

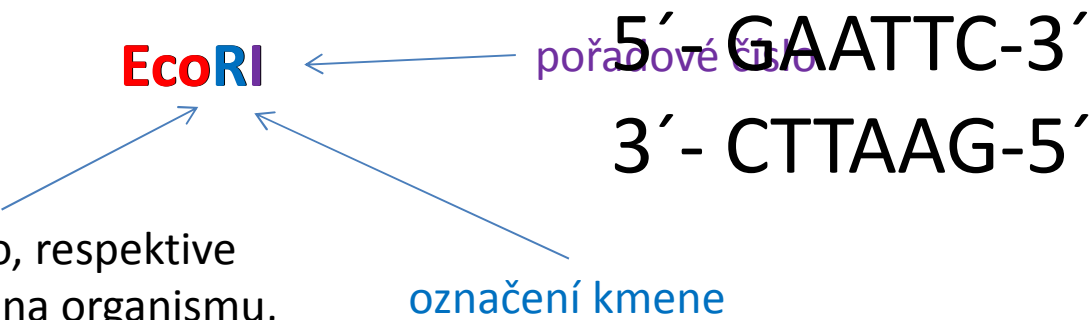
Detekce Leidenské mutace

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

3. Restrikční štěpení, elektroforéza
+ interpretace výsledků

Restrikční endonukleasy (restriktasy)

- **bakteriální** enzymy štěpící cizorodou dsDNA na kratší úseky → *restrikční fragmenty*
- **biologický význam:** ochrana bakterií **před cizí DNA** (bakteriofágy, plazmidy) → vlastní DNA je chráněna **metylací** v restrikčním místě
- rozpoznávají specifické sekvence (restrikční místa) v DNA a DNA v nich štěpí
- **restrikční místa** – dlouhá asi 4-8 nukleotidů, často mají charakter palindromů (obrácených repetit)

- označování:


5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'

pořadové číslo

označení kmene

podle rodového, respektive druhového jména organismu, ze kterého restriktasa pochází, např. *Escherichia coli*

Palindrom

- je jakákoliv sekvence symbolů - slovo, věta, číslo, sekvence DNA, kterou lze číst zprava doleva nebo zleva doprava a má vždy **stejný** význam

nezařazen, Anna, Kuna nese nanuk, ...

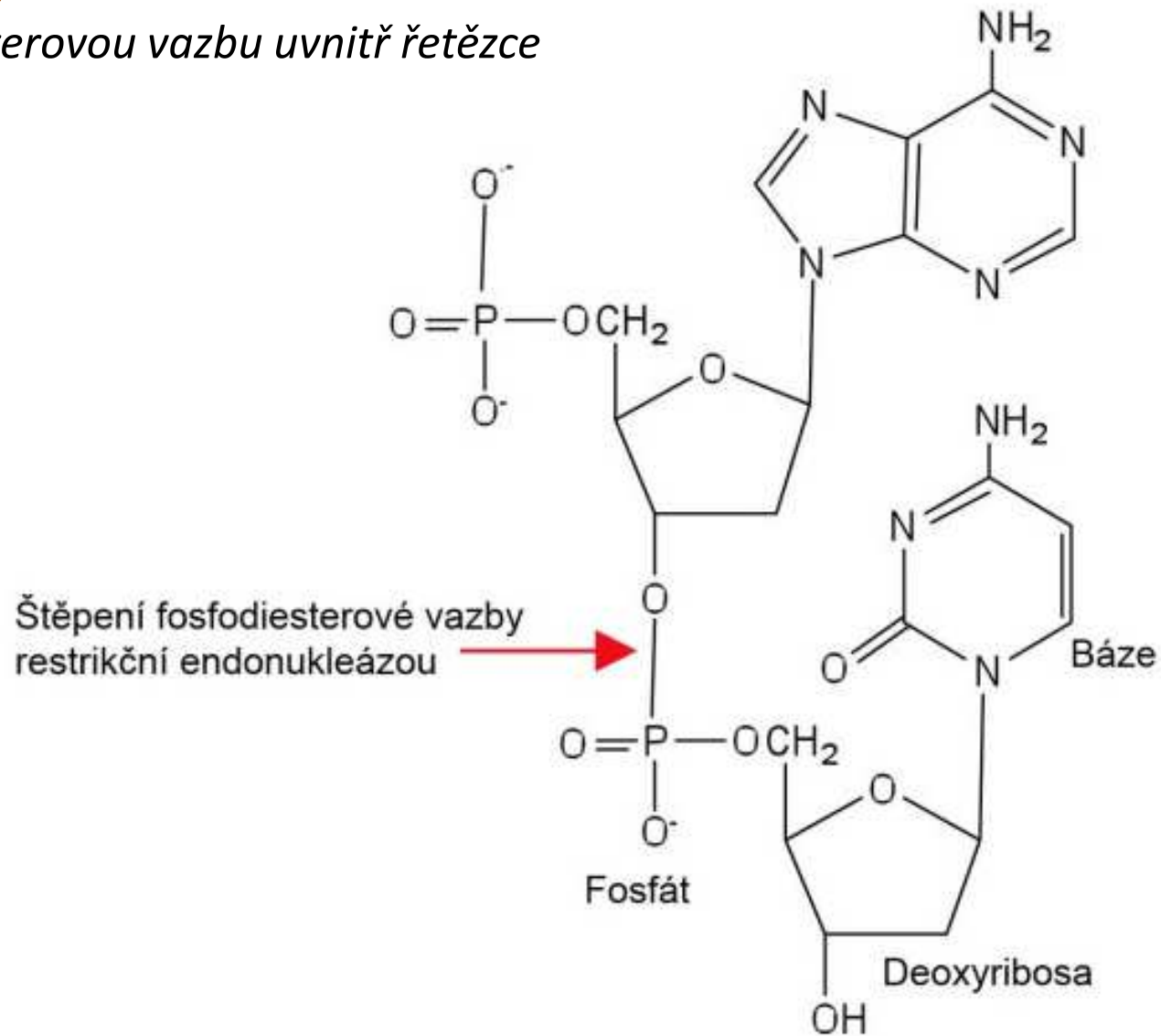
Palindrom v genetice

– sekvence NK (DNA nebo RNA), která je stejná pokud se čte od 5' konce k 3' konci jednoho vlákna a od 5' k 3' konci na komplementárním vlákně



endonukleázy

- štěpí fosfodiesterovou vazbu uvnitř řetězce



x exonukleázy

- štěpí fosfodiesterovou vazbu od 3' nebo 5' konce (exo)

- známo asi 3000 restriktáz, asi 600 komerčně dostupných

- Podle aktivity:

I. typu - vyžadují ATP pro štěpení

- bifunkční enzymy spojující metylaci a štěpení
- štěpí daleko od rozpoznávaného místa

II. typu - nejčastěji využívané v genovém inženýrství

- nevyžadují ATP pro štěpení
- štěpí přímo v restričním místě nebo v jeho bezprostřední blízkosti
- frekvence štěpení závisí na délce rozeznávané sekvence $\approx 4^n$

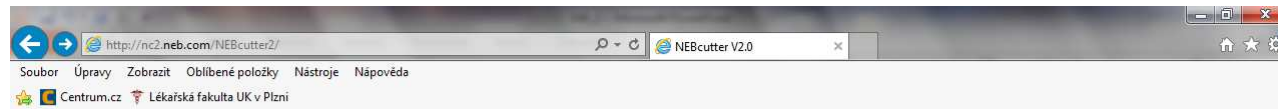
III. typu - rozpoznávají dvě nepalindromické sekvence v inverzní orientaci

- štěpí 20 – 30 bází za rozpoznávacím místem

IV. typu - štěpí modifikovanou DNA např. methylovanou

The Restriction Enzyme Database

<http://rebase.neb.com>



NEBcutter V2.0



This tool will take a DNA sequence and find the large, non-overlapping open reading frames using the E.coli genetic code and the sites for all Type II and commercially available Type III restriction enzymes that cut the sequence just once. By default, only enzymes available from NEB are used, but other sets may be chosen. Just enter your sequence and "submit". Further options will appear with the output. **The maximum size of the input file is 1 MByte, and the maximum sequence length is 300 Kbases.**

[What's new in V2.0](#) [Citing NEBcutter](#)

Local sequence file: <input type="text"/> <input type="button" value="Procházet..."/>	Standard sequences:
GenBank number: <input type="text"/> <input type="button" value="Browse GenBank"/>	# Plasmid vectors <input type="text"/>
or paste in your DNA sequence: (plain or FASTA format)	# Viral + phage <input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="button" value="Submit"/>
The sequence is: <input checked="" type="radio"/> Linear <input type="radio"/> Circular	<input type="button" value="More options"/>
Enzymes to use:	<input type="button" value="Set colors"/>
<input checked="" type="radio"/> NEB enzymes	
<input type="radio"/> All commercially available specificities	
<input type="radio"/> All specificities	
<input type="radio"/> All + defined oligonucleotide sequences	
<input type="radio"/> Only defined oligonucleotide sequences	
define oligos	
Minimum ORF length to display: <input type="text" value="100"/> a.a.	
Name of sequence: <input type="text"/> (optional)	
Earlier projects:	
<small>Note: Your earlier projects will be deleted 2 days after they were last accessed. You need to have cookies enabled in your browser for this feature to work.</small>	<input type="button" value="Delete projects"/>
<input type="checkbox"/> Disable NEBcutter cookies	

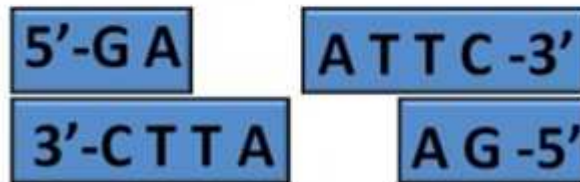


Štěpení DNA restriční endonukleázou

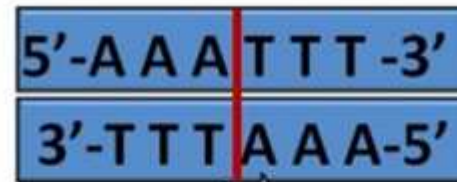
EcoRI



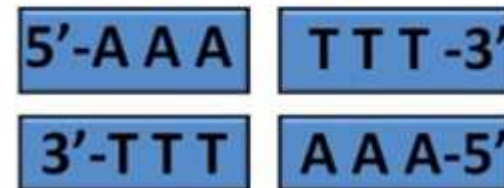
LEPIVÉ = KOHEZNÍ KONCE



AhaIII



TUPÉ KONCE

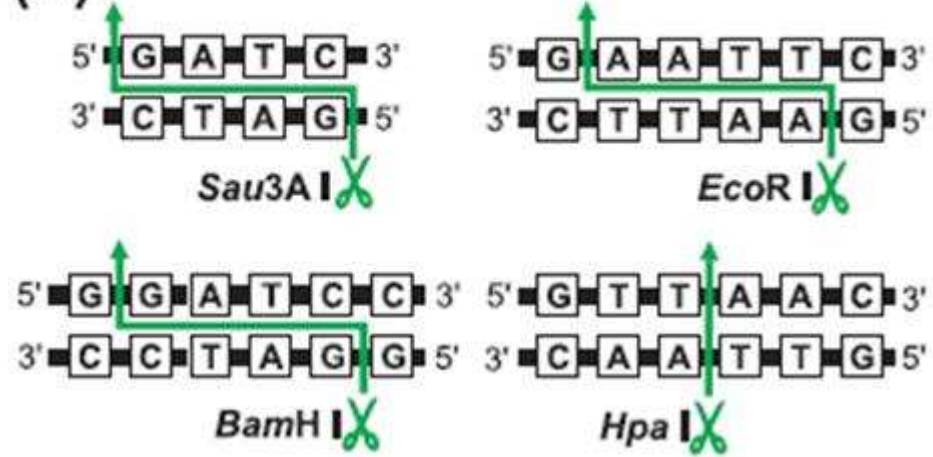


⇒ nástroj ke štěpení a skládání fragmentů DNA do nových celků

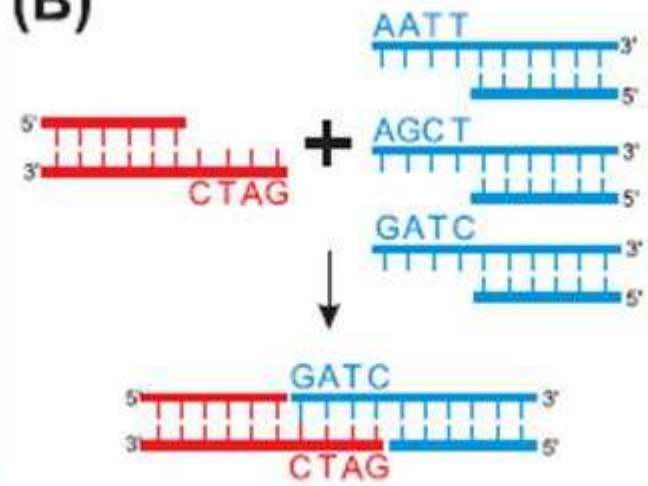
- RE nerozlišují původ DNA jen svoji specifickou sekvencí

