

ENZIMI
DI
RESTRIZIONE

La scoperta degli enzimi di restrizione e modificazione

Intorno agli anni '50 si notò che talvolta l'introduzione in *E.coli* di DNA esogeno, proveniente da un diverso ceppo di *E.coli*, veniva rapidamente frammentato in piccoli pezzi (ristretto). L'analisi di un DNA virale rivelatosi capace di resistere alla degradazione, rivelò, una decina di anni più tardi, la presenza di alcune basi metilate. Si scoprì infine l'esistenza in *E.coli* di sistemi di restrizione/modificazione capaci di metilare specifiche basi e, contemporaneamente, di tagliare le stesse basi quando non metilate.

ENZIMI DI RESTRIZIONE

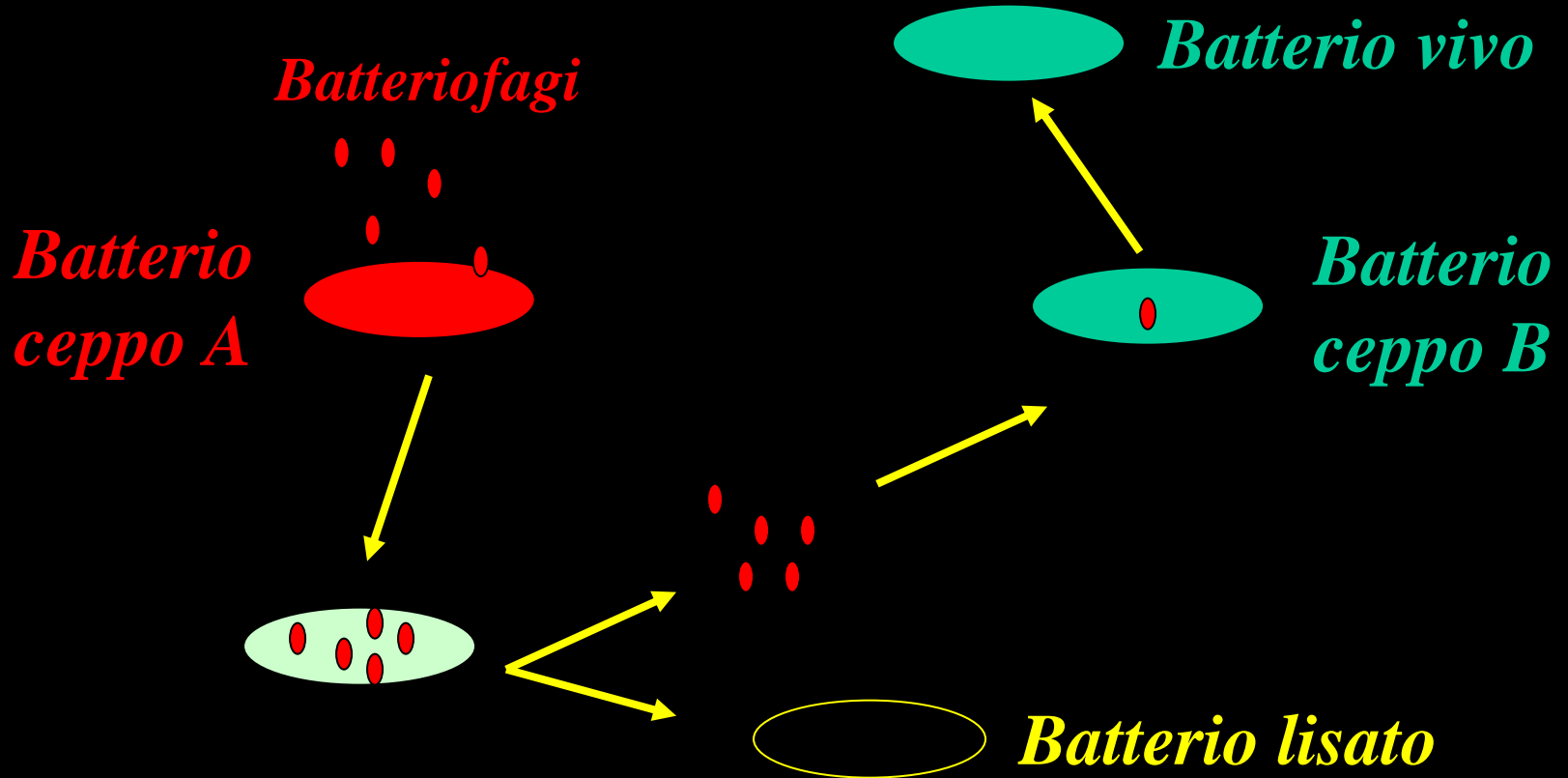
Sono enzimi (endonucleasi di restrizione) di origine batterica capaci di tagliare il DNA a doppia elica in punti specifici, laddove riconoscono una determinata sequenza di basi.

Sono prodotti da diverse specie di batteri per difendersi dall'invasione di batteriofagi, riconoscendo e degradando ogni DNA estraneo.

Il DNA endogeno viene modificato (metilazione) dal batterio stesso in modo da non essere riconosciuto dall'enzima di restrizione il quale può agire solo sul DNA non modificato proveniente da altra fonte:

