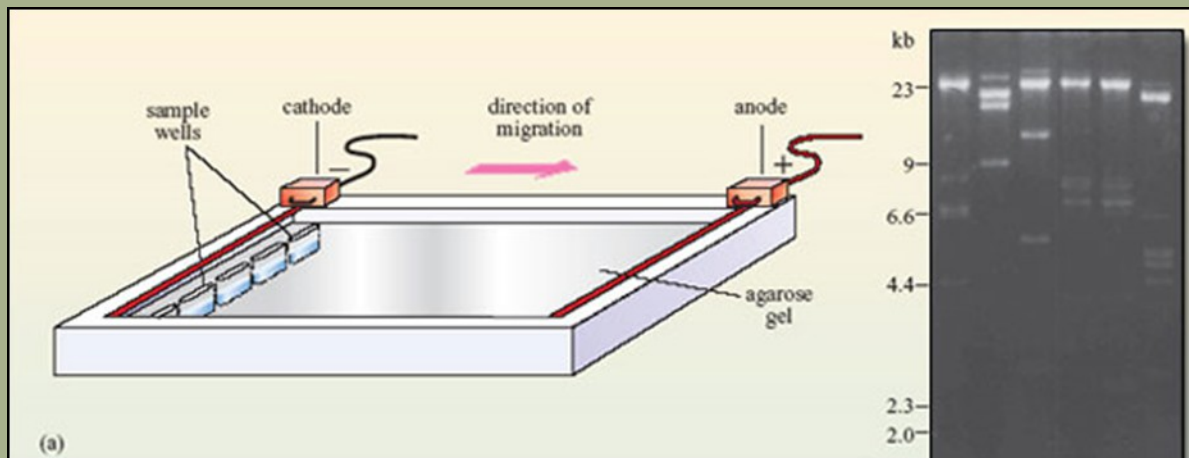
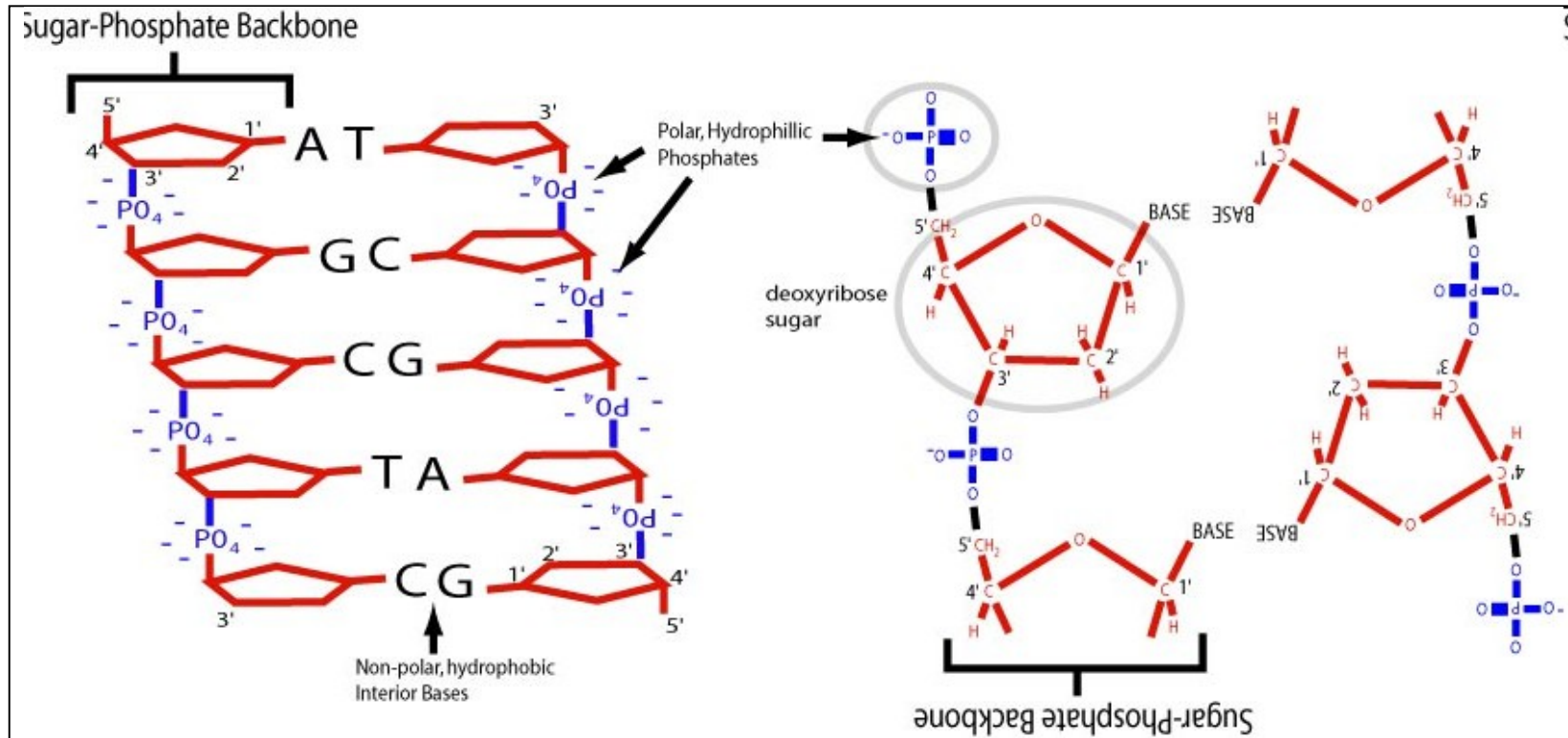


Elektroforezne metode



http://openlearn.open.ac.uk/file.php/2645/S377_1_007i.jpg

Naboj na molekuli DNA



http://cnx.org/content/m11411/latest/sugar-phosphate_backbone.jpg

Elektroforezne metode

Ločevanje makromolekul v električnem polju skozi zamrežene strukture: vplivajo **naboj, velikost, oblika**

Standardne izvedbe:

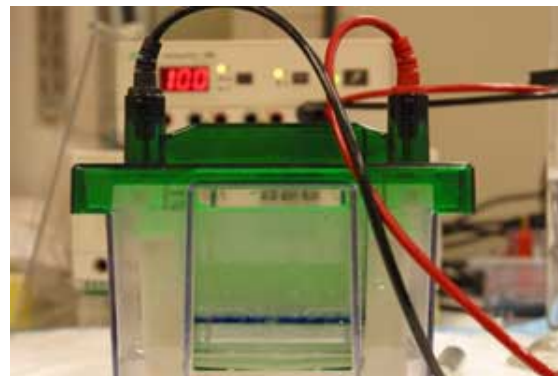
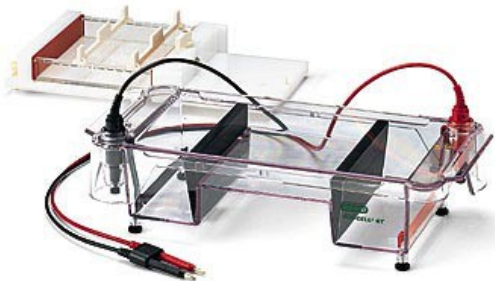
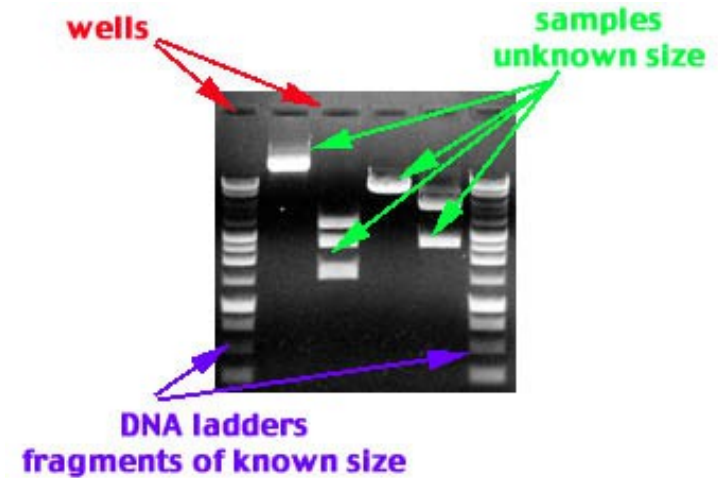
Proteini: PAGE, IF; 2D

Nukl. kisline: agarozna gelska elektroforeza (AGE)

Oligonukleotidi, kratki fragmenti NA (do~300 bp): PAGE

Določanje nukl. zaporedja DNA: kapilarna elektroforeza

Orientacija gela: horizontalna (večinoma AGE; IF)
vertikalna (večinoma PAGE)



Elektroforezne metode (2)



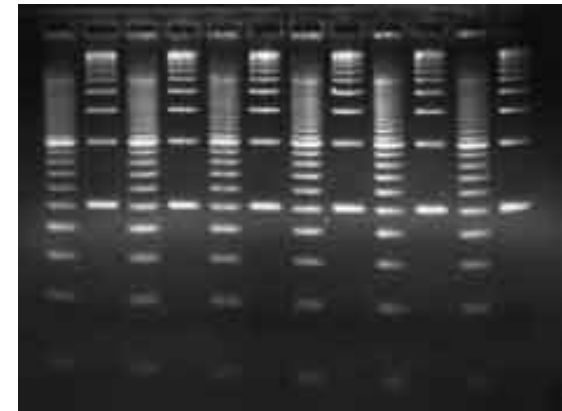
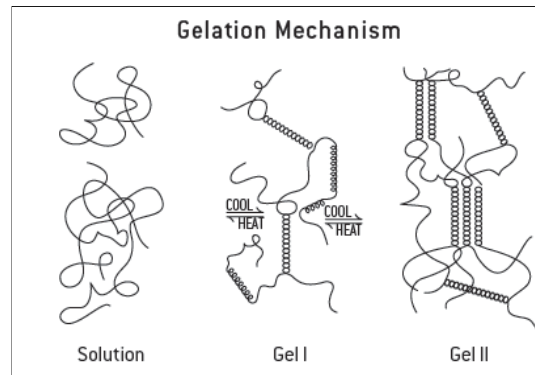
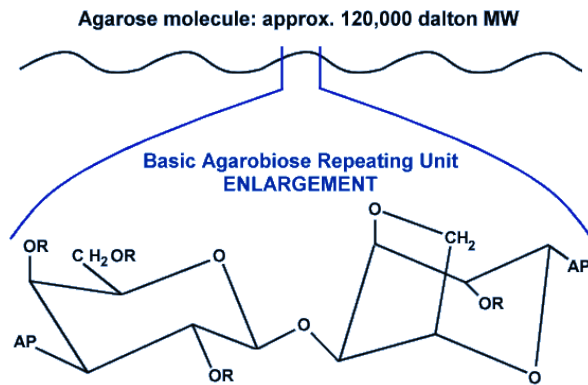
Lastnosti agaroze

agarosa: polisaharid iz rdečih alg (*Gracillaria*, *Gelidium*):

1,3- β -D-galaktopiranoza + 1,4- 3,6-anhidro- α -L-galaktopiranoza = agarobioza

agarobioza polimerizira v dolge verige s povpr. M ~120.000 (400 enot)

na polisaharidu so tudi nabite skupine (piruvat, sulfat) - določajo posebne lastnosti / gradacije
merilo prisotnih nabitih skupin je elektroendosmoza (EEO)