Příklad

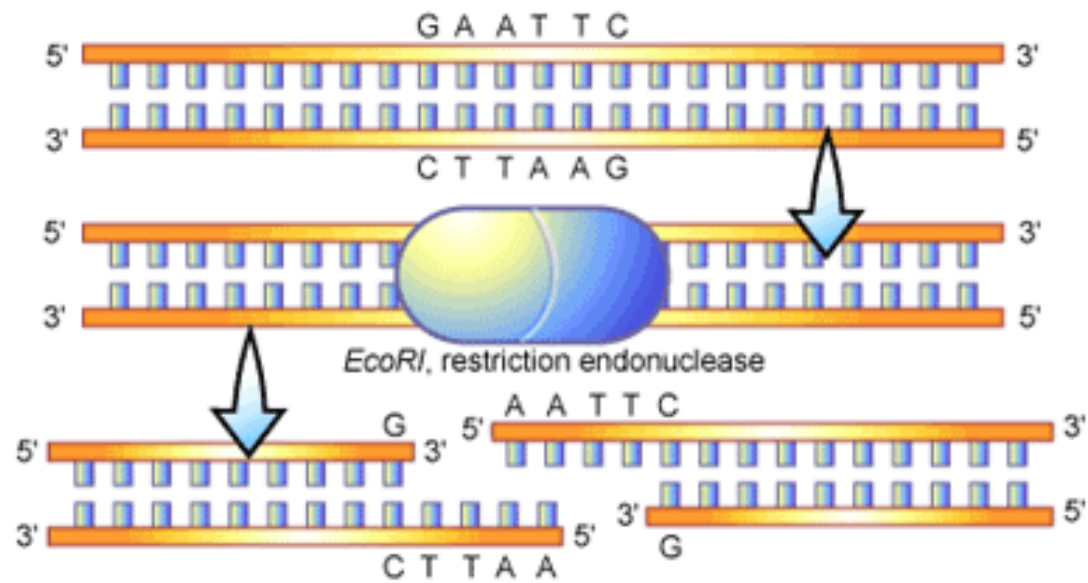
(A)



(B)



Štěpení DNA restrikční endonukleázou EcoRI



ROZPOZNÁVANÁ SEKVENCE. Rozpoznávaná sekvence restričních enzymů je nejčastěji palindromickou sekvencí, tzn. takovou sekvencí, která je stejná, když se čte stejně zepředu jako zezadu. Přičemž rozlišujeme zrcadlový palindrom, kdy se sekvence čte tímto způsobem v rámci jednoho řetězce (např. CTAATC) nebo invertovaný palindrom, kdy se takto čte sekvence v rámci obou komplementárních řetězců (např. GAATTC, komplementární sekvence je CTTAAG).

Palindromická sekvence je sekvence, která je ve směru 5'-3' z horního řetězce stejná jako sekvence ve směru 5'-3' z dolního řetězce



TYPY RESTRIKTÁZ. V současné době je známo asi 3000 restriktáz, z toho asi 600 je komerčně dostupných. Podle aktivity rozlišujeme restriktázy na tři typy, I, II a III.

Restriktázy typu I. Rozpoznávací místo je tvořeno ze dvou sekvencí, jedna z těchto sekvencí je dlouhá 3 – 4 nukleotidů a druhá je dlouhá 4 – 5 nukleotidů, přičemž mezi oběma sekvencemi je vzdálenost 6 – 8 nukleotidů. Tyto enzymy fungují jako tři různé jednotky. Jedna jednotka je zodpovědná za rozlišení rozpoznávací sekvence a vazbu na DNA, druhá má metyltransferázovou aktivitu, tj. zajišťuje metylaci hostitelské DNA, a třetí jednotka zajišťuje štěpení DNA. Ke štěpení DNA dochází v místě, které je nejméně 1000 bází vzdálené od rozpoznávací sekvence. Pro svou aktivitu tyto restriktázy vyžadují S-adenosyl metionin, ATP a Mg^{2+} ionty.

Restriktázy typu II. Klasická restriktáza typu II je tvořena jednou jednotkou (je tedy homodimerem), rozpoznává palindromickou sekvenci dlouhou 4 – 8 bází a tuto sekvenci i štěpí. Jedná se o nejčastěji využívaný typ restriktáz v genovém inženýrství.

Využití restrikčních endonukleas

- fragmentaci DNA
- AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)
- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- STRP (Short Tandem Repeat Polymorphism)
- při molekulárním klonování fragmentu DNA do vektoru či spojování dvou fragmentů DNA dohromady

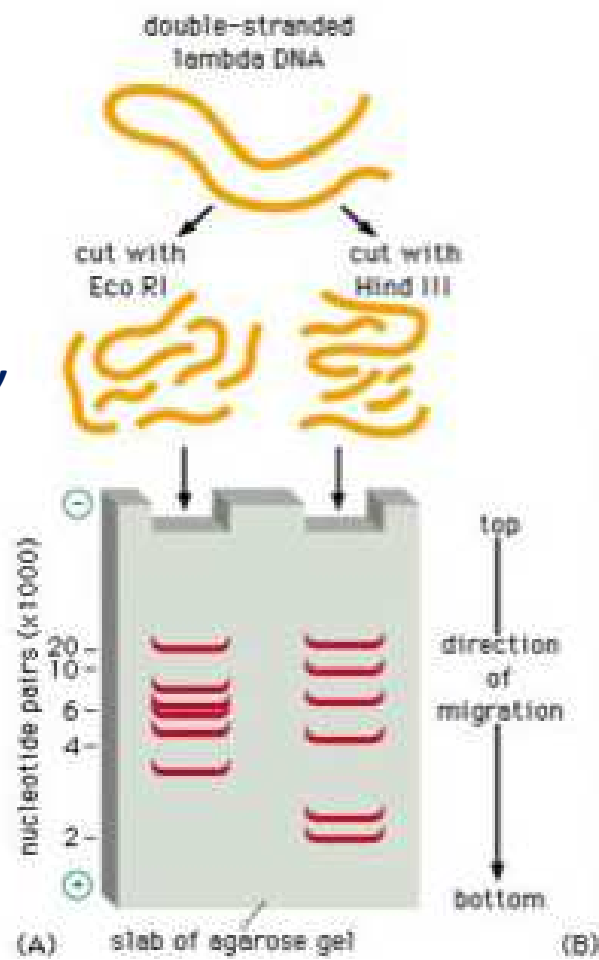
Využití restričních endonukleas

- k fragmentaci DNA
- DNA fingerprinting
 - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
 - PCR-RFLP = AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)
 - STRP (Short Tandem Repeat Polymorphism)
- při molekulárním klonování fragmentu DNA do vektoru či spojování dvou fragmentů DNA dohromady

RE

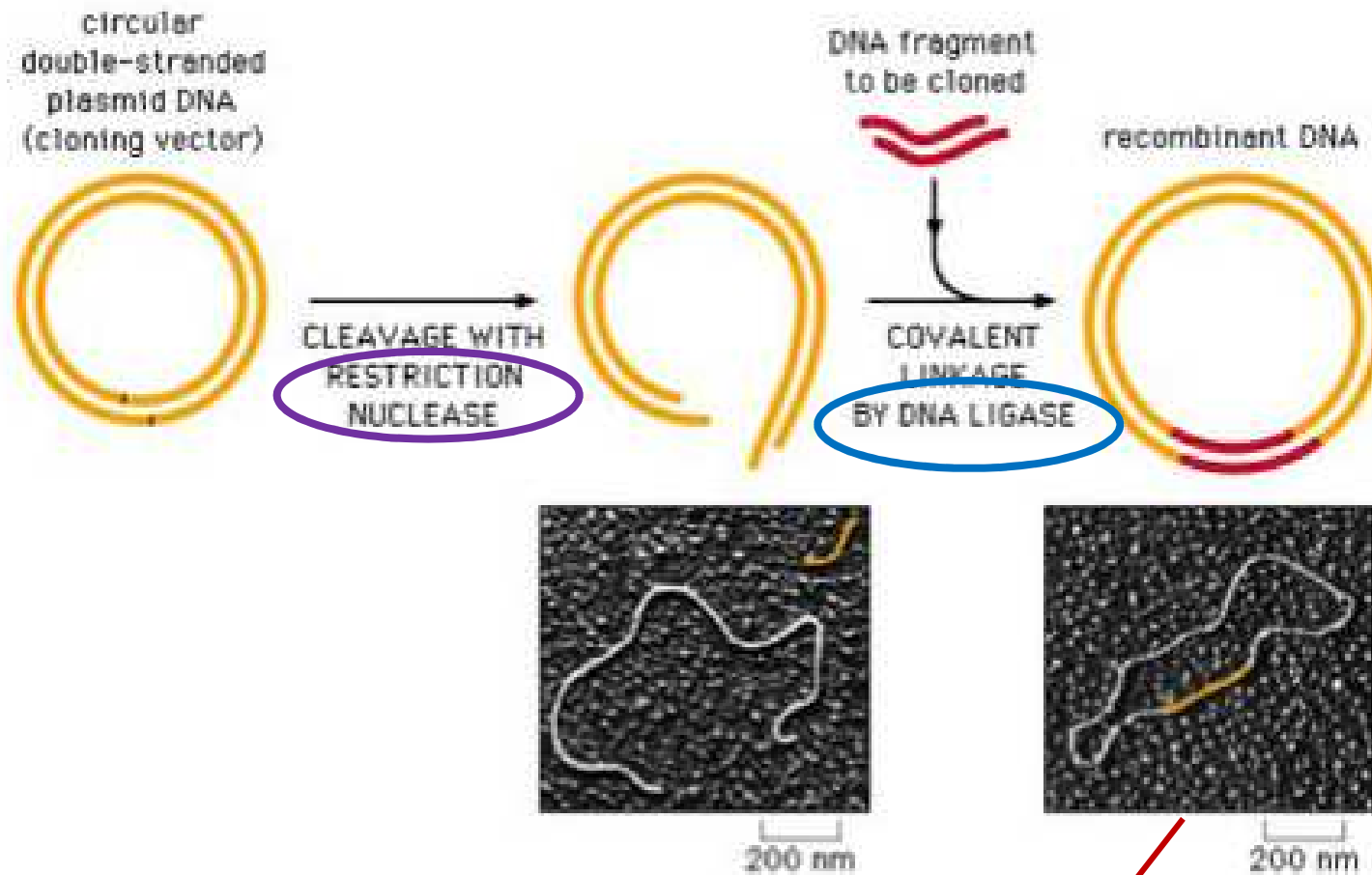
restrikční fragmenty

separace pomocí ELFO



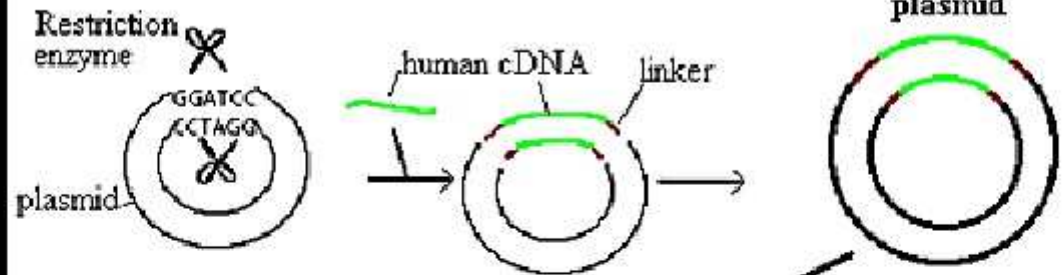
(B)

Rekombinace DNA

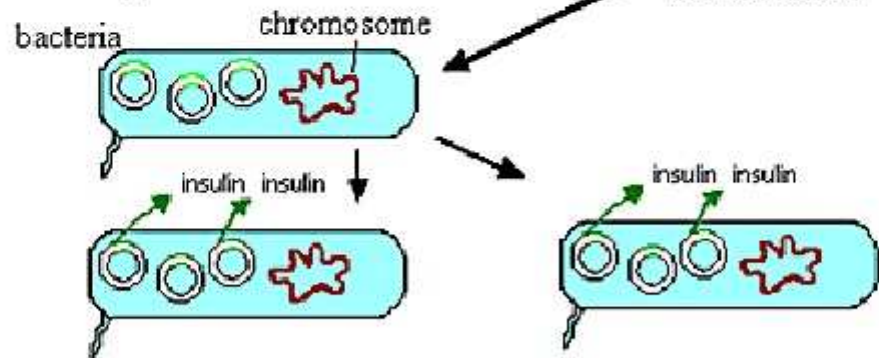


vložení do *bakterie* → kultivace → *klonu*

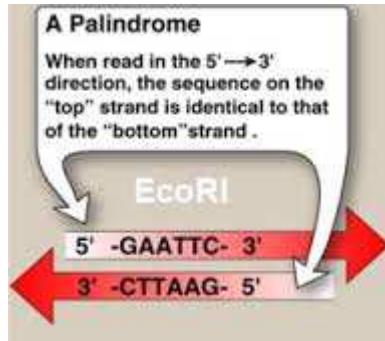
Transfer of the Insulin gene



Cloning the Insulin Gene



Transfer and cloning of the Insulin gene



Mirror Plane





PRODUCT INFORMATION

Thermo Scientific

FastDigest **MnII** *Moraxella nonliquefaciens*

#FD1074 50 µL (for 50 rxns)
Lot: _____ Expiry Date: _____

5'...C C T C (N) 7↓...3'
3'...G G A G (N) 6↑...5'

Supplied with: 1 mL of 10X FastDigest Buffer
1 mL of 10X FastDigest Green Buffer

Store at -20°C



BSA included

www.thermoscientific.com/onebio

Description

Thermo Scientific FastDigest enzymes are an advanced line of restriction enzymes for rapid DNA digestion. All FastDigest™ enzymes are 100% active in the universal FastDigest and FastDigest Green buffers and are able to digest DNA in 5-15 minutes. This enables any combination of restriction enzymes to work simultaneously in one reaction tube and eliminates the need for sequential digestions. FastDigest enzymes can be used to digest plasmid, genomic and viral DNA as well as PCR products and do not show star activity even in prolonged incubations.