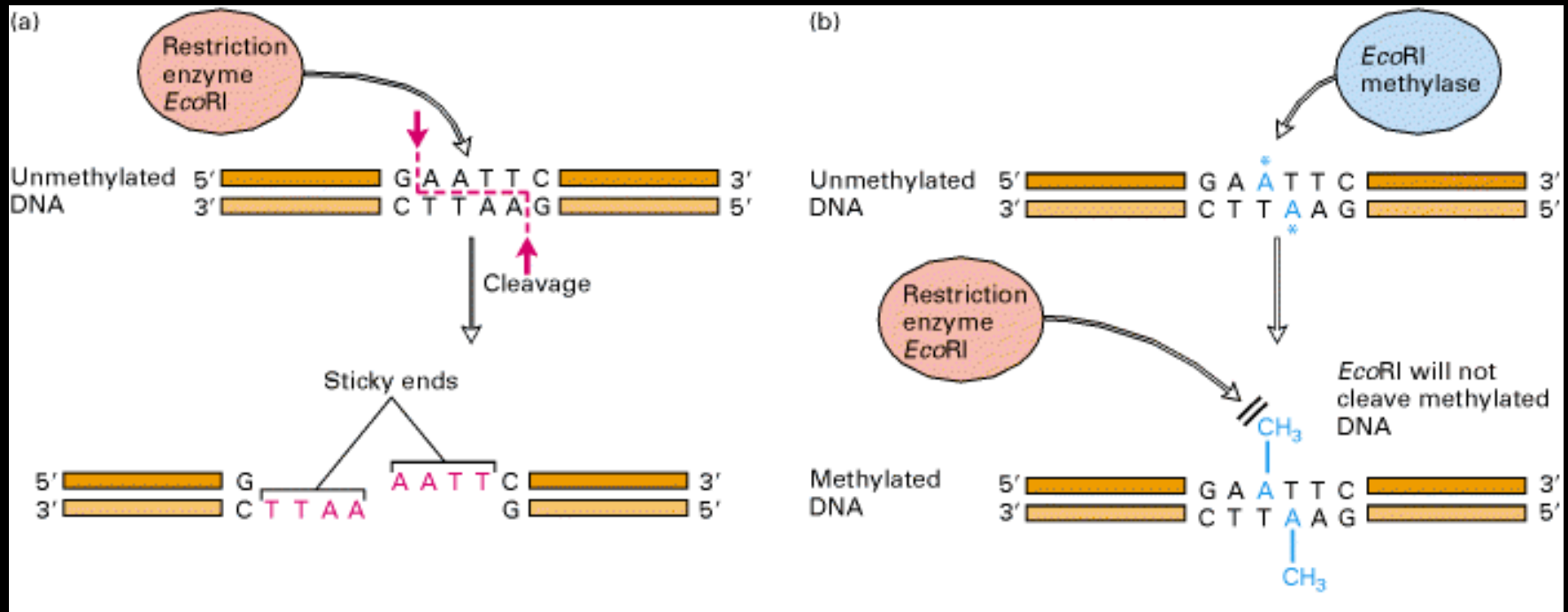
SISTEMA DI RESTRIZIONE E MODIFICAZIONE

SISTEMA DI RESTRIZIONE E MODIFICAZIONE = SISTEMA DI PROTEZIONE



ENDONUCLEASI DI RESTRIZIONE

Nel 1970 Hamilton Smith ha isolato il primo enzima che taglia il DNA a livello di una sequenza nucleotidica specifica.



RICONOSCIMENTO DI SEQUENZE PALINDROMICHE

Le sequenze riconosciute dagli enzimi di restrizione sono generalmente delle PALINDROMI (4, 6 e 8 basi) ovvero sequenze di basi a simmetria binaria: presentano la stessa sequenza se vengono lette in direzione 5' → 3'

5' GAATTC 3'

3' CTTAAG 5'

Esistono tre classi di enzimi di restrizione: Gli enzimi di tipo I e III portano le attività di restrizione e di metilazione nella stessa molecola e non sono utilizzati in biologia molecolare. Gli enzimi di classe II, invece, portano le due attività su molecole distinte. Centinaia di endonucleasi di tipo II sono correntemente utilizzate e commercializzate.

NOMENCLATURA

La nomenclatura degli enzimi di restrizione si basa sul genere e sulla specie del batterio dal quale è stato isolato l'enzima di restrizione: per es. Bam HI deriva da *Bacillus amyloliquefaciens*, Eco RI da *Escherichia coli*, Hind III da *Haemophilus influenzae* etc.

L'Utilizzo degli enzimi di restrizione: La maggior parte di essi funziona in semplici tamponi tra pH 7 e 8 , generalmente a 37°C. Le condizioni di utilizzo sono comunque sempre specificate dai fornitori.

Per definizione **1 UNITA'** di enzima di restrizione rappresenta la quantità di enzima richiesta per digerire completamente 1 µg di DNA substrato in un' ora.

Tutti gli enzimi, in condizioni non ottimali, danno il cosiddetto "effetto star", che consiste nella capacità dell'enzima di "confondersi" riconoscendo e tagliando sequenze simili, ma non identiche a quella target.

Gli enzimi di restrizione possono produrre tre tipi di estremità:

- Estremità piatte (blunt ends)
- Estremità coesive (sticky ends) sporgenti al 5' (5' protruding)
- Estremità coesive (sticky ends) sporgenti al 3' (3' protruding)

Trovano molteplici applicazioni, oltre che nella routine di laboratorio, in clonaggi e subclonaggi, nella costruzione di mappe di restrizione, negli RFLP, ecc.

TIPO DI TAGLIO:

-BLUNT ENDS O TAGLIO NETTO

Es. SmaI

5'-CCC GGG-3'

5'-CCC-3'

5'- GGG-3'

3'-GGG CCC-5'

3'-GGG-5'

3'-CCC-5'

-STICKY ENDS O CODINE ADESIVE: -5' PROTRUDING

-3' PROTRUDING

Es. Eco RI (5' PROTRUDING)

5'-G/AATTC-3'

5'-G-3'

5'-AATTC-3'

3'-CTTAA/G-5'

3'-CTTAA-5'

3'-G-5'

Es. Kpn I (3' PROTRUDING)

5'-GGTAC/C-3'

5'-GGTAC -3'

5'-C-3'