Koncentracija določa območje ločevanja - tabele (odvisno od čistosti agaroze); običajna agarosa: 0,5 % - 2 % delovna koncentracija (ločuje v območju 150 bp - 25.000 bp).

gel območje ločevanja (linearna dsDNA)

0,5 % 25 kb do 1,0 kb

0,7 % 12 kb do 0,8 kb

1,0 % 10 kb do 0,5 kb

1,2 % 7 kb do 0,4 kb

1,5 % 3 kb do 0,2 kb

Izvedba elektroforez

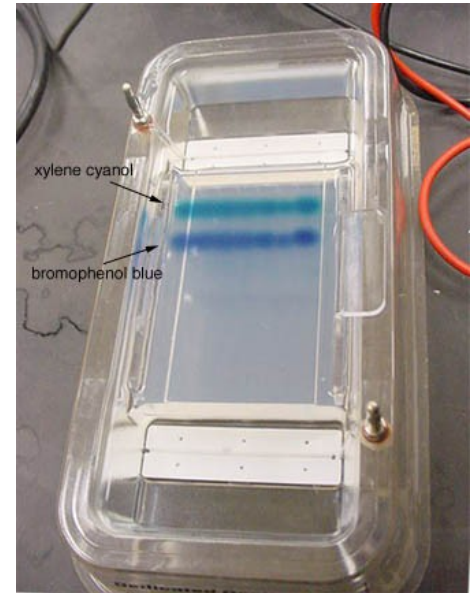
Puferski sistemi za ločevanje DNA:

- **PAGE:** TBE (Tris-borat-EDTA)
- **AGE:** TAE (Tris-acetat-EDTA)
 - za izolacijo DNA iz gela;
 - če $t > 6$ h, mora puffer krožiti;
- TBE - za DNA < 1 kb



Izvedba AGE

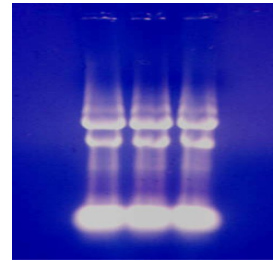
- agarozo segrejemo v elektroforeznem puftru, da se stali
- nekoliko ohladimo, nalijemo v model, kjer polimerizira
- vzorcu DNA dodamo nanašalni puffer, ki vsebuje tudi obtežilno substanco (glicerol, saharozo ali fikol) in markerska barvila (1 ali več), npr. bromfenolmodro, ksilencianol
- gel mora biti potopljen
- naneseemo vzorce
- 5-8 V/cm; za >10 kb 1-2 V/cm



AGE za ločevanje molekul RNA

Puffer: MOPS ali borat + formaldehid (3 %)

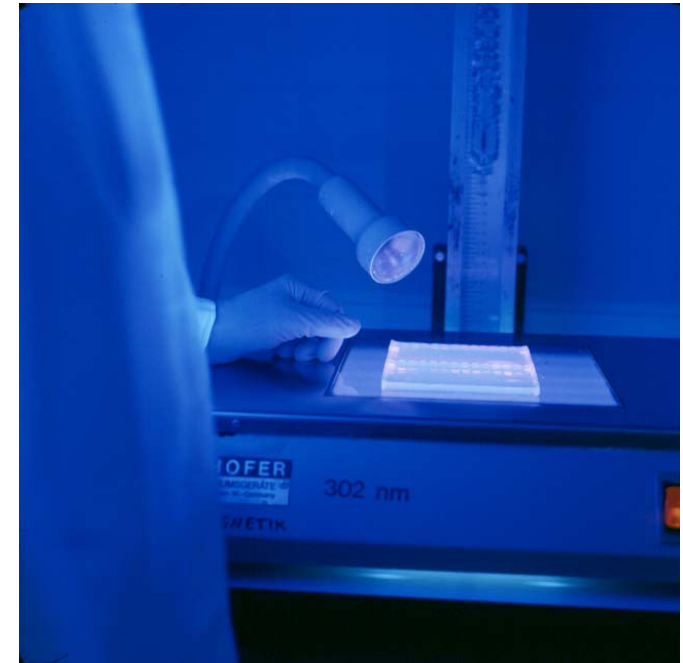
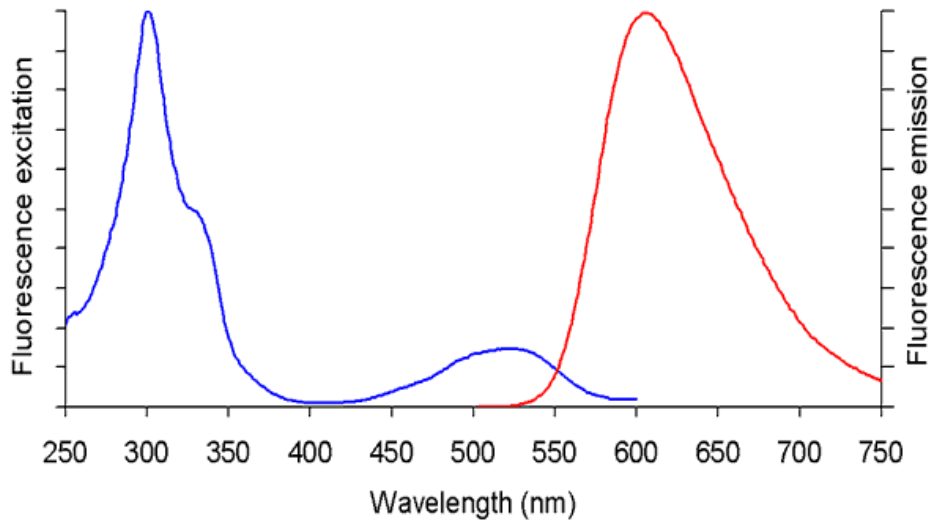
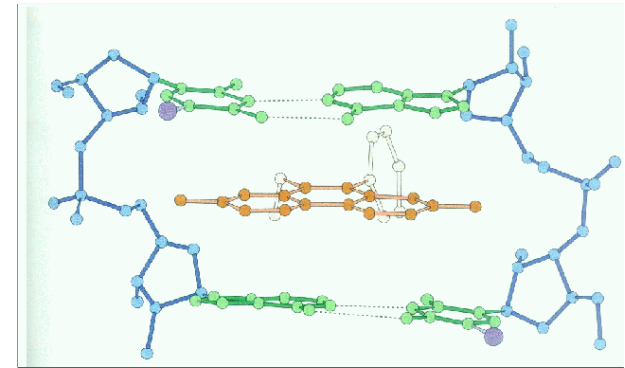
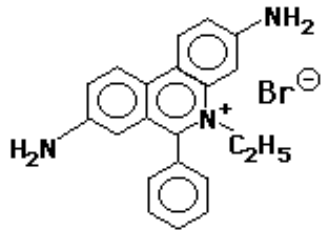
Vzorcju dodamo formaldehid (6 % končna konc.) in deioniziran formamid (25 % - 50 % končna konc.) ali pa glioksal (1 M) in DMSO (50 %) ter segrejemo na 65 °C – 80 °C (denaturacija), nato pa naneseemo na agarozni gel.



Načini za **izolacijo DNA iz gela:** gelaze, vezava na nosilce, ekstrakcija,...

Detekcija nukleinskih kislin v gelu

- etidijev bromid: >5 ng DNA (302 nm/590 nm)



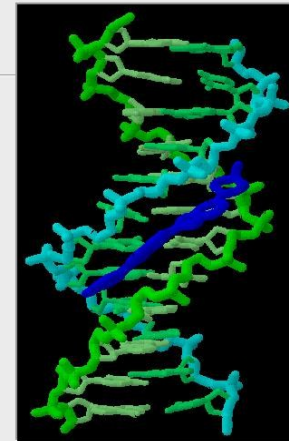
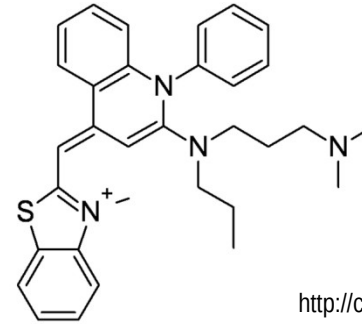
Varnost: fluoresc. barvila in UV so mutagena sredstva

Detekcija nukl. kislin v gelu / 2

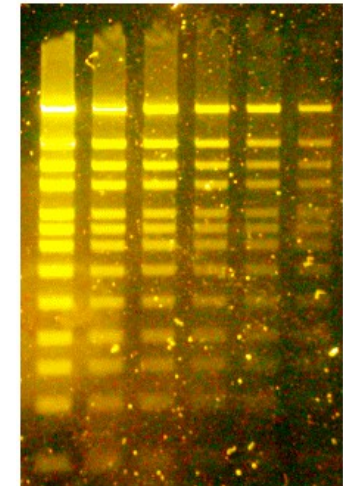
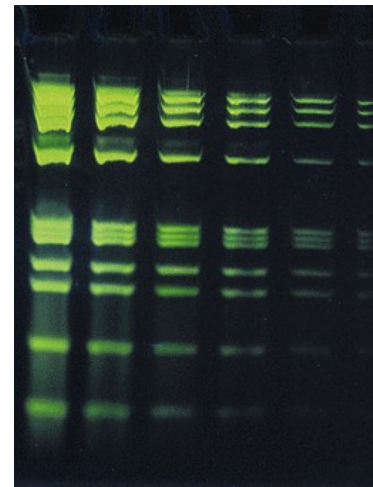
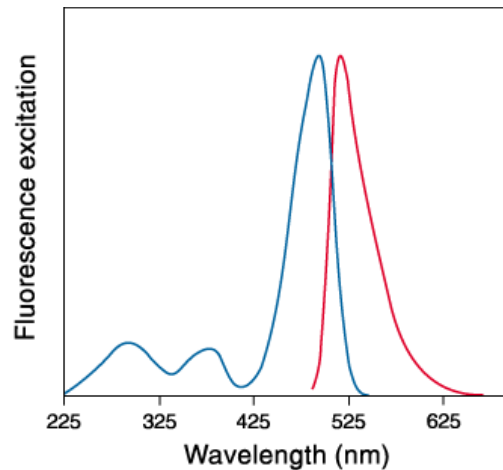
- **SYBR-Green I** (dsDNA), II (ssDNA, RNA)
(I: 295 nm/525 nm; >60 pg DNA)
(II: 254 nm/520 nm; >3 ng na nedenaturirajočih
oz. 50 ng DNA na denaturirajočih gelih pri 300 nm)
- SYBR-Gold: >10 pg
- SYBR-Safe: nižja mutagenost

SYBR Green 1®

dsDNA minor-groove
binding dye

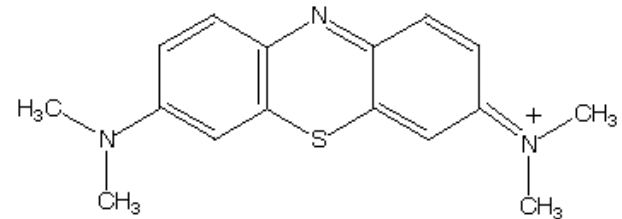


<http://cgr.otago.ac.nz/SLIDES/TAQMAN/SLD013.HTM>

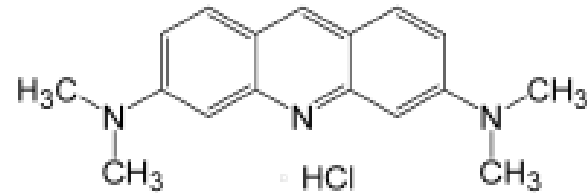


Detekcija nukl. kislin v gelu / 3

- **metilensko modro:** >200 ng



- **akridin oranžno:** >50 ng (ločuje ss/dsDNA; zamudno)



- **srebro:** >1 ng (zamudno)

- specifične sonde: detektiramo le tisto DNA, ki nas zanima
→ različni načini označevanja (radioaktivno, bioluminiscenca,...)