Enzymes used in common downstream applications such as ligation, blunting and dephosphorylation reactions also have 100% activity in FastDigest and FastDigest Green Buffer.

FastDigest Green Buffer includes a density reagent along with blue and yellow tracking dyes that allow for direct loading of the reaction mixtures on a gel.

The blue dye of the FastDigest Green Buffer migrates with 3-5 kb DNA fragments in a 1% agarose gel and has an excitation peak at 424 nm.

The yellow dye of the FastDigest Green Buffer migrates faster than 10 bp DNA fragments in a 1% agarose gel and has an excitation peak at 615 nm.

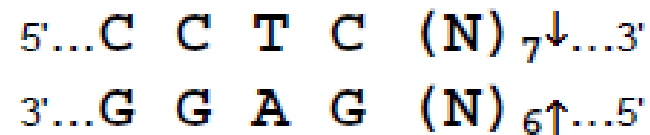
For applications that require analysis by fluorescence excitation FastDigest Buffer is recommended, as the dyes of the FastDigest Green Buffer may interfere with some fluorescence measurements.

Rev.9

Mnl I

Moraxella non liquefaciens

- atypický RE (restrikční enzym)
- rozpoznává tuto sekvenci (*asymetrické místo – není palindromem*):



→ jednonukleotidový přesah



- enzym je dodáván ve **FastDigest Green pufru**

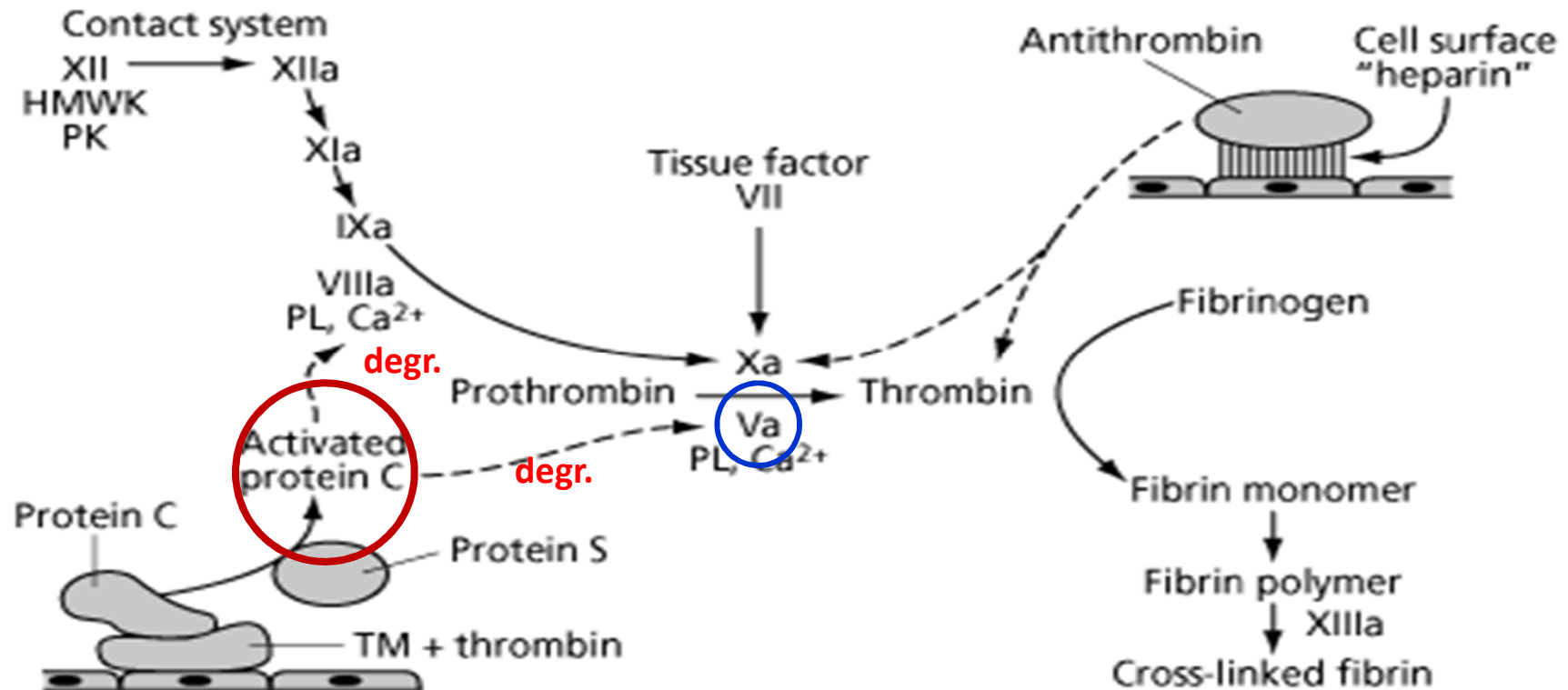
obsahuje: **modré barvivo (xylenová modř)**

– rychlost migrace v 1 % agarosovém gelu - **3-5 kb** DNA

+

žluté barvivo – rychlost **10 bp** DNA

Vztah protein C – hemokoagulační kaskáda



Stanovení Leidenské mutace

záměna **G** ⇒ **A** ⇒ štěpné místo pro restriční enzym **Mnl I** chybí
⇒ úsek DNA zůstává vcelku

1. PCR úseku DNA kde nastává mutace a okolí v rozsahu 288 bp
2. štěpení PCR produktu restričním enzymem
3. elektroforesa vyštěpených produktů

alela normální

GGTGCAGCACACCAACATGACACATGTATACATATGTAACAAACCTGCACGTTGTGCACA
TGTACCCTAGAACTTAAAGTATAATTTAAAAAAAATAAAAATAAAAGAATTCCTTTTGCA
ATATTAATTGGTTCAGCGAAAGCTTATTTATTTATTTATTATCATGAAATAACTTTGCA
AATGAAAACAATTTTGAATATATTTTCTTTCAG**GCAGGAACAACCCATGATCAGAGCAG**
TTCAACCAGGGGAAACCTTACTTATAAGTGGAACATCTTAGAGTTTGATGAACCCACAG
AAAATGATGCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACA
TCGCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGCGAG
GAATACAGGTATTTTGTCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTGAGAATTTCTTCTGGCT
AGAACATGTTAGGTCTCCTGGCTAAATAATGGGGCATTTCCTTCAAGAGAACAGTAATTG
TCAAGTAGTCCTTTTTTAGCACCAGTGTGATAACATTTATTCTTTTTTTTTTTTTTTGTCTTG
TCTATTTTTTATCAGTACCATCACTGCCGAAGGCAAGTCTAGAGTGTGATAACATATTTTG

FVL F

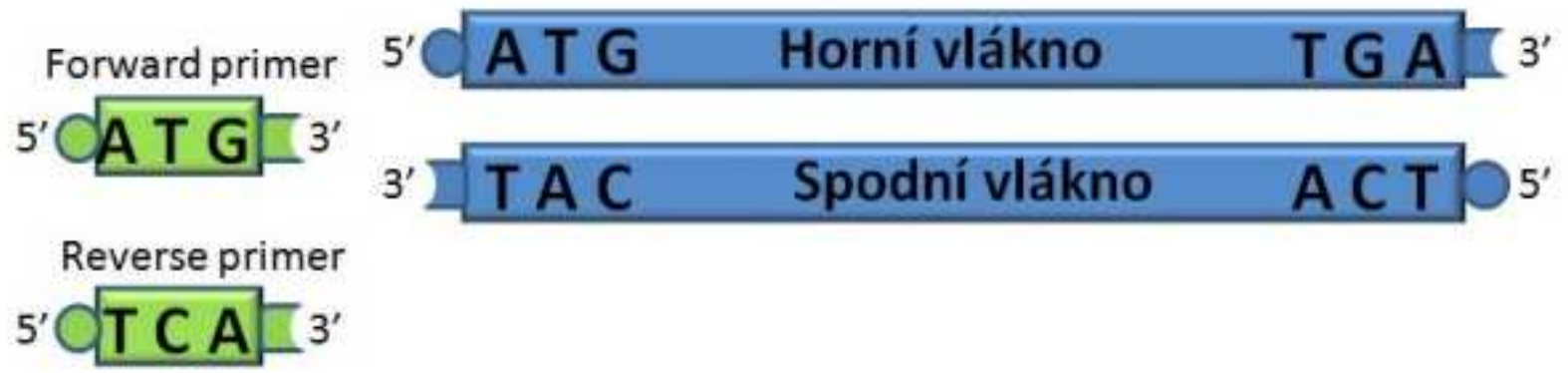
5'- GGA ACA ACA CCA TGA TCA GAG CA -3'

23 mer

FVL R

5'- TAG CCA GGA GAC CTA ACA TGT TC -3'

23 mer



alela normální

GGTGCAGCACACCAACATGACACATGTATACATATGTAACAAACCTGCACGTTGTGCACA
TGTACCCTAGAACTTAAAGTATAATTTAAAAAAAATAAAAATAAAAGAATTCCTTTTGCA
ATATTAATTGGTTCAGCGAAAGCTTATTTATTTATTTATTATCATGAAATAACTTTGCA
AATGAAAACAATTTTGAATATATTTTCTTTCAG**GCA****GGAACAACCCATGATCAGAGCAG**
TTCAACCAGGGGAAACCTTACTTATAAGTGGAACATCTTAGAGTTTGATGAACCCACAG
AAAATGATGCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACA
TCGCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGCGAG
GAATACAGGTATTTTGTCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTGAGAATTTCTTCTGGCT
AGAACATGTTAGGTCTCCTGGCTAAATAATGGGGCATTTCCTTCAAGAGAACAGTAATTG
TCAAGTAGTCCTTTTTTAGCACCAGTGTGATAACATTTATTCTTTTTTTTTTTTTTTGTCTTG
TCTATTTTTTATCAGTACCATCACTGCCGAAGGCAAGTCTAGAGTGTGATAACATATTTTG

délka PCR produktu: **288 bp**

5'...C C T C (N)₇↓...3'
3'...G G A G (N)₆↑...5'

FVL F	5'- GGA ACA ACA CCA TGA TCA GAG CA -3'	23 mer
FVL R	5'- TAG CCA GGA GAC CTA ACA TGT TC -3'	23 mer

alela normální

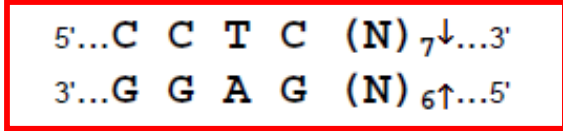
GGTGCAGCACACCAACATGACACATGTATACATATGTAACAAACCTGCACGTTGTGCACA
 TGTACCCTAGAACTTAAAGTATAATTTAAAAAAAATAAAAATAAAAGAATTCCTTTTGCA
 ATATTAATTGGTTCAGCGAAAGCTTATTTATTTATTTATTATCATGAAATAACTTTGCA
 AATGAAAACAATTTTGAATATATTTTCTTTCAG**GCA****GGAACAACCCATGATCAGAGCAG**
TTCAACCAGGGGAAACCTTATACTTATAAGTGGAACATCTTAGAGTTTGATGAACCCACAG
AAAATGATGCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACA
TCGCCTCTGGGCTA↓**ATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGC**↑**GAG**
GAATACAGGTATTTTGTCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTGAGAATTTCTTCTGGCT
AGAACATGTTAGGTCTCCTGGCTAAATAATGGGGCATTTCCTTCAAGAGAACAGTAATTG
 TCAAGTAGTCCTTTTTTAGCACCAGTGTGATAACATTTATTCTTTTTTTTTTTTTTTGTCTTG
 TCTATTTTTTATCAGTACCATCACTGCCGAAGGCAAGTCTAGAGTGTGATAACATATTTTG

délka PCR produktu: **288 bp**

wild type: **158 bp**

37 bp

93 bp



FVL F

5'- GGA ACA ACA CCA TGA TCA GAG CA -3'

23 mer

FVL R

5'- TAG CCA GGA GAC CTA ACA TGT TC -3'

