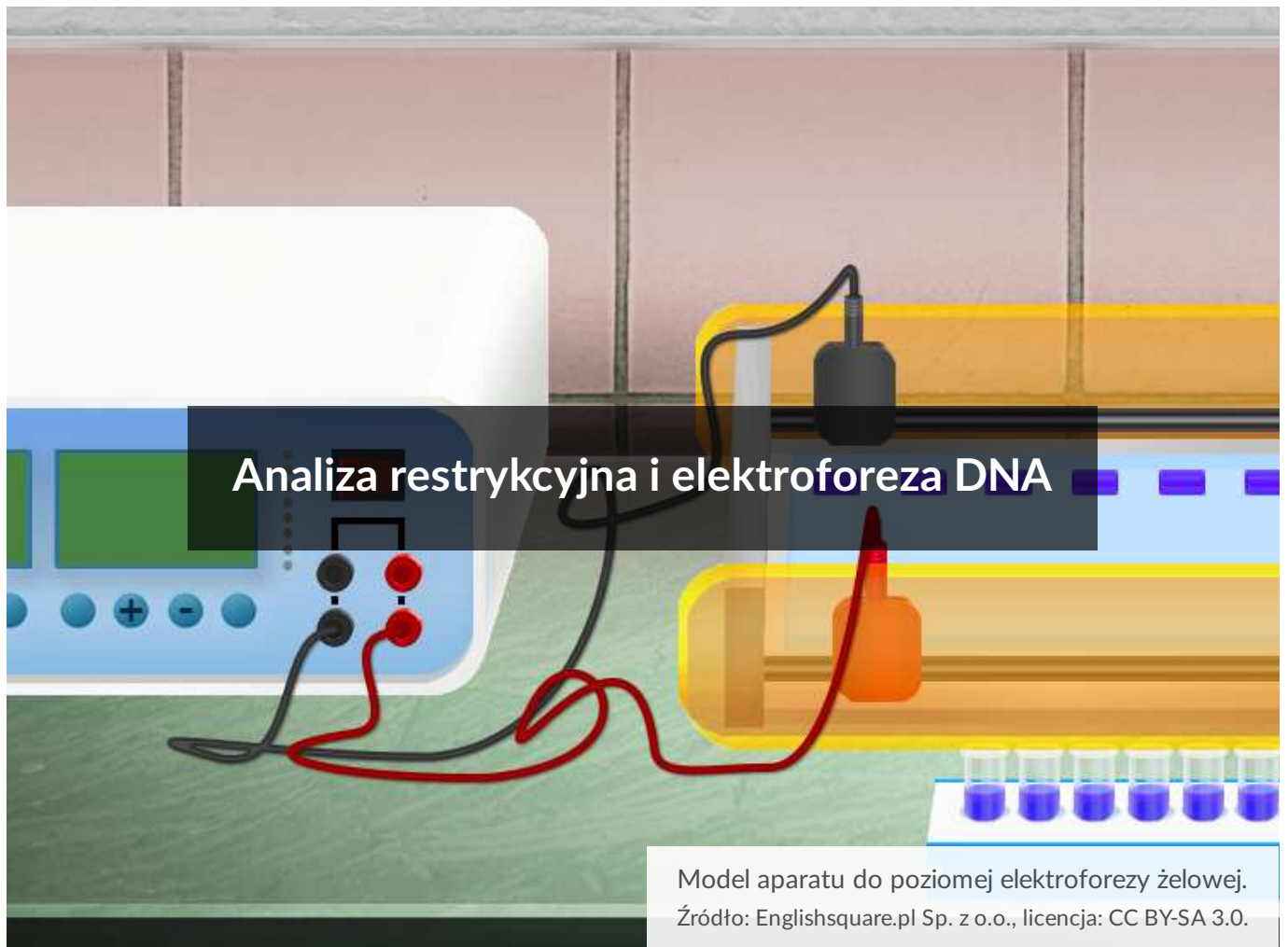


Analiza restrykcyjna i elektroforeza DNA

- Wprowadzenie
- Przeczytaj
- Wirtualne laboratorium (WL-I)
- Sprawdź się
- Dla nauczyciela



Enzymy restrykcyjne (restryktazy) występują u bakterii, gdzie zapobiegają włączeniu DNA bakteriofaga do ich DNA genomowego. Odkrycie i wyizolowanie restryktaz, a także poznanie specyfiki ich działania, pozwoliło na rozwój biotechnologii i biologii molekularnej. W jaki sposób wykorzystywana jest aktywność enzymów restrykcyjnych w warunkach laboratoryjnych?