Barvila za DNA z nižjo mutagenostjo

Standardna barvila za detektiranje DNA v elektroforeznih gelih so mutagena.

Zato je treba z njimi delati zelo previdno in jih odstranjevati kot za okolje škodljive kemikalije. Zaradi velikih količin pufrov/gelov/raztopin za barvanje to predstavlja znaten strošek. Biokemijska podjetja so zato razvila nova barvila z zmanjšano mutagenostjo, ki niso nič manj občutljiva od etidijevega bromida.

MegaFluor

Barvilo je velika molekula, zato ne more prehajati membran. Je fluorescenčno barvilo, kompatibilno s standardnimi transiluminatorji/filtri. Vzorcju dodamo barvilo + nanašalni pufer in inkubiramo 5 min pri 60 °C pred elektroforeznim ločevanjem. Meja detekcije je (do 10x) nižja kot pri barvanju z etidijevim bromidom, ker se sam gel ne obarva in lahko uporabimo daljše integracijske čase na kameri.

Problemi:

- cena >> etid. bromid
- ozko območje linearnosti (ni informacije o množini DNA)
- ni primerno za denaturirajoče gele
- poseben elektroforezni pufer

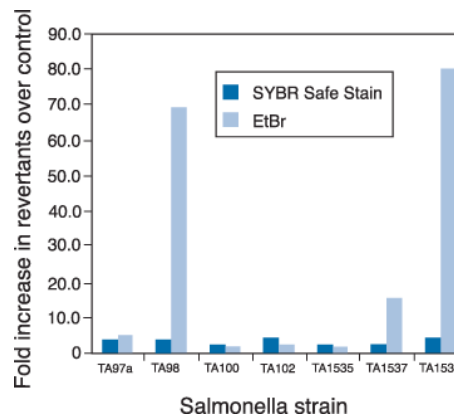
Sybr Safe

Proizvajalec barvila Sybr Green je razvil barvilo z zmanjšano mutagenostjo, ki je še vedno (~2x) bolj občutljivo kot etidijev bromid, a precej manj od barvila Sybr Green.

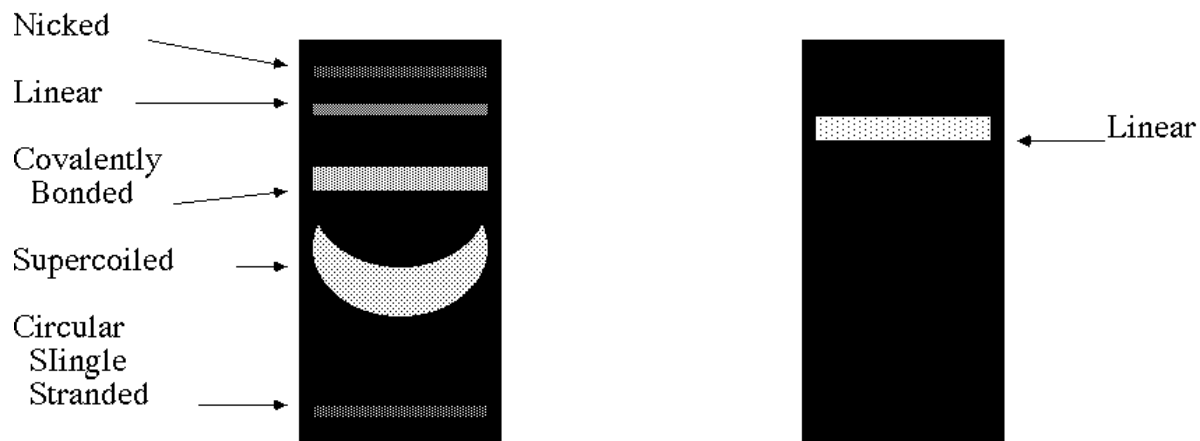
Problemi:

- barvanje po elektroforezi 30 min
- ni naprodaj v prahu
- deluje samo v pufru TBA (standard je TAE)
- cena
- potreben poseben filter na kameri za optimalno detekcijo

Test *	Cell Type	Test result with S9 Activation †	Test result without S9 Activation
Transformation test ¹	Syrian hamster embryo (SHE) cells	Not applicable	Negative
Chromosomal aberration test ²	Cultured human peripheral blood lymphocytes	Negative	Negative
Forward-mutation test ^{3,4}	L5178Y TK mouse lymphoma cells	Negative	Negative



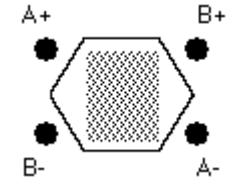
Potovanje krožnih in linearne oblike DNA



http://humgen.wustl.edu/hdk_lab_manual/image/plsmid3.gif

Posebne izvedbe agarozne elektroforeze

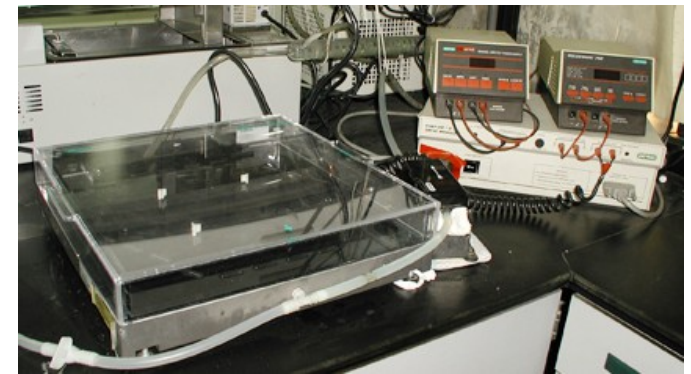
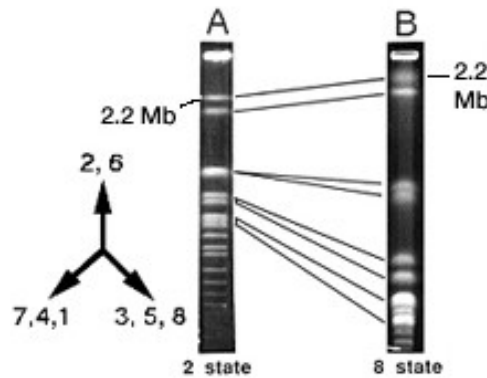
- alkalna elektroforeza: ssDNA
- AGE v denaturirajočih pogojih: RNA (formamid, formaldehid)
- elektroforeza v utripajočem polju (PFE) in izvedenke: za dolge DNA
 - občasno obrnjeno el. polje (FIGE) 5 kb - 1 MB
 - elektrode razmeščene na 4 ali 6 straneh (PFGE) 20 kb - 10 MB
 - rotirajoče el. polje (ROFE)



A. Two-state mode
 24 hour run time, 120° included angle
 60 to 120 second switch time ramp
 6 V/cm, 0.5x TBE at 14° C
 1.0% Pulsed Field Certified Agarose

B. Multi state mode
 60 hour run time
 State (vector)

1. 90 second switch time, -60° angle
2. 45 second switch time, 180° angle
3. 90 second switch time, 60° angle
4. 90 second switch time, -60° angle
5. 90 second switch time, 60° angle
6. 45 second switch time, 180° angle
7. 90 second switch time, -60° angle
8. 90 second switch time, 60° angle

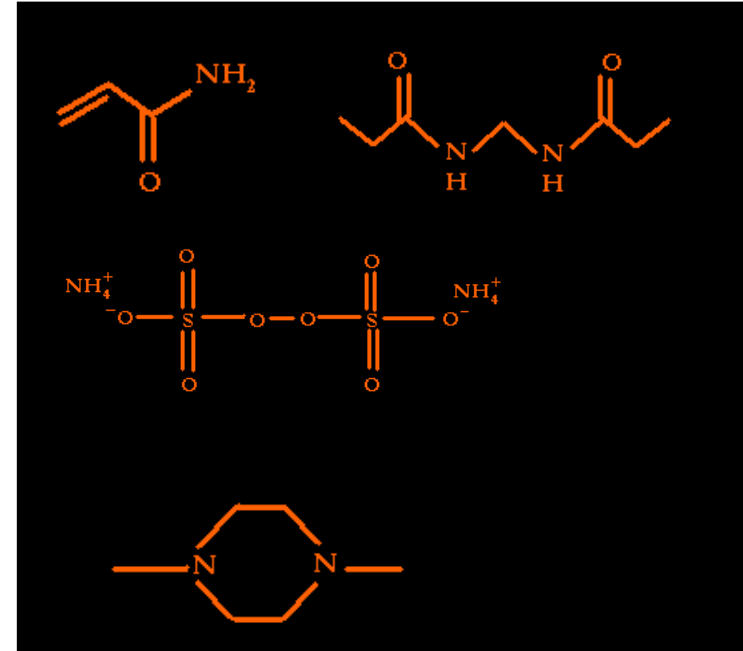


Poliakrilamidna gelska elektroforeza

poliakrilamid:
polimer akrilamida in N',N'-metilenbisakrilamida

katalizator polimerizacije: amonijev persulfat

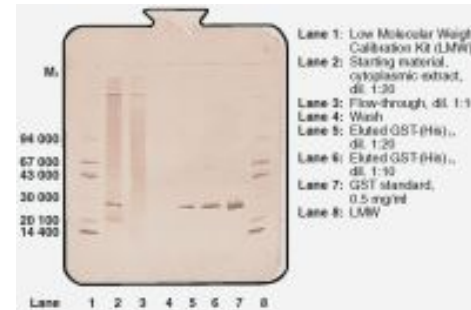
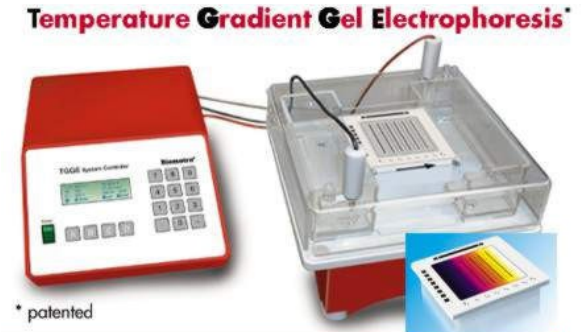
induktor: TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamin)



- * območje zamreženja: 3 % - 20 %
- * za DNA: vedno kontinuirni geli (proteini: diskontinuirni)
- * za ločevanje fragmentov do ~300 bp; ssDNA → + 7 M urea
- * **akrilamid v monomerni obliki je zelo strupen!**

Posebne izvedbe PAG

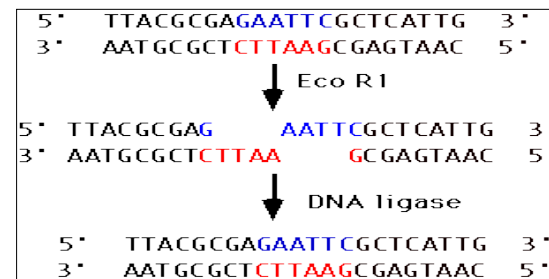
- elektroforeza v temperaturnem gradientu (TGGE):
detekcija mutacij; 5 °C – 80 °C, potrebno določiti območje,
vedno v primerjavi s kontrolo
- avtomatska elektroforezna enota (Phast)