23 mer

alela Leiden

GGTGCAGCACACCAACATGACACATGTATACATATGTAACAAACCTGCACGTTGTGCACA
TGTACCCTAGAACTTAAAGTATAATTTAAAAAAAATAAAAATAAAAGAATTCCTTTTGCA
ATATTAATTGGTTCCAGCGAAAGCTTATTTATTTATTTATTATCATGAAATAACTTTGCA
AATGAAAACAATTTTGAATATATTTTCTTTCAG**GCA****GGAACAACCCATGATCAGAGCAG**
TTCAACCAGGGGAAACCTTATACTTATAAGTGGAACATCTTAGAGTTTGATGAACCCACAG
AAAATGATGCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACA
TCG**CCTC****TGGGCTA**↓**ATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGCAAG**
GAATACAGGTATTTTGTCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTGAGAATTTCTTCTGGCT
AGAACATGTTAGGTCTCCTGGCTAAATAATGGGGCATTTCCTTCAAGAGAACAGTAATTG
TCAAGTAGTCCTTTTTTAGCACCAGTGTGATAACATTTATTCTTTTTTTTTTTTTTGTCTTG
TCTATTTTTTATCAGTACCATCACTGCCGAAGGCAAGTCTAGAGTGTGATAACATATTTTG

délka PCR produktu: **288 bp**

wild type: **158 bp** **130 bp**

5'...C C T C (N)₇↓...3'
3'...G G A G (N)₆↑...5'

FVL F 5'- GGA ACA ACA CCA TGA TCA GAG CA -3' 23 mer
FVL R 5'- TAG CCA GGA GAC CTA ACA TGT TC -3' 23 mer

alela Leiden

TGTACCCTAGAACTTAAAGTATAATTTAAAAAAAATAAAAATAAAAGAATTCCTTTTGCA
ATATTAATTGGTTCAGCGAAAGCTTATTTATTTATTTATTATCATGAAATAACTTTGCA
AATGAAAACAATTTTGAATATATTTTCTTTCAGGCAAGGAACAACACCATGATCAGAGCCAG
TTCAACCAGGGGAAACCTATACTTATAAGTGGAACATCTTAGAGTTTGATGAACCCACAG
AAAATGATGCCAGTGCTTAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACA
TCGCCTCTGGGCTA↓ATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGCCAAG
GAATACAGGTATTTTGTCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCCTGAGAATTTCTTCTGGCT
AGAACATGTTAGGTCTCCTGGCTAATAATGGGGCATTTCCTTCAAGAGAACAGTAATTG
TCAAGTAGTCCTTTTTAGCACCAGTGTGATAACATTTATTCTTTTTTTTTTTTTGTCTTG
TCTATTTTTATCAGTACCATCACTGCCGAAGGCAAGTCTAGAGTGTGATAACATATTTTG

Leiden: 158 bp 130 bp

CTG GAC AGG CGA GGA ATA CAG AGG GCA
Leu-Asp-Arg-Arg-Gly-Ile-Gln-Arg-Ala

LDRRGIQRA

CTG GAC AGG CAA GGA ATA CAG AGG GCA
Leu-Asp-Arg-Gln-Gly-Ile-Gln-Arg-Ala

Detekce Faktor V Leiden

ATATTAATTGGTTCCAGCGAAAGCTTATTTATTTATTTATTATCATGAAATAACTTTGCA

AATGAAAACAATTTTGAATATATTTTCTTTCAG **GCAGGAACTCCCA** F primer → **TCAGAGCAG**

TTCAACCAGGGGAAACCTATACTTATAAGTGGAACATCTTAGAGTTTGATGAACCCACAG

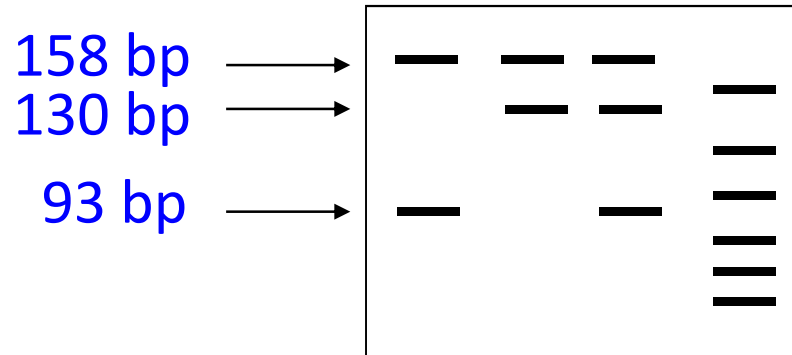
AAAATGATGCCAGTGCTTAAACAAGACCATACTACAGTGACGTGGACATCATGAGAGACA

TCGCCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGC **SAG**

GAATACAGGTATTTTGTCTTGAAGTAACCTTTCAGAAATTCTGAGAATTTCTTCTGGCT

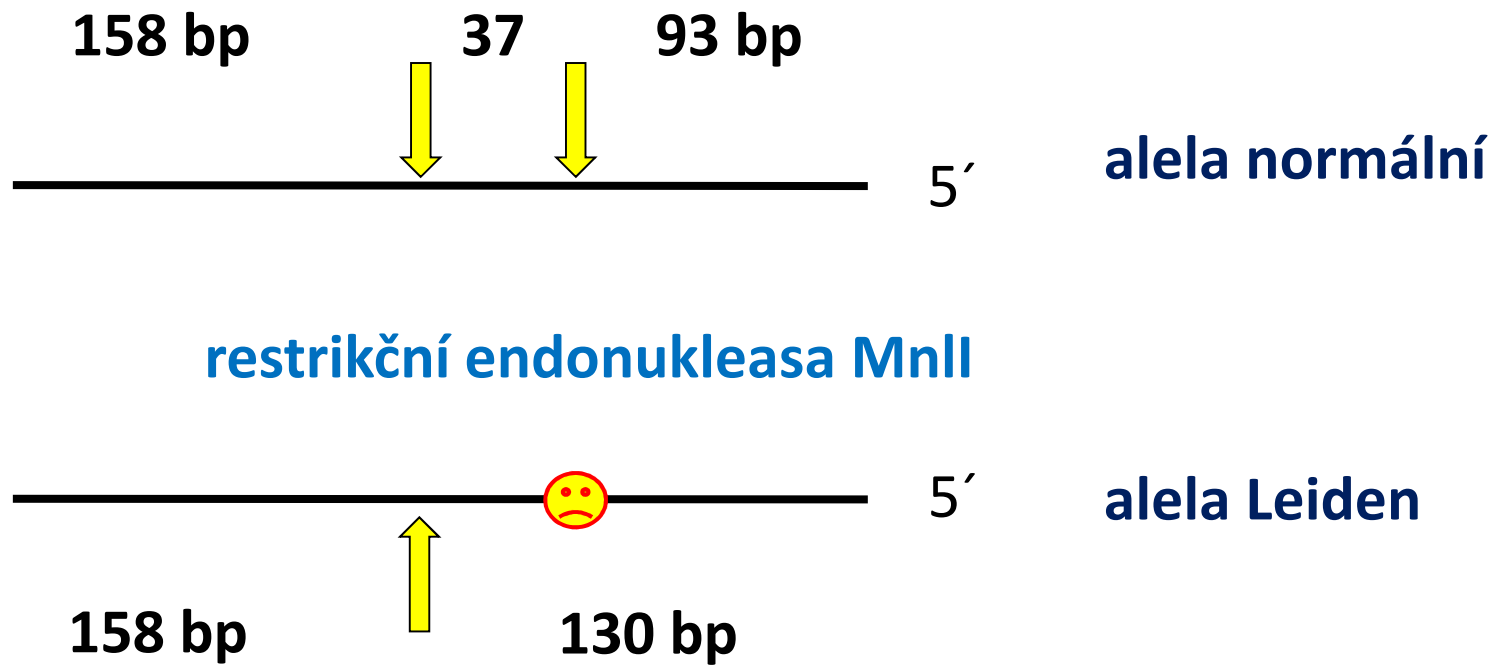
A **GAACATGTTAGTAGGTC** R primer ←

5...C C T C (N)₇↓...3'
3'...G G A G (N)₆↑...5'



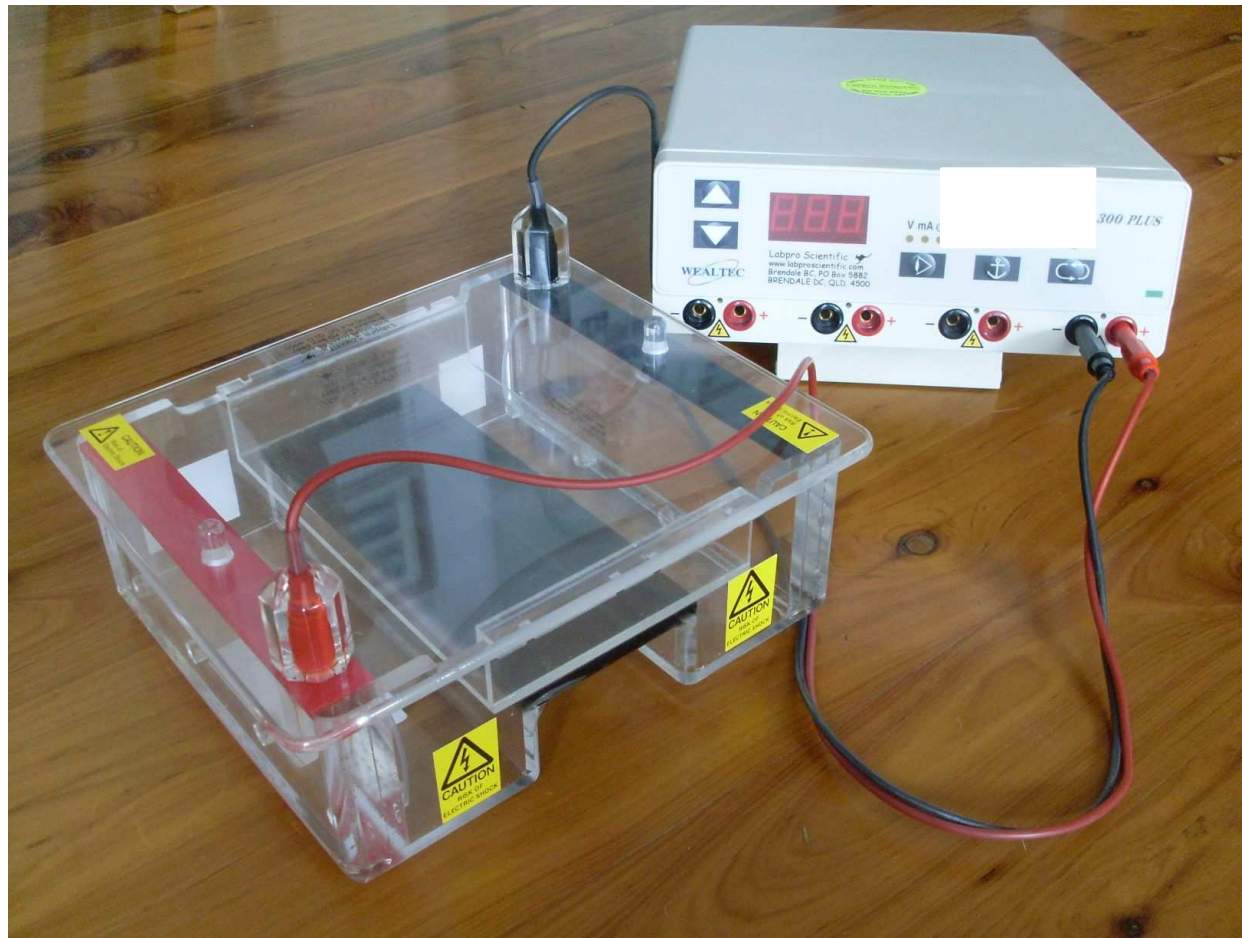
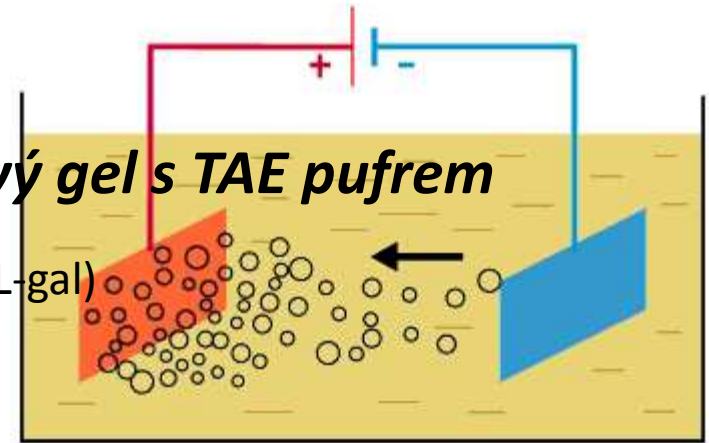
délka PCR
produktu **288** bp

