

ENDONUCLEAZE DE RESTRICTIE

Definitie

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.

Restriction enzymes are a group of enzymes that can cut double-stranded DNA molecules into smaller restriction fragments. The enzymes work by cleaving the bonds in the phosphate backbone of the DNA molecule. These bonds can be reformed by ligase enzymes and in this manner restriction fragments with different origin can be spliced together in novel ways.

Clasificare

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.

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 *BglI* și *BglII*.

	Tip II	TipIII	TipI
Structura proteica	Metilaze și endonucleaze distincte	Enzima bifuncțională care conține 2 subunități	Enzima bifuncțională careconține 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 fața de situsul de recunoaștere	Nespecific, la mai mult de1000 pb de situsul de recunoaștere
Restricție și metilare	Reacții separate	Simultane	Exclusive

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.

ER 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:

5'-G-A-A-T-T-C-3'

3'-C-T-T-A-A-G-5'

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:

5'-G-3'

5'-A-A-T-T-C-3'

3'-C-T-T-A-A-5'

3'-G-5'

În mod similar, multe alte enzime de restricție generează fragmente cu capete 5' coezive; altele (ex: *PstI*) 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

5'-T-G-G-C-C-A-3'

3'-A-C-C-G-G-T-5'

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

5'-T-G-G-3'

5'-C-C-A-3'

3'-A-C-C-5'

3'-G-G-T-5'

enzimele de restricție de tip II pot fi împărțite în 2 subfamii, 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 subfamii diferite.

Some examples of Type II restriction endonucleases

Restriction endonucleases are used by bacteria to recognize foreign DNA and destroy (restrict) it by introducing double-stranded cuts at characteristic **palindromic recognition sites**. They are typically named after the bacterial species from which they were first isolated. For

example, *EcoRI* was the (I)st (R)estriction endonuclease isolated from *E. coli*. *Eco* + *R* + *I*. Most endonucleases used in molecular biology recognize **four or six base sites** ("four-cutters" and "six-cutters"); some have ten-base sites, and are called "*long cutters*" because the interval between sites is much greater.

A palindrome is a word or phrase that reads the same forward or backward: "Able was I ere I saw Elba", "Madame I'm Adam," or the Finnish word for a soap seller, "Saippukauppias". DNA palindromes read the same forward and backward when both strands are considered. In the first example above, the recognition site of *EcoRI* is **5'-GAATTC-3'**, so the paired strand is **3'-CTTAAG-5'**: the double-stranded 6 bp sequence will therefore read the same in either direction.

Enzima

12-1 TABLE Recognition, Cleavage, and Modification Sites of Various Restriction Enzymes			Note: An asterisk (*) is commonly used to indicate methylation sites, but an "m" is used here to prevent confusion with radioactive labeling.		
Enzyme	Source organism	Restriction site in double-stranded DNA	Enzyme	Source organism	Restriction site in double-stranded DNA
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	5' -G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G- 3' ↓ m m ↑	<i>HpaII</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	5' -C-C-G-G- -G-G-C-C- 3' ↓ ↓
<i>EcoRII</i>	<i>E. coli</i>	5' -G-C-C-T-T-G-G-C- -C-G-G-A-A-C-C-G- 3' ↓ m m ↑	<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	5' -C-T-G-C-A-G- -G-A-C-G-T-C- 3' ↓ ↓
<i>HindII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	5' -G-T-Py-Pu-A-A-C- -C-A-Pu-Py-T-T-G- 3' ↓ m m ↑	<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	5' -C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C- 3' ↓ ↓
<i>HindIII</i>	<i>H. influenzae</i>	5' -A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A- 3' ↓ m m ↑	<i>BamI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5' -G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G- 3' ↓ ↓
<i>HaeIII</i>	<i>H. aegyptius</i>	5' -G-G-C-C- -C-C-G-G- 3' ↓ ↓	<i>BglII</i>	<i>B. globiggi</i>	5' -A-G-A-T-C-T- -T-C-T-A-G-A- 3' ↓ ↓

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 aceeași poziții se numesc izoschizomere; spre exemplu, secvența

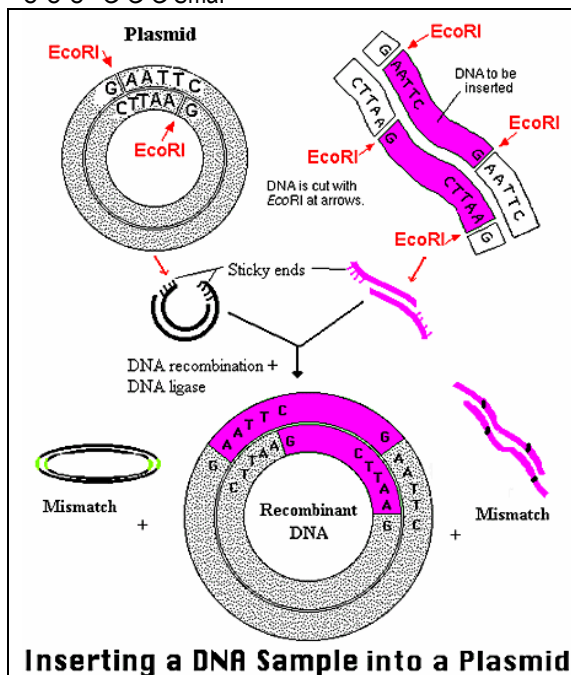
^AG-A-T-C

este recunoscută de enzimele *MboI* 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:

C^A-C-C-G-G-G *XmaI*

C-C-C^A-G-G-G *SmaI*



A piece of target DNA can be inserted into a plasmid if both the circular plasmid and the target DNA have been cleaved by the same restriction nuclease in such a way as to create sticky ends. The newly created recombinant molecule is stabilized with the DNA ligase enzyme which repairs nicks in the backbone of the DNA molecule.