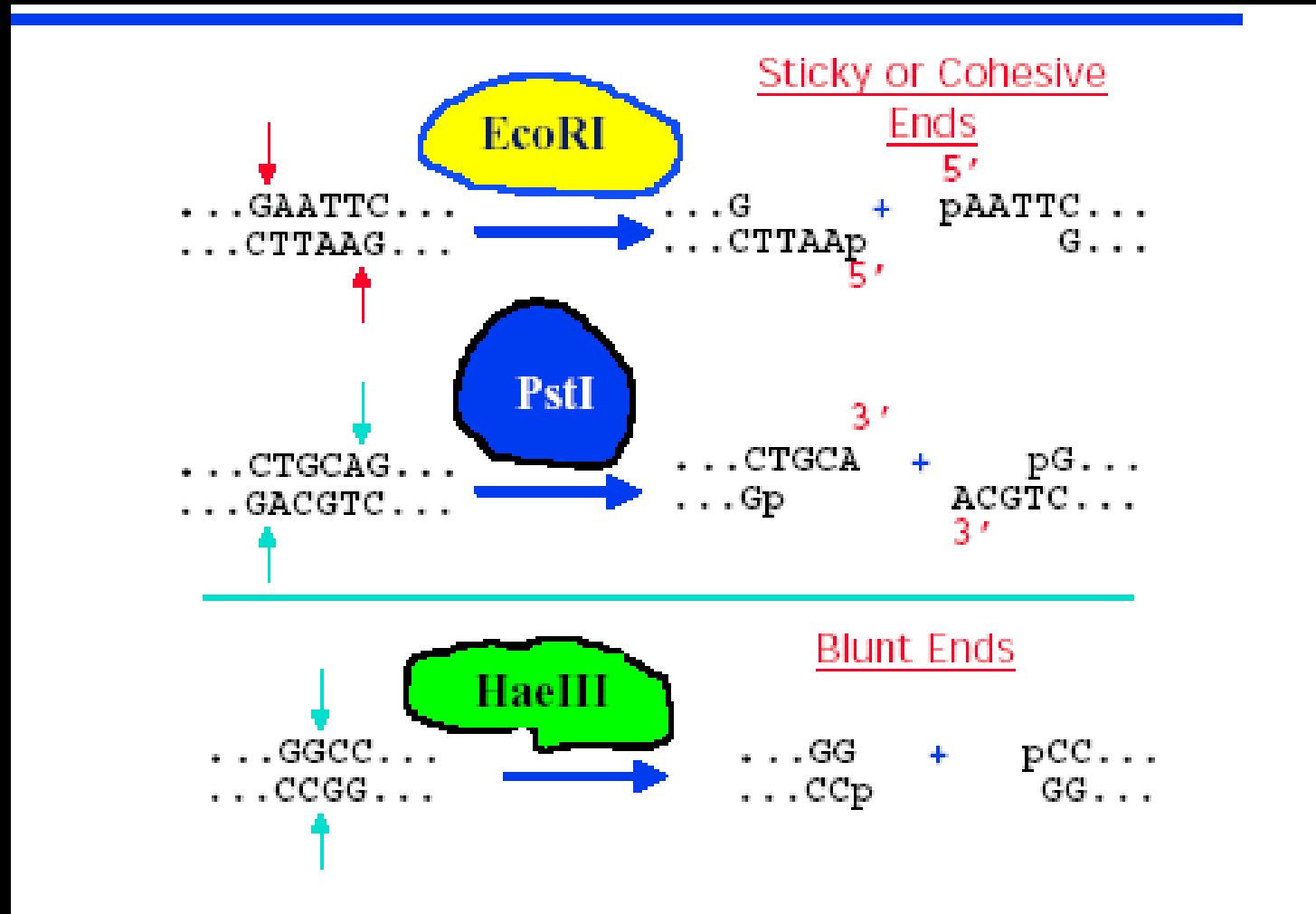
3'-C/CATGG-5'

3'-C-5'

3'-CATGG-5'

