

Hasítás restriktív endonukleázal

A géntechnika egyik alap művelete a II. típusú restriktív endonukleázal végzett DNS hasítás. Ezekre az enzimekre az jellemző, hogy 4, 6 vagy 8 bázisnyi szekvenciát ismernek fel specifikusan, és az itt lévő utólagos metilézéstől függően (a megfelelő metilcsoport hiányába) vagy a felismerő helyen belül vagy attól néhány bázisnyira elhasítják a DNS molekulát. A hasítás történhet a két szálon ugyanott, ekkor un. tompa véget kapunk, és néhány (ált. 4) bázis távolságra, ilyenkor tapadós vég jön létre.

A gyakorlat során 6 bázis felismerési helyű, tapadós véget eredményező enzimeket fogunk használni. Ezeket leggyakrabban klónozáskor, a vektor kinyitására, illetve a klónozendó fragment kivágására, ezenkívül restriktív térképezésre használják.

A restriktív enzim neve annak a baktériumnak a nevéből ered, amelyikből izolálták. Például:

EcoRI – Az *Escherichia coli*-ből elsőként izolált restriktív enzim.

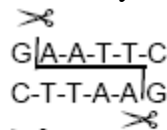
HindIII – A *Haemophilus influenzae*-ből harmadikként izolált restriktív enzim.

PstI – A *Providencia stuartii*-ből elsőként izolált restriktív enzim.

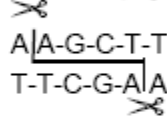
A felhasznált endonukleázok:

EcoRI

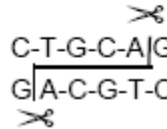
Hasítási hely:



HindIII



PstI



A gyakorlat során lambda fág DNS-t hasítunk három restriktív endonukleázal.

Az emésztés kivitelezése:

Eppendorf csőben összemérjük:

4 µl lambda DNS,

5 µl restriktív puffer,

1 µl restriktív enzim (EcoRI, HindIII vagy PstI).

Megjegyzés: a restriktív enzimek hőmérséklet érzékenyek, azért jégen kell tartani őket.

Készítünk egy enzim nélküli, hasítatlan lambda fágot tartalmazó kontrollt is:

4 µl lambda DNS,

6 µl puffer.

A csöveket 30 percig 37 °C-on inkubáljuk.

A reakció eredményét agaróz gél elektroforézissel vizsgáljuk.

A gél elektroforézishez a mintákhoz hozzáadunk 2 µl sample loading dye-t.

A Biorad cég által gyártott standard mintákból (EcoRI-gyel/HindIII-mal/PstI-gyel hasított lambda DNS) 10 µl-hez szintén hozzáadunk 2 µl sample loadnig dye-t. A standardokat a saját mintáink mellet megfuttatjuk.

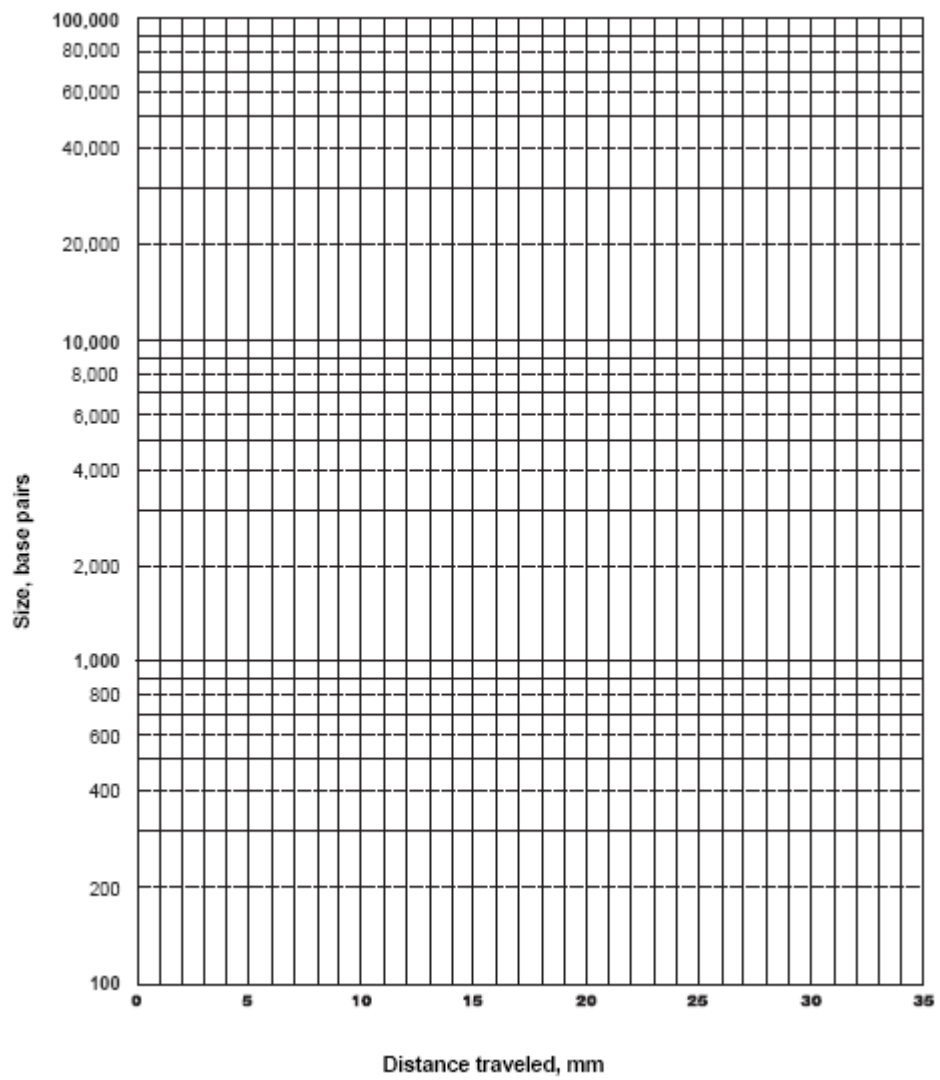
Opcionális: A gél elektroforézis előtt a mintákat 65 °C-on 5 percig inkubáljuk, majd jégre helyezzük. Ez a gélen a DNS fragmensek sávjainak jobb elkülönülését segíti elő.

Beadandó jegyzőkönyv:

- A felhasznált restrikciós endonukleáz neve.
- A felcseppentési terv és az elektroforézis eredménye rajzon.
- A hasítatlan kontroll, valamint a három standard minta (EcoRI-gyel/HindIII-mal/PstI-gyel hasított lambda DNS) és a saját minta fragmentumainak távolsága a kiindulástól.
- A DNS marker (HindIII-mal hasított lambda DNS) alapján becsült fragmentum méretek (saját minta, illetve kontroll és standardok).
- Az eredmények kiértékelése.

Mellékletek:

- Féllogaritmusos beosztású papír.
- A felhasznált restrikciós endonukleázok által létrehozott fragmentek pontos mérete



Uncut lambda DNA	<i>Pst</i> I lambda digest	<i>Eco</i> RI lambda digest	<i>Hind</i> III lambda digest
48,502 bp	11,497 bp	21,225 bp	23,129 bp
	5,077	7,421	9,416
	4,749	5,804	6,557
	4,507	5,643	4,361
	2,838	4,878	2,322
	2,559	3,530	2,027
	2,459		564
	2,443		125
	2,140		
	1,986		
	1,700		
	1,159		
	1,093		
	805		
	514		
	468		
	448		
	339		
	264		
	247		
	216		
	211		
	200		
	164		
	150		
	94		
	87		
	72		
	15		