Encimi pri molekularnem kloniranju

Standardni encimi v tehnologiji rekombinantne DNA so:

- **restriktaze:** rezanje dsDNA na mestih s palindromnim zaporedjem
- **ligaze:** povezovanje fragmentov DNA s fosfodiestrsko vezjo
- **polimeraze:** podaljševanje verige na osnovi matrice
- **RNaze**



Redkeje uporabljamo tudi:

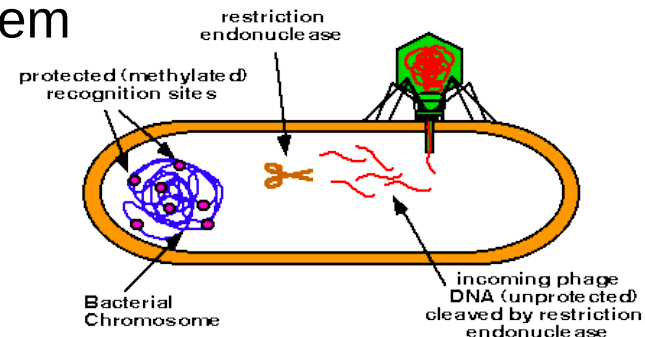
- fosfataze (odcep končnega fosfata z DNA)
- polinukleotid kinaze (vezava fosfata; npr. pri radioaktivnem označevanju)
- reverzne transkriptaze
- eksonukleaze (postopno odcepljanje nukleotidov s konca verige)
- metilaze (dodajanje Met- na DNA)

Encimi /2

- Pri pripravi rekombinantnih proteinov večkrat uporabljamo visoko specifične **endopeptidaze** za odcep fuzijskega dela.
- Fuzijski partner pri pripravi rekombinantnih proteinov je lahko encim (npr. glutation-S-transferaza, tioredoksin).
- Hiperglikozilacijo odpravimo z delovanjem **glikozidaz**.

Restriksijske endonukleaze

restriktaze (RE): bakterijski obrambni mehanizem pred tujo DNA (npr. bakteriofagno)



Tipi RE:

tip I: cepi ~1kb od prepoznavnega mesta, rabi ATP

tip II: cepi znotraj ali tik ob prepoznavnem mestu, ne rabi ATP

tip III: cepi ~25 bp od prepoznavnega mesta, rabi ATP

doslej znane RE iz ~800 vrst bakterij; tip II: 3864 različnih RE (560 kloniranih, 527 sekvenciranih) (zbirka REBASE; 12. okt. 2011)

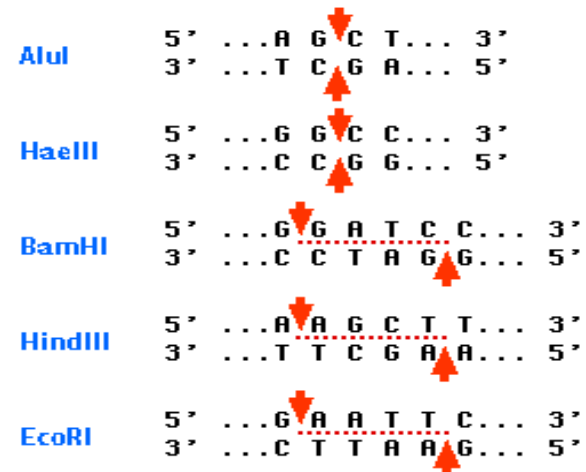
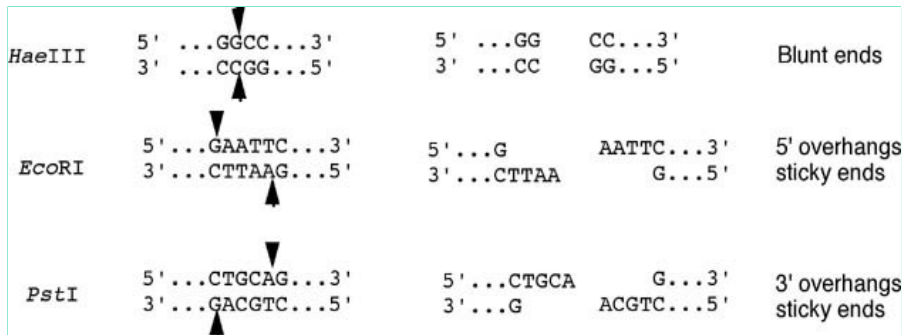
komercialno je dostopnih 647 različnih RE (242 razl. specifičnosti od 300 znanih)

Restriktaze prepoznajo palindromno zaporedje 4, 6, 8 ali več nukleotidov; daljša ko je prepoznavna regija, redkeje reže neko dolgo tarčno DNA.

Nomenklatura: začetnice bakterijske vrste, seva in številka, npr. *EcoRI* (*Escherichia coli* RY13), *BamHI* (*Bacillus amylophilus* H)

Restriktaze /2

Po rezanju nastanejo topi ali lepljivi konci (previs na 5'- ali 3'- strani verige):



Uporaba:

- priprava fragmentov naravne ali sintetične DNA,
- priprava vektorja za vnos,
- analiza naravnih (RFLP) in rekombinantnih molekul DNA.

Izoshizomeri: encimi iz različnih organizmov z enakim tarčnim zaporedjem.

AatI: AGG/CCT *StuI*: AGG/CCT ... ni nujno, da cepijo za istim nukleotidom – take imenujemo:

Neoshizomeri: prepoznajo enako zaporedje, a cepijo različno.

NaeI: GCC/GGC *Eco56I*: G/CCGGC

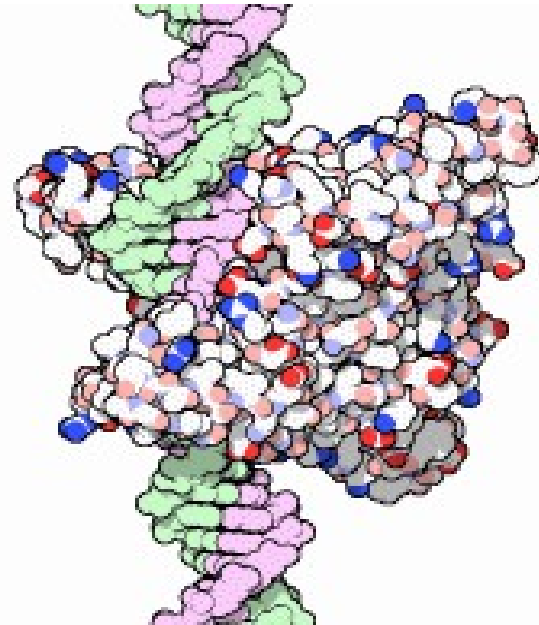
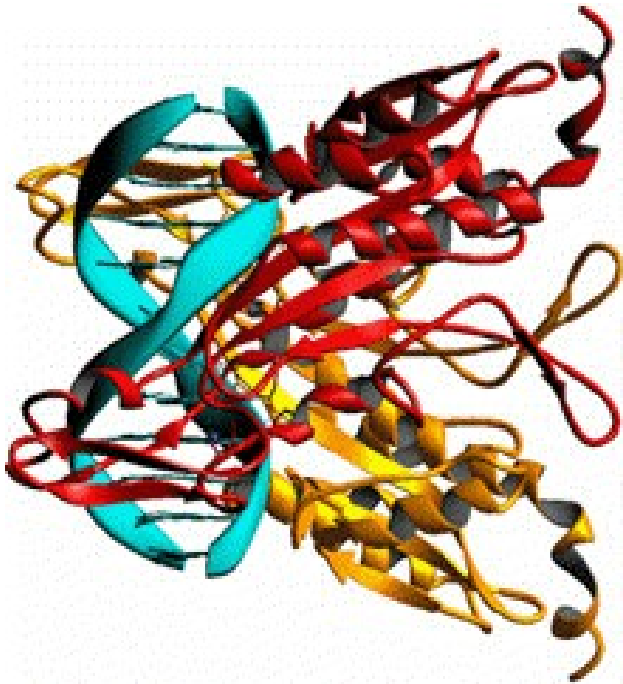
Restriktaze /3

EcoRI, prva restriktaza, ki so jo uporabili pri kloniranju

M=30.926 Da (monomer)

(prva opisana RE: *HindII*, 1970; NN1978 Hamilton Smith)

Na DNA se *EcoRI* veže preko 6 aa, 12 H-vezi.



Restriktaze: encimska reakcija

Reakcijska mešanica: *(tipične količine za analizo z AGE)*

DNA ~1 μg

pufer 1/10 V (10x koncentrat)

RE 5-10 U

reakcija 1 h pri 37 °C (izjeme: 25 °C, 65 °C)

- RE mora biti < 10 % celotnega volumna reakcijske mešanice (glicerol → star-aktivnost)
- količina RE je odvisna od števila RE mest
- celotni volumen naj bo primeren velikosti žepkov (do 15 μl)

Encimska enota:

1U cepi 1 μg bakteriofaga λ v 1 h pri 37 °C

upoštevati je treba velikost DNA, število RE mest, stabilnost RE, cepitev scDNA (nekatero RE so optimalno aktivne samo na linearni DNA)

Restriktaze: posebnosti pri delu

Star-aktivnost:

RE lahko v suboptimalnih pogojih cepijo zaporedje, ki ni enako običajnemu prepoznavnemu zaporedju. Do tega pride, če je:

- koncentracija encima zelo visoka (>100 U/ μ g)
- koncentracija glicerola >5 %
- v pufru napačen dvovalentni ion
- koncentracija NaCl prenizka (<25 mM)
- pH izven območja optimuma (predvsem pri pH >8)
- v reakcijski mešanici prisoten DMSO, etanol ali druga organska topila

Pride lahko do: prepoznavanja zaporedja z zamenjano 1 bazo, neupoštevanje zunanjih baz v prepoznavnem zaporedju, cepitve le 1 verige.

Restriktaze: posebnosti pri delu /2

Rezanje z 2 restriktazama:

Izbrati moramo pogoje, v katerih oba encima dobro delujeta.

Če so aktivnosti v nekem pufri različne, moramo dodati ustrezno večjo količino encimov.

Če so optimalni reakcijski pogoji za oba encima zelo različni, izvedemo reakcijo v 2 stopnjah z vmesno zamenjavo pufra.

Pri preparativnih reakcijah (>2 μg DNA) lahko izvajamo 'navzkrižno cepitev'.

Rezanje v bližini koncev DNA:

nekateri encimi potrebujejo na 5'-koncu še nekaj dodatnih bp, da se učinkovito vežejo na DNA in jo nato razrežejo.