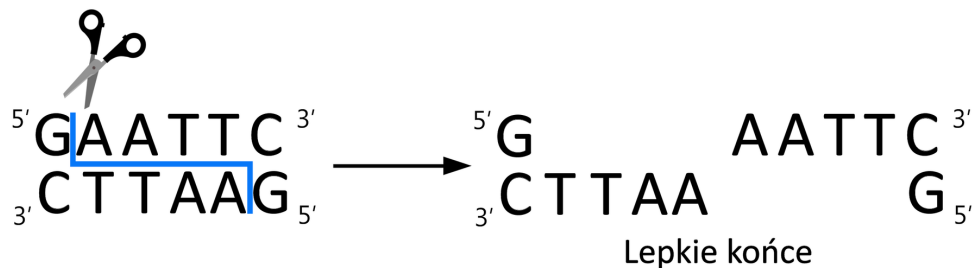
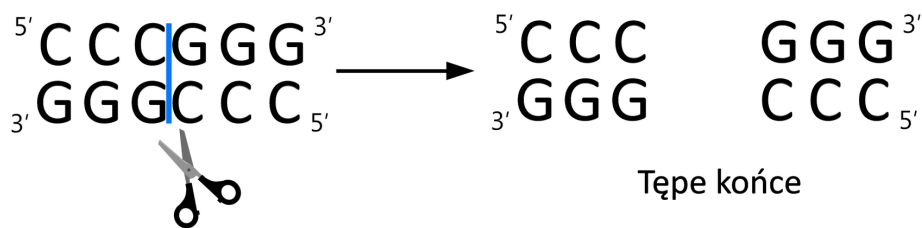
Twoje cele

- Wyjaśnisz mechanizm działania enzymów restrykcyjnych.
- Przedstawisz istotę analizy restrykcyjnej i elektroforezy DNA.
- Opiszysz warunki i przebieg elektroforezy DNA.
- Wykonasz doświadczenie polegające na analizie restrykcyjnej i obserwacji produktów rozdziału elektroforetycznego uzyskanych fragmentów restrykcyjnych.

Przeczytaj

Enzymy restrykcyjne

Enzymy restrykcyjne (restryktazy) są enzymami należącymi do [endonukleaz](#). Rozpoznają one specyficzne sekwencje DNA długości od kilku do kilkunastu nukleotydów (zwykle 4–8 pz). Zazwyczaj są to **sekwencje palindromowe**, czyli takie same, gdy odczytuje się je na obu niciach w kierunku od 5' do 3'. Rozpoznanie sekwencji charakterystycznej dla danego enzymu powoduje hydrolizę **wiązań fosfodiestrowych**, najczęściej w obrębie sekwencji rozpoznawanej przez enzym. Powstałe fragmenty restrykcyjne DNA mogą być zakończone [lepкими](#) bądź [tępyми](#) końcami, w zależności od rodzaju enzymu. Duża liczba różnych enzymów restrykcyjnych oraz ich specyficzność w rozpoznawaniu określonych sekwencji DNA pozwalają na wykorzystanie ich działania w procesach inżynierii genetycznej.



Przecięcie DNA enzymami restrykcyjnymi może dawać w rezultacie tzw. **tępe końce**, gdy zachodzi w naprzeciwległych miejscach obu nici DNA, albo tzw. **lepkie końce**, gdy zachodzi w obu niciach

w miejscach przesuniętych względem siebie o kilka nukleotydów. Sekwencja rozpoznawana przez restryktazy składa się zwykle z 4–8 par zasad.

Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o. o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Znanych jest ponad 1000 enzymów restrykcyjnych. Nazwy restryktaz wykorzystywanych w laboratoriach składają się z dwóch lub trzech członów. Pierwszy z nich zawiera trzyliterowy symbol informujący o gatunku bakterii, z której enzym został wyizolowany. Kolejny człon, czyli dodatkowa wielka litera, oznacza szczep bakterii, natomiast ostatni człon to cyfra rzymska określająca serię, np.:

- **EcoRI** – pierwszy enzym wyizolowany z *Escherichia coli* szczepu R;
- **BamHI** – pierwszy enzym wyizolowany z *Bacillus amyloliquefaciens* szczepu H.