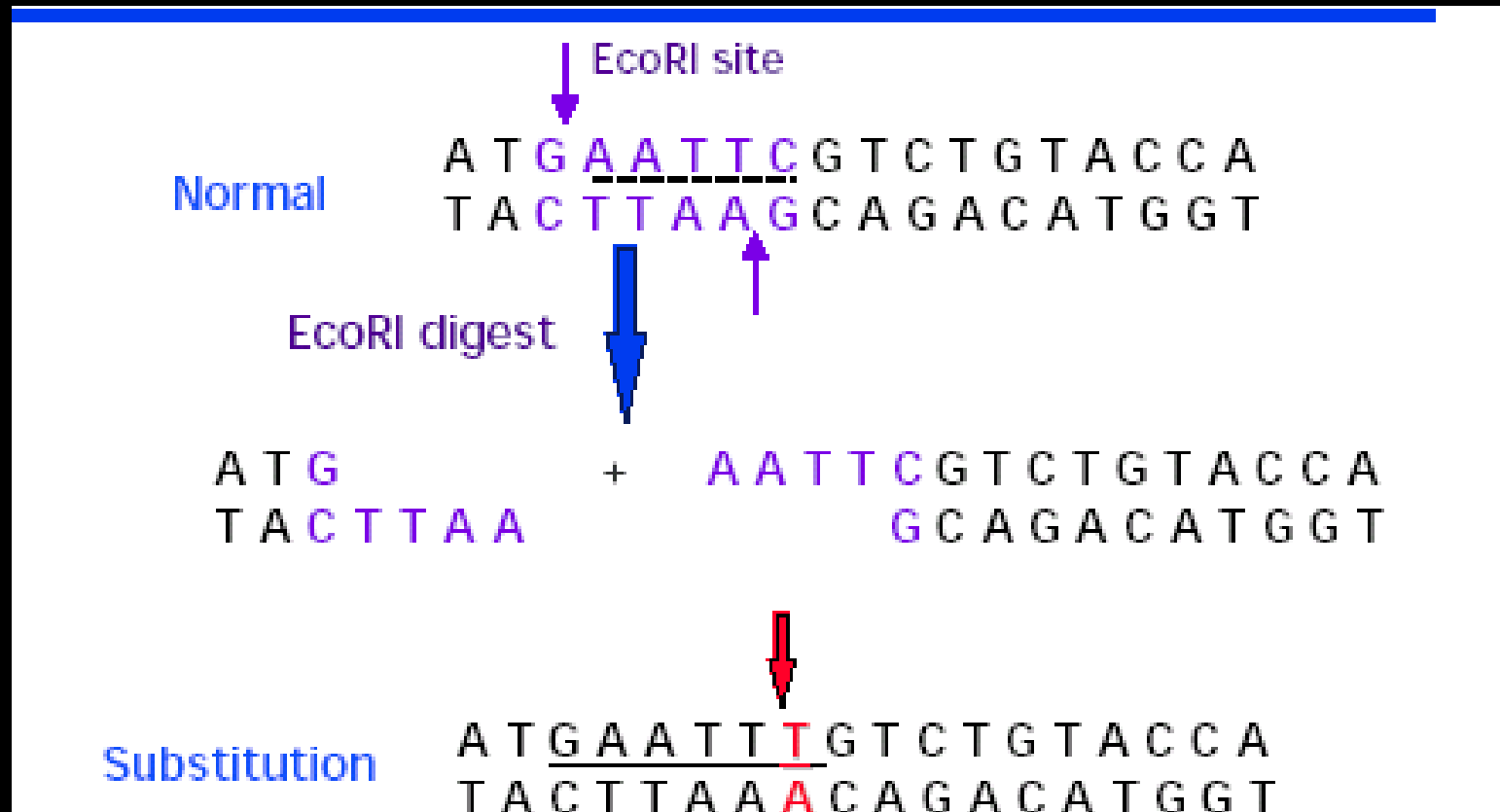
Endonucleasi di restrizione

Enzimi che tagliano il DNA a doppia elica in siti specifici



Blunt Ends = estremità prive di estensione

Endonucleasi di restrizione



EcoRI non taglierà questa sequenza

QUANTE VOLTE TAGLIA UN ENZIMA DI RESTRIZIONE?

La maggior parte riconosce palindromi di 4 o 6 nucleotidi se assumiamo che i 4 nucleotidi siano distribuiti a caso nelle molecole di DNA:

-per enzimi che riconoscono palindromi di 4 nt si avrà **IN MEDIA** un taglio ogni 256 nucleotidi ($4 \times 4 \times 4 \times 4$).

-per enzimi che riconoscono palindromi di 6 nucleotidi avremo **IN MEDIA** un taglio ogni 4.096 nucleotidi (4^6).

ISOSCHIZOMERI

Sebbene gli enzimi di restrizione isolati siano oltre 3500, le sequenze bersaglio che possono essere tagliate sono molte di meno (appena più di duecento). E' evidente che molti enzimi isolati da batteri diversi hanno la stessa specificità di sequenza (RICONOSCONO LA STESSA SEQUENZA), sono cioè isoschizomeri.

Esempi:

HapII *Haemophilus aphrophilus*

HpaII *Haemophilus parainfluenzae*

MspI *Moraxella species*

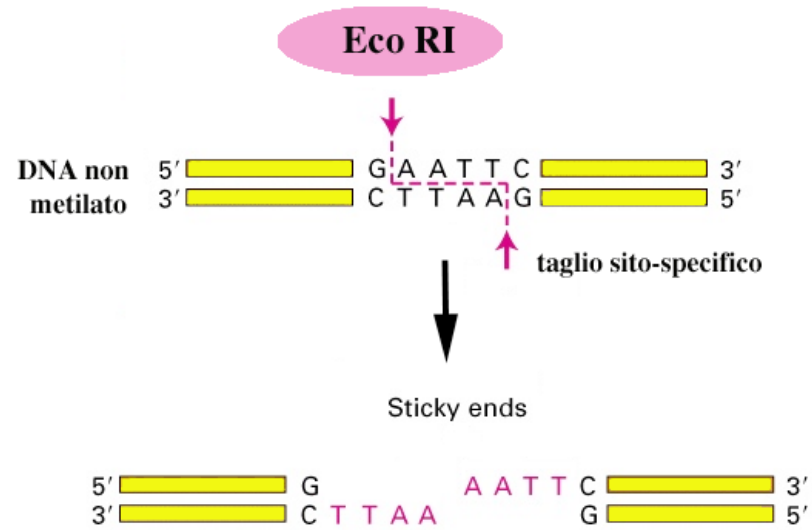
riconoscono e tagliano tutti la stessa sequenza C|CGG

SmaI *Serratia marcescens* CCC|GGG

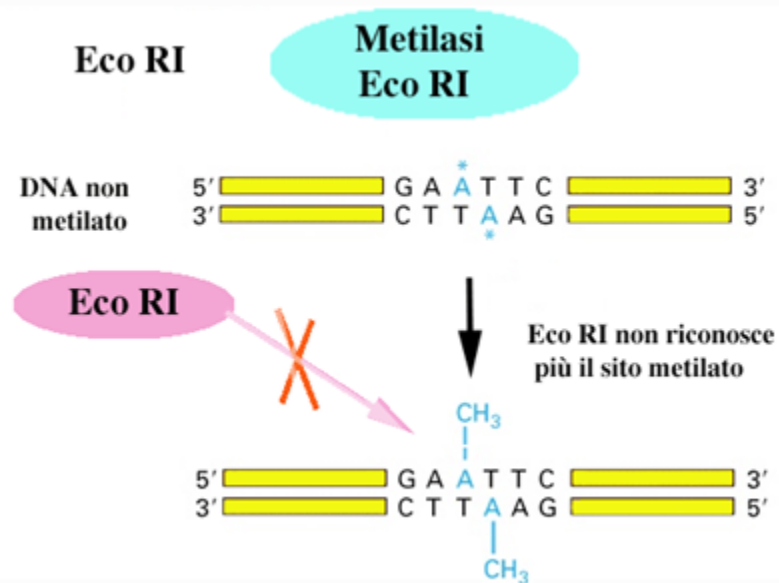
XmaI *Xantomonas malvacearum* C|CCGGG

riconoscono la stessa sequenza, ma tagliano in modo diverso.