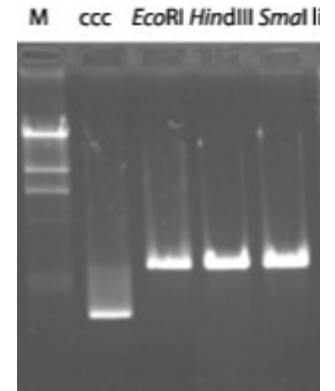
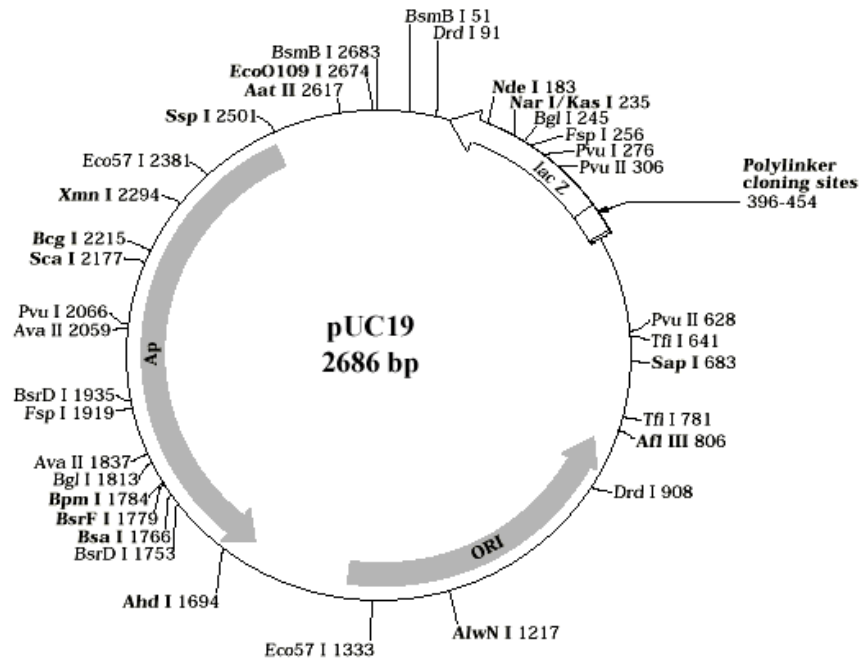
Rezanje v bližini koncev

encim	bp od konca	učinkovitost	vektor	prvotno mesto
		rezanja (%)		
<i>EcoRI</i>	1	100 (1)	LITMUS 29	Xho I
	1	88 (1)	LITMUS 29	Pst I
	1	100 (1)	LITMUS 39	Nhe I
<i>Hin d III</i>	3	90 (2)	LITMUS 29	Nco I
	2	91 (2)	LITMUS 28	Nco I
	1	0 (2)	LITMUS 29	BamH I
<i>Pst I</i>	3	98 (1)	LITMUS 29	EcoR V
	2	50 (5)	LITMUS 39	Hind III

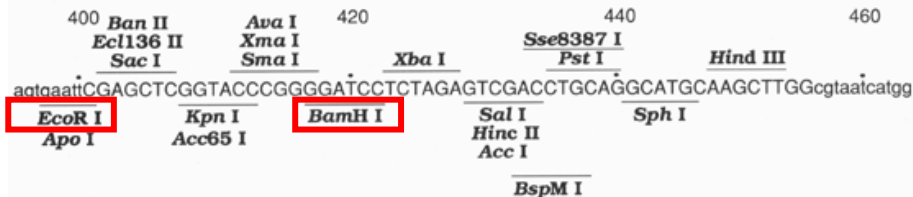
encim	zaporedje oligonukleotida	dolžina	učinkovitost (%)	
		verige	2 h	20 h
<i>EcoRI</i>	GGAATTC	8	>90	>90
	CGGAATTCG	10	>90	>90
	CCGGAATTCGG	12	>90	>90
<i>Hin dIII</i>	CAAGCTTG	8	0	0
	CCAAGCTTGG	10	0	0
	CCCAAGCTTGGG	12	10	75
<i>Not I</i>	TTGCGGCCGCAA	12	0	0
	ATTTGCGGCCGCTTTA	16	10	10
	AAATATGCGGCCGCTATAAA	20	10	10
	ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTAT	24	25	90
	AAGGAAAAAAGCGGCCGCAAAAGGAAAA	28	25	>90

Navzkrižno rezanje DNA

Rezanje plazmida z dvema restriktazama z vmesno kontrolo učinkovitosti



polylinker region



Navzkrižno rezanje DNA

Izvedba rezanja plazmida z dvema restriktazama

5 μg pUC19, 100 ng/ μl \sim 3 pmol \rightarrow 50 μl

25 μl (2,5 μg)

+

*Eco*RI, pufer 2x Tango

25 μl (2,5 μg)

+

*Bam*HI, pufer 2x Tango

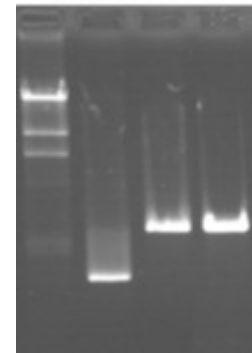
npr. 2 h 37 °C

500 ng analiziramo z agarozno elektroforezo

če je rezanje bilo popolno, dodamo

v 1. alikvot *Bam*HI

v 2. alikvot *Eco*RI



Navzkrižno rezanje DNA

Izvedba rezanja plazmida z dvema restriktazama

pUC 19	25 μ l (2,5 μ g)		25 μ l (2,5 μ g)
<i>Eco</i> RI	2 μ l (20 U)	<i>Bam</i> HI	2 μ l (20 U)
10x Tango	7 μ l		7 μ l
dH ₂ O	1 μ l		1 μ l
<hr/>			
skupaj	35 μ l		35 μ l
konc.	71 ng/ μ l		71 ng/ μ l
za AGE:	7 μ l		7 μ l
<hr/>			
vektor	28 μ l		28 μ l
<i>Bam</i> HI	2 μ l	<i>Eco</i> RI	2 μ l

Restriktaze: posebnosti pri delu /3

Rezanje dodatno zvite DNA:

Nekateri encimi bistveno slabše režejo dodatno zvito DNA od linearne. Ker je enota določena na linearni molekuli DNA, je treba v takih primerih dodati več restriktaze kot bi je bilo teoretično potrebno.

Cleavage Substrate:
LITMUS

Enzyme	Units to Cleave	Reference Substrate
AatII	3	λ DNA
Acc65I	1	λ DNA
AflII	2	λ DNA
AflIII	1	λ DNA
AgeI	1	λ DNA
AhdI	1	λ DNA
ApaI	1	λ DNA
AvrII	1	λ DNA
BaeI	3	λ DNA
BamHI	5	λ DNA
BglII	8	λ DNA
BsaXI	2	λ DNA
BsiWI	3	λ DNA
BspEI	1	λ DNA
BsrGI	1	λ DNA
BtgI	5	λ DNA
EagI	10	λ DNA
EcoRI	4	λ DNA
EcoRV	1	λ DNA
HindIII	4	λ DNA
KasI	4	λ DNA
KpnI	2	λ DNA
MluI	2	λ DNA
NcoI	1	λ DNA
NgoMIV	2	λ DNA
NheI	1	λ DNA
NheI-HF™	5	λ DNA
NmeAIII	***	λ DNA
NsiI	1	λ DNA
PciI	3	λ DNA
PstI	1	λ DNA
SacI	5	λ DNA
SalI	10	λ DNA
SnaBI	1	λ DNA
SpeI	1	λ DNA
SphI	4	λ DNA
StuI	3	λ DNA
TliI	2	λ DNA
XhoI	10	λ DNA

Cleavage Substrate:
pBR322

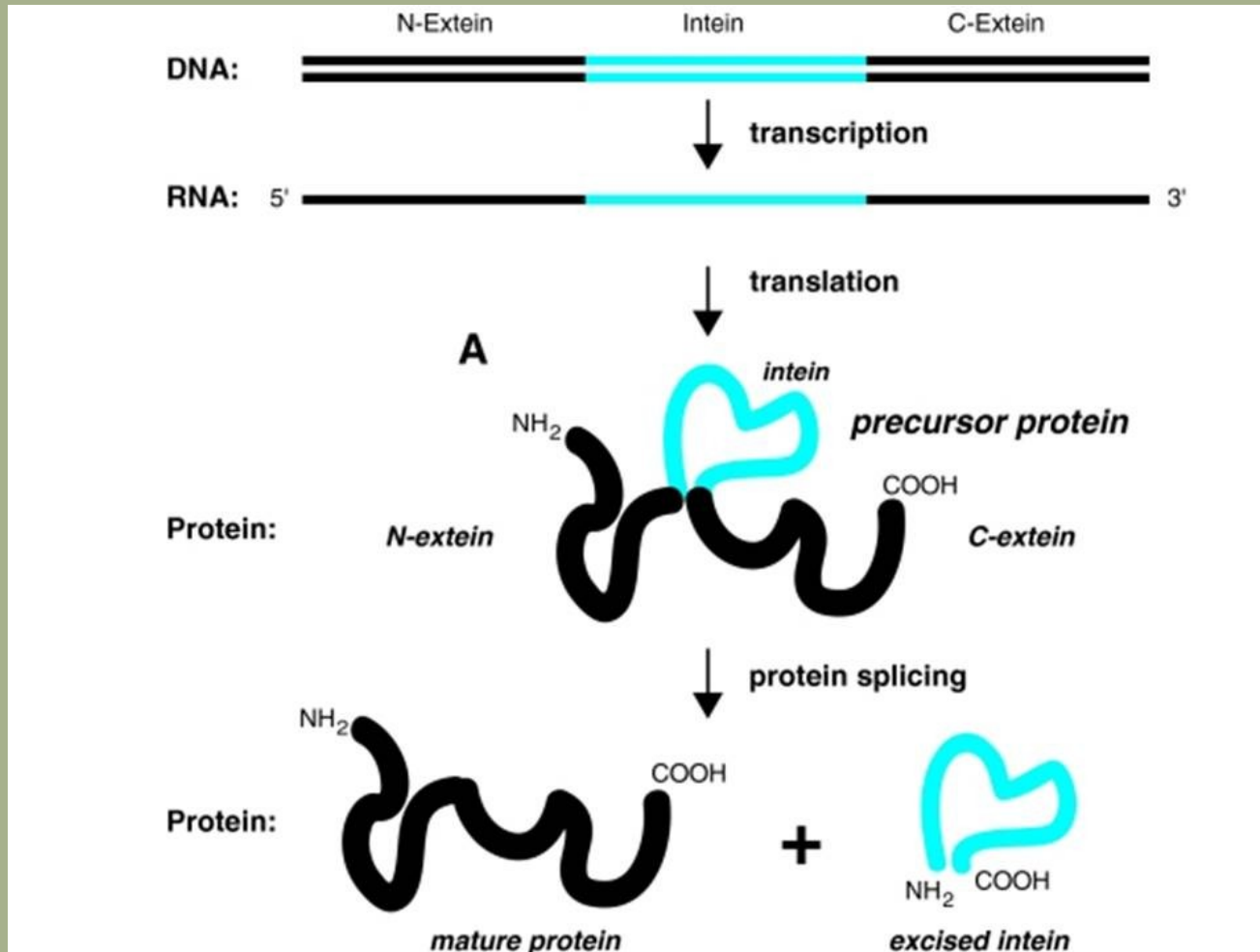
Enzyme	Units to Cleave	Reference Substrate
AatII	3	λ DNA
AflIII	1	λ DNA
AhdI	1	λ DNA
AlwNI	1	λ DNA
AseI	0.3	λ DNA
AvaI	10	λ DNA
BamHI	3	λ DNA
BsaAI	20	λ DNA
BsaI	2	λ DNA
BsaXI	2	λ DNA
BsgI	1	λ DNA
BsmI	1	λ DNA
BspDI	1	λ DNA
BspMI	**	λ DNA
BspQI	3	λ DNA
ClaI	5	λ DNA
EagI	10	λ DNA
EcoNI	3	λ DNA
EcoRI	2.5	λ DNA
EcoRV	1	λ DNA
HindIII	5	λ DNA
NdeI	3	λ DNA
NheI	10	λ DNA
NheI-HF™	10	λ DNA
NruI	1	λ DNA
PciI	3	λ DNA
PstI	1	λ DNA
PvuI	2	λ DNA
PvuII	2	λ DNA
PvuII-HF™	4	λ DNA
SalI	10	λ DNA
SalI-HF™	2.5	λ DNA
SapI	1	λ DNA
ScaI	20	λ DNA
ScaI-HF™	4	λ DNA
SphI	2	λ DNA
SphI-HF™	3	λ DNA
SspI	2	λ DNA

