

Enzimi di Restrizione

Origine e Funzione

- Sono **proteine** di origine batterica che tagliano il **DNA esogeno**
Sistema di difesa: **proteggono i batteri** dai batteriofagi danneggiandone il DNA
- I batteri proteggono il proprio DNA endogeno tramite la metilazione
- La nomenclatura segue l'organismo di origine
 - **Eco**RI da *Escherichia coli*
 - **Bam**HI da *Bacillus amyloliquefaciens*

Nucleasi

Le nucleasi sono enzimi che tagliano i legami sui filamenti degli acidi nucleici:

- Le **esonucleasi** aggrediscono una delle estremità libere del DNA e iniziano a tagliare proseguendo verso l'estremità opposta.
- Le **endonucleasi** invece tagliano i legami interni in una molecola di DNA lineare o circolare.

Classi

Gli enzimi di restrizione sono divisi in tre categorie:
endonucleasi di tipo I, II e III

- **Tipo I e III**

Necessitano di energia per il taglio e possono anche catalizzare altre reazioni di modificazione del Dna

- **Tipo I**

- Riconoscono seq di 3/4bp separate da 6/8bp non specifici
- Provocano tagli casuali sul DNA

- **Tipo III**

- Riconoscono seq di 5/6bp ma tagliano fino a 25bp di distanza
- Endonucleasi e metilasi sono sullo stesso enzima

Non sono utili per la tecnica del DNA ricombinante o per la discriminazione allelica

- **Tipo II**

- Tagliano il DNA all'interno di particolari e specifiche sequenze di riconoscimento. Riconoscono sequenze simmetriche "leggendo" in direzione 5' → 3' entrambe le emieliche: Sequenze Palindromiche.

(Palindromo = dal greco: palin [= indietro] dromw [= corro]) è un verso che, letto da sinistra o da destra, ha lo stesso significato.