3.1



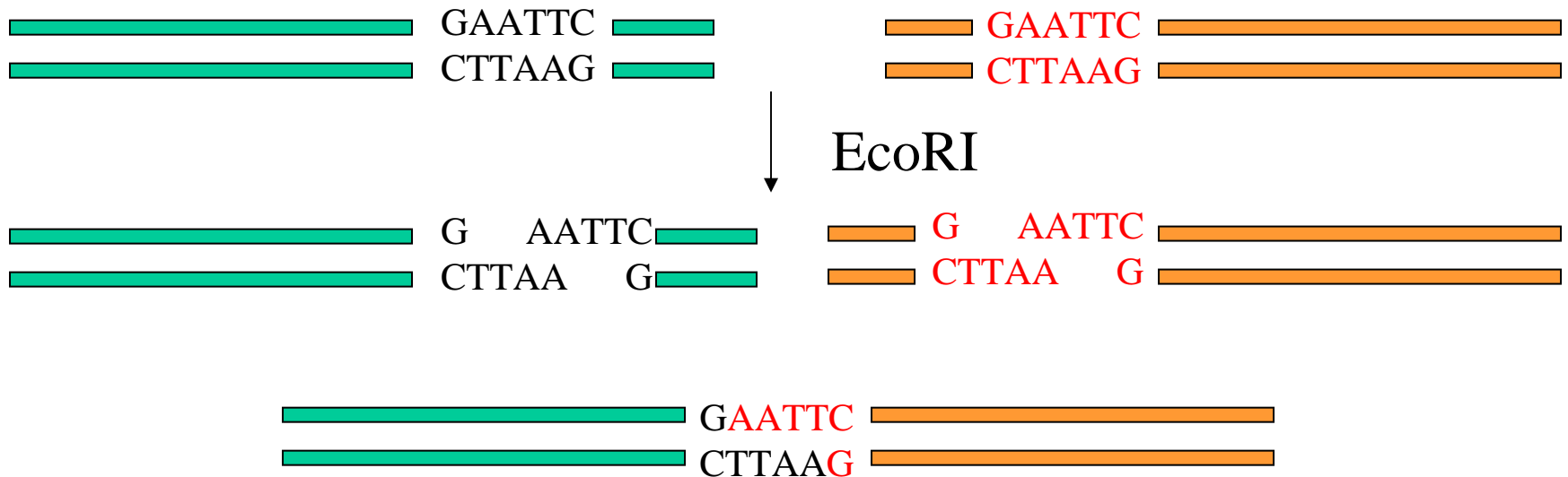
3.2



DNA RICOMBINANTE: due tratti di DNA che in natura non sono adiacenti, vengono uniti in provetta.

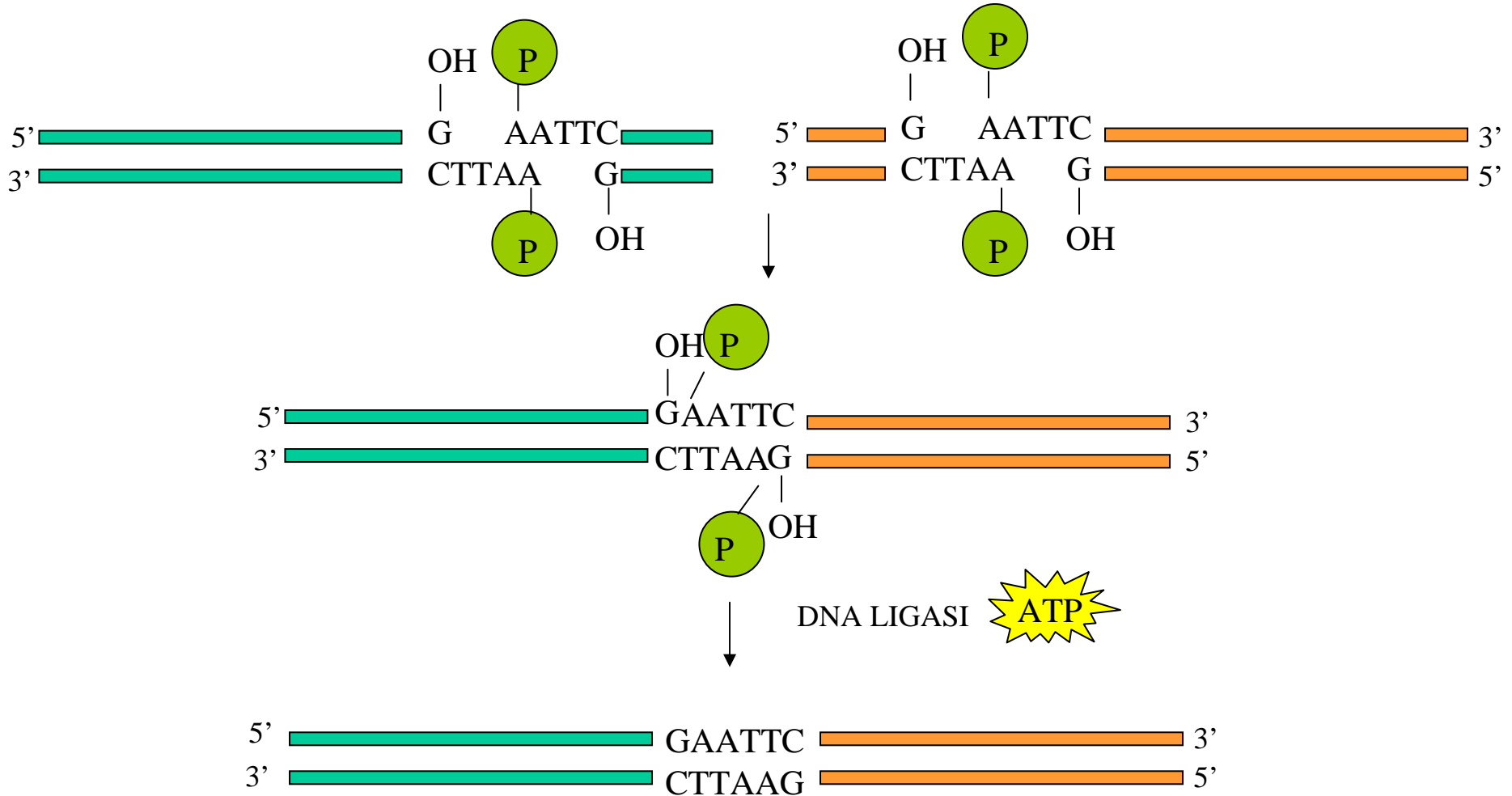
Le proprietà degli enzimi di restrizione sono state essenziali per la tecnica del DNA ricombinante.

I due tratti da unire vengono tagliati con uno stesso enzima di restrizione.



Le estremità appiccicose prodotte da uno stesso enzima possono appaiarsi tra loro.

LA DNA LIGASI E' UN ENZIMA CHE LEGA COVALENTEMENTE DUE MOLECOLE DI DNA



ALCUNI ENZIMI PRODUCONO ESTREMITA' BLUNT



ESTREMITA' BLUNT POSSONO ESSERE LEGATE A ESTREMITA' BLUNT PRODOTTE DA QUALSIASI ALTRO ENZIMA, NON CI SONO LE LIMITAZIONI IMPOSTE DALLA COMPLEMENTARIETA' DELLE BASI DELLE CODINE APPICCICOSE.