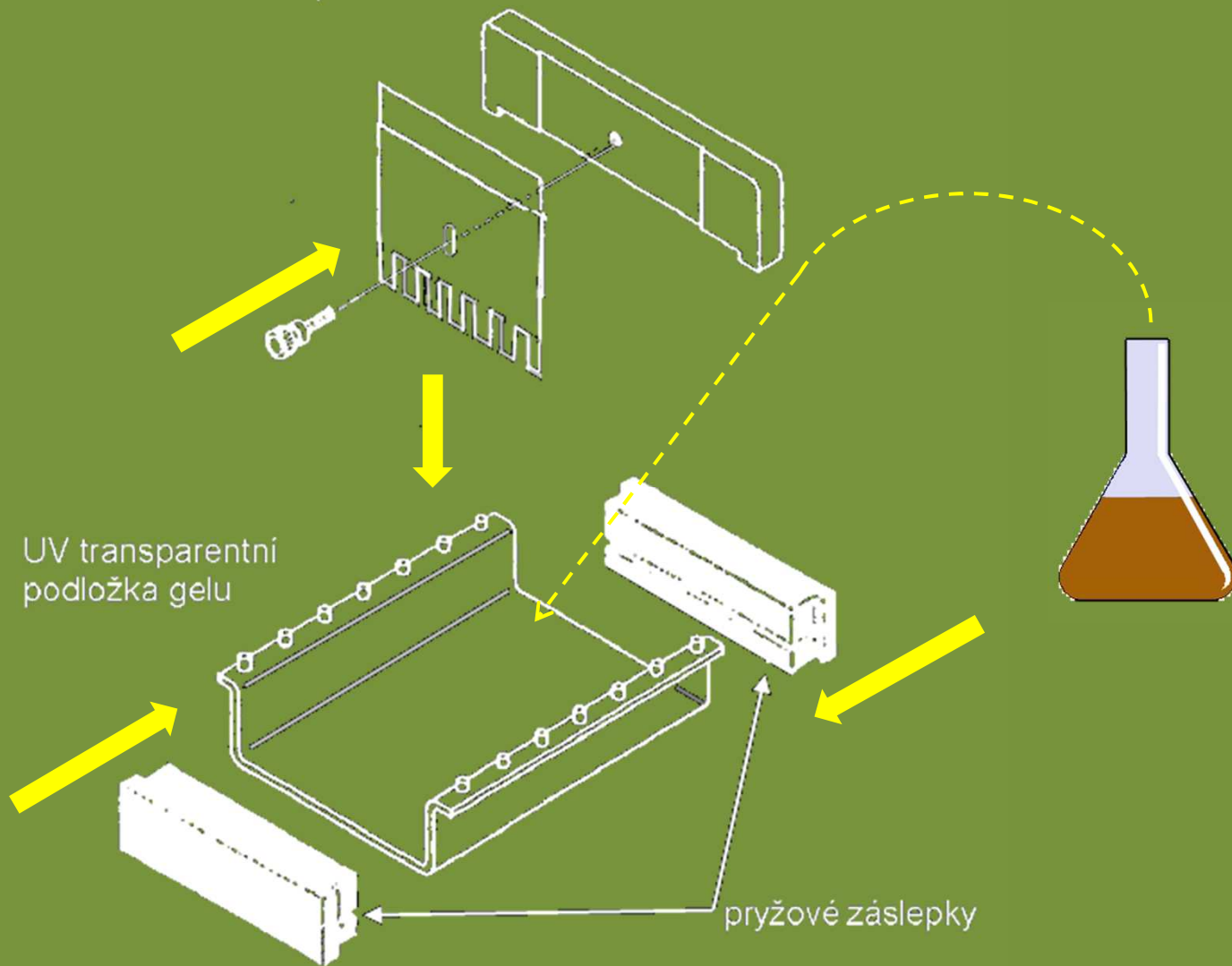
Stanovení Leidenské mutace pomocí PCR RFLP



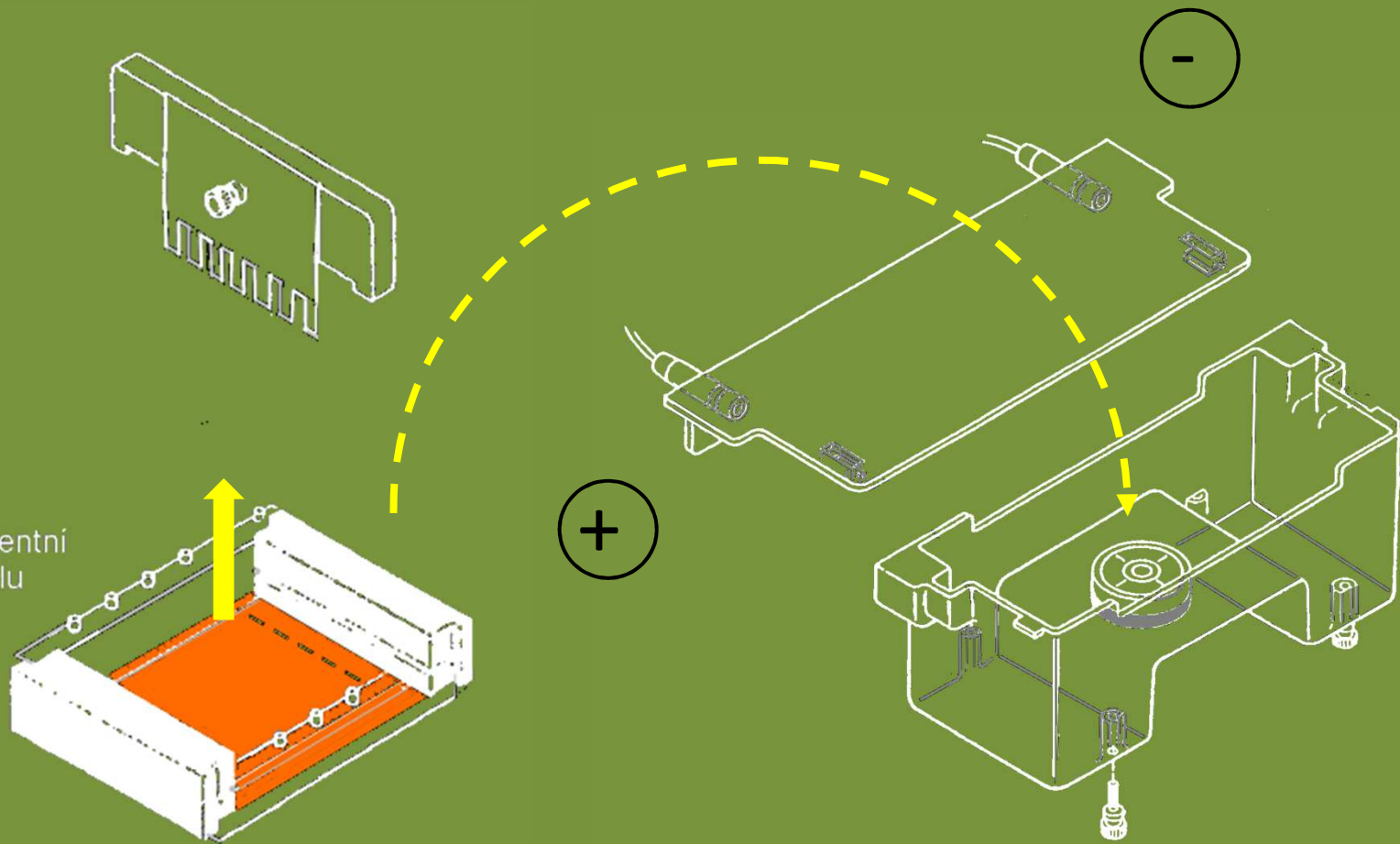
Elektroforéza – 3 % agarózový gel s TAE pufrem

Agaróza – z mořských řas, lineární polysacharid (D-gal a L-gal)



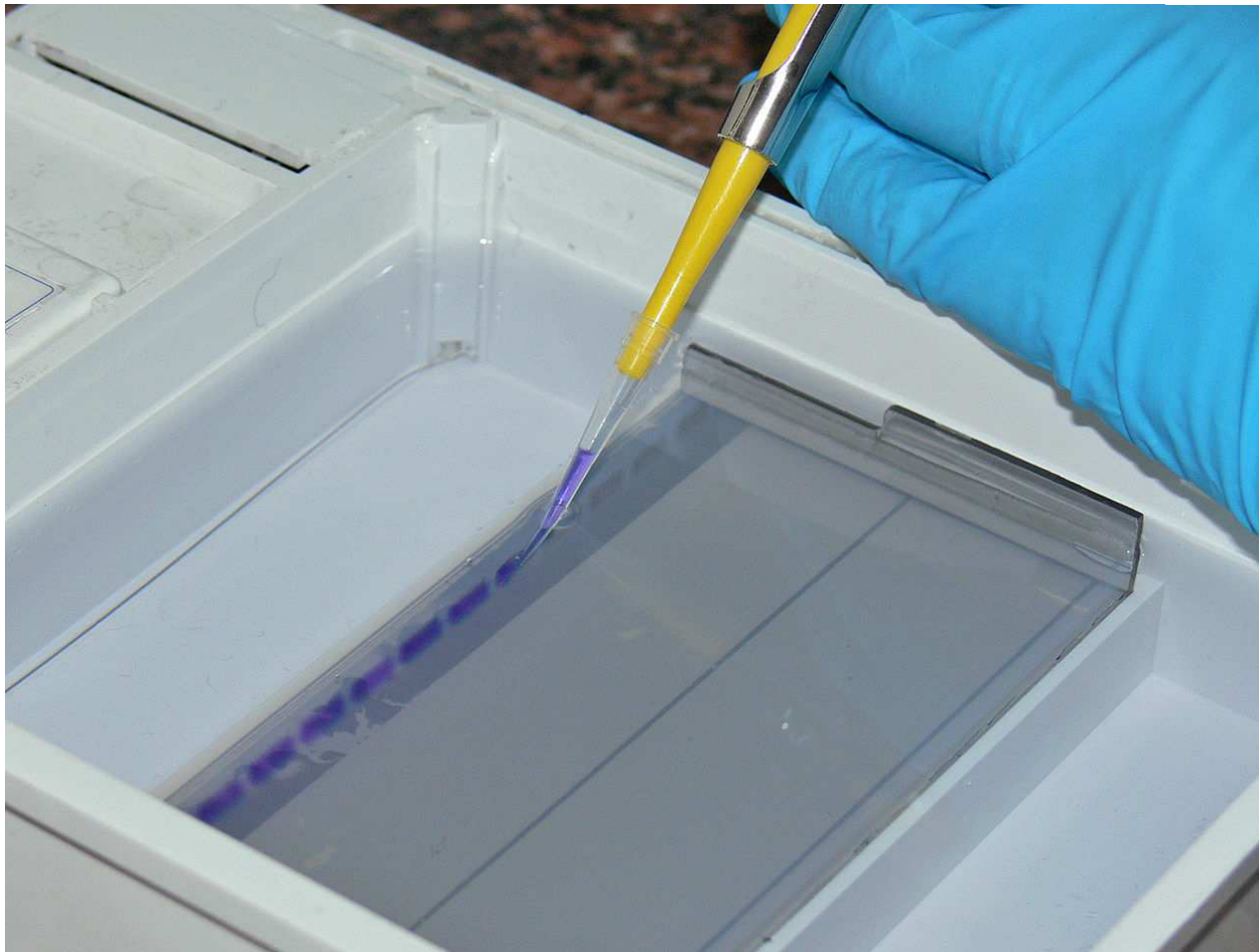
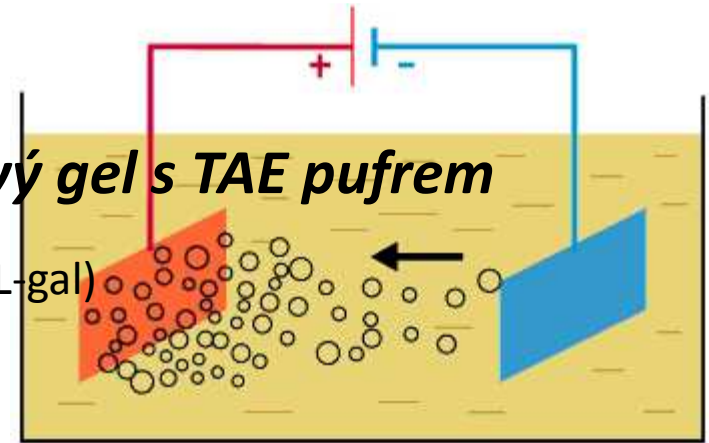


UV transparentni
podložka gelu



Elektroforéza – 3 % agarózový gel s TAE pufrem

Agaróza – z mořských řas, lineární polysacharid (D-gal a L-gal)