Cleavage Substrate:
pUC19

Enzyme	Units to Cleave	Reference Substrate
AatII	3	λ DNA
AccI	5	λ DNA
AflIII	1	λ DNA
AhdI	1	λ DNA
AlwNI	2	λ DNA
ApoI	1	λ DNA
AvaI	10	λ DNA
BamHI	1	λ DNA
BanII	1	λ DNA
BpmI	1	λ DNA
BsaI	1	λ DNA
BspMI	**	λ DNA
BsrFI	2	λ DNA
EcoO109I	8	λ DNA
EcoRI	2.5	λ DNA
HincII	4	λ DNA
HindIII	5	λ DNA
KpnI	2	λ DNA
NarI	20	λ DNA
NdeI	2	λ DNA
NmeAIII	***	λ DNA
PciI	3	λ DNA
PstI	1	λ DNA
PvuII-HF™	2	λ DNA
SacI	5	λ DNA
SalI	10	λ DNA
SalI-HF™	5	λ DNA
SapI	1	λ DNA
ScaI	15	λ DNA
ScaI-HF™	4	λ DNA
SmaI	1	λ DNA
SphI	3	λ DNA
SphI-HF™	3	λ DNA
SspI	5	λ DNA
TspMI	1	λ DNA
XbaI	2	λ DNA
XmnI	5	λ DNA

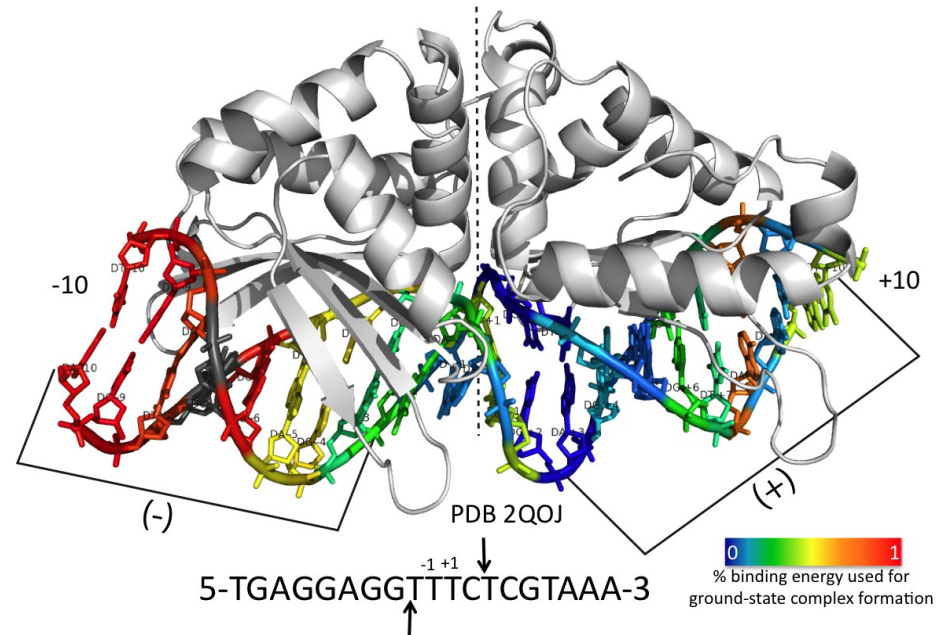
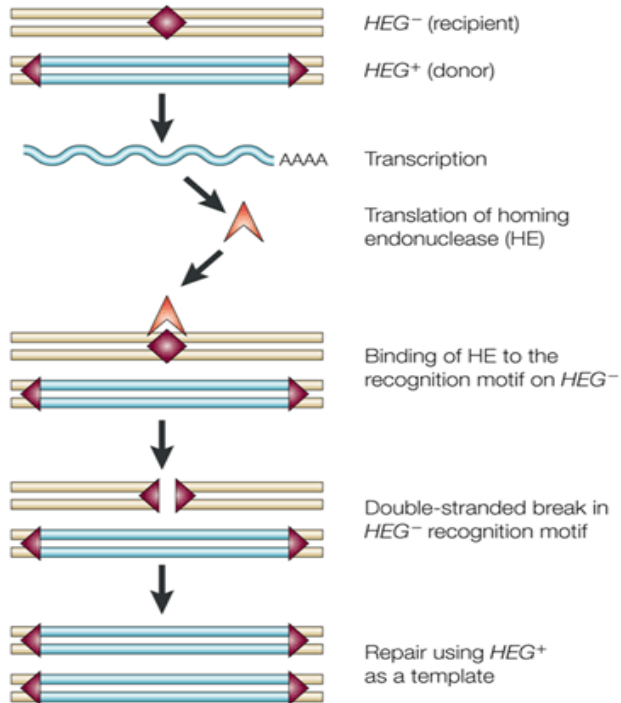
** BspMI cleaves pUC19

Inteini



Prenašalne endonukleaze /1

homing endonucleases



Prenašalne endonukleaze /2

- Te restriktaze prepoznajo asimetrično zaporedje na dsDNA, dolgo 12-40 bp.
- Sodelujejo pri lateralnem prenosu prekinjajočih nukleotidnih zaporedij (intronov, inteinov) v alele brez njih. Zapis zanje je na samih mobilnih elementih.
2011: znanih je 94 encimov s 76 specifičnostmi, 5 je komercialno dostopnih.
- Intronske endonukleaze so označene z **I**-Xxx N (npr. I-Sce I),
inteinske pa s **PI**-Xxx N (npr. PI-Sce I)

5' ..TAACTATAACGGTCCTAA↓GGTAGCGA..3'
3' ..ATTGATATTGCCAG GATTCCATCGCT..5'

I-Ceu I; iz gena za kloroplastno RNA *Chlamydomonas eugametos*
1 U cepi 1 µg predhodno lineariziranega pBHS v 3 h pri 37 °C.

5' ..TGGCAAACAGCTATTAT↓GGGTATTATGGGT..3'
3' ..ACCGTTTGTGCGAT AATACCCATAATACCCA..5'

PI-Psp I iz prekursorja DNA-polimeraze *Pyrococcus sp.* GB-D.
Prekursorski protein se *in vivo* razcepi na polimerazo in restriktazo.
1 U cepi 2 µg predhodno lineariziranega pAKR7 v 1 h pri 65 °C.

Zarezovalne endonukleaze

nicking endonucleases

- Encime so najprej našli med restriktazami s heterodimerno strukturo.
- Nekatere encime so pripravili z mutacijami običajnih restriktivskih endonukleaz.
- Prepoznajo dsDNA s točno določenim zaporedjem, a cepijo samo eno verigo v dupleksu (lahko zunaj prepoznavnega zaporedja).
- Uporabljamo jih kot osnovo za novo sintezo komplementarne verige, za eksonukleazno razgradnjo v notranjosti neke regije, ali za ustvarjanje krajših vrzeli v eni verigi. Komercialno dostopnih je 15 različnih.
- Zarezovalne endonukleaze so označene z **Nt**.XxxN (npr. Nt.A/I) – cepijo zgornjo verigo, ali **Nb**.XxxN (npr. Nb.BbvCI) – cepijo spodnjo verigo.

Nb.Mva1269I (Nb.BsmI)

#ER2051 1000 u

Lot: **Expiry Date:**

5'...G A A T G C...3'

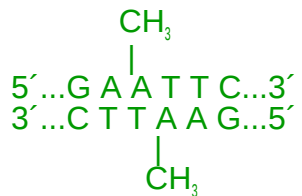
3'...C T T A C↑G...5'

Metilaze

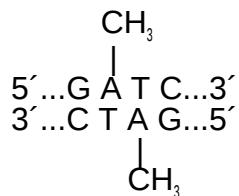
Metilaze katalizirajo vezavo $-CH_3$ skupin na bazi A ali C v določenih zaporedjih.



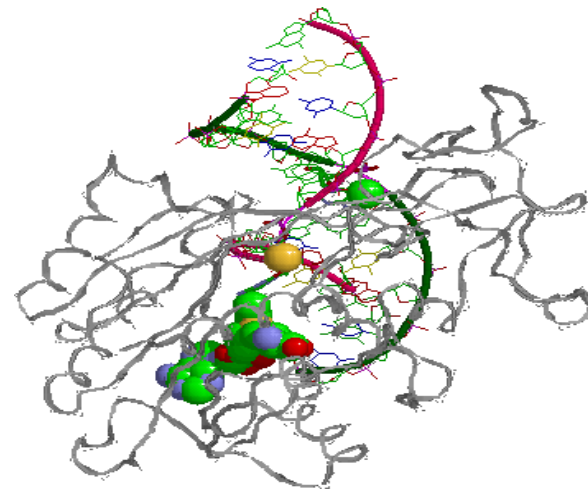
metilaza *Bam*HI



metilaza *Eco*RI



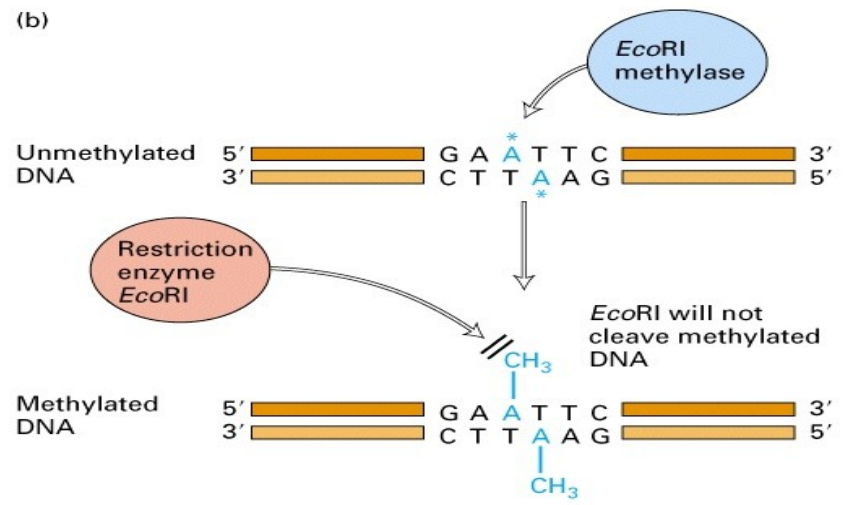
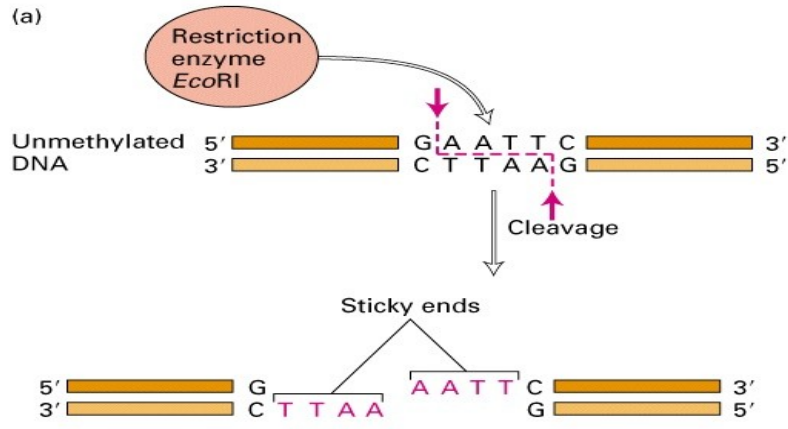
metilaza *dam*



metilaza *Hha*I

Metilaze pri *E. coli* zaščitijo lastno DNA pred razgradnjo z restriktazami. Laboratorijski sevi so pogosto *dam*⁺, *dcm*⁺ in DNA, izolirana iz takih sevov, je lahko odporna na delovanje restriktaz *in vitro*, pa tudi replikacija lahko teče počasneje. Izbrati je treba primerne gostiteljske seve.