SVANTAGGIO: LIGASI DI ESTREMITA' BLUNT E' MENO EFFICIENTE PECHE' NON SI HA APPAIAMENTO TRA CODINE A SINGOLO FILAMENTO.



SmaI



EcoRV

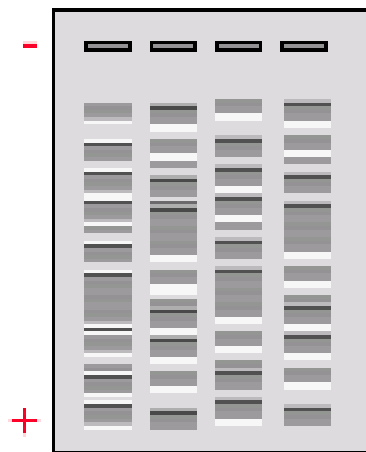


LA SEQUENZA IBRIDA CHE SI FORMA NON E' RICONOSCIUTO DA NESSUNO DEI DUE ENZIMI.

Southern Blotting (DNA)

Restriction Enzyme
Digested DNA

Electrophoresis to
separate DNA fragments
based on size



Agarose Gel

Denature &
Transfer DNA

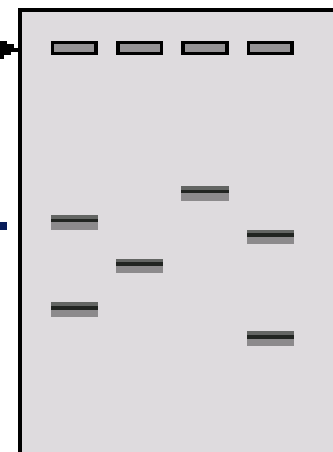
Hybridization of
probe to immobilized
DNA on blot



Nitrocellulose Blot

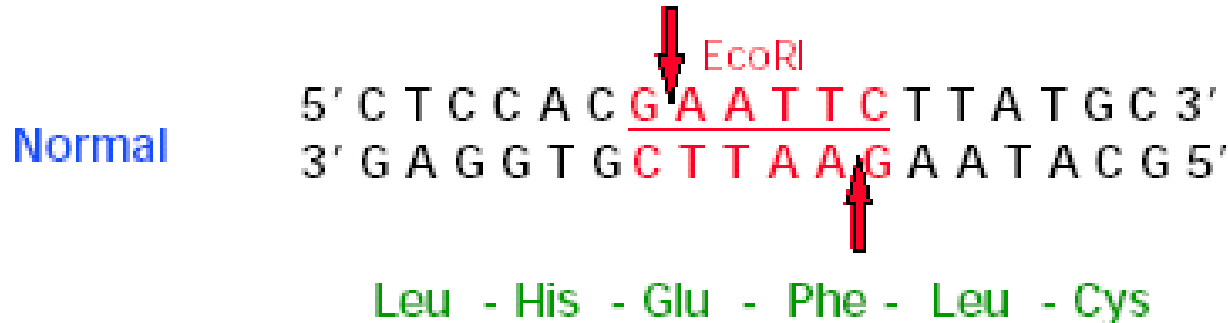
Identification of specific
DNA fragments with
homology to the probe

