

3.2. Enzime utilizate în tehnologia ADN recombinant

Enzimele de restricție

Introducere

Sistemele de restricție și modificare (metilare) au fost descoperite în urma analizei interacțiilor bacteriofag-bacterie. ADN-ul fagic eliberat de o anumită tulpină bacteriană poate infecta cu succes bacterii care aparțin aceleiași tulpini, deoarece prezintă același model de modificare ca și ADN-ul gazdei. În cazul în care fagii menținuți pe o anumită tulpină bacteriană sunt transferați pe alta, ADN-ul fagic este atacat de enzimele de restricție ale noii gazde: bacteriofagul este restricționat la o tulpină bacteriană.

Fenomenul de restricție nu este absolut; unii fagi nu sunt restricțiați, fie pentru că prezintă mutații în situsurile recunoscute de sistemele de restricție ale gazdei, fie pentru că dobândesc un model de modificare similar celui al ADN-ului gazdei.

Principala caracteristică a unui sistem de restricție și modificare constă în faptul că o tulpină bacteriană prezintă metilaze și endonucleaze care au aceeași specificitate de secvență. Metilaza va adăuga o grupare metil (la un rest de citozină sau adenină) la aceeași secvență care este recunoscută de enzima de restricție. În urma metilării un situs țintă devine rezistent la restricție.

La bacterii există 3 sisteme de metilare, care induc formarea de 6-metiladenină sau 5-metilcitozină:

1. **sistemul *hsd***, care determină un model specific metilare pe resturi de adenină care identifică bacteria gazdă; există la multe specii de bacterii, în unele cazuri determinând și metilări pe resturi de citozină;
2. **sistemul *dam*** este implicat în evidențierea catenelor de ADN nou replicate de catenele vechi; este implicat în controlul replicării ADN și în marcarea catenelor ADN care sunt subiect pentru reparare;
3. **sistemul *dcm*** este implicat în metilarea citozinei; funcțiile sale *in vivo* sunt necunoscute.

Specificitatea de gazdă pentru o tulpină bacteriană este dată de acțiunea specifică a acestor metilaze, care dau un **model** de modificare al ADN-ului. Modificarea permite unei tulpini bacteriene să facă distincția între ADN-ul propriu și orice ADN "străin", înțelegând prin ADN străin orice moleculă de ADN care nu prezintă același model de metilare. Această diferențiere face ca orice moleculă de ADN străin (fagic, plasmidial, cromosomal) să fie atacat și clivat de enzimele de restricție. Prin urmare, rolul sistemelor de restricție și modificare este acela de a proteja ADN-ul propriu de "contaminare" cu secvențe de altă origine.

Nomenclatura

Descoperirea unui număr foarte mare de enzime de restricție a impus adoptarea unei nomenclaturi universale. Astfel, se folosește un cod de 3 litere, în format italic, prima litera semnificând genul, iar celelalte 2 specia bacteriană de la care a fost izolată enzima (spre exemplu, *Eco* – *Escherichia coli*); în unele cazuri, o a patra literă (în format normal) indică tulpina bacteriană (ex: *EcoR*). Dacă o anumită tulpină bacteriană are mai mult de 1 sistem de restricție-modificare, acestea se identifică prin numere romane : spre exemplu *Bgl* I și *Bgl* II.

Tipuri de sisteme de restricție/modificare

Endonucleazele de restricție sunt enzime care recunosc secvențe de ADN specifice, scurte, legarea fiind urmată de clivare, fie la situsul de recunoaștere, fie la o distanță oarecare de acesta, în funcție de tipul de enzimă. Sistemele enzimatice de restricție/modificare (sau restricție/metilare) au fost împărțite în 3 categorii: **Tipul I**, **Tipul II** și **Tipul III**. Tipurile I și III constau în enzime care au atât funcții de restricție cât și funcții de modificare; ambele tipuri recunosc secvențe specifice, nemetilate, de ADN dc; enzimele de tip I clivează ADN-ul într-o manieră randomizată (situs-nespecific), pe când cele de tip III taie la situsuri specifice, dar nu în cadrul secvenței de recunoaștere, ci la o distanță de 25-27 nucleotide de acesta (ex: *EcoP1* – codificată de fagul P1). Sistemele de tip II constau în enzime separate care îndeplinesc funcțiile de metilare, respectiv, restricție.