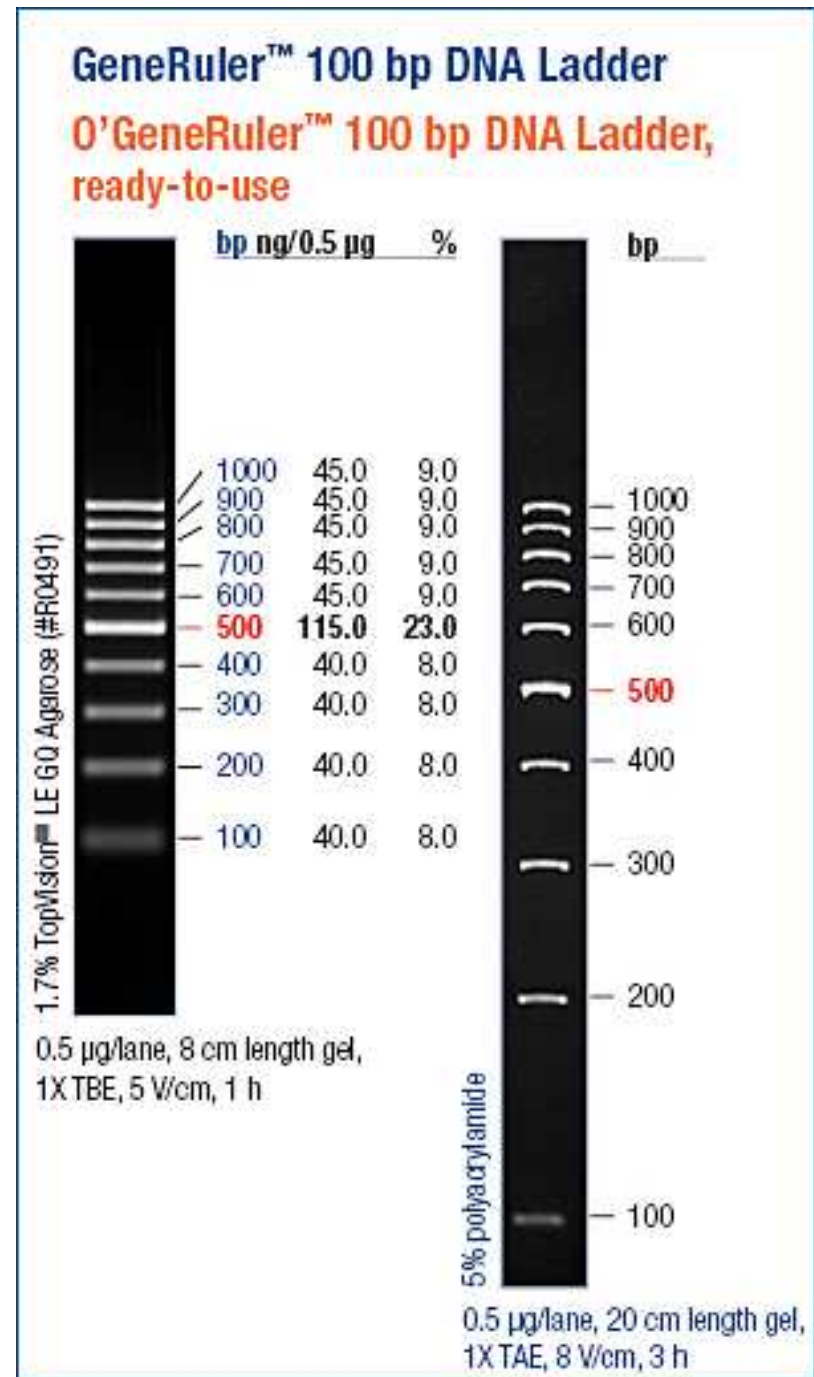
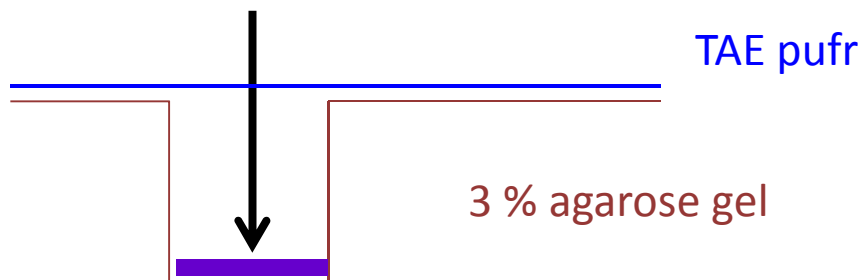


DNA marker

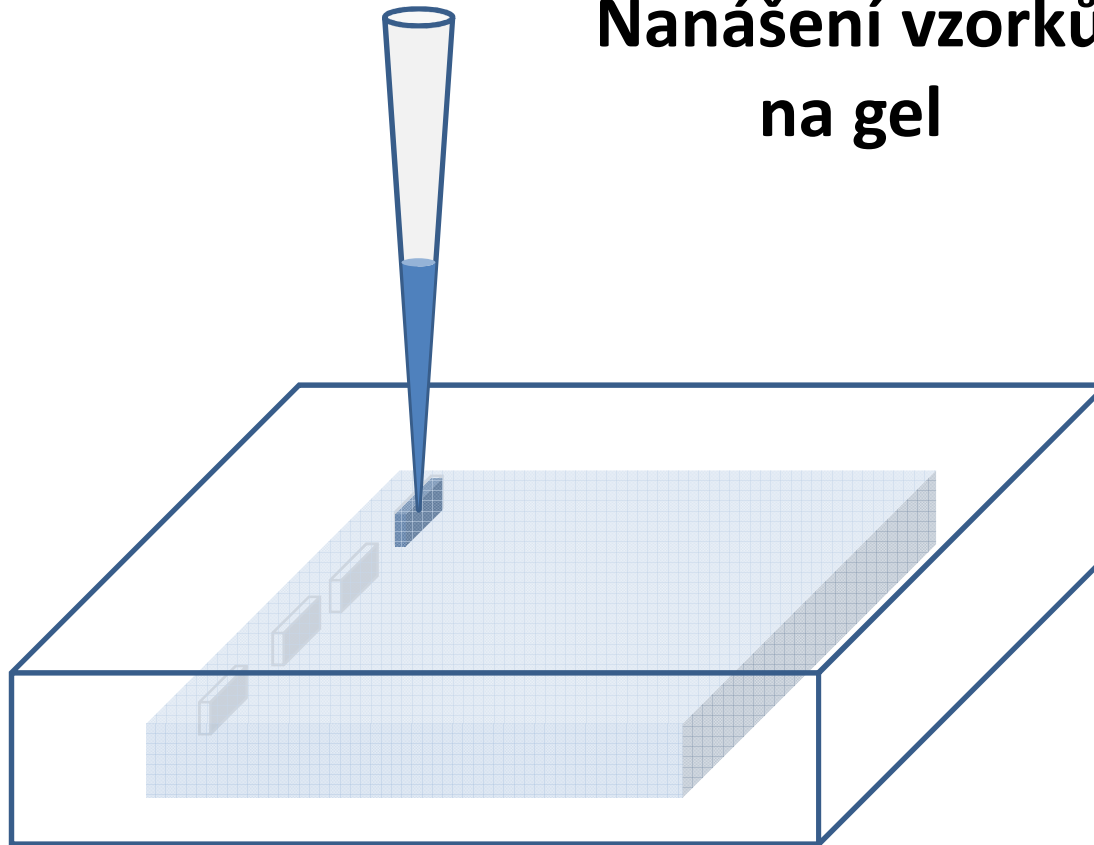
- směs purifikovaných DNA fragmentů
- je dodáván s nanášecím pufrem **Loading Dye**:



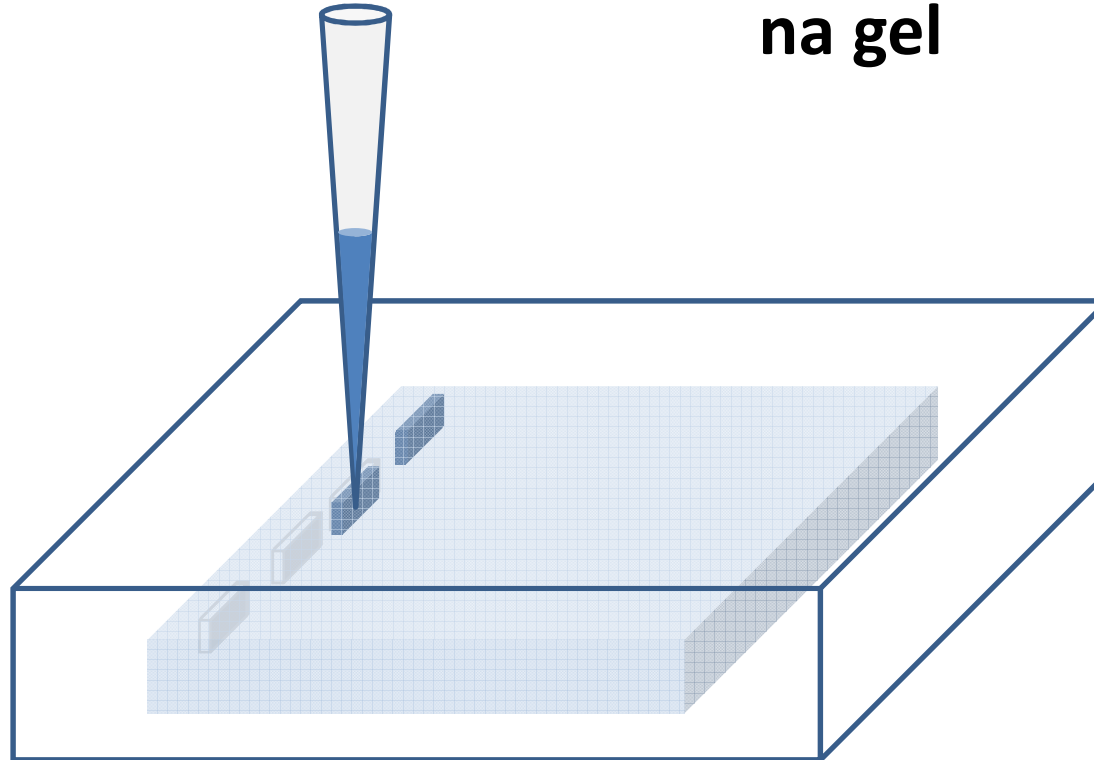
- **bromphenol blue** – barva, lepší orientace na gelu
- glycerol – zvyšuje hustotu vzorku
- rychlost migrace na gelu – přibl. 500 bp
- +
- **modré barvivo (xylenová modř)** - rychlost migrace 3-5 kb



