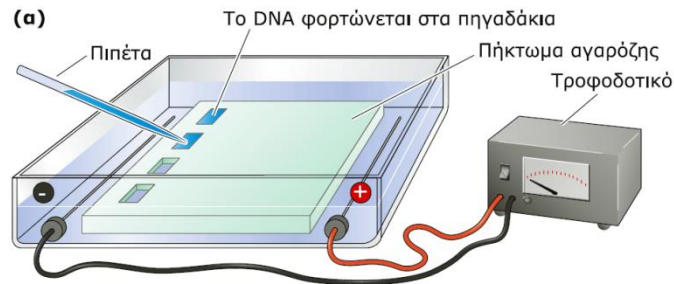
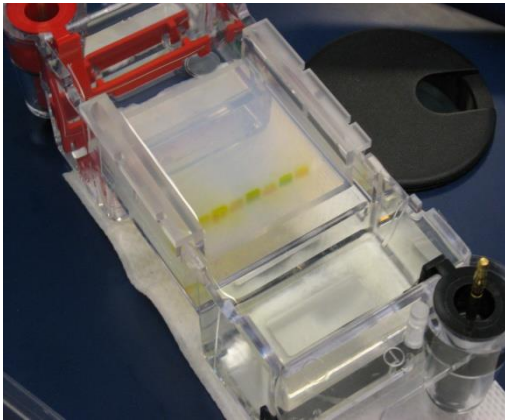
Κλωνοποίηση DNA



Παπανικολάου, Γ. 2015. Κλωνοποίηση DNA.

Κατασκευή Βιβλιοθηκών DNA



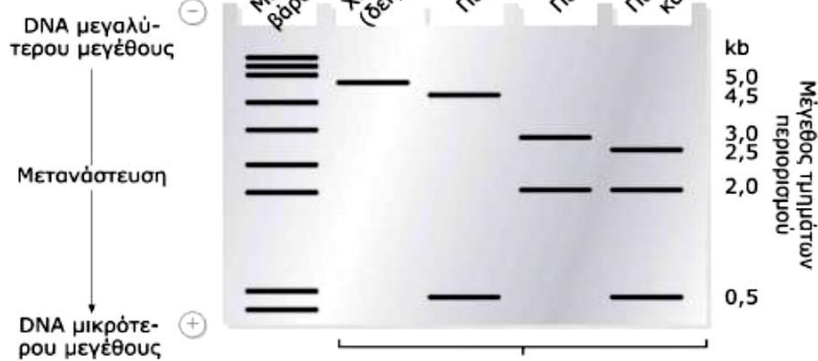


Διαχωρισμός μορίων DNA διαφορετικού μεγέθους με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Κατασκευή ενός περιοριστικού χάρτη

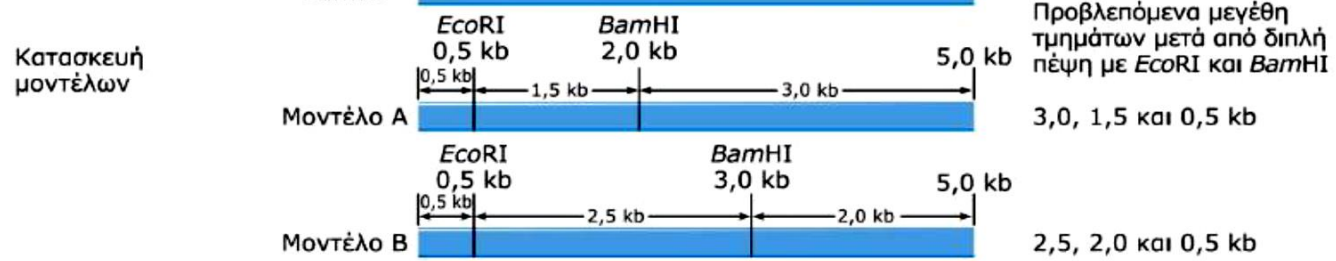
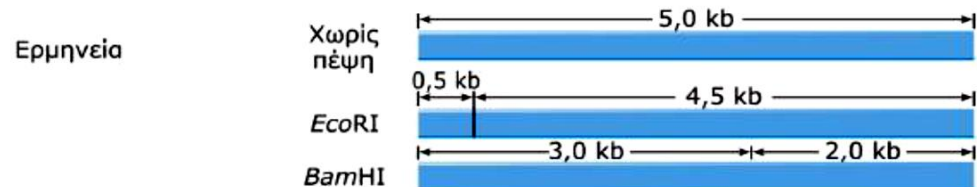
Πολλαπλά αντίγραφα ενός κλωνοποιημένου γραμμικού τμήματος DNA, μεγέθους 5,0 kb.