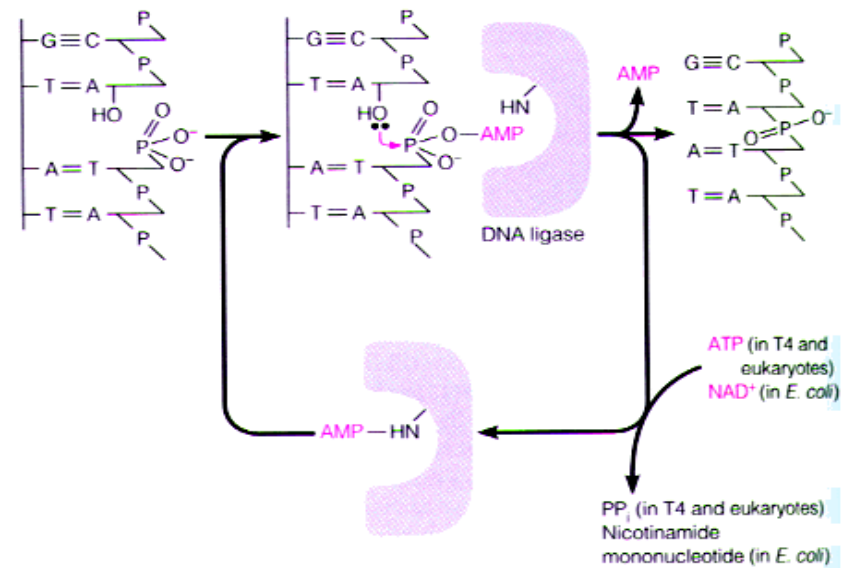
Metilaze = **Metiltransferaze**



Ligaze

DNA-ligaze povezujejo fragmente DNA med seboj: prosti 5'-fosfat povežejo s prosto sosednjo 3' -OH skupino.

- ligaze so od ATP (T4) ali NAD^+ (*E. coli*) -odvisne
- najpogosteje uporabljamo T4-ligazo (deluje na lepljive in tope konce),
za delo s PCR tudi *Taq*-ligazo



RNA-ligaza: povezuje konce ssDNA ali RNA

Ligazna reakcija

reakcijska mešanica:

- fragment 1 (DNA)
- fragment 2 (DNA)
- ligaza
- pufer (vsebuje ATP in pogosto tudi PEG)

koncentracija DNA >25 ng/ml (lepljivi konci) oz. ~1 ng/ml (topi konci)

količina ligaze: topi konci >> lepljivi konci

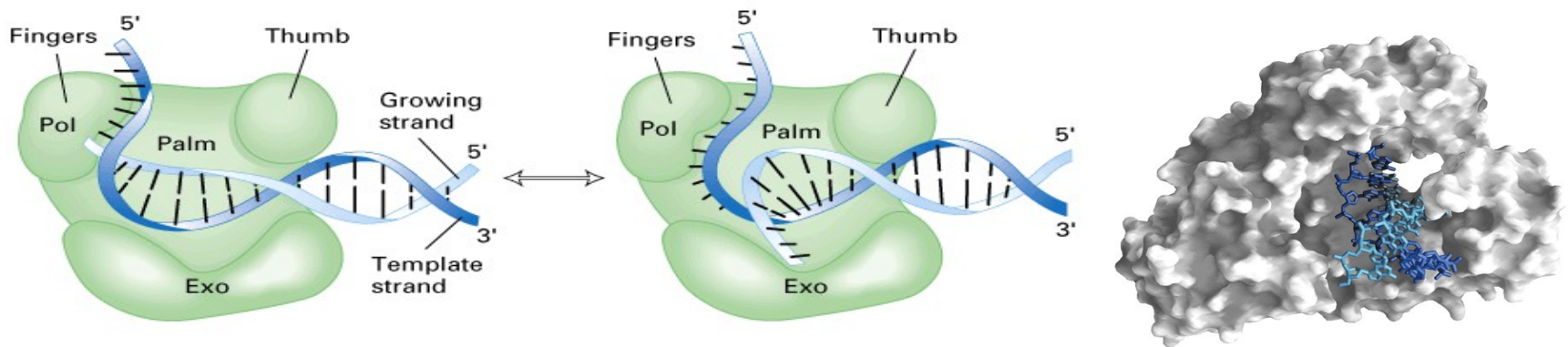
DNA-polimeraze

Polimeraze katalizirajo sintezo dolge verige nukleinske kisline po matrici.



DNA-polimeraza I: holoencim (109 kDa)

- sinteza dsDNA (5' → 3'), eksonukleazna aktivnost 3' → 5' (kontrolno branje), eksonukleazna aktivnost 5' → 3'
- uporabljamo jo za sintezo 2. verige cDNA in za označevanje s pomikom zarez (nick-translation)

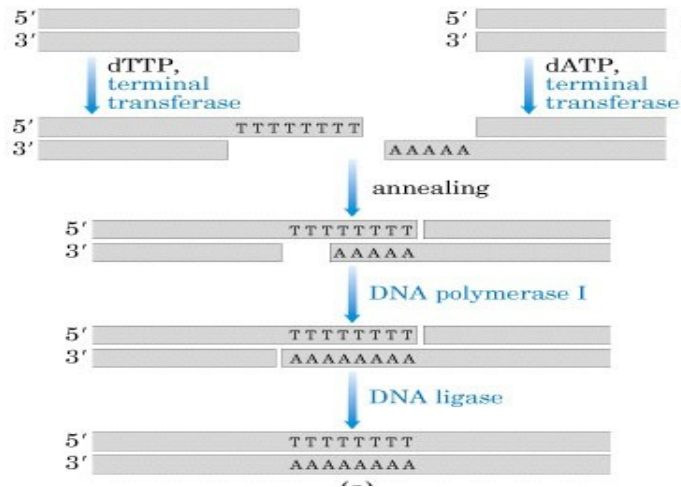


veliki fragment DNA-pol I: Klenow-fragment (76 kDa)

- nima eksonukleazne aktivnosti 5' → 3'
- uporabljamo ga za sintezo 2. verige cDNA, označevanje 3'-koncev, zapolnjevanje koncev, ki štrlijo na 5'-strani
- obstaja tudi rekombinantna varianta DNA-pol, ki je Exo

Druge polimeraze

Terminalna transferaza: dodaja posamezne dNTP (tudi več zapored) na 3'-OH konec DNA-verige in tako npr. omogoča radioaktivno označevanje 3'-koncev.



RNA-polimeraza (npr. T7-, SP6-): transkripcija *in vitro* s fagnih promotorjev. Uporabljamo za sintezo RNA, ki jo nato prevedemo *in vitro*, in za sintezo radioaktivno označene RNA.

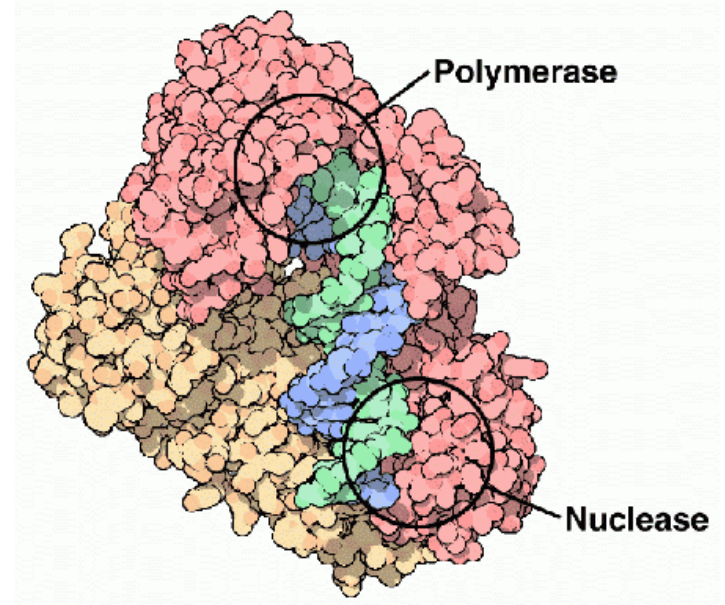
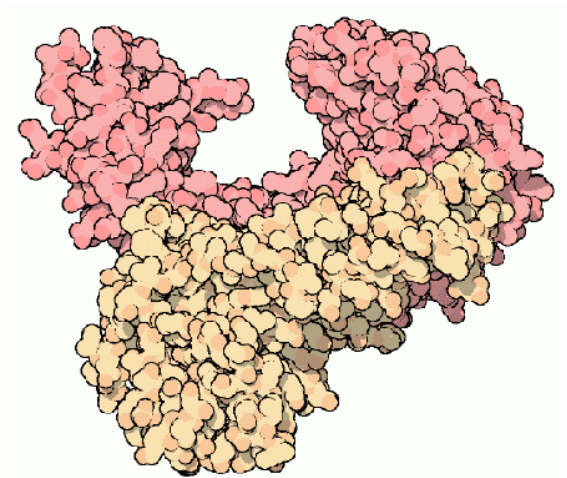
Reverzne transkriptaze

Katalizirajo sintezo cDNA na osnovi matrice mRNA.

Encimi so retrovirusnega izvora.

reverzna transkriptaza AMV (iz virusa ptičje mieloblastoze) ima lahko za matrico tudi DNA; rabi začetni oligonukleotid, Mg^{2+} ali Mn^{2+} . Ima tudi aktivnost RNaze H.

reverzna transkriptaza M-MuLV (Moloneyev virus levkemije pri miših) ima tudi šibko aktivnost RNaze H; uporabljamo jo za reverzno prepisovanje dolgih mRNA (<5 kb).



Eksonukleaze

eksonukleaze: razgrajujejo NA na koncih polimerov

Nukleaza S1: razgrajuje ssDNA

Exo III: odstranjuje nukleotide s 3'-konca DNA

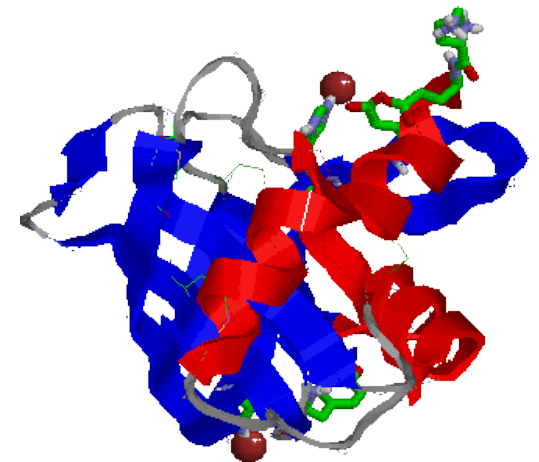
RNaze

ribonukleaze: razgrajujejo RNA

RNaza H prepozna dupleks DNA-RNA in cepi RNA na naključnih mestih. Uporabljamo jo pri sintezi cDNA.