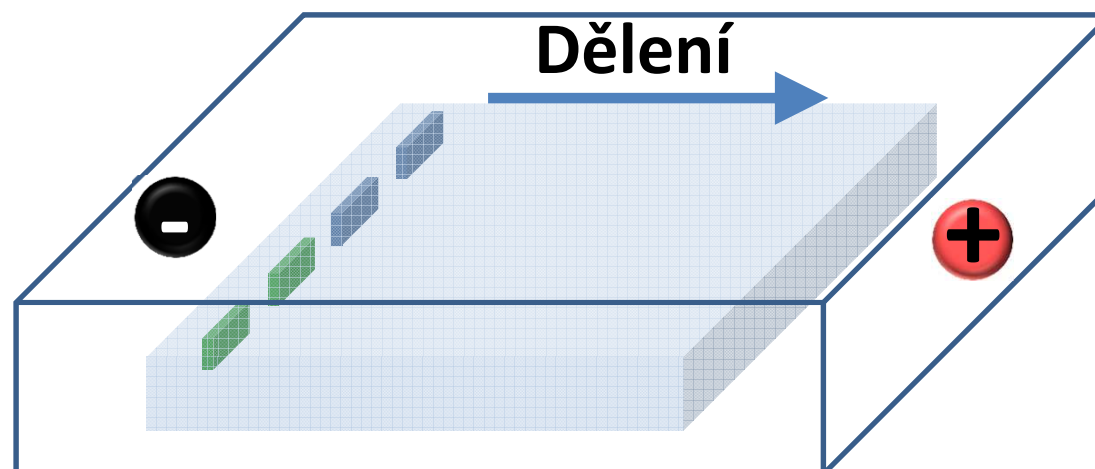
Nanášení vzorků na gel

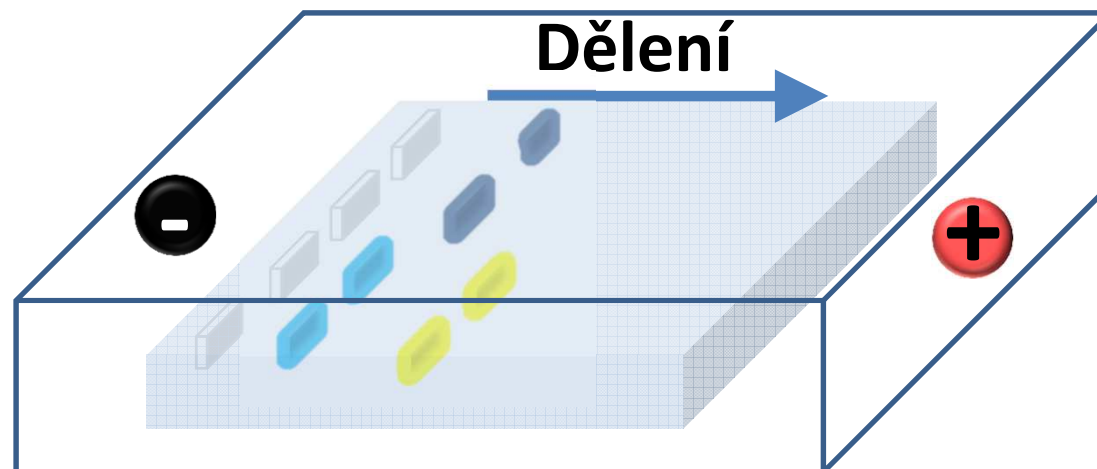


Nanášení vzorků na gel

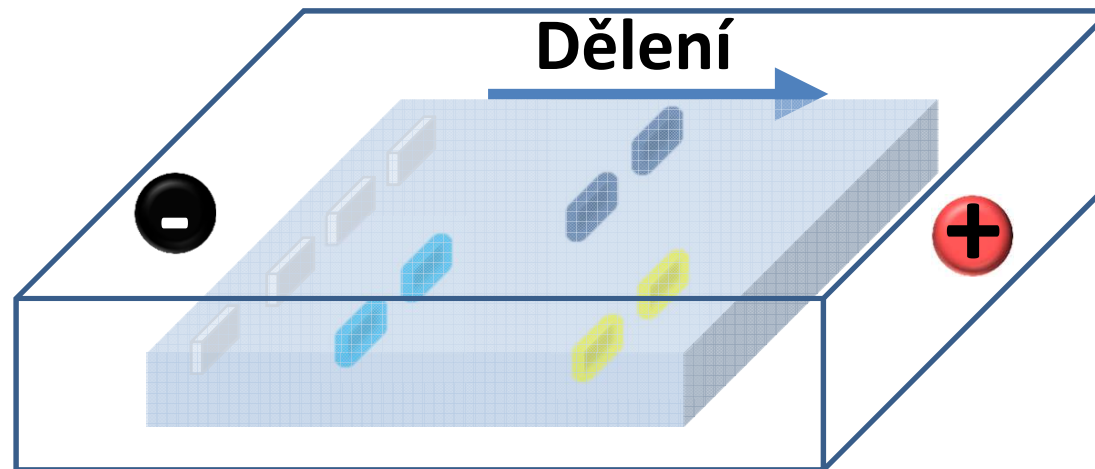


Připojení k elektrickému zdroji

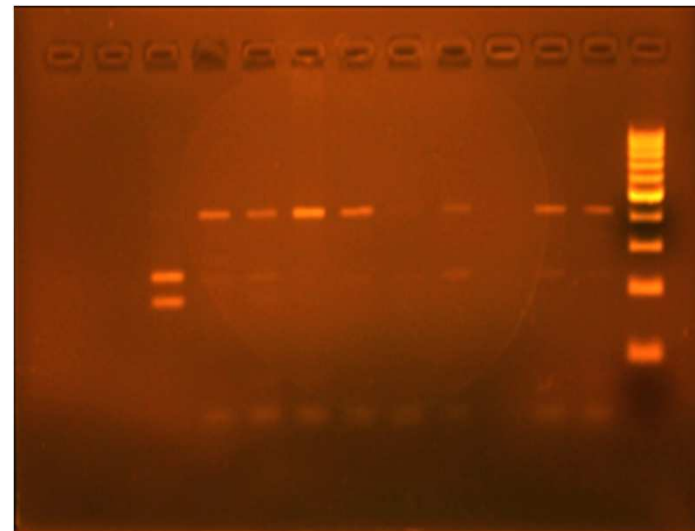
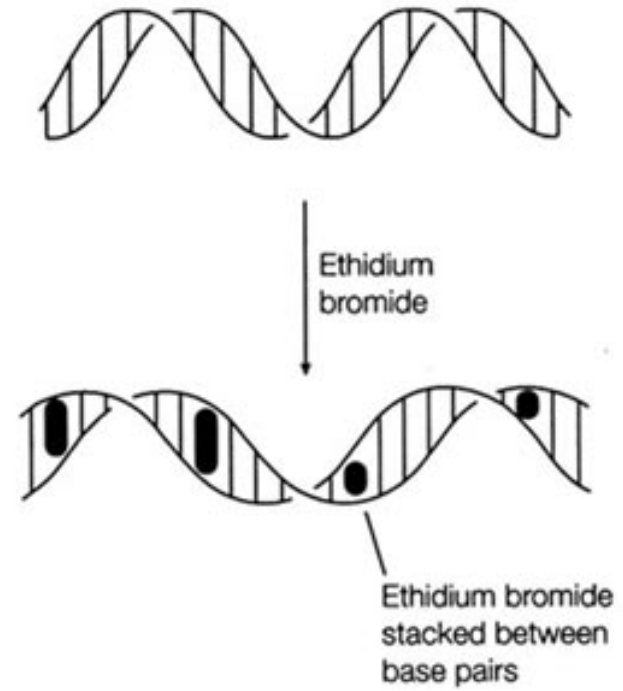
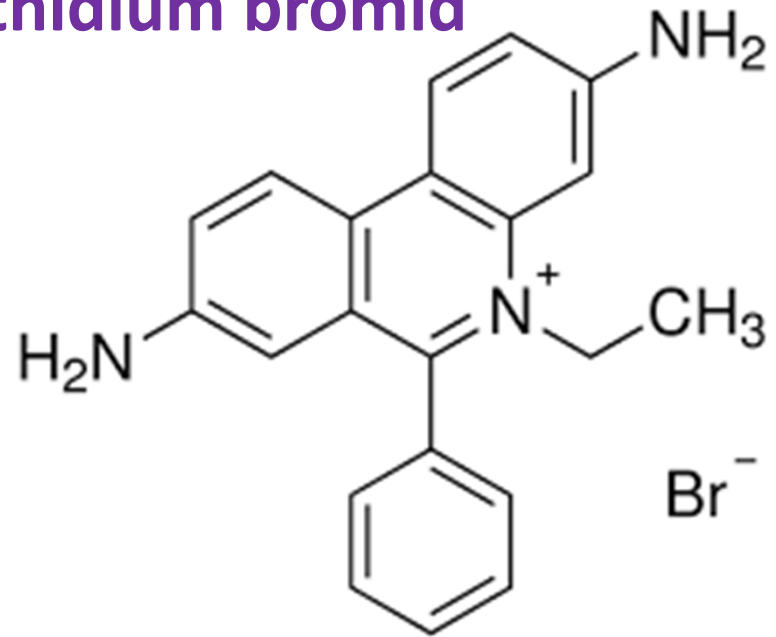




Ukončení elektroforézy
odpojení od zdroje elektrického napětí,
vyjmutí gelu z elektroforetické vany

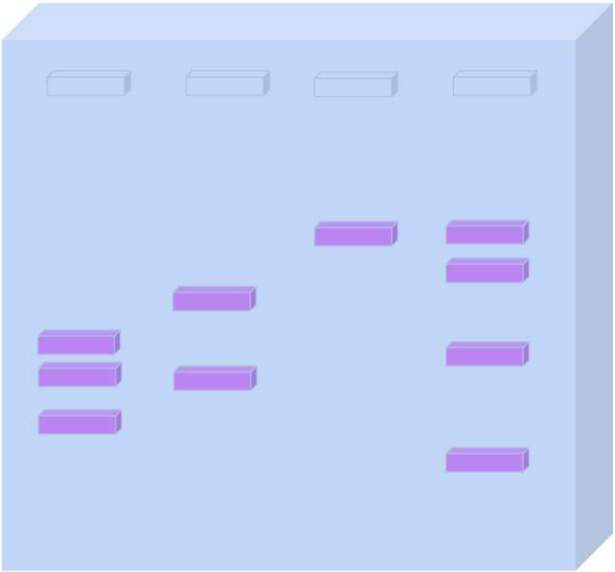


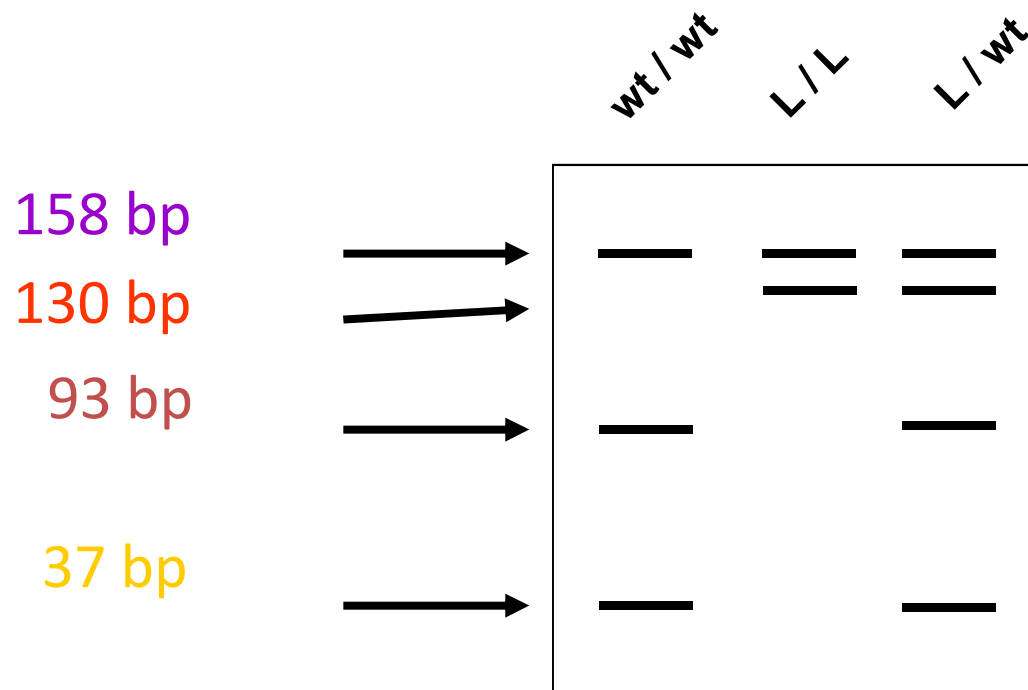
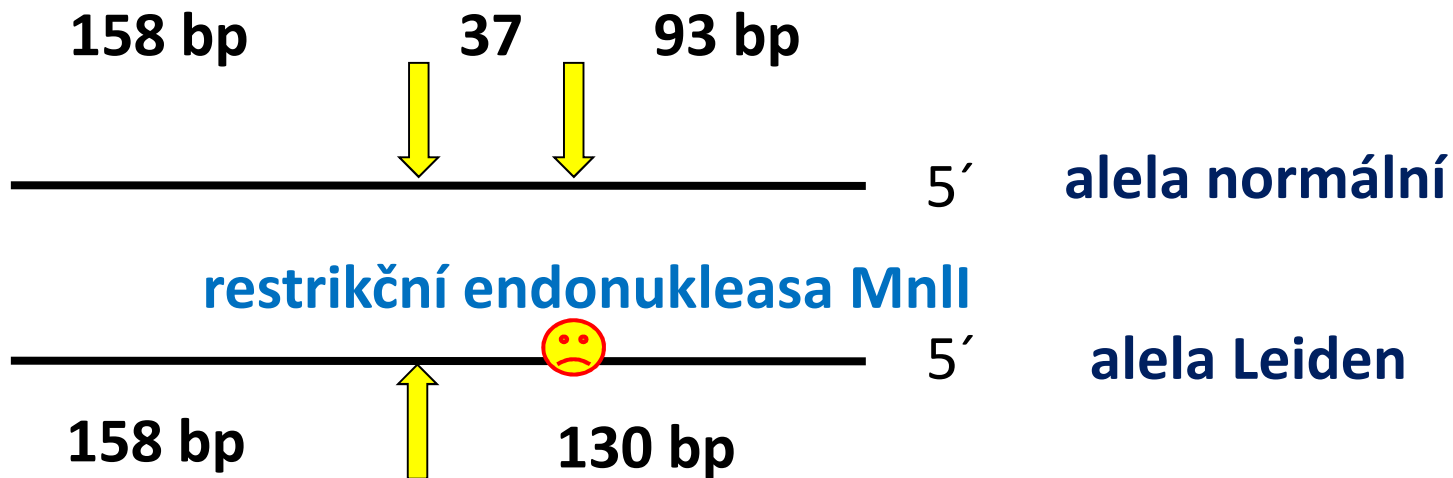
Ethidium bromid