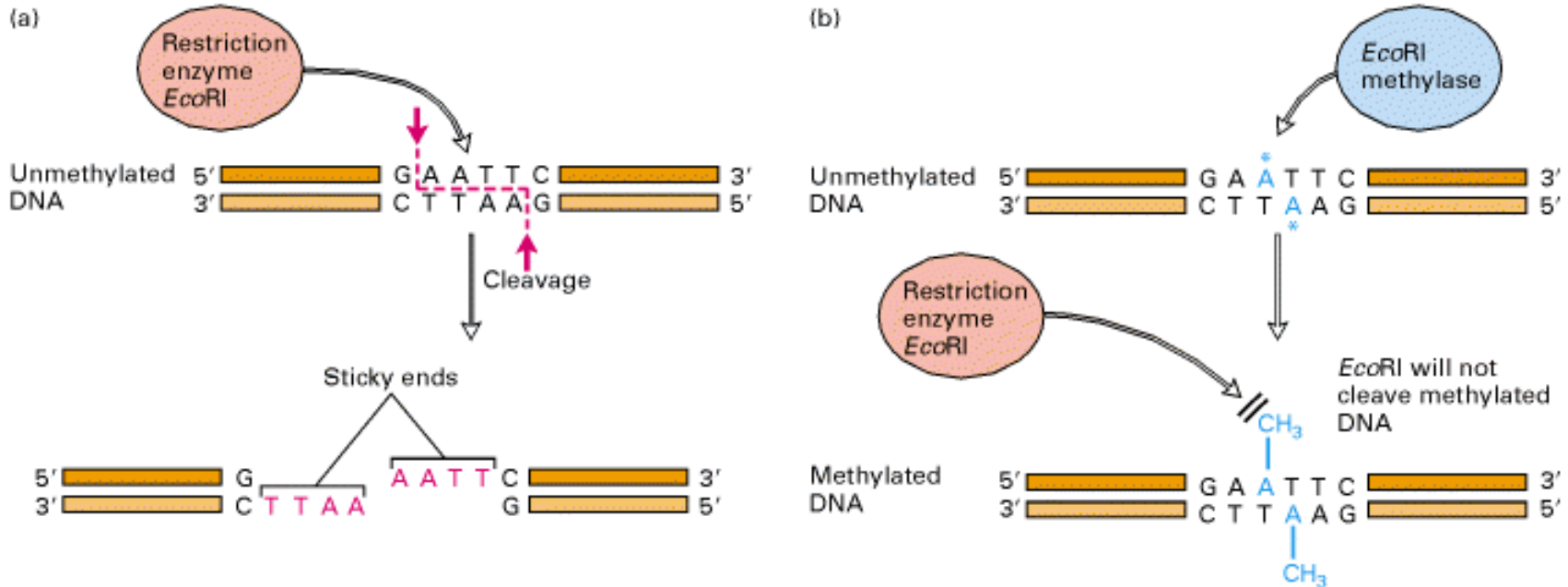
Ad esempio parole come: AMA, ORO, ANNA,

...alcune frasi: ARTE TETRA, AI LATI D'ITALIA, ...A MAN A PLAN A CANAL PANAMA

- Alcuni enzimi generano estremità piatte tagliando a metà della sequenza di riconoscimento Altri generano estremità sporgenti
- Sono possibili ponti di idrogeno con estremità sporgenti compatibili

Largamente usati per le tecniche di biologia molecolare

Come si proteggono I batteri dalle proprie Endonucleasi?



Nello stesso batterio ad ogni Endonucleasi di Restrizione corrisponde una metilasi che riconosce la stessa sequenza

Disponibilità

- Ci sono più di 200 enzimi disponibili estratti e commercializzati da compagnie biotecnologiche.

Sono isolati da batteri "wild Type" o da batteri ricombinanti

Nomenclatura

Esempi:

- EcoRI

- E = Escherichia genere
- co = coli specie
- R = strain RY12 ceppo
- I = numero romano = primo enzima isolato etc..

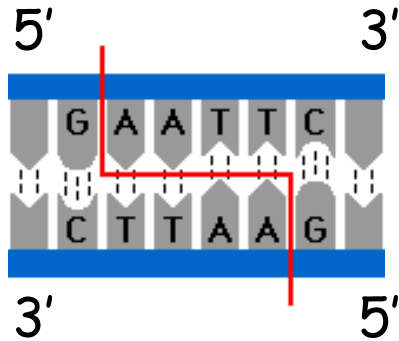
Sito di riconoscimento

- Generalmente di 4, 6, 8, 10 paia di basi
- Gran parte dei siti (ma non tutti) sono palindromi. Le endonucleasi di restrizione leggono allo stesso sulle due emieliche in direzione 5'--->3'

Table 4.1 Recognition sequences of some restriction endonucleases

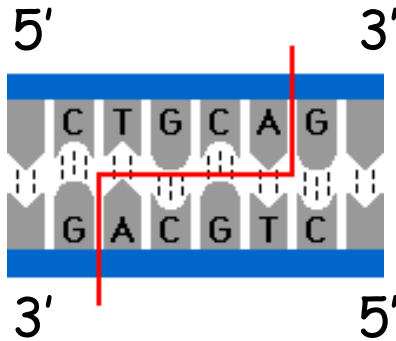
Enzyme	Recognition site	Type of cut end
<i>EcoRI</i>	G [↓] A—A—T—T—C C—T—T—A—A [↑] G	5'-phosphate extension
<i>BamHI</i>	G [↓] G—A—T—C—C C—C—T—A—G [↑] G	5'-phosphate extension
<i>PstI</i>	C—T—G—C—A [↓] G G [↑] A—C—G—T—C	3'-hydroxyl extension
<i>Sau3AI</i>	[↓] G—A—T—C C—T—A—G [↑]	5'-phosphate extension
<i>PvuII</i>	C—A—G [↓] C—T—G G—T—C [↑] G—A—C	Blunt end
<i>HpaI</i>	G—T—T [↓] A—A—C C—A—A [↑] T—T—G	Blunt end
<i>HaeIII</i>	G—G [↓] C—C C—C [↑] G—G	Blunt end
<i>NotI</i>	G [↓] C—G—G—C—C—G—C C—G—C—C—G—G—C [↑] G	5'-phosphate extension

Tipo di estremità generata



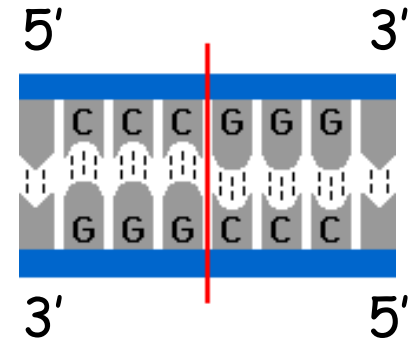
Eco RI

Estremità sporgenti 5'



Pst I

Estremità sporgenti in 3'



Sma I

Estremità piatte

Le estremità sporgenti sono coesive poichè l'ER taglia fra le stesse basi anche su filamenti diversi che quindi si possono poi appaiare tramite legami a ponte di idrogeno