Enzymy restrykcyjne dzieli się na kilka klas, ze względu na miejsce cięcia sekwencji DNA oraz niezbędne [kofaktory](#):

- **klasa I** - dokonują cięcia w odległości nawet 1000 pz (par zasad) od rozpoznawanej sekwencji; kofaktorami w reakcji są m. in. ATP, jony magnezu (Mg^{2+}) oraz [S-adenozylometionina](#);
- **klasa II** - przecinają dwuniciowy DNA w obrębie rozpoznawanej sekwencji palindromowej; kofaktorem enzymów tej klasy są jony magnezu (Mg^{2+});
- **klasa III** - hydrolizują wiązania w tylko jednej nici DNA w odległości do 25 nukleotydów od specyficznej sekwencji; wymagane kofaktory to ATP i jony magnezu (Mg^{2+}); S-adenozylometionina wzmacnia aktywność enzymów tej klasy.

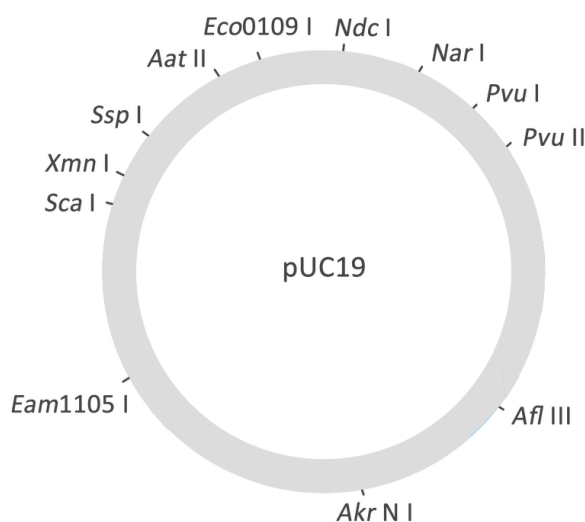
Najczęściej używanymi enzymami restrykcyjnymi w biologii molekularnej są enzymy klasy II, ze względu na fakt przecinania DNA w obrębie rozpoznawanej przez nie sekwencji palindromowej. Dzięki temu możliwe jest obliczenie wielkości powstałego po cięciu produktu i jego identyfikacja.

Więcej informacji o enzymach restrykcyjnych znajdziesz w materiale: [Enzymy stosowane w biotechnologii molekularnej](#).

Wykorzystanie enzymów restrykcyjnych

Dzięki obecności miejsc restrykcyjnych możliwe jest np. wprowadzanie do **wektora** genów pochodzących od innych organizmów na drodze **rekombinacji homologicznej**. Proces ten opiera się na działaniu restryktaz dokonujących cięcia DNA oraz ligazy, która łączy wolne końce powstałych cząsteczek. Znajomość specyficzności danego enzymu restrykcyjnego pozwala na zaprojektowanie fragmentów DNA w taki sposób, aby możliwe było połączenie **wstawki** z wektorem (np. plazmidem).

Aby ułatwić wprowadzanie modyfikacji genetycznych, tworzone są **mapy restrykcyjne** plazmidów, które wskazują ułożenie miejsc na cząsteczce ciętych przez różne enzymy restrykcyjne. Dzięki nim planując doświadczenie, można dobrać enzym, który rozpoznaje sekwencje obecne w plazmidzie oraz określić, w jakim miejscu plazmid zostanie przecięty.



Mapa restrykcyjna plazmidu pUC19, posiadającego 2686 par zasad. Oznaczenia, takie jak *Eam1105 I*, *Akr N I*, to miejsca cięcia dla poszczególnych enzymów restrykcyjnych.

Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Aby wprowadzić do plazmidu pożądaną DNA należy zastosować te same enzymy, których użyto do trawienia wstawki. Dzięki obecności lepkich końców o takiej samej sekwencji w obu fragmentach możliwe jest połączenie ich za pomocą ligazy DNA. Następnie plazmidy można namnożyć w komórkach bakteryjnych w celu uzyskania większej ilości kopii.