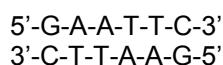
Există și un al 4-lea sistem de restricție/modificare care operează în sens invers: conține o enzimă de restricție care recunoaște și clivează o secvență de ADN metilată. Anumite tulpini de *Streptococcus pneumoniae* prezintă enzimă *DpnI* care clivează secvență GATC numai dacă această este metilată; aceste tulpini nu prezintă o metilaza care să metileze secvențele GATC. Alte tulpini ale acestei bacterii prezintă enzima *DpnII*, care clivează GATC nemetilate, dar aceste tulpini prezintă metilaze specifice, care modifică această secvență, astfel încât ADN-ul lor este metilat. *DpnI* poate fi folosită pentru restricția de substraturi metilate, substraturi pe care enzimele care recunosc aceeași secvență sunt inactice (*Mbo* I, *Sau3A* I). Ambele sisteme vor restricționa ADN-ul străin care intră în tulpina bacteriană și prezintă un model diferit de metilare; sistemele de restricție care recunosc și clivează ADN metilat sunt rare și probabil mai puțin eficiente, deoarece vor degrada doar moleculele de ADN care prezintă un model specific de metilare.

	Tip II	TipIII	TipI
Structura proteica	Metilaze și endonucleaze distincte	Enzima bifuncțională care conține 2 subunități	Enzima bifuncțională care conține 3 subunități
Situs de recunoaștere	Secvențe de 4-6 pb, adesea palindromice	Secvențe asimetrice de 5-7 pb	Secvențe bipartite și asimetrice
Situs de clivare	Același sau apropiat de situsul de recunoaștere	La 24-26 pb în aval față de situsul de recunoaștere	Nespecific, la mai mult de 1000 pb de situsul de recunoaștere
Restricție și metilare	Reacții separate	Simultane	Exclusive

Tab.3.2. Principalele tipuri de sisteme de restricție/modificare

Sisteme de restricție/modificare de tip II

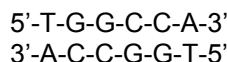
Sistemele de restricție/modificare de tip II sunt cele mai des întâlnite (se întâlnesc la una din 3 tulpini bacteriene) și constau în endonucleaze și metilaze distincte, activitatea ambelor enzime fiind dependentă de ioni de magneziu. Genele pentru endonucleazele și metilazele de tip II sunt adiacente în cromosomii bacterieni, în toate cazurile studiate până în prezent. Metilazele sistemului II de restricție/metilare pot induce formarea de 5-Me-citozină, 4-Me-citozină (mai puțin întâlnită) sau 6-Me-adenina. Enzimele de restricție de tip II au o secvență de recunoaștere scurtă, de 4-6 nucleotide, în cele mai multe cazuri palindromică. De exemplu, enzima *EcoRI* recunoaște o secvență hexanucleotidică:



Similar altor endonucleaze de restricție, *EcoRI* nu taie la nivelul axei de simetrie a secvenței de recunoaștere, ci spre capătul 5', între G și A, ducând la formarea de capete 5' coezive:



În mod similar, multe alte enzime de restricție generează fragmente cu capete 5' coezive; altele (ex: *Pst I*) generează fragmente cu capete 3' coezive, în timp ce alte enzime taie la nivelul axei de simetrie a secvenței de recunoaștere, ducând la formarea de fragmente cu capete drepte. Spre exemplu, enzima *BalI* recunoaște secvența



și taie la nivelul axei de simetrie ducând la obținerea de capete drepte :



Organizarea structurală a enzimelor de restricție de tip II

Enzimele de restricție de tip II au fost și sunt folosite ca sistem model pentru a analiza diverse aspecte ale interacțiilor specifice ADN-proteine și mecanismele hidrolizei legăturilor fosfodiesterice. Până în prezent, deși pentru cel puțin 60 de enzime de restricție a fost determinată secvența de aminoacizi, au fost elucidate structurile tridimensionale numai pentru enzimele *EcoRV*, *PvuII*, *EcoRI*, *BamHI*, iar mai recent pentru *Cfr10I* și *BglI*. Analiza structurii primare a arătat, surprinzător, o lipsă de similaritate în ceea ce privește secvența de aminoacizi. Totuși, în urma analizei structurilor secundare și terțiare, enzimele de restricție de tip II pot fi împărțite în 2 subfamilii, în funcție de tipul de fragmente de ADN generate după clivare. Astfel, *BamHI*, *EcoRI* și *Cfr10I* hidrolizează secvențele de recunoaștere în zigzag, ducând la formarea de capete ADN 5' coezive, și sunt structural mai înrudite între ele decât cu *EcoRV* și *PvuII*, care clivează ADN-ul ducând la obținerea de capete drepte. *BglI*, o endonuclează care produce capete 3' coezive, este structural mult mai apropiată enzimelor *EcoRV* și *PvuII*, dar actualmente nu este considerată ca reprezentant al unei subfamilii diferite.