Πέψη με ένζυμα περιορισμού και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.



Αποτελέσματα

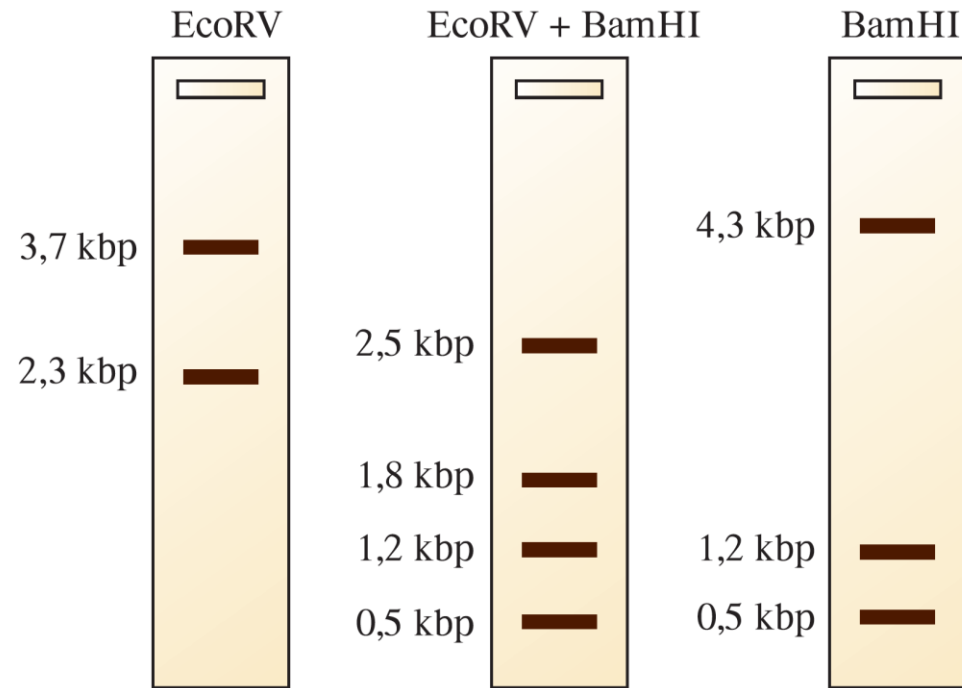
Χωρίς πέψη	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI + BamHI</i>
5,0 kb	4,5 kb 0,5 kb	3,0 kb 2,0 kb	2,5 kb 2,0 kb 0,5 kb



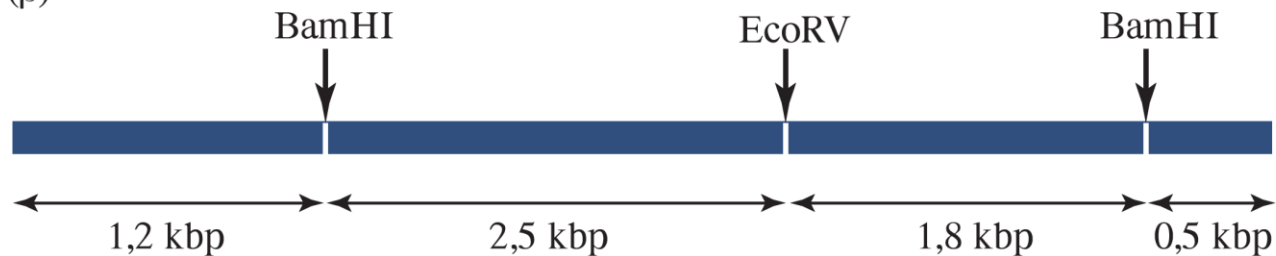
Συμπέρασμα Τα πειραματικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι σωστό είναι το μοντέλο Β.

