

Занятие 5. ФЕРМЕНТЫ РЕСТРИКЦИИ (РЕСТРИКТАЗЫ I, II ТИПОВ), ДНК-ЛИГАЗЫ

Цель занятия: ознакомиться с ферментами рестрикции и способами получения гибридной ДНК от различных организмов, освоить методы гибридизации ДНК на примере решения типовых задач.

1 Принцип действия и функция рестриктаз.

Тематика рефератов

1. История открытия рестриктаз.
2. Характеристика рестриктаз I и II типов.
3. Принцип действия и функция ДНК-лигаз.

Вопросы для самоконтроля

1. Какую функцию выполняют лигазы?
2. Что такое распознаваемые участки?
3. Приведите примеры известных вам рестриктаз.
4. Каким образом осуществляет разрезание фермент рестрикции EcoRI?
5. Что такое конструирование гибридных (рекомбинантных) ДНК?

Задание 1. Разобрать понятия: ферменты рестрикции, распознаваемые участки, липкие концы, ровные (тупые) концы, EcoRI, Sma I, Hind III, конструирование ДНК.

Задание 2. Решите предлагаемые задачи:

1. Имеется последовательность из 27 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:

5`-ЦТГААТТАГГАТЦЦАГГЦААТАГТГТГ-3`
3`-ГАЦТТААТЦЦТАГГТЦЦГТТАТЦАЦАЦ-5`

Каким способом и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

2. Имеется последовательность из 24 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:

5`-ТЦАГААТГЦТГГЦЦААГТАЦТТАГ-3`
3`-АГТЦТТАЦГАЦЦГГТТЦАТГААТЦ-5`

Каким способом и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

3. Ниже приведены две последовательности одноцепочечных молекул ДНК. Какую из них в двухцепочечной форме могут разрезать

известные вам рестриктазы?

а) 5`-АЦТЦАГААТТЦАЦТЦГ-3`

б) 5`-ГЦЦТЦАТТЦГААГЦЦТГА-3`

4. Ниже приведены три последовательности одноцепочечных молекул ДНК. Какую из них в двухцепочечной форме могут разрезать известные вам рестриктазы?

а) 5`-ТАГГЦТААГЦТТАЦЦГАТ-3`

б) 5`-ЦГААТАТТТЦЦГГАТГАА-3`

в) 5`-АГГТЦЦТТАТЦЦГАТААТТ-3`

5. Рестрикционный фермент Hpa II разрезает ДНК по последовательности ЦЦГГ. Какова средняя длина фрагментов разрезанной ДНК?

6. Рестрикционный фермент EcoRI разрезает ДНК по последовательности ГААТТЦ. Насколько часто этот фермент будет разрезать двухцепочечную ДНК?

7. Если последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК распределяется случайным образом, то какова будет средняя длина фрагмента при разрезании ДНК рестриктазами, узнающими последовательность из восьми нуклеотидов?

8. Гаплоидный геном человека содержит около 3×10^9 нуклеотидных пар ДНК. Сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено при разрезании человеческой ДНК рестрикционным ферментом NotI, узнающим октамерную последовательность ГЦГГ-ЦЦГЦ?

9. Сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено при разрезании человеческой ДНК рестрикционным ферментом Sma I?

10. Гаплоидный геном дрожжевого грибка *Saccharomyces cerevisiae*, состоящий из одной хромосомы, содержит около $13,5 \times 10^6$ нуклеотидных пар ДНК. Если вы порежете эту ДНК ферментом EcoRI, то сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

11. Гаплоидный геном *Saccharomyces cerevisiae* ($13,5 \times 10^6$ н. п.) разрежали ферментом HaeIII. Сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

12. Геном кишечной палочки *Escherichia coli*, представляющий собой одну кольцевую хромосому, содержит около $4,7 \times 10^6$ н. п. Его разрежали ферментом HaeIII. Сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

13. Геном *Drosophila melanogaster*, состоящий из четырёх

хромосом, содержит около 10^8 нуклеотидных пар ДНК. Если вы порежете эту ДНК ферментом EcoRI, то сколько различных рестрикционных фрагментов будет получено?

14. Ниже приведены последовательности двух фрагментов ДНК, выделенных из организмов разных видов.

5'-АААГЦТТЦТГААТЦЦГАТЦГ-3'

3'-ТТТЦГААГАЦТТАГГЦТАГЦ-5'

5'-ГТАЦТЦАГАТЦЦТАГГАТААГЦТТА-3'

3'-ЦАТГАГТЦТАГГАТЦЦАТТЦГААТ-5'

С помощью каких ферментов можно получить гибридную молекулу ДНК из этих фрагментов? Опишите последовательные этапы получения гибридной молекулы.

15. Опишите последовательные этапы получения гибридной ДНК из представленных ниже фрагментов.

5'-ТАЦАТЦЦГГАГТАГГАТЦЦТ-3'

3'-АТГАТАГГЦЦТЦАТЦЦТАГГА-5'

5'-ЦГГАТЦЦТАГАТТЦЦАТА-3'

3'-ГЦЦТАГГАТЦТААГГТАТ-5'

Задание 3. Объяснить следующие термины: рестриктазы, сайт рестрикции, ДНК-лигаза, гибридные (рекомбинантные) ДНК.

Тест 1

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (1–8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

–. В приведенной ДНК имеется один участок распознавания: ГГАТЦЦ для рестриктазы Bam I (см. таблицу на стр. 18). Поэтому ДНК может быть разрезана в одном месте с образованием двух фрагментов.

–. Рестриктаза EcoR I может разрезать фрагмент а.

–. Частота встречаемости четырехнуклеотидного фрагмента ЦЦГГ составит $(1/4)^4 = 1/256$. Таким образом, средняя длина фрагментов ДНК при разрезании Nra II составит 256 нуклеотидных пар.

–. Средняя длина фрагментов ДНК при разрезании рестриктазами, узнающими восьминуклеотидную последовательность, составит 65536 нуклеотидных пар.

–. Средняя длина фрагментов при разрезании рестриктазами составит 53637 нуклеотидных пар.

Тест 2

Ниже приведены 4 правильных ответа для 7 задач (9–15). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

- . Должно получиться $732422 + 23 = 732445$ рестриционных фрагментов.
- . $52734 + 1 = 52735$ фрагментов.
- . $24414 + 4$.
- . Bam I может разрезать фрагменты с образованием липких концов, а ДНК-лигаза скрепит их в одну молекулу.
- . 52734 фрагментов.

Тест 3

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (1–8). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

- . ДНК может быть разрезана в одном месте рестриктазой Nae III с образованием двух фрагментов.
- . Фрагменты **а** и **б** могут быть разрезаны рестриктазами Hind III и Hra II соответственно.
- . Средняя длина фрагментов ДНК при разрезании EcoRI составит 4096 нуклеотидных пар.
- . В результате полного расщепления человеческой ДНК рестриктазой Not I должно получиться $45776 + 23 = 45799$ фрагментов.
- . Средняя длина фрагментов ДНК при разрезании EcoRI составит 2055 нуклеотидных пар.

Тест 4

Ниже приведены 3 правильных ответа для 7 задач (9–15). Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

- . $3296 + 1 = 3297$ фрагментов.
- . 18359 рестриционных фрагментов.
- . С помощью Hind III можно разрезать оба фрагмента ДНК с образованием липких концов АГЦГ. Затем при смешении фрагментов липкие концы скреплятся между собой за счет водородных связей, а окончательную сшивку в единую гибридную молекулу произведет ДНК-лигаза.
- . 22575 рестриционных фрагментов.

Тест 5

1. Назовите функцию, которую выполняют ДНК-лигазы:
 - а) доставка чужеродной ДНК в клетку;
 - б) разрезание ДНК;

в) сшивание двух фрагментов ДНК с образованием полной структуры.

2. Рестриктазы действуют на:

- а) одноцепочечную ДНК;
- б) одноцепочечную РНК;
- в) двуцепочечную ДНК.

3. Какова длина распознаваемых рестриктазами участков ДНК?

- а) 2-3 пары нуклеотидов;
- б) 4-8 пар нуклеотидов;
- в) более 8 пар нуклеотидов.

4*. Как называется место, в котором рестриктаза разрезает ДНК?

- а) сайт рестрикции;
- б) сайт узнавания;
- в) сайт расщепления;
- г) распознаваемые участки.

5. Назовите бактерию, из которой была выделена рестриктаза EcoR

I:

- а) *Bacillus amyloliquefaciens*;
- б) *Escherichia coli*;
- в) *Haemophilus haemolyticus*;
- д) *Bacillus subtilis*.

6. Рестриктазы действуют:

- а) только на ДНК бактерий;
- б) только на ДНК вирусов;
- в) на ДНК растений и животных;
- г) им безразлично, чью ДНК разрезать.

7*. Выберите рестриктазы, которые разрезают ДНК с образованием тупых концов:

- а) Bam I;
- б) Sma I;
- в) Hae III;
- г) Hind III;
- д) Hpa II.

8. Назовите сайт узнавания для рестриктазы EcoR I:

- а) 5`-Г-А-А-Т-Т-Ц-3`
3`-Ц-Т-Т-А-А-Г-5`
- б) 5`-Г-Г-А-Т-Ц-Ц-3`
3`-Ц-Ц-Т-А-Г-Г-5`

в) 5`-Ц-Ц-Ц -Г-Г- Г-3`
3`-Г-Г- Г- Ц-Ц-Ц-5`

г) 5`-Ц-Ц-Г-Г-3`
3`-Г-Г-Ц-Ц-5`.

9. Какая из нижеприведенных рестриктаз узнает последовательность ДНК 5`-Ц-Ц-Ц-Г-Г-Г-3`
3`-Г-Г-Г-Ц-Ц-Ц-5`?

- а) Hae III;
- б) Hind III;
- в) Hpa II;
- г) Bam I;
- д) Sma I.

10. Сколько рестриктаз известно в настоящее время?

- а) более 120;
- б) более 300;
- в) более 500;
- г) около 1000.

11. Какую связь лигируют ДНК-лигазы?

- а) водородную;
- б) фосфодиэфирную;
- в) пептидную.

12. На сколько частей рестриктаза EcoR I разрежет предлагаемую последовательность ДНК из 23 нуклеотидов:

5`- ГГТТЦАГАГААТТЦАЦГТААТЦЦ-3`?
3`- ЦЦААГТЦТЦТТААГТГЦАТТАГГ-5`

- а) на 2 части;
- б) на 3 части;
- в) на 4 части;
- г) не разрежет.

13. Какая из нижеприведенных рестриктаз может разрезать данную последовательность ДНК:

5` - ЦГГЦАТТГЦАТГТТАГЦЦГГТАГЦЦ-3`
3` -ГЦЦГТААЦГТАЦААТЦГГЦЦАТЦГГ-5`

- а) Sma I;
- б) Hae III;
- в) Bam I;
- г) Hpa II;
- д) Hind III.

14. Назовите нуклеотиды, образующие липкие концы при разрезании молекулы ДНК рестриктазой EcoR I:

а) ААТТ
ТТАА

б) ГААТТ
ЦТТАА

в) ГААТ
ЦТТА

г) ГААТТЦ
ЦТТААГ.