În ciuda similarității reduse la nivelul secvenței de aminoacizi, toate endonucleazele de tip II prezintă un centru catalitic similar care constă în 5 catene β -pliate flancate de 2 α -helixuri. În acest centru catalitic activ, conservat spațial, se regăsesc 3 resturi de aminoacizi esențiali în activitatea catalitică a endonucleazelor. Aceste resturi de aminoacizi sunt reprezentate, în general, de 2 resturi acide (glutamat sau aspartat) și un rest de lizina (tab.3.3.). Singura excepție o reprezintă *Bam HI* care conține în situsul activ 3 grupări acide, 2 resturi de glutamat și unul de aspartat.

<i>Pvu II</i>	<i>Eco RV</i>	<i>Bgl I</i>	<i>Eco RI</i>	<i>Bam HI</i>	<i>Cfr 10I</i>
Asp58	Asp74	Asp116	Asp91	Asp94	Asp134
Glu68	Asp90	Asp142	Glu111	Glu111	Glu204
Lys70	Lys72	Lys144	Lys113	Glu113	Lys190

Tab.3.3. Compoziția în aminoacizi a centrului catalitic activ pentru enzimele *Pvu II*, *Eco RV*, *Bgl I*, *Eco RI*, *Bam HI* și *Cfr 10I*.

Mecanismul de clivare al ADN

Enzimele de restricție de tip II necesită prezența de Mg^{++} pentru a cliva secvențele de recunoaștere. Deoarece în urma clivării ADN rezultă molecule cu capete 5' fosfat și 3' hidroxil, se presupune ca legăturile fosfodiesterice sunt clivate prin activarea unei molecule de apă și atacul nucleofilic al acesteia asupra grupării fosfat. Se consideră că ruperea unei legături fosfodiesterice necesită 3 componente: o grupare bazică care să activeze molecula de apă nucleofilică; un acid Lewis, cum ar fi un ion metalic bivalent, necesar pentru a stabiliza sarcinile negative ale fosforului pentavalent și un acid care va transfera un proton grupării 3' hidroxil. Toate cele 3 resturi de aminoacizi din centrul catalitic al unei enzime de restricție de tip II sunt esențiali pentru clivare; mutații în oricare din aceste situsuri duc la anularea sau la reducerea drastică a activității de restricție.

Deoarece situsurile de recunoaștere pentru enzimele sistemului II sunt simetrice, pot fi metilate ambele catene ADN. În aceste condiții, un situs de recunoaștere poate fi găsit în stare complet metilată (cu ambele catene ADN metilate), hemimetilată (doar una dintre catene metilată) sau nemetilată. Astfel, in vivo, putem întâlni următoarele situații:

- situsurile complet metilate nu sunt supuse acțiunilor de restricție sau modificare (metilare);
- situsurile hemimetilate nu sunt recunoscute de enzimele de restricție, dar sunt recunoscute de metilaze, care determină modificarea catenei nemetilate;
- situsurile nemetilate pot fi ținte atât pentru restricție cât și pentru metilare; în general, un astfel de situs este restrictat, fiind foarte rare cazurile în care ADN-ul nemodificat dobindește pattern-ul de metilare al noii gazde.

Metilazele nu adaugă mai multe grupări metil per reacție; dacă substratul este reprezentat de ADN nemetilat, enzima introduce o singură grupare metil, disociază de pe ADN, fiind necesară o a doua reacție de asociere la substrat/metilare pentru introducerea celei de-a doua grupări metil. Structural, metilazele prezintă 2 domenii separate de un "șanț" în care este legat ADN-ul; s-a dovedit că secvența țintă de ADN este denaturată local, restul de bază azotată care urmează a fi metilat fiind "extras" din dublul helix, este adăugată gruparea metil (în general, donorul de grupări metil este S-adenozil-metionină), după care restul de bază azotată este dispus în poziția originală.

În unele cazuri, secvențele de recunoaștere tetranucleotidice apar în cadrul secvențelor hexanucleotidice ale altor enzime de restricție. Este cazul enzimelor *Mbo* I și *Sau*3A I, care recunosc o secvență G-A-T-C, în timp ce *Bam* HI recunoaște secvența G-G-A-T-C-C. Deoarece aceste 3 enzime generează același tip de capete coezive, fragmentele de ADN obținute prin digestie cu *Mbo* I sau cu *Sau*3A I pot fi clonate într-un vector digerat cu *Bam* HI.

Alte enzime de restricție din cadrul tipului II nu necesită secvențe palindromice de recunoaștere (Tipul IIs); aceste enzime vor tăia ADN-ul la un număr precis de baze în afara secvenței de recunoaștere. Spre exemplu, *Mbo* II recunoaște secvența 5'-G-A-A-G-A-3', și taie la o distanță de 8 baze față de capătul 3' al acestei catene, și la 7 baze față de capătul 5' al catenei complementare.