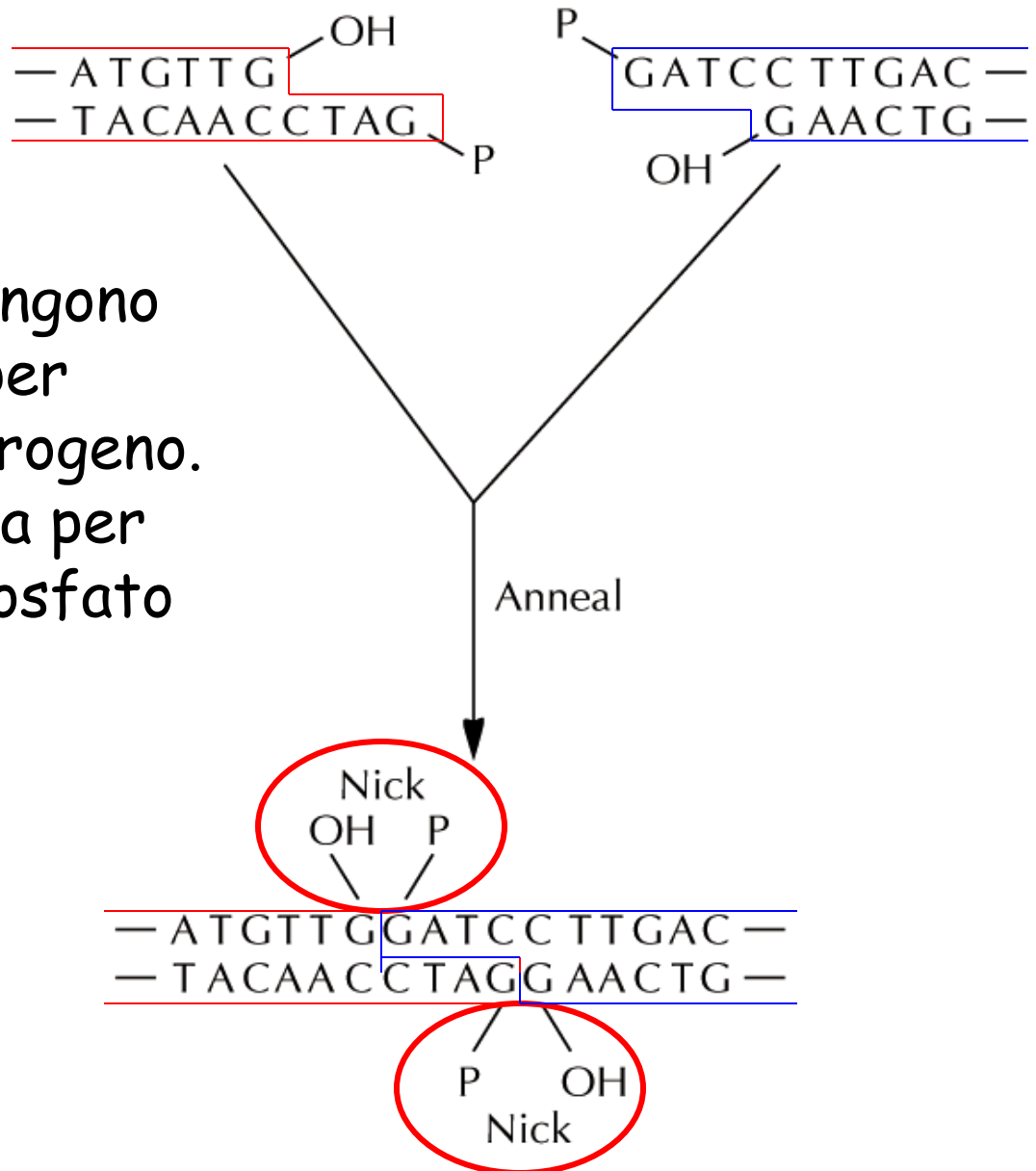
Usi in Biologia Molecolare

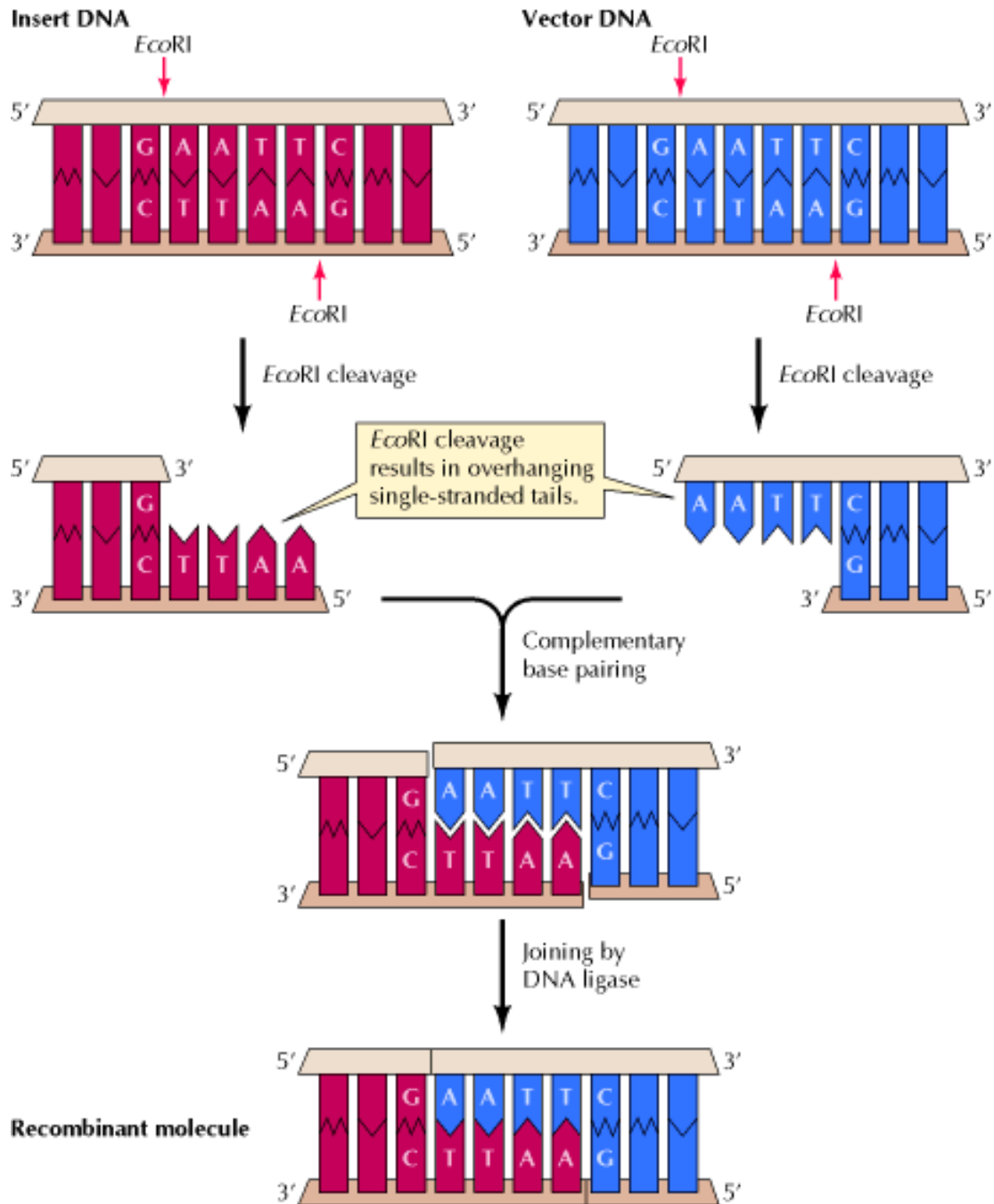
- Principalmente sono due gli usi degli ER:
 - **Tecniche di DNA ricombinante**, per tagliare e legare frammenti di DNA anche provenienti da organismi diversi
 - **Diagnosi di mutazioni o polimorfismi**

DNA ricombinante

Es. BamHI

Le eliche di DNA rimangono attaccate solamente per l'effetto dei legami idrogeno. Servirà un'altro enzima per saldare lo scheletro fosfato in modo covalente





Diagnosi

Polimorfismo a singolo nucleotide

Un polimorfismo a singolo nucleotide (spesso definito in inglese *Single Nucleotide Polymorphism* o **SNP**, pronunciato *snip*) è una variazione a carico di un unico **nucleotide** che si presenta tra individui della stessa specie

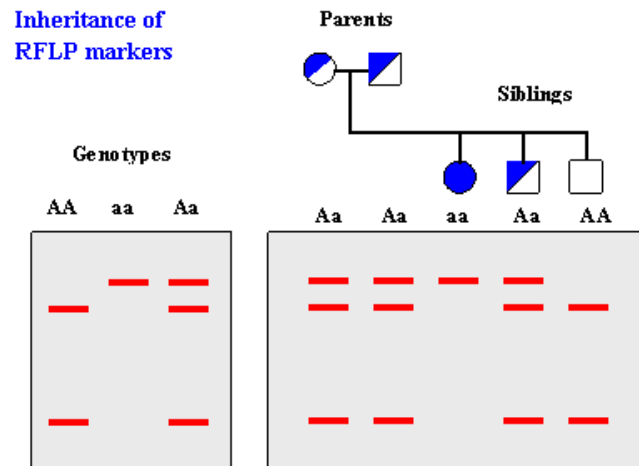
Diagnosi

Polimorfismo a singolo nucleotide

Un polimorfismo a singolo nucleotide (spesso definito in inglese *Single Nucleotide Polymorphism* o **SNP**, pronunciato *snip*) è una variazione a carico di un unico **nucleotide** che si presenta tra individui della stessa specie

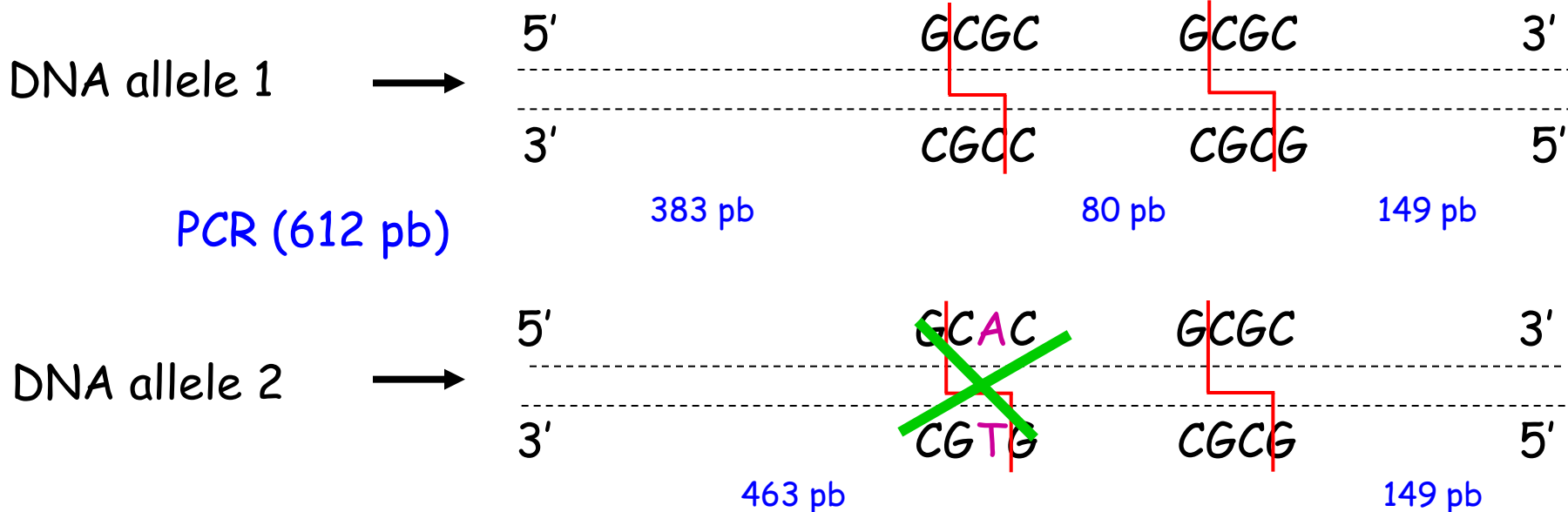
Individuazione degli SNPs

Un metodo utile per individuare gli SNPs è la valutazione dei cosiddetti **restriction fragment length polymorphisms** (*polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione*, o RFLP). Se un **allele** contiene un sito di riconoscimento per un **enzima di restrizione** ed un altro no, la digestione dei due alleli genererà due frammenti di dimensione differente.



Diagnosi

Digestione

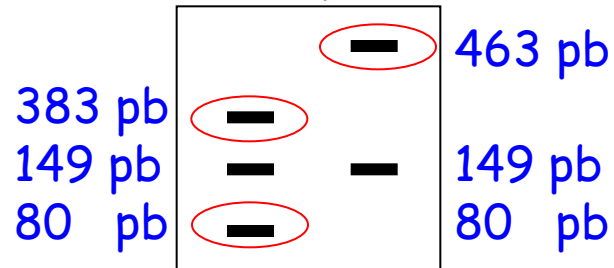


Separazione dei Frammetti su gel

Allele 1

Allele 2 (mutato)

Elettroforesi



Frammenti diagnostici