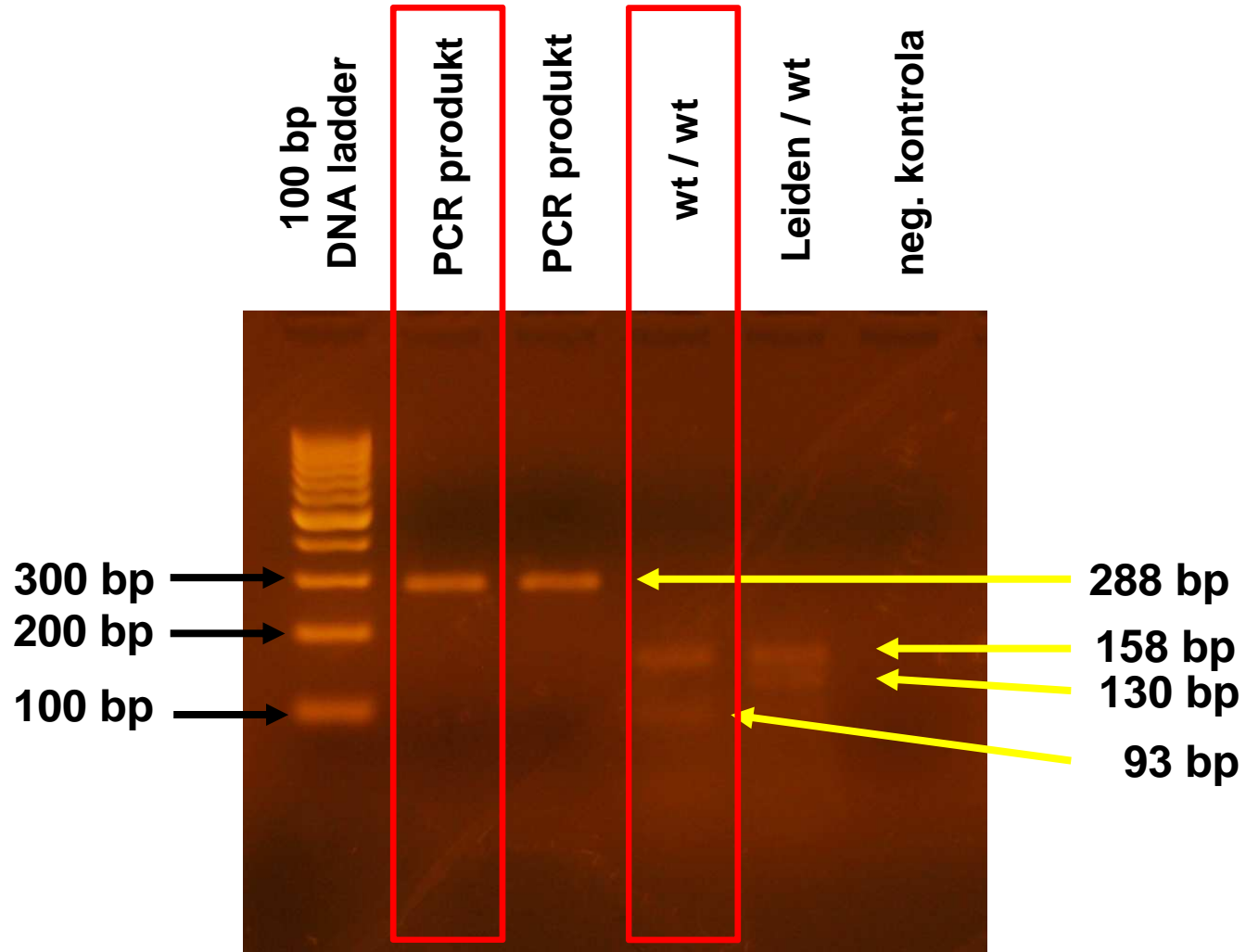


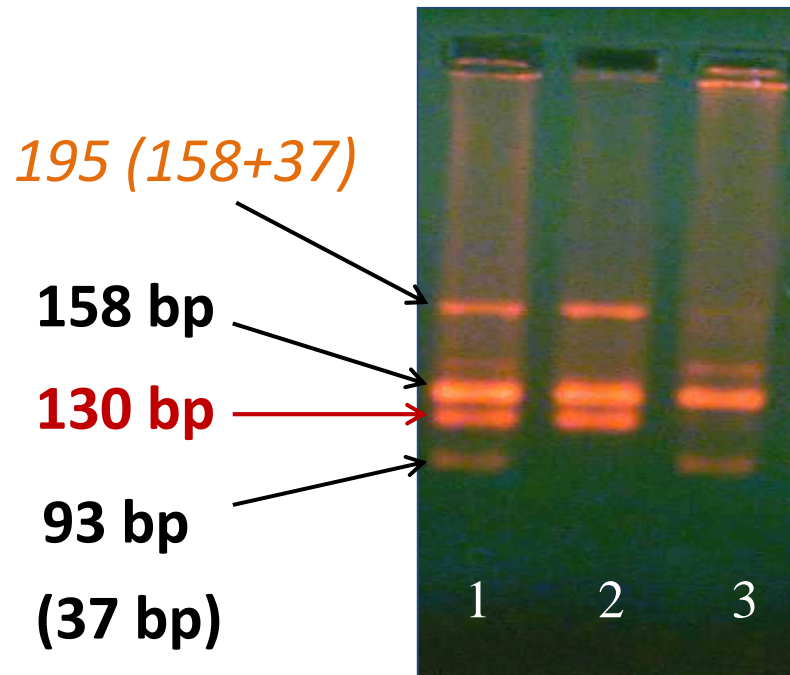
UV záření





Analýza produktů PCR po elektroforese na gelu





1. G/A

2. A/A

3. G/G

158 bp, 130 bp, 93 bp, (37 bp)

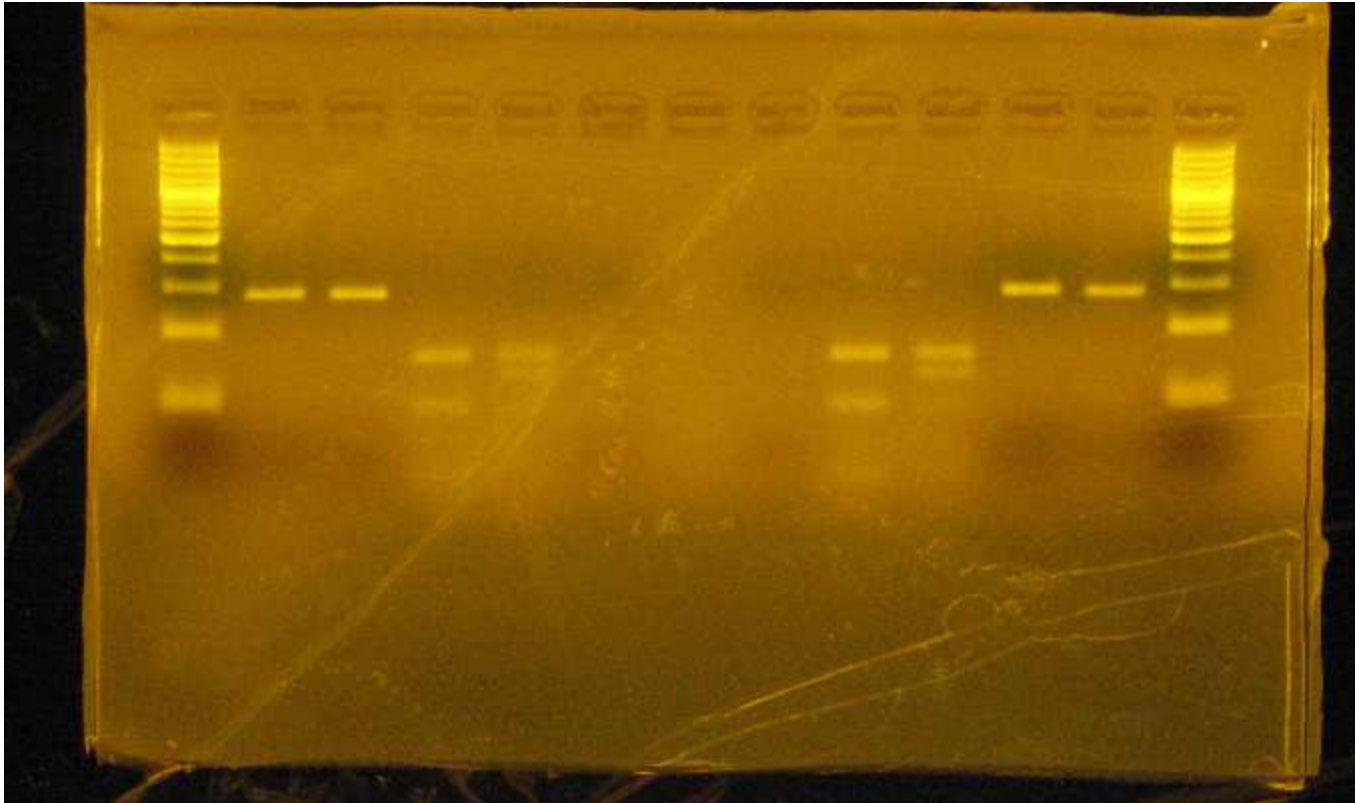
158 bp, 130 bp

158 bp, 93 bp, (37 bp)

heterozygot

homozygot s mutovanou alelou

homozygot s normální alelou



Restrikční štěpení + elektroforéza + interpretace výsledků

V tomto praktiku použijeme restrikční endonukleázu MnlI k analýze úseku DNA amplifikovaného PCR metodou v minulém týdnu.

Pracujte v rukavicích (powder-free)!

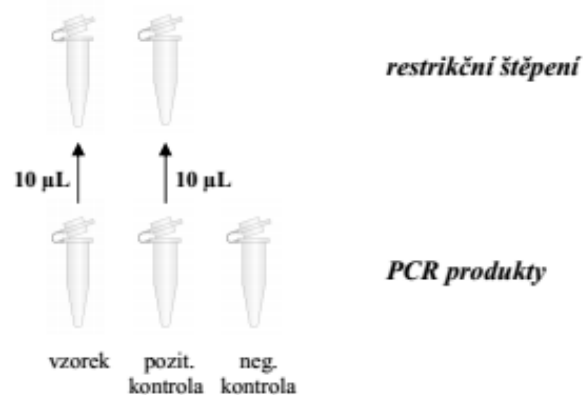
Restrikční štěpení

Dostanete **3 PCR zkumavky** ze sady deseti PCR reakcí zpracovávaných v minulém týdnu.

V každé je 20 μL PCR reakční směsi (doufejme že s příslušným PCR produktem).

- vzorek vaší DNA *zkumavka označená vašimi iniciálami*
- pozitivní kontrola (faktor V Leiden, heterozygot) *zkumavka označená "+K"*
- negativní kontrola *zkumavka označená "-K"*

K provedení restrikční analýzy budete potřebovat **dvě nové PCR zkumavky**. Do jedné přeneste přesně **10 μL** PCR produktu ze zkumavky se zpracovaným vzorkem vaší DNA, do druhé ze zkumavky s pozitivní kontrolou. Označte nové zkumavky symbolem "R", tj. "*vaše iniciály R*", "+ R".



Celkový objem reakce restrikčního štěpení bude 20 μL . Zatím máte ve zkumavkách připraveno přesně 10 μL PCR produktů k analýze.

1. Přidejte následující v uvedeném pořadí:

PCR produkt (DNA)	10 μL
voda	7 μL
10x FastDigest Green Buffer	2 μL
FastDigest enzym MnlI	1 μL

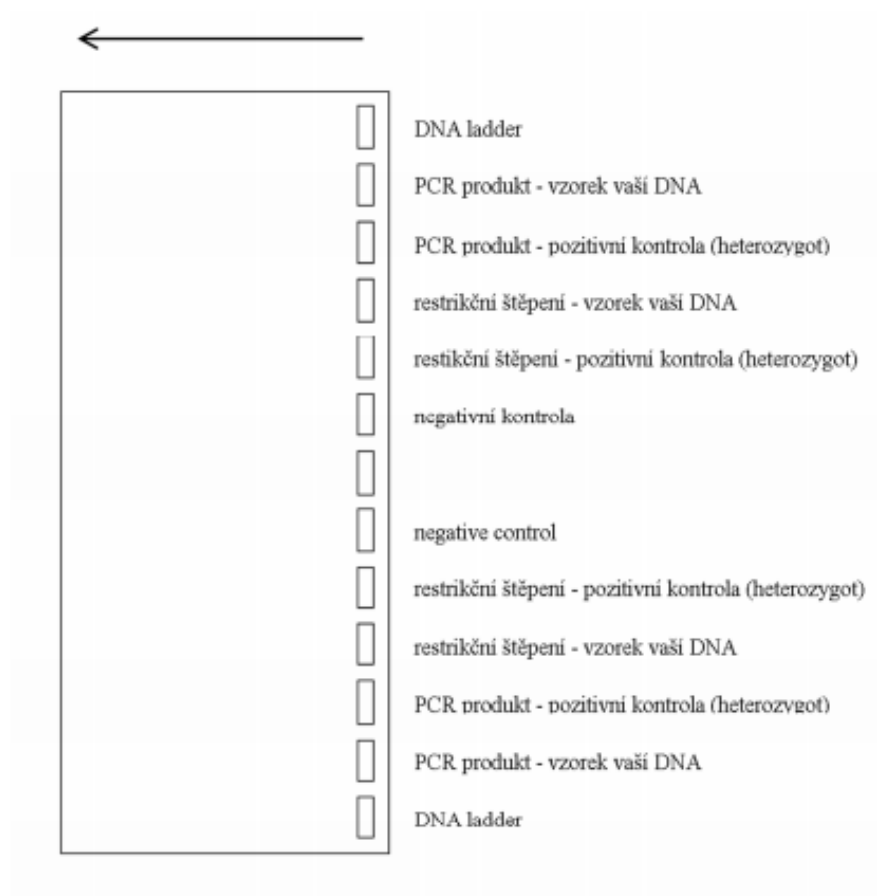
	20 μL

2. Lehce zvortexujte a následně dejte krátce zcentrifugovat.
3. Inkubujte při **37° C** v bloku termocykleru po dobu **10 min**.

Gelová elektroforéza

Přidejte po **2 μ L** nanášecí barvičky do třech zkumavčiček, kde jsou PCR produkty.

Na gel se bude nanášet vždy **10 μ L**, pořadí podle obrázku. V jednom gelu je 13 jamek. Každá pracovní skupinka obsadí polovinu gelu (6 jamek).



Interpretace výsledků

délka PCR produktu: **288 bp**

restrikční štěpení:	homozygot wild type:	158 bp, 93 bp, 37 bp
	faktor V Leiden heterozygot:	158 bp, 130 bp, 93 bp, 37 bp
	faktor V Leiden homozygot:	158 bp, 130 bp