Sisteme de restricție-modificare de Tip I și III

A doua categorie de sisteme de restricție-modificare este reprezentată de tipurile I și III, care constau în enzime multimerice ce prezintă atât activitate de restricție cât și activitate de metilare. Mecanismele de acțiune ale acestor enzime sunt diferite unele de altele și de cele ale tipului II, fiind totodată mai puțin întâlnite.

Sisteme de restricție-modificare de tip I

Există 3 familii de enzime de Tip I, codificate de grupuri de gene înrudite; sistemele *Eco* B și *Eco* K aparțin sistemului *hsd*, sunt primele descoperite, cele mai cunoscute, și reprezintă unul dintre aceste 3 grupuri. O enzimă de restricție de tip I constă în 3 subunități diferite (Fig. 3.26.). Astfel, enzima *Eco*K cuprinde subunitățile R_2M_2S : subunitatea R este responsabilă de restricție, subunitatea M de metilare iar subunitatea S de recunoașterea secvenței țintă de ADN. În urma recunoașterii substratului de către subunitatea S, legarea enzimei la ADN poate fi urmată fie de metilare fie de restricție. Activitățile subunităților R și M sunt exclusive; subunitățile M și S pot forma heterodimeri MS, care exprimă funcția de metilare independent de cea de restricție.

Fiecare subunitate este codificată de câte o genă proprie: *hsdR*, *hsdM* și *hsdS* (Fig. 3.27.). Mutații în gena *hsdR* determină fenotip $r^- m^+$; ADN-ul nu mai este restricționat, dar este metilat. Mutații în *hsdS* determină un fenotip $r^- m^-$, deoarece complexul enzimatic nu se mai leagă la ADN. Mutații în *hsdM* previn atât modificarea cât și restricția, ceea ce duce la concluzia că subunitatea M este cumva implicată în funcționarea subunității R. Acesta ar putea reprezenta un mecanism de siguranță, care asigură ca mutantele *hsdM* să prezinte mai degrabă un fenotip $r^- m^-$, decât unul $r^+ m^-$ care ar fi letal (în absența activității metilazei, ar fi restrictat și ADN-ul propriu). Situsurile de recunoaștere pentru *Eco*B și *Eco*K sunt structuri bipartite, formate dintr-o secvență specifică de 3 pb separată prin câteva perechi de baze de o secvență specifică de 4 pb. Faptul că cele 2 secvențe

specifice sunt separate printr-o secvență nespecifică, sugerează că ele sunt situate pe aceeași față a ADN-ului; secvența nespecifică nu este implicată în recunoaștere.

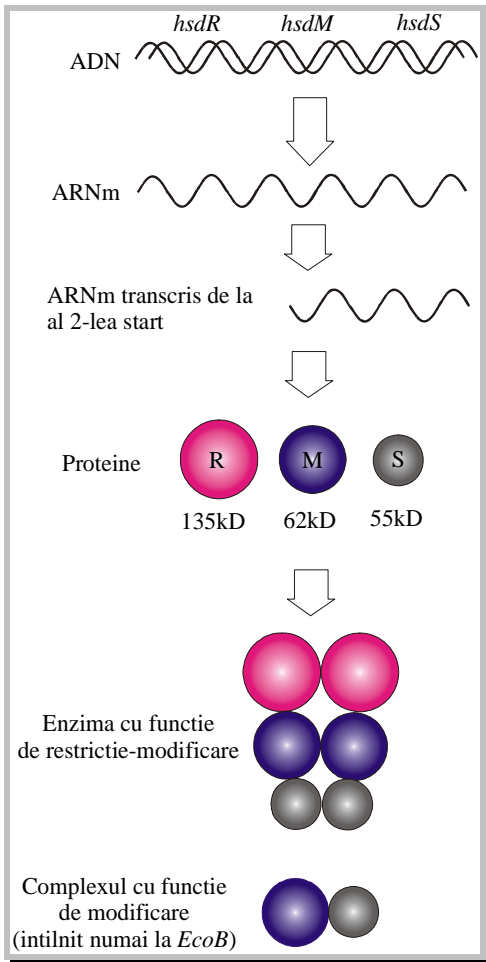


Fig.3.26. Structura enzimelor de restricție de tip I

Fiecare secvență a situsului țintă este recunoscută de câte un domeniu distinct al subunității S. Recombinări între genele *hsdS* pot genera noi tipuri de subunități de recunoaștere care conțin o combinație de domenii de recunoaștere.