RNaza A cepi RNA, ki jo dobimo kot stranski produkt pri izolaciji plazmidne DNA.

Pri RNazah je nevarno, da vsebujejo tudi DNaze.

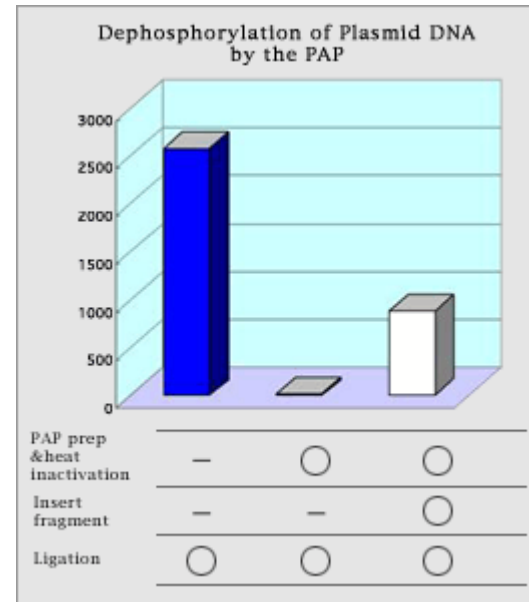
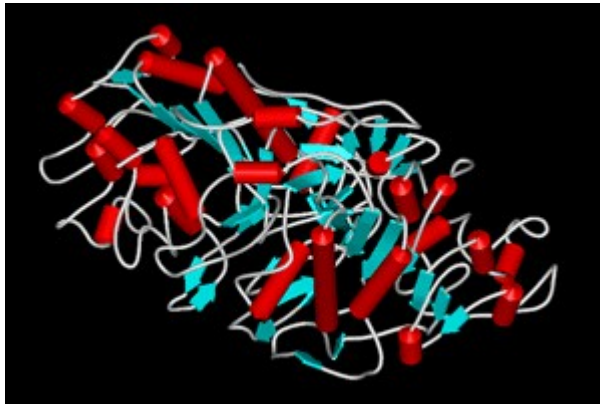


Fosfataza

Alkalna fosfataza: odcep fosfatne skupine s 5'-konca DNA. Uporabljamo predvsem alkalno fosfatazo iz telečjega želodca (CIP).

Po odcepu fosfata se molekula pri ligaciji ne cirkularizira.

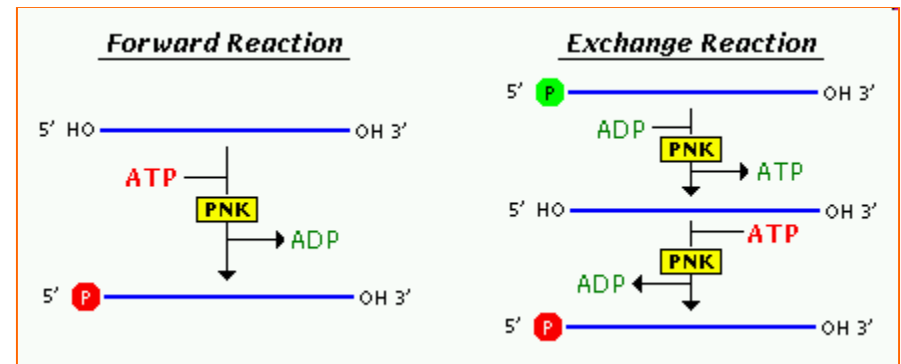
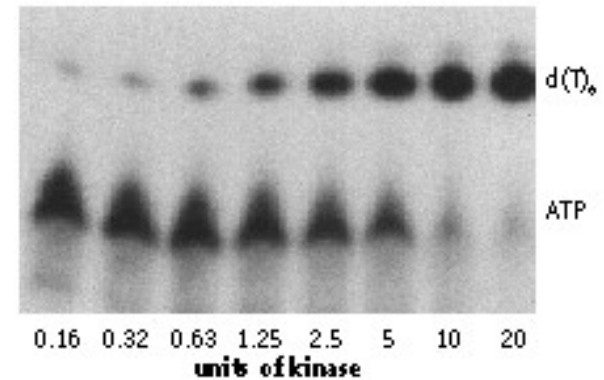
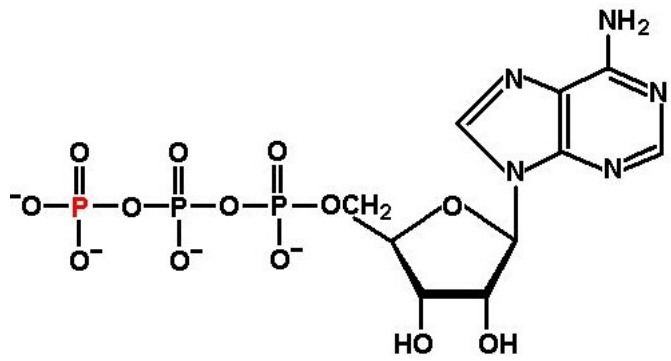
Po odcepu fosfata lahko na molekulo DNA vežemo radioaktivno označeno fosfatno skupino (PNK).



Polinukleotid kinaza

Polinukleotid kinaza (PNK): dodaja fosfatno skupino na 5'-konec DNA; uporabljamo predvsem encim iz faga T4.

- γ -fosfat se z ATP prenese na DNA
- tako lahko na DNA prenesemo radioaktivni fosfat (ra γ -ATP)



Peptidaze v tehnologiji rDNA

(Restriksijske) endopeptidaze: prepoznajo in cepijo peptidno vez med fuzijskim delom in proteinom, ki ga želimo proizvesti. Proteinaze morajo biti zelo čiste.

Najpogosteje uporabljamo serinske proteinaze:

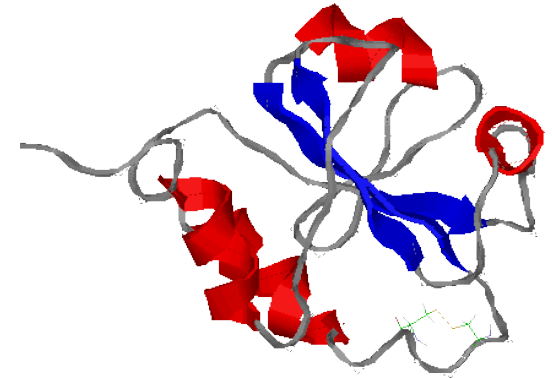
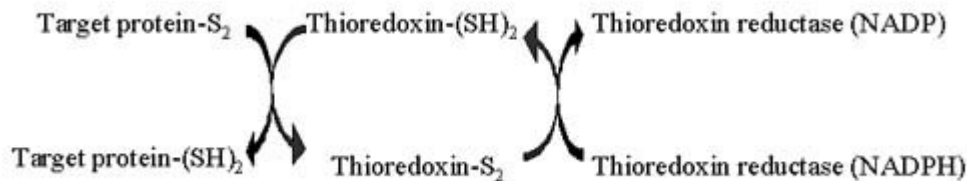
- **trombin (EC 3.4.21.5)**
F-L-A-E-G-G-G-V-R / X
E-G-G-G-V-R-G-P-R / X
N-E-E-G-F-F-S-A-R / X
- **koagulacijski faktor Xa (EC 3.4.21.6)**
Ile-Glu-Gly-Arg / Xxx
Ile-Asp-Gly-Arg / Xxx
Ala-Glu-Gly-Arg / Xxx
- **enterokinazo (EC 3.4.21.9)**
Asp-Asp-Asp-Asp-Lys / Xxx
(tudi Glu₄-Lys / Xxx)

Specifičnosti proteinaz se delno prekrivajo (npr. trombin delno cepi tudi na prepoznavnih mestih F Xa)

Proteinaza K: nespecifična glivna (*Tritrachium album*) Ser proteaza; z njo razgrajujemo proteinske nečistoče v preparatih NA.

Protein-disulfid izomeraze

PDI: katalizirajo prerazporejanje S-S vezi v proteinskih molekulah in med njimi. (EC 5.3.4.1)



lokalizacija (*H.s.*): lumen ER

pH_{opt} ~7,5-8,5

M~57 000; sestavljen iz 2 tioredoksinskih domen (~110 aa)

obstaja v reducirani ali oksidirani obliki (tioredoksin-reduktaza, odvisna od NADPH)

Pri molekularnem kloniranju nastopa **tioredoksin** kot fuzijski partner, ki naj bi pomagal pri nastanku pravih disulfidnih mostičkov. PDI je lahko tudi na ločenem plazmidu.

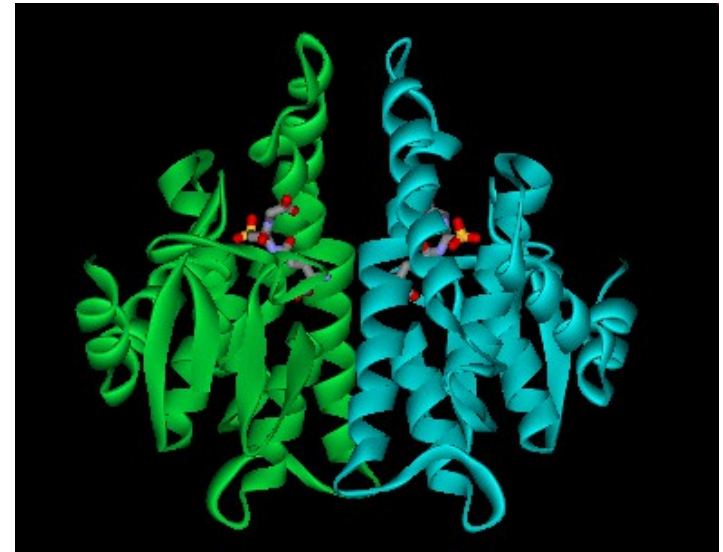
Glutation S-transferaze

GST: skupina encimov s široko specifičnostjo; sodelujejo tudi pri izomerizacijah in izmenjavi disulfidov. (EC 2.5.1.18)



- * R: alifatska, aromatska ali heterociklična skupina
- * X: sulfatna, nitritna ali halidna skupina

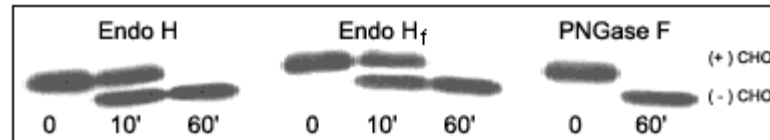
- GST uporabljamo kot fuzijski partner
- omogoča čiščenje fuzijskih proteinov na koloni z glutationom
- $\text{pH}_{\text{opt}} \sim 7-8,5$
- dimer (2 x ~23 kDa)



Glikozidaze

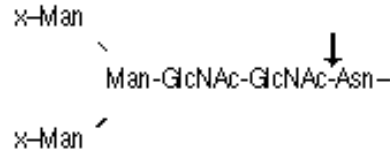
Glikozidaze odcepljajo stranske Ch-verige.

Uporabljamo jih, če ugotovimo, da je protein hiperglikoziliran ali nepravilno glikoziliran, Ch-ostanki pa niso nujno potrebni za lastnosti proteina, ki nas zanimajo.



Uporabljamo predvsem:

endoglikozidazo H



endoglikozidazo F
(PNGaza F)

