Лекція 3

**Інструменти роботи з ДНК (ферменти)**

А) ДНК-полімерази.

Фермент, який синтезує ДНК, називають ДНК-полімеразою, а той, який копіює існуючу молекулу ДНК або РНК, називають ДНК або РНК-залежною ДНК-полімеразою) Новий нуклеотид завжди синтезується в напрямку 5 '→ 3'. Особливістю ферментів є нездатність використовувати в якості матриці повністю одноланцюгову послідовність ДНК. Щоб почати синтез, фермент повинен мати хоча б коротку двуланцюгову область на 3'-кінці, до якої (з уже її 3'-кінця) він буде приєднувати нові нуклеотиди. Тому реакція ініціюється прикріпленням до матриці короткого синтетичного олігонуклеотида (приблизно 20 нуклеотидів), який і служить затравкою для синтезу ДНК.

Другою особливістю ферментів є те, що багато хто з них є багатофункціональними, тобто здатними розщеплювати молекули ДНК, так само як і синтезувати їх (ця їхня здатність необхідна при реплікації). ДНК-полімерази можуть мати дію екзонуклеаз 3 '→ 5' (видаляє нуклеотиди з 3'-кінця нитки, яка тільки що була синтезована), екзонуклеаз 5 '→ 3' (видаляє частину полінуклеотида, вже приєднаного до матричної нитки, яку така полімераза копіює) або обох екзонуклеаз.

У наукових дослідженнях застосовують:

1) **полімеразу Корнберга** - варіант ДНК-полімерази I *Escherichia coli*, яка грає ключову роль в реплікації генома цієї бактеріі. Цей фермент володіє дією екзонуклеази 3 '→ 5' і 5 '→ 3', що обмежує його застосування для маніпуляцій ДНК. В основному його застосовують при мічення ДНК. Варіантом цієї полімерази є **фрагмент Кленова** (з природного ферменту вирізали фрагмент, який зумовлює 5 '→ 3'екзонуклеазну активність).

 У 80-і роки на зміну фрагменту Кленова в реакціях секвенування прийшов розроблений фермент **секвеназа** - змінена версія ДНК-полімерази I фага Т7.

2) **термостабільну ДНК-полімеразу**, здатну функціонувати при температурах набагато вище 37оС без денатурації. Ферменти отримані з бактерій *Thermus aquaticus,* які живуть в гарячих джерелах при температурах 95о і чий фермент ДНК-полімераза I має оптимальну робочу температуру 72оС. Використовується для проведення ПЛР.

3) **Зворотню траскріптазу** (ревертаза, РНК-залежна ДНК-полімераза), яка знімає копії ДНК з РНК, а ні з ДНК-матриць. Зворотні траскріптази залучені в цикли реплікації ретровірусів. У пробірці зворотна траскріптаза використовується для отримання копій ДНК з молекул мРНК. Ці копії називають комплементарними ДНК (**кДНК**). Їх синтез важливий для деяких способів клонування генів і методів, що застосовуються для картування областей геному, які кодують задані молекули мРНК.

**Б) Ендонуклеази рестрикції (рестриктази).**

Серед можливих варіантів ферментів цієї групи (екзо- і ендо-, специфічні до РНК, до одно- або оланцюгової ДНК) найбільш широко в усіх аспектах технології рекомбінантної ДНК використовують **ендонуклеази рестрикції (рестриктази)**. Це фермент, який зв'язується з молекулою ДНК в області певної послідовності і робить двуланцюговий розріз в цій послідовності або біля неї. Через специфічність послідовності позиції розрізів в межах молекули ДНК можуть бути передбачені (за умови, що послідовність ДНК відома); це дозволяє вирізати певні сегменти з більшої молекули. Можливості суворого управління позицією розрізу характерні для ферментів II типу. Наприклад фермент II типу EcoRI розрізає ДНК тільки в гексануклеотиді 5'-GAATTC-3 '. Тому перетравлення ДНК ферментом II типу дає відтворений набір фрагментів, послідовності яких передбачувані, якщо послідовність цільової молекули ДНК відома.

 Всього було виділено понад 2500 ферментів II типу, а більше 300 з них використовуються в лабораторії. Багато ферментів мають гексануклеотідні цільові ділянки, але інші розпізнають більш короткі чи довгі послідовності.

**Номенклатуру рестриктаз** було запропоновано Смітом і Натансом у 1973 році, що включає такі пункти:

1. Абревіатура назви кожного ферменту є похідною від бінарної назви мікроорганізму, що містить дану метилазно-рестриктазну систему. Для позначення рестриктаз застосовують велику першу букву роду та дві маленькі букви виду, наприклад Eco – *Escherichia* *coli*, Sal – *Streptomyces* *albus*.

2. Для позначення серотипу або штамму додають ще літеру, наприклад, Есо B.

3. За типом рестриктази того самого виду, наприклад, *Haemophilus* *influenzae*, позначають римськими цифрами: Hind II, Hind I, Hind IIІ.

Відомі також приклади ферментів з виродженими сайтами розрізання; це означає, що вони розрізають ДНК у всіх ділянках з сімейства таких ділянок. Наприклад, HinfI (з *Haemophilus influenza*) розпізнає послідовність 5'-GANTC-3 ', де N- будь-який нуклеотид.

**Класифікація рестриктаз**

**Рестріктази першого типу (**ЕсоК з *Escherichia coli К12***)** дізнаються певну послідовність нуклеотидів і розрізають двуланцюгову молекулу ДНК неподалік від цієї послідовності в довільній точці і саме місце розрізу не строго спеціально (мабуть, після утворення комплексу з ДНК фермент неспецифічно взаємодіє з віддаленою ділянкою ДНК або пересувається уздовж ланцюга ДНК).