Structura situsului de recunoaștere este:

T G A N N N N N N N N T G C T
A C T N N N N N N N N N A C G A

O anumită secvență de ADN este clivată sau modificată în funcție de starea în care se găsește situsul țintă: dacă situsul țintă este complet metilat, enzima se leagă la ADN, dar este eliberată fără reacții ulterioare; dacă secvența țintă este hemimetilată, enzima metilează catena nemetilată, perpetuând modelul de metilare al gazdei; dacă situsul țintă este nemetilată, legarea enzimei duce la clivare. Mutații care permit enzimei să modifice un situs nemetilată se găsesc în *hsdM*, ceea ce sugerează că metilaza este responsabilă de detectarea stării în care se găsește ținta.

Grupările metil sunt furnizate de S-adenozil-metionină (SAM), care este convertit în S-adenozil-homocisteină în timpul reacției. În stadiul inițial al reacției, SAM acționează ca efector allosteric, modificând conformația subunității S, ceea ce permite legarea acesteia la ADN. În urma legării la ADN, enzima interacționează cu ATP, hidroliza acestuia fiind necesară pentru clivare; SAM este eliberat de enzima anterior reacției de restricție (Fig.3.27).

În cazul enzimelor de tip I, clivarea nu apare la situsul de recunoaștere, ci la o distanță de circa 1000 pb față de acesta. Cu toate acestea, alegerea secvenței ce va fi restricțată nu este întru totul întâmplătoare, unele situsuri fiind clivate preferențial. Reacția de clivare are loc în 2 etape: mai întâi este clivată una dintre catene ADN, apoi cealaltă catenă este clivată în apropierea primei incizii; clivarea este urmată de o activitate exonucleazică, însoțită de hidroliza extinsă a ATP. O caracteristică interesantă a acestor enzime este aceea că proteina rămâne permanent legată la ADN, chiar dacă clivarea are loc la o distanță de circa 1000 pb de situsul de recunoaștere și legare.

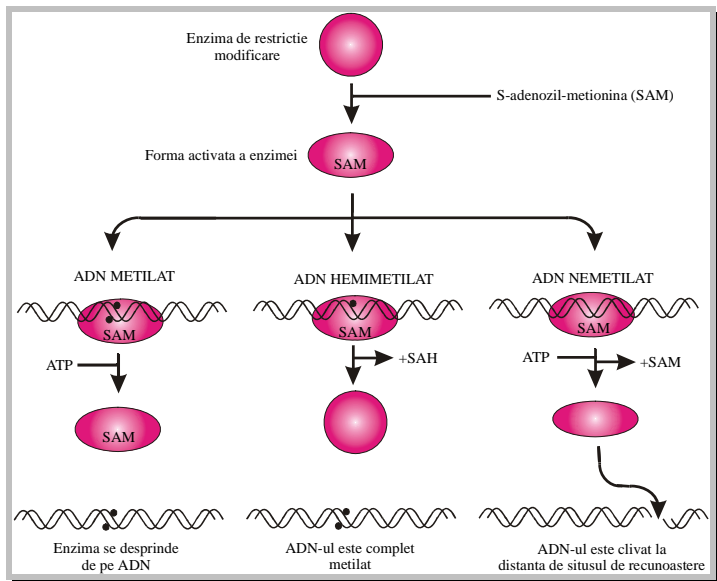


Fig.3.27. Modul de acțiune al enzimelor de tip I

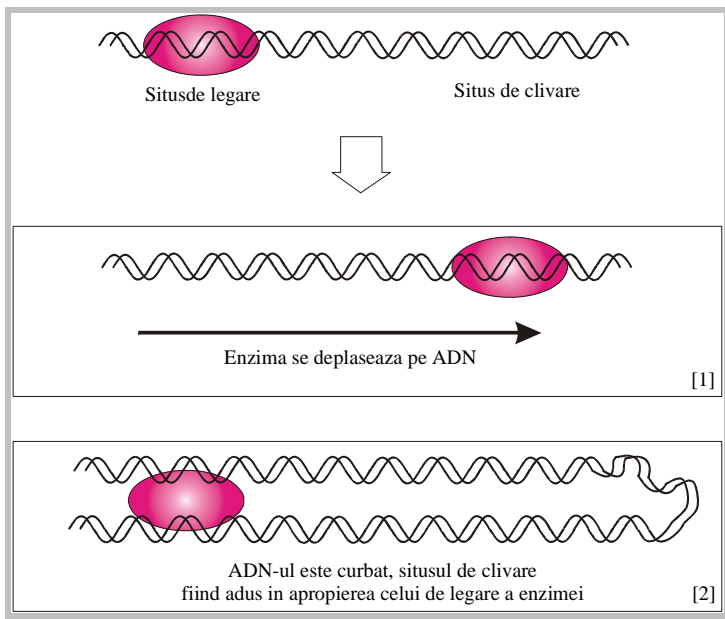


Fig.3.28. Relația dintre situsul de recunoaștere și cel de clivare pentru enzimele de tip I

Au fost emise 2 ipoteze privind relația dintre situsul de recunoaștere și cel de clivare:

- enzima se leagă la ADN la nivelul situsului de recunoaștere, apoi se deplasează de-a lungul moleculei ADN până la nivelul situsului de restricție (Fig.3.28.)
- enzima rămâne atașată la nivelul secvenței de recunoaștere și determină pliarea ADN-ului, prin interacția cu un alt domeniu de legare la ADN (Fig.3.28).

Cel de-al doilea model este mai plauzibil, fiind susținut de date de microscopie electronică.

Sisteme de restricție-modificare de tip III

Enzimele de restricție și modificare de tip III sunt mult mai rare, până în prezent fiind caracterizate doar 3 astfel de sisteme: *EcoP1* și *EcoP15* codificate de plasmidele P1 și P15 de la *E.coli* și *Hinf*, de la *H. influenzae* serotip Rf. Fiecare enzimă este formată din 2 tipuri de subunități: subunitatea R, responsabilă de restricție și subunitatea SM responsabilă pentru recunoașterea ADN țintă și modificare (Fig.3.29.).

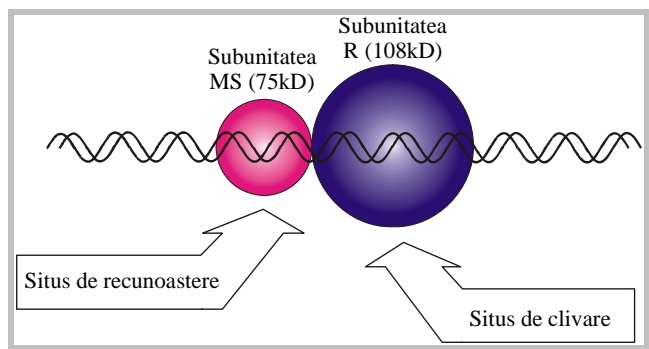


Fig.3.29. Structura enzimelor de restricție-modificare de tip III

Activitățile de restricție și modificare sunt exprimate simultan. Într-o prima etapă, enzima se leagă la ADN, acțiune care necesită ATP; în urma legării, funcțiile de metilare, respectiv restricție competiționează pentru a reacționa cu ADN-ul. Metilarea va apare la nivelul situsului de recunoaștere; restricția apare la 24-26 pb față de situsul de recunoaștere, probabil pentru că enzima este suficient de mare pentru a contacta ADN-ul la acest nivel. Restricția constă în 2 incizii în trepte, la distanța de 2-4pb.

Enzimele sistemului de tip III metilează resturi de adenină, dar situsurile țintă pentru P1 și P15 au o caracteristică interesantă: pot fi metilate doar pe una din catene. Secvența acestor situsuri este:

```

AGACC
TCTGG (P1)

CAGCAG
GTCGTC (P15)
    
```

În urma replicării rezultă 2 tipuri de situsuri de recunoaștere: un situs care prezintă restul de adenină metilat, similar modelului original și un situs nemetilat. Acest din urma situs reprezintă o țintă atât pentru restricție cât și pentru metilare. Ce factori determină ca situsul nemetilat să fie metilat și nu restrictat? S-a dovedit că există o diferență în cerințele pentru activitățile de metilare respectiv restricție: metilaza poate recunoaște și modifica un singur situs de recunoaștere, pe când restrictaza are nevoie de 2 situsuri inversate, ambele nemetilate (Fig..3.30.). Deoarece replicarea a 2 situsuri inversate duce întotdeauna la secvențe care au unul dintre situsuri metilat, aceste situsuri sunt ținte pentru modificare și nu pentru restricție.

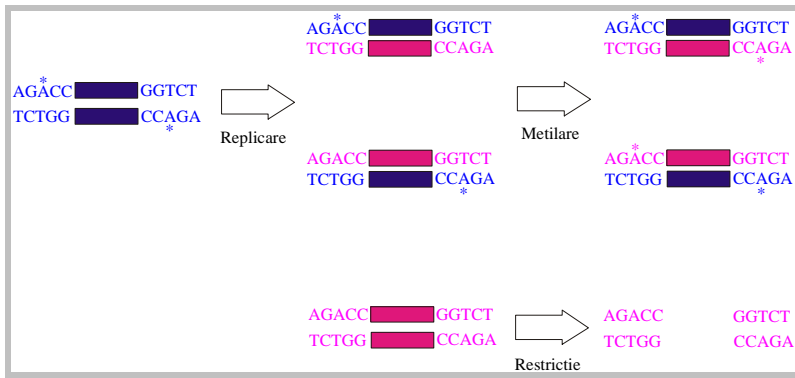


Fig.3.30. Enzimele tipului III au nevoie de 2 situsuri inversate nemetilate pentru a exprima activitatea de restricție

Numărul și dimensiunea fragmentelor generate de o enzimă de restricție depind de frecvența cu care apar situsurile de recunoaștere ale enzimei respective. Într-o moleculă de ADN care conține 50% GC, o secvență de recunoaștere de 4 perechi de baze va apare cu o frecvență de 44 (256) bp, o secvență de 6 bp cu o frecvență de 64 (1096) bp, iar o secvență de recunoaștere de 8 bp cu o frecvență de 84 (65536) bp.

Fragmente mici de ADN sunt obținute prin digestie cu enzime care recunosc secvențe de 4 bp, cum ar fi *Hae* III, utile în aplicații cum ar fi ADN fingerprinting. Pentru cartare sau clonare genomica, unde sunt necesare fragmente mari de ADN, se folosesc enzime care recunosc secvențe de 8 sau mai multe bp; enzimele care recunosc secvențe de 6 bp sunt cel mai des folosite pentru inserarea de ADN heterolog în vectori de clonare, vectori în care au fost introduse, prin inginerie genetica, o serie de situsuri unice pentru endonucleaze, cunoscute ca polilinker sau situsuri de policlonaire.

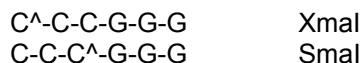
Enzimele izoschizomere și neoschizomere

În general, enzimele de restricție recunosc secvențe de ADN diferite. Cu toate acestea, din gazde diferite au fost izolate enzime care au același situs de recunoaștere. Enzimele care au aceeași secvența de recunoaștere și taie în aceleași poziții se numesc izoschizomere; spre exemplu, secvența



este recunoscută de enzimele *Mbo* I și *Sau3A* I, care taie în aceeași poziție; prin urmare aceste enzime sunt izoschizomere.

O enzimă este neoschizomeră față de altă enzimă dacă ambele enzime recunosc aceeași secvența, dar au situsuri de clivare diferite:



Endonucleaze de tip "Homing"

Aceste endonucleaze se pot autopropaga în cadrul unui genom ca urmare a funcției lor catalitice. Aceste enzime se găsesc în toate regnurile biologice, și prezintă mecanisme care asigură viabilitatea genomului gazda. O astfel de clasă de enzime (notată cu prefixul I, cum ar fi, spre exemplu, I-Crel) sunt codificate de ORF-uri conținute în grupul I de introni de la eucariote și bacterii, ca și în intronii grupului archaea. O altă clasă de astfel de enzime (notată cu prefixul PI – PI-Scel) rezultă din splicingul unor proteine precursor; în urma procesării acestei proteine precursor, rezultă o endonuclează și proteina "homing" funcțională. Aceste endonucleaze invadează alele care nu conțin secvențe de ADN codificatoare de endonucleaze, realizând rupturi dublu-catenare la nivelul unor secvențe specifice de ADN; procesele de reparare și recombinare care urmează duc la conversia alelei respective într-o formă care codifică pentru endonucleaze. Există mai multe caracteristici care deosebesc endonucleazele tip homing de endonucleazele de tip II tipice. Endonucleazele tip homing recunosc secvențe de ADN lungi, degenerate, de 15-40 pb. În al doilea rând, endonucleazele de gazdă prezintă similaritate de secvența, la nivelul secvenței de aminoacizi, secvența consens cel mai des întâlnită fiind LAGLIDADG, care, în unele cazuri se întâlnește de 2 ori în cadrul aceleiași secvențe proteice.

Recomandări generale pentru realizarea reacțiilor de digestie a unor molecule de ADN cu endonucleaze de restricție

Principalele componente ale unei reacții de restricție ADN

Componentele obligatorii ale oricărei reacții de restricție ADN sunt :

1. Enzima de restricție
2. ADN
3. Tamponul de reacție
4. a.d.s. (apă distilată sterilă)

Aceste componente se adaugă în următoarea ordine: a.d.s., tampon, ADN, enzimă , toate în fundul unui tub Eppi mic (0.5 ml) steril, și nu pe peretii acestuia.

Se lucrează steril, cu mănuși și se schimbă vârful pipetei la fiecare component al reacției și la fiecare tub de reacție (cu excepția primului component – a.d.s.)

Opțional: în afară de componentele obligatorii, în anumite reacții de restricție este recomandabil să se adauge:

BSA (Bovine Seric Albumine) în concentrație finală de 100 ug/ml (în mod special în reacțiile de restricție a unor molecule mari de ADN, de ex. ADN cromosomal, sau în cazul anumitor enzime de restricție pentru care se consultă cataloagele producătorilor).

RNazaA în concentrație finală de 100-200 ug/ml (în cazul în care în etapele de purificare a ADN nu a fost făcut și tratament cu RNazaA sau în cazul RFLP pe ADN cromosomal).

Enzima

1 unitate [U] de activitate a unei enzime de restricție este definită ca fiind cantitatea de enzimă necesară pentru digestia completă a 1 ug ADN substrat, în 60 min, la temperatura adecvată, folosind un tampon adecvat, într-un volum total de reacție de 50 ul. Această definiție este valabilă în cazul folosirii ADN din diverse virusuri (fag λ , fag T4, adenovirusul Ad-2, virusul SV40) și pentru vectorii de clonare/exprimare.

Cantități recomandate :

Pentru digestia unor vectori de clonare	1 – 5 U / ug ADN
Pentru digestia unor molecule de ADN plasmidial extras din tulpini naturale de MO	4 – 8 U / ug ADN
Pentru digestia unor molecule de ADN cromosomal	5 – 15 U / ug ADN

Enzimele de restricție se stochează la -20°C . La utilizare se mențin pe gheață.

În cazul majorității enzimelor de restricție, concentrația produsului comercializat este de 10-20 U/ μl . Din acest motiv, în multe situații este necesară efectuarea unei *prediluții* a soluției stoc de enzimă în tampon de reacție.

Alegerea enzimei

Este preferabil să se facă în funcție de ADN-ul probă, fiind necesar să se știe pentru ce enzime de restricție prezintă acesta situsuri de recunoaștere.

Alegerea enzimelor de restricție depinde și de scopul aplicației- pentru restricție de ADN plasmidial se folosesc enzime obișnuite (*Eco* RI, *Hind* III etc.), în timp ce pentru RFLP genomic, spre exemplu, se poate opta fie pentru enzimele uzuale (cele de mai sus), fie pentru enzime de restricție cu situsuri rare.

Se recomandă, de asemenea, ca volumul de enzimă utilizat să reprezinte între 1/10 și 1/5 din volumul total de reacție.

ADN (cantitatea de probă, puritatea și concentrația acestuia)

În reacțiile de restricție, probele de ADN trebuie să fie:

- suficient de pure, mai ales în ceea ce privește contaminanții proteici;
- suficient de concentrate, dat fiind că se recomandă ca volumul probei de ADN să nu depășească 1/3-1/2 din volumul total de reacție;

Într-o reacție de digestie trebuie introdusă o cantitate de ADN suficient de mare pentru ca în gel să se obțină fragmentele de dimensiunea dorită sau (în funcție de aplicație) benzi vizibile.

Tamponul de reacție

Se livrează în prețul enzimei. Este comercializat în formă 10X (de zece ori concentrat), motiv pentru care se adaugă în amestecul de reacție în proporție de 1/10 din volumul total al acestuia.

Temperatura de reacție

Este de 37°C , pentru majoritatea enzimelor de reacție. Trebuie verificat, însă, întotdeauna într-un catalog de produse, deoarece există și enzime de restricție care au optimum-ul de activitate la diferite alte temperaturi.

Timpul de reacție

Indiferent de volumul de reacție, enzima de restricție utilizată, sau varianta tehnicii de lucru aplicate *timpul minim de reacție* este de o oră.

Tipul probei ADN digerate	Timpul de reacție
ADN fag λ , vectori	1.5 - 2.5 h
Plasmide naturale	3 - 5 h
ADN cromosomal	6 - 24 h

Variante de stopare a reacției de restricție

- scăderea temperaturii amestecului de reacție până la -20°C ;
- adăugarea la amestecul de reacție a 0,2 volume (față de volumul total al amestecului) de EDTA Na_2 0.5 M;
- adăugare de BFE sau BFER (în vederea încărcării gelului de electroforeză).

Electroforeza în gel de agaroză

Concentrația agarozei se apreciază în funcție de dimensiunile presupse ale fragmentelor de digestie- spre exemplu, în cazul fragmentelor obținute la digestia ADN λ sau a vectorilor se utilizează agaroză 0,8- 0,9 %. Tamponul de electroforeză folosit: TBE 0.5X