Expose to Film

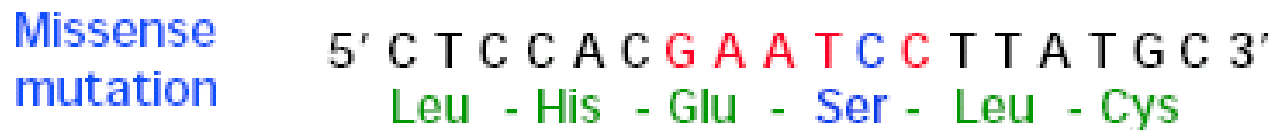


Autoradiogram

Mutazioni puntiformi



Due mutazioni puntiformi che cambiano la sequenza nucleotidica



EcoRI non è in grado di tagliare le due sequenze mutate

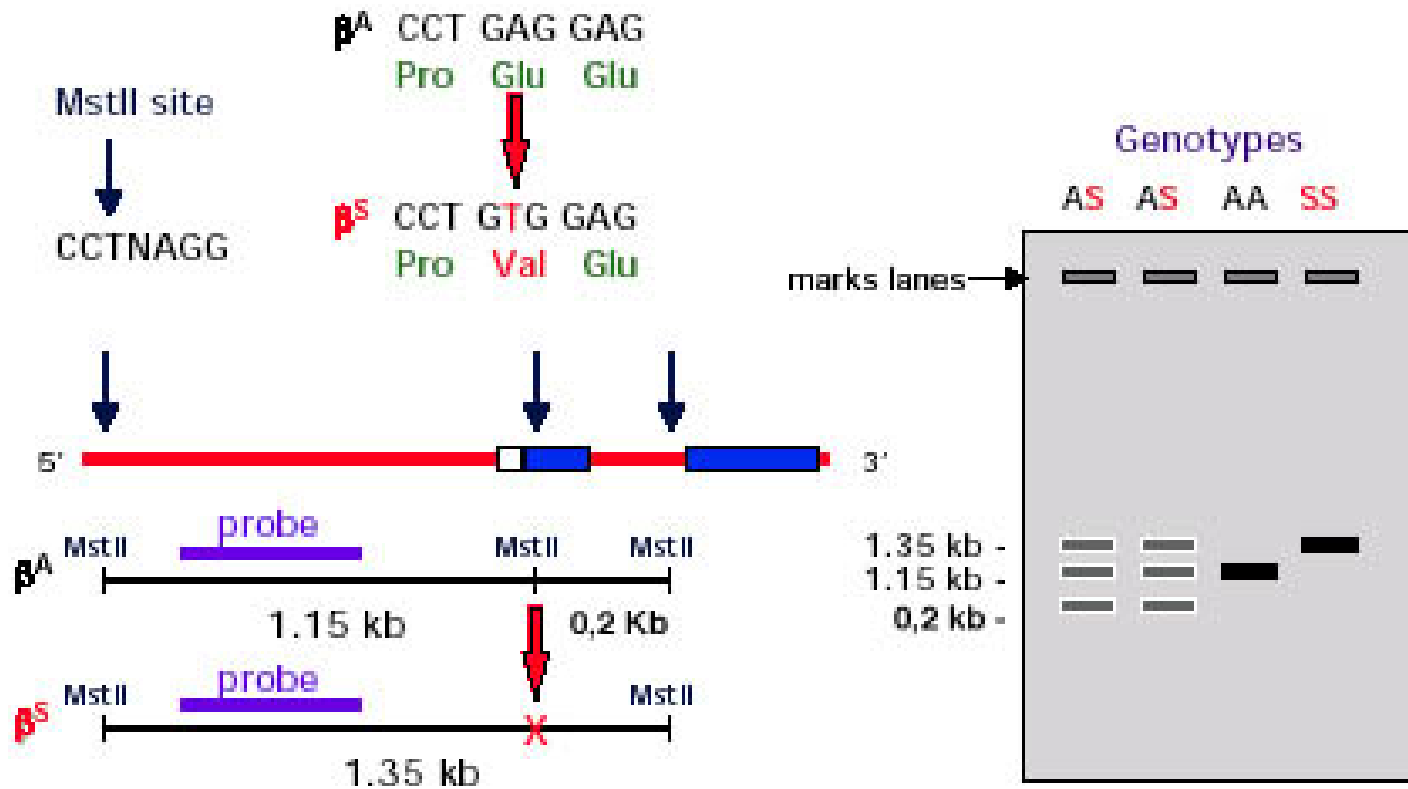
Polimorfismi del DNA

polimorfismi del DNA = differenze nella sequenza di DNA

–per definizione due o più alleli ad un locus la cui frequenza nella popolazione è >1%

Il termine **polimorfismo** viene esteso ai casi di cambiamento nella sequenza del DNA: negli RFLP per indicare differenze nelle lunghezze dei frammenti di restrizione causate da perdita o guadagno di siti di restrizione nel DNA, nelle delezioni o inserzioni di DNA, nelle ripetizioni di gruppi nucleotidici nei microsatelliti e minisatelliti, nelle ripetizioni di trinucleotidi, nelle mutazioni puntiformi (SNP), etc.

Diagnosi molecolare dell'anemia falciforme



la sonda non ibridizza con il frammento MstII di 0.2 Kb

Enzimi per manipolare gli acidi nucleici

Oltre agli enzimi di restrizione, nelle tecniche di biologia molecolare si usano altri enzimi, per la manipolazione del materiale genetico *in vitro*.

DNA ligasi

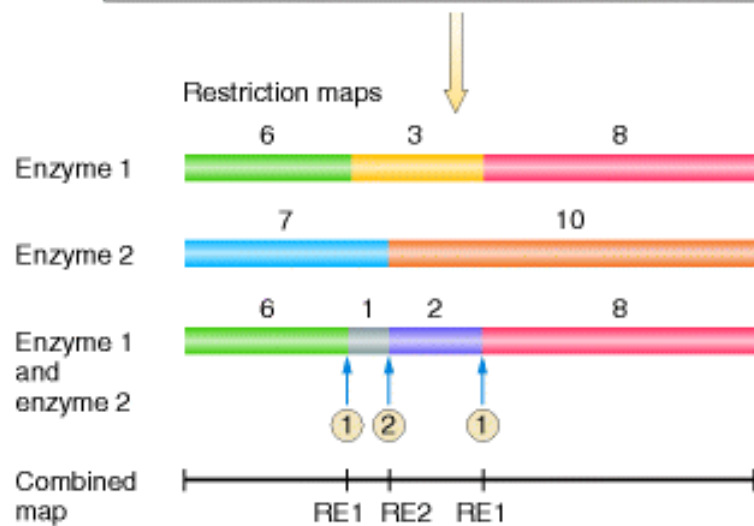
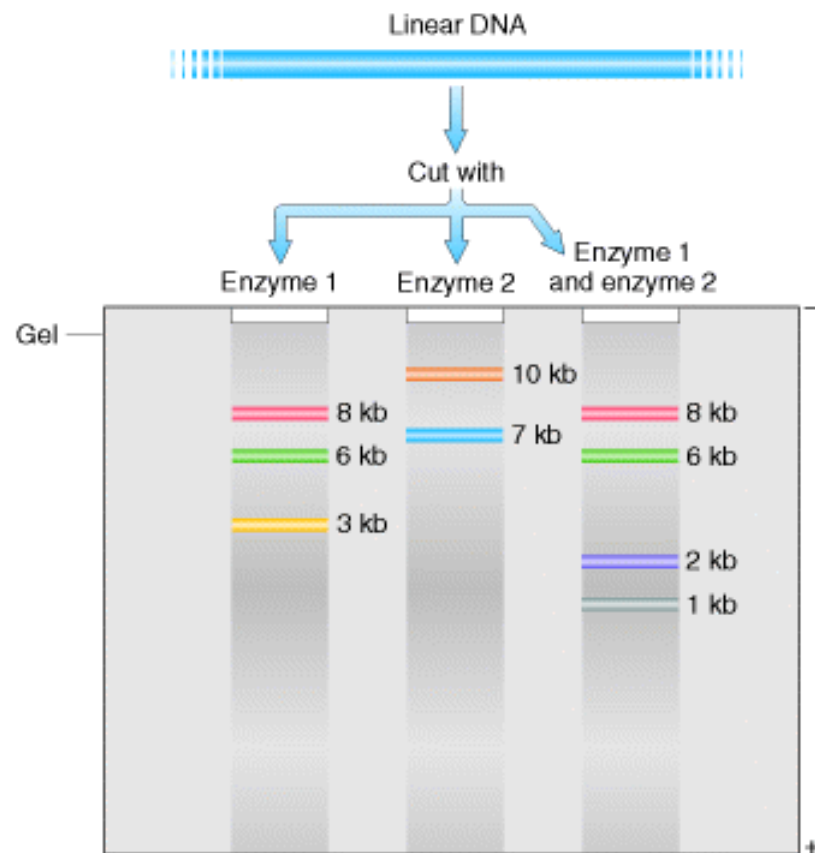
DNA Polimerasi