Κατασκευή ενός περιοριστικού χάρτη

(α)



(β)



(α) Αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης πέψεων ενός γραμμικού μορίου DNA μεγέθους 6.000 bp με τα ένζυμα που υποδεικνύονται σε κάθε περίπτωση.

(β) Ο περιοριστικός χάρτης του μορίου όπως προκύπτει από την ανάλυση των αποτελεσμάτων των τριών πέψεων.

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες Εφαρμογή στο εργαστήριο

Μια **μονάδα (U, unit)** περιοριστικής ενδονουκλεάσης είναι η ποσότητα εκείνη του ενζύμου που οδηγεί σε πλήρη πέψη 1 μg καθαρού DNA σε 60' κάτω από τις συνιστώμενες συνθήκες επώασης.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες διαφέρουν ως προς τις βέλτιστες συνθήκες δράσης τους:

- Τη θερμοκρασία επώασης
- Τον χρόνο επώασης
- Την σύσταση του διαλύματος επώασης

Πρωτόκολλο πέψης δείγματος DNA με περιοριστική ενδονουκλεάση :

1. Δείγμα DNA διαλυμένο σε H₂O ή TE
2. 10X διάλυμα επώασης
3. Περιοριστική ενδονουκλεάση

Τα ένζυμα περιορισμού είναι σταθερά όταν διατηρούνται στους -20 °C και σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 50% γλυκερόλη.

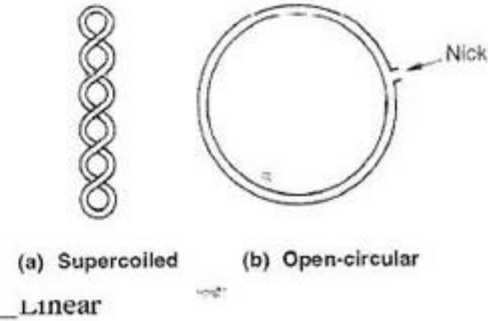
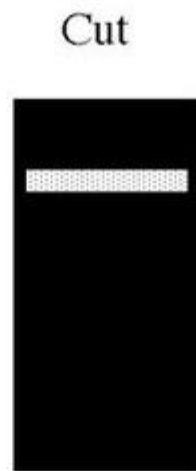
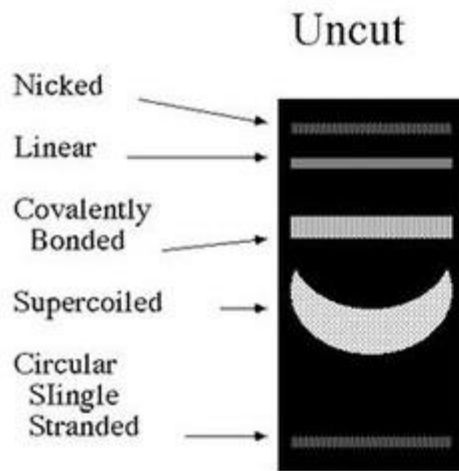
1. H₂O

Επώαση (Θερμοκρασία και χρόνος) ανάλογα το ένζυμο

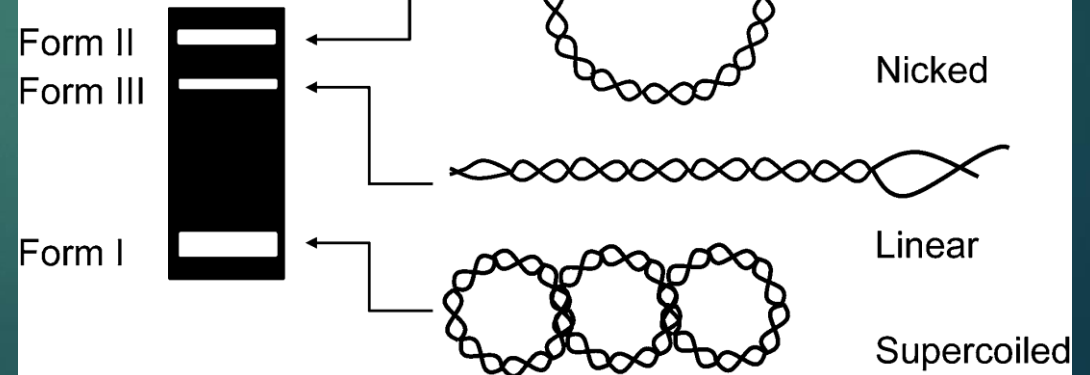
Σταματάμε την αντίδραση με την προσθήκη 2 μl 0.5M EDTA pH8

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες Πέψη Πλασμιδίου

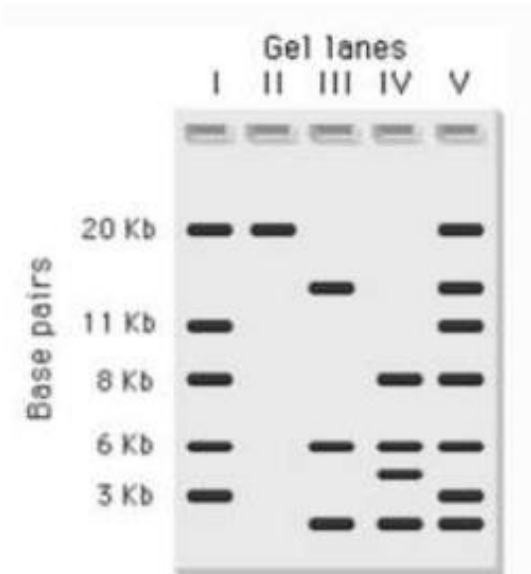
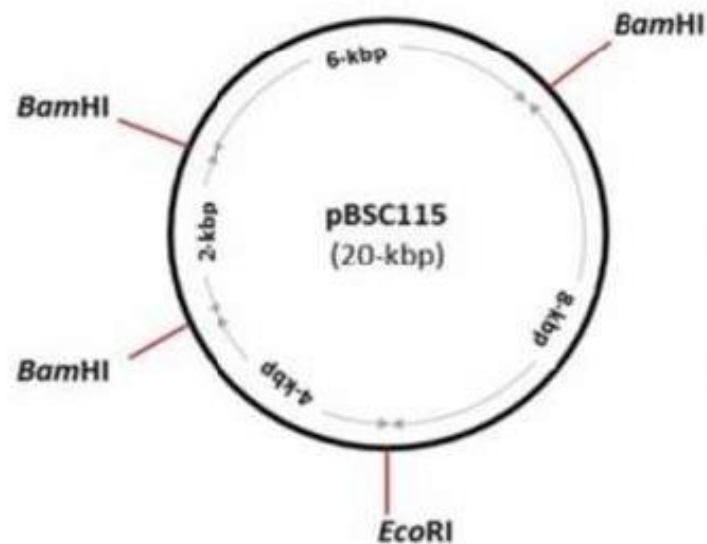
Relative Positions of Different DNA Forms of a Plasmid on a Tris-Acetate Agarose Gel



Plasmid DNA:



Ένα πλασμίδιο κόβεται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και BamHI και τα θραύσματα που προκύπτουν διαχωρίζονται σε ένα gel ηλεκτροφόρησης. Στην παρακάτω φωτογραφία φαίνονται τα αποτελέσματα του gel ηλεκτροφόρησης. Ποια στήλη (I ,II, III, IV ή V) δείχνει τα θραύσματα που προκύπτουν μετά τη πέψη με BamHI ;



Διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους, ΟΧΙ ΜΕ ΤΗΝ ΣΕΙΡΑ τους στο αρχικό τμήμα!!

Ένα πλασμίδιο υπόκειται στην δράση της EcoRI, οπότε παράγονται δύο τμήματα των 2 kb και 6kb αντίστοιχα. Όταν το ίδιο πλασμίδιο υπόκειται στη δράση της HindIII, παράγονται 2 τμήματα των 1,5kb και 6,5kb.

Από την ταυτόχρονη επώαση του πλασμιδίου με τις δύο περιοριστικές ενδονουκλεάσες παράγονται 4 τμήματα των 0,5kb, 1kb, 1,5kb και 5kb.

Να απεικονίσετε στο πλασμίδιο τις σχετικές θέσεις αναγνώρισης των δύο νουκλεασών.



Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

<https://www.youtube.com/watch?v=GsWo8dCivWs>

<https://www.youtube.com/watch?v=3esTzddSgX8>