**Рестріктази другого типу** (наприклад, EcoRI) дізнаються певну послідовність і розрізають подвійну спіраль ДНК в певній фіксованій точці всередині цієї послідовності. Рестріктази цього типу розпізнають паліндромні послідовності по 4-8 п.н., які мають центральну вісь і зчитуються однаково в обидві сторони від осі симетрії.

Більшість рестриктаз II-класу розпізнають послідовності від 4 до 6 нуклеотидних пар, тому рестриктази ділять на «велико- та дрібнорозщеплюючі». Cайт з четирьох (тетра) нуклеотидів зустрічається в средньому 1 раз через кожні 256 пар основ, а з шести (гекса-) нуклеотидів - через 4096 пар основ. «Дрібнорозщеплюючі» рестріктази розпізнають **тетрануклеотід** і вносять в молекули набагато більше розривів, ніж «великорозщеплюючі», які розпізнають послідовність з **шести** нуклеотидних пар. Це пов'язано з тим, що ймовірність находження певної послідовності з чотирьох нуклеотидів набагато вище, ніж послідовності з шести нуклеотидів.

До дрібнорозщеплюючих відносяться рестриктази Hpa II и Alu (з *Arthrobacter luteus*), до крупнощепящих - EcoR I (из *Escherichia coli*) и Hind III.

**Рестріктази третього (проміжного) типу** (наприклад, EcoPI) дізнаються потрібну послідовність і розрізають двуланцюгову молекулу ДНК, відступивши певне число нуклеотидних пар від її кінця (або в декількох точках на різній відстані від сайту впізнавання). Ці рестріктази дізнаються асиметричні сайти.

Ферменти рестрикції розрізають ДНК двома різними способами. Багато з них просто роблять дволанцюговий розріз, після якого залишається тупий або рівний кінець. Але інші розрізають дві нитки ДНК в різних позиціях, зазвичай віддалених один від одної на два або на чотири нуклеотида, і фрагменти ДНК,що утворюються, мають на кожному кінці короткі одноланцюгові шматки. Їх називають **липкими** або нерівними кінцями, тому що в результаті спарювання основ між ними молекула ДНК може назад склеїтися воєдино. Після обробки ДНК ендонуклеазами рестрикції отримані фрагменти можуть бути досліджені електрофорезом в агарозному гелі з метою визначення їх розмірів.

Рестріктази є ферментами, активність яких залежить від складу реакційної суміші та температури проведення реакції. Тривалість роботи: від 1 години до 12 години. Оптимальна температура різна, найчастіше 37 °С. Всі рестріктази - Mg2 + -залежні. Буферні розчини повинні містити цей іон.

**В) ДНК-лігази.**

 Фрагменти ДНК, які були отримані шляхом обробки ендонуклазою рестрикції, можна знову з'єднати разом або прикріпити до нового фрагменту за допомогою ДНК-лігази.

 Дана реакція вимагає енергії, яка забезпечується додаванням в реакційну суміш або АТФ або НАД в залежності від типу застосовуваної лігази.

Найбільш широко використовувану ДНК-лігазу отримують з клітин *E.coli*, заражених бактериофагом Т4. Цей фермент бере участь у реплікації ДНК фага і кодується його геномом.

У природі його роль полягає в синтезі фосфоефірних зв'язків між непов'язаними нулеотидами, що належать якомусь одному з полінуклеотидів двдволанцюгової молекули. Щоб з'єднати разом два фрагмента рестрикції лігаза повинна синтезувати два фосфодіефірних зв'язки - по однму в кожній з ниток дволанцюгової ДНК. Ця реакція може статися тільки якщо кінці, які повинні бути з'єднані, випадково зійдуться досить близько один з одним - лігаза не здатна вхопитися за них і звести їх разом. Полегшує цю процедуру наявність **липких кінців**. Тому розвинулися методи перетворення тупих кінців в липкі шляхом прикріплення до них лінкерів або адаптерів. Це молекулярні "перехідники".

Інший спосіб створення липких кінців - прикріплення гомополімерного хвоста (до 3'-кінця прикріплюють, наприклад поли Г-хвіст, який дозволить молекулі злучитися з поліЦ-хвостом).

**Г) Ферменти модифікації кінців.**

По-перше це кінцева (термінальна) дезоксінуклеотидилтрансфераза, яку отримують з тканини вілочкової залози теляти.

 По-друге, це лужна фосфатаза і полінуклеотидкіназа Т4, які діють на додаток одна одній. Лужна фосфатаза, яку отримують з різних джерел, включаючи *E.coli* і кишкову тканину теляти, видаляє фосфатні групи з 5'-кінців молекул ДНК, що перешкоджає лігіруванню цих молекул одна з одною, і, оброблений фосфотазою кінець може лігувати з необробленим фосфатазою кінцем, але зв'язок не може утворюватися, якщо жоден з них не несе 5'-фосфат. Тому, розумно використовуючи лужну фосфатазу, можна направляти дію ДНК-лігази визначеним чином, так щоб були отримані тільки бажані продукти лигирования. Полінуклеотідкіназа Т4, що отримується з клітин E.coli, заражених бактериофагом Т4, виконує зворотну лужній фосфатазі реакцію, додаючи фосфати до 5'-кінців. Подібно лужній фосфатазі, цей фермент використовують в ході експериментів по лігіруванню або для мічення основ ДНК.