Ważne!

Wydajność ligacji jest o wiele większa w przypadku lepkich końców, ponieważ mogą one łączyć się wiązaniami wodorowymi z komplementarnymi jednoniciowymi końcami innych cząsteczek DNA.

Aby gen ze wstawki ulegał ekspresji, musi ona zostać wbudowana w odpowiedniej orientacji, tak aby sekwencja genu znajdowała się za promotorem bakteryjnym, w orientacji 5'–3' na nici kodującej i kończyła sygnałem prowadzącym do terminacji transkrypcji. Jednak ponieważ lepkie końce na obu stronach wstawki są takie same, dlatego może ona zostać połączona z plazmidem w odwrotnej orientacji do zamierzonej. W takim przypadku sekwencja genu byłaby odczytywana „od tyłu”, przez co nie uległby on ekspresji.

Więcej o plazmidach znajdziesz w e-materiałach:

- [Wektory genetyczne](#);
- [Klonowanie DNA](#).

Analiza restrykcyjna

Aby sprawdzić, czy zaszła ligacja wstawianego genu z plazmidem, oraz w jakiej orientacji został wstawiony gen, dokonywana jest **analiza restrykcyjna**. Technika ta pozwala na identyfikację fragmentów powstających po cięciu enzymem restrykcyjnym na podstawie ich wielkości.

Analizę restrykcyjną przeprowadza się poprzez poddanie plazmidów trawieniu restrykcyjnemu. Trawienie restrykcyjne zachodzi w środowisku wodnym z buforem, który zapewnia niezbędne warunki reakcji. Czas reakcji zależy od rodzaju enzymu i wielkości materiału poddawanego trawieniu. Użyte w reakcji enzymy powinny trawić wstawkę, a następnie plazmid. Po trawieniu przeprowadza się ligację wstawki z plazmidem. Na podstawie długości powstałych po trawieniu fragmentów można odróżnić plazmid zawierający wstawkę od tego, który nie został połączony z żadnym fragmentem DNA.

Kolejnym krokiem w analizie restrykcyjnej jest **wizualizacja produktów trawienia**. Dokonuje się jej na drodze elektroforezy.

Elektroforeza DNA

Elektroforeza to metoda polegająca na poruszaniu się naładowanych cząstek pod wpływem pola elektrycznego. Cząstki mające na swojej powierzchni ładunek dodatni dążą do elektrody ujemnej (**katody**), mające zaś ładunek ujemny – do elektrody dodatniej (**anody**).

W DNA obecne są grupy fosforanowe, przez co ma on ładunek ujemny. Dzięki temu wszystkie cząsteczki tego kwasu nukleinowego migrują w stronę dodatniego bieguna pola elektrycznego, a szybkość migracji zależy od wielkości cząsteczek – im mniejsza (krótsza) cząsteczka DNA lub RNA, tym szybciej przesuwa się w stronę elektrody dodatniej.

Elektroforeza żelowa pozwala na rozdzielenie kwasów nukleinowych w porowatym żelu. **Żel** to galaretowata substancja, która składa się z agarozy lub poliakrylamidu. Wylewa się go cienką warstwą do szklanego pojemnika. Działa on jak sito, umożliwiając separację cząsteczek. Są w nim wydrążone **studzienki**, w których umieszcza się próbki, np. zawierające plazmidy po trawieniu restrykcyjnym. Oprócz badanych próbek na żelu umieszcza się również mieszaninę fragmentów DNA o znanej wielkości, tzw. **marker masy** nazywany też **drabinką** (ang. *ladder*).

Żel umieszcza się w **aparacie do elektroforezy** wypełnionym **buforem**. Następnie poddaje się go działaniu **poła elektrycznego**. Pod jego wpływem fragmenty kwasów nukleinowych o różnej wielkości przemieszczają się od katody w stronę anody z różną szybkością. Mniejsze cząsteczki migrują szybciej, gdyż łatwiej przeciskają się w sieci żelu, natomiast cząsteczki, które są większe od porów, są prawie nieruchome. Dodatek odpowiedniego **barwnika** pozwala na obserwację tempa migracji próbek w żelu. Elektroforeza prowadzona jest pod napięciem 100–120 V przez ok. 20–30 min.

Schemat aparatu do elektroforezy. Kwasy nukleinowe mają ładunek ujemny, dlatego będą wędrować w kierunku anody.

Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Przebieg elektroforezy.

Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Po zakończonej elektroforezie żel analizuje się w świetle UV. Rozdzielone fragmenty widoczne są w postaci **prążków** dzięki świeceniu barwników [fluorescencyjnych](#) wiążących się z DNA.

Liczba prążków świadczy o tym, ile miejsc restrykcyjnych zostało rozpoznanych przez enzymy restrykcyjne w danej cząsteczce DNA.

Wielkość fragmentów DNA określa się na podstawie porównania ich szybkości migracji w żelu (na podstawie pozycji odpowiednich prążków) z szybkością migracji fragmentów DNA o znanej długości (pozycje prążków z drabinki).

Wizualizacja fragmentów DNA; pz przy liczbach w drabince wskazuje, ile par zasad znajduje się w danym fragmencie DNA.

Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Elektroforezę DNA stosuje się m.in. w biologii molekularnej, farmakologii, medycynie sądowej, weterynarii, diagnostyce medycznej oraz kontroli jakości żywności. Wykorzystywana może być także w kryminalistyce do identyfikowania osób

podejrzanych o popełnienie przestępstwa. Wówczas próbkę zebraną z miejsca przestępstwa oraz próbki uzyskane od osób podejrzanych nakłada się na żel. Po zakończonej elektroforezie należy je porównać. Jeśli układ prążków w danej próbce jest taki sam jak w próbce pobranej z miejsca przestępstwa, dana osoba najprawdopodobniej jest winna.

Słownik

elektroforeza

jedno ze zjawisk elektrokinetycznych polegające na poruszaniu się naładowanych cząsteczek pod wpływem pola elektrycznego; cząsteczki mające na swojej powierzchni ładunek dodatni dążą do elektrody ujemnej, natomiast obdarzone ładunkiem ujemnym – do elektrody dodatniej; jest to także technika rozdziału cząsteczek pod wpływem pola elektrycznego dzięki różnicom w masie i/lub ładunku

endonukleazy

grupa enzymów należąca do hydrolaz – enzymów katalizujących cięcie cząsteczek kwasów nukleinowych

fluorescencja

zjawisko polegające na emitowaniu światła przez wzbudzony atom lub cząsteczkę, spowodowane wzbudzeniem przez pochłonięcie światła lub innego promieniowania elektromagnetycznego

kofaktory

grupa związków chemicznych potrzebnych enzymom do katalizowania reakcji chemicznych; kofaktory nieorganiczne to m.in. jony metali; kofaktory organiczne to np. witaminy

lepkie końce

powstające po trawieniu restrykcyjnym jednoniciowe końce dwuniciowych cząsteczek DNA, które są komplementarne do innego jednoniciowego odcinka na końcu drugiej cząsteczki DNA

rekombinacja homologiczna

procesy prowadzące do powstania nowych genotypów, w wyniku niezależnej segregacji genów leżących na różnych chromosomach oraz zmiany w obrębie nici DNA

S-adenozylometionina

pochozna adenozyiny i metioniny, u człowieka jest głównym substratem w procesach metylacji, czyli przyłączania grup metylowych

tępe końce

powstające po trawieniu restrykcyjnym dwuniciowe zakończenie fragmentu DNA

wektor

niewielka cząsteczka DNA zdolna do replikacji w komórce biorcy; podstawowe narzędzie inżynierii genetycznej; może zostać zrekombinowana przez włącznie do niej fragmentu innej cząsteczki DNA, który po wprowadzeniu do komórek gospodarza będzie w nich powielany i poddawany ekspresji; do komórek ssaków wektory można wprowadzać za pośrednictwem wirusów

wstawka

fragment DNA włączony np. do plazmidu dzięki technikom inżynierii genetycznej

Wirtualne laboratorium (WL-I)

Laboratorium 1

Przeprowadź doświadczenie w wirtualnym laboratorium biotechnologicznym. Rozwiąż problem badawczy i zweryfikuj hipotezę. W formularzu zapisz swoje obserwacje, sformułuj wnioski i zweryfikuj hipotezy.

W celu produkcji białka X stworzono wstawkę z genem tego białka zakończoną lepkiemi końcami. Przeprowadzono ligację wstawkę z plazmidem (wektorem) w miejscu rozpoznawanym przez enzym HindIII. Ligacja może dawać trzy różne rezultaty:

- brak wbudowania wstawkę,
- wstawkę wbudowaną w prawidłowej orientacji,
- wstawkę wbudowaną w odwrotnej orientacji (nie ulega ekspresji).

Plazmidy namnożono w koloniach bakteryjnych, a następnie wyizolowano, otrzymując 5 próbek zawierających wyizolowane plazmidy (po jednej próbce z każdej kolonii bakteryjnej). W celu przeprowadzania analizy restrykcyjnej próbki trawiono enzymem PvuI. Na podstawie długości powstałych fragmentów można wnioskować o wyniku ligacji.

Możliwe rezultaty ligacji genu białka X z plazmidem pUC19. Na schematach zaznaczono miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne HindIII i PvuI oraz odległości między nimi wyrażone w pz.

Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Problem badawczy: Które plazmidy po ligacji zawierają wstawkę w odpowiedniej orientacji?

Hipoteza 1: Wszystkie plazmidy zawierają prawidłowo wbudowane wstawkę.

Hipoteza 2: Wstawkę została prawidłowo wbudowana tylko w niektóre plazmidy.

Materiał biologiczny:

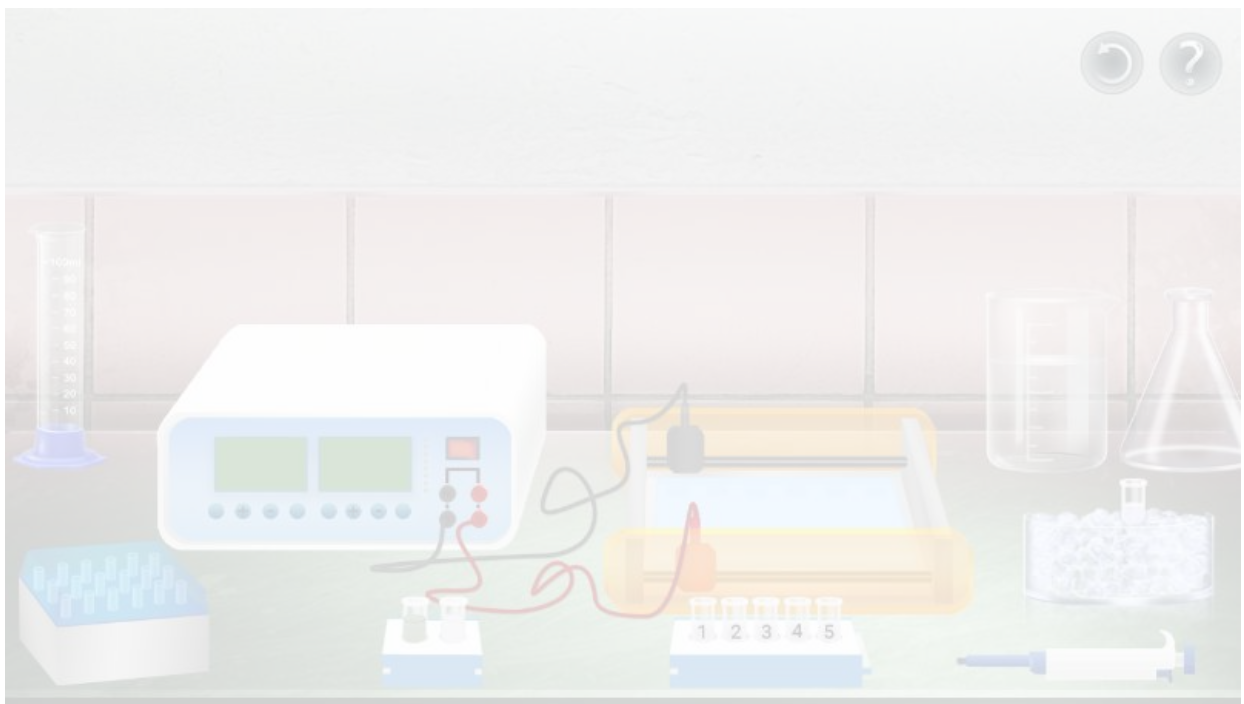
- plazmidy zawierające geny X uzyskane z kolonii bakteryjnych

Sprzęt laboratoryjny:

- probówki Eppendorfa;
- pipeta automatyczna z końcówkami;
- aparat do elektroforezy;
- kuweta z lodem.

Odczynniki:

- woda destylowana;
- bufor do trawienia z barwnikiem;
- enzym restrykcyjny PuvI;
- marker masy;
- żel do elektroforezy.



Zasób interaktywny dostępny pod adresem <https://zpe.gov.pl/a/DY2RHUaXD>

Polecenie 1

Sprawdź się

Pokaż ćwiczenia:   

Ćwiczenie 1



Ćwiczenie 2



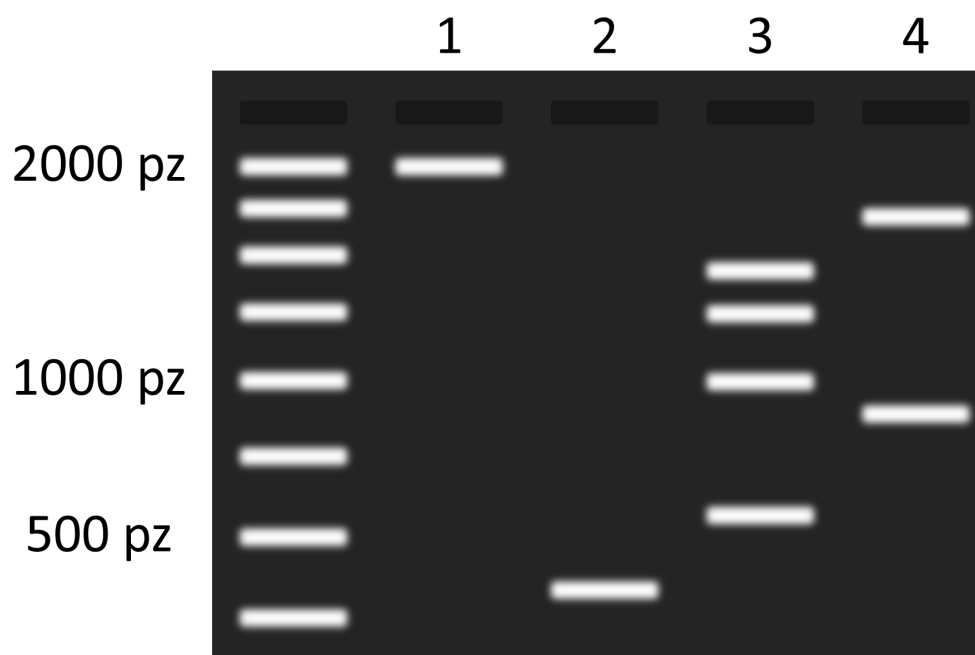
Ćwiczenie 3



Ćwiczenie 4



Ćwiczenie 5



Wynik elektroforezy.

Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Ćwiczenie 6



Ćwiczenie 7



Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

Ćwiczenie 8



Dla nauczyciela

Autor: Anna Juwan

Przedmiot: Biologia

Temat: Analiza restrykcyjna i elektroforeza DNA

Grupa docelowa: uczniowie III etapu edukacyjnego – kształcenie w zakresie podstawowym i rozszerzonym

Podstawa programowa:

Zakres podstawowy

Treści nauczania – wymagania szczegółowe

VIII. Biotechnologia. Podstawy inżynierii genetycznej. Uczeń:

3) przedstawia istotę technik stosowanych w inżynierii genetycznej (elektroforeza DNA, metoda PCR, sekwencjonowanie DNA);

Zakres rozszerzony

Treści nauczania – wymagania szczegółowe

XV. Biotechnologia. Podstawy inżynierii genetycznej. Uczeń:

4) przedstawia istotę technik stosowanych w inżynierii genetycznej (hybrydyzacja DNA, analiza restrykcyjna i elektroforeza DNA, metoda PCR, sekwencjonowanie DNA);

Kształtowane kompetencje kluczowe:

- kompetencje cyfrowe;
- kompetencje osobiste, społeczne i w zakresie umiejętności uczenia się;
- kompetencje matematyczne oraz kompetencje w zakresie nauk przyrodniczych, technologii i inżynierii.

Cele operacyjne (językiem ucznia):

- Wyjaśnisz mechanizm działania enzymów restrykcyjnych.
- Przedstawisz istotę analizy restrykcyjnej i elektroforezy DNA.
- Opiszysz warunki i przebieg elektroforezy DNA.
- Wykonasz doświadczenie polegające na analizie restrykcyjnej i obserwacji produktów rozdziału elektroforetycznego uzyskanych fragmentów restrykcyjnych.

Strategie nauczania:

- konstruktywizm;
- konektywizm.

Metody i techniki nauczania:

- odwrócona klasa;
- z użyciem komputera;
- burza mózgów;
- ćwiczenia laboratoryjne;
- ćwiczenia interaktywne;
- krzyżówka.

Formy pracy:

- praca indywidualna;
- praca w parach;
- praca w grupach;
- praca całego zespołu klasowego.

Środki dydaktyczne:

- komputery z głośnikami, słuchawkami i dostępem do internetu;
- zasoby multimedialne zawarte w e-materiale;
- tablica interaktywna/tablica, pisak/kreda.

Przed lekcją:

1. Uczniowie zapoznają się z treścią w sekcji „Przeczytaj”.

Przebieg lekcji

Faza wstępna:

1. Nauczyciel wyświetla na tablicy temat lekcji oraz cele zajęć, omawiając lub ustalając razem z uczniami kryteria sukcesu.
2. Nauczyciel łączy uczniów w pary, a następnie każdej z nich daje do rozwiązania krzyżówkę. Po odczytaniu hasła krzyżówki nauczyciel pyta uczniów, co wiedzą o restryktazach. Chętne osoby wypowiadają się.

Faza realizacyjna:

1. **Burza mózgów.** Nauczyciel rozpoczyna burzę mózgów, mówiąc: „Enzymy są katalizatorami reakcji zachodzących w naszym organizmie. W jaki sposób możemy je świadomie wykorzystywać?”. Uczniowie zapisują swoje odpowiedzi na tablicy w formie

słoneczka. Następnie nauczyciel wspólnie z uczniami dokonuje selekcji zapisanych propozycji, wykreślając błędne, i podsumowuje burzę mózgów.

- Praca z multimedium („Wirtualne laboratorium (WL-I)”)**. Uczniowie przeprowadzają indywidualnie doświadczenie w wirtualnym laboratorium biotechnologicznym. Rozwiązują problem badawczy. W formularzu zapisują swoje obserwacje, formułują wnioski i weryfikują hipotezy. Następnie rozwiązują polecenie nr 1: „Wyjaśnij, dlaczego do analizy restrykcyjnej nie użyto enzymu HindIII”. Wybrane osoby przedstawiają odpowiedzi na forum klasy.
- Utrwalenie wiedzy i umiejętności.** Uczniowie w parach wykonują ćwiczenie nr 7 (w którym mają za zadanie – na podstawie przedstawionych informacji i własnej wiedzy – określić, która z przedstawionych osób może być podejrzana o dokonanie przestępstwa) z sekcji „Sprawdź się”. Następnie porównują swoje odpowiedzi z najbliższymi siedzącymi sąsiadami. Nauczyciel w razie trudności naprowadza podopiecznych na właściwe rozwiązania lub wyjaśnia wątpliwości.

Faza podsumowująca:

- Nauczyciel dzieli uczniów na czteroosobowe grupy. Każda z nich dostaje arkusz papieru i flamastry. Na podstawie zdobytej wiedzy, własnych obserwacji oraz informacji dostępnych w internecie uczniowie wymieniają wady i zalety analizy restrykcyjnej i elektroforezy DNA.
- Nauczyciel wyświetla treści zawarte w sekcji „Wprowadzenie” i na ich podstawie dokonuje podsumowania najważniejszych informacji przedstawionych na lekcji. Wyjaśnia także wątpliwości uczniów.

Praca domowa:

- Wykonaj ćwiczenia od 1 do 6 z sekcji „Sprawdź się”.
- Dla chętnych: Wykonaj ćwiczenie nr 8