Nucleasi

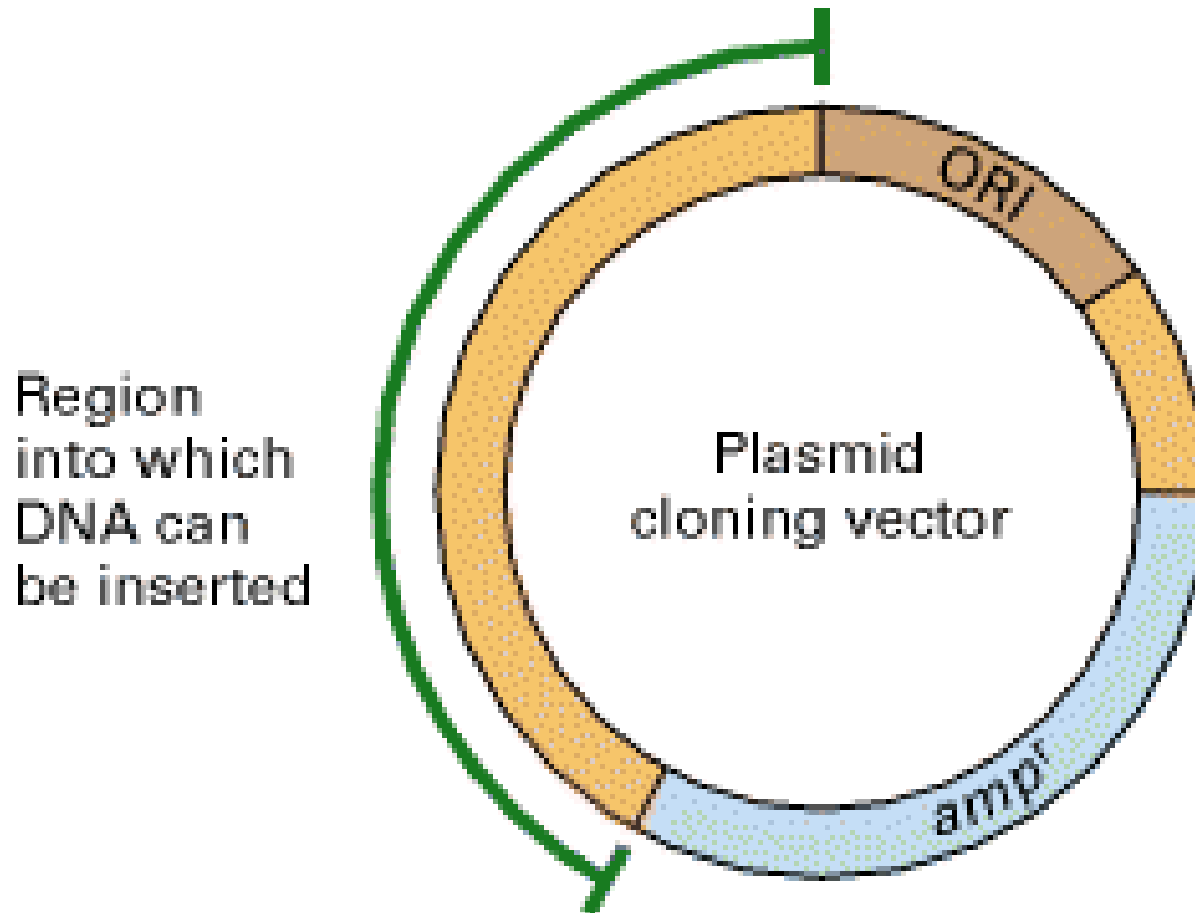
Metilasi

Chinasi

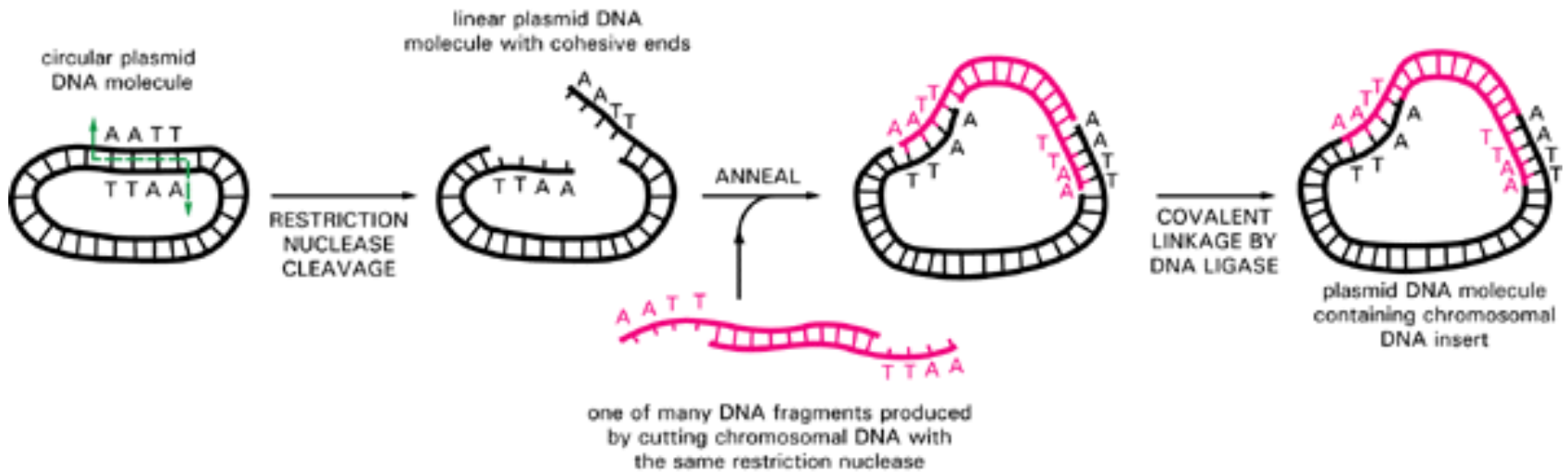
Fosfatasi



VETTORI DI CLONAGGIO



INSERIMENTO DI UN TRATTO DI DNA ESOGENO IN UN VETTORE DI CLONAGGIO



CLONAGGI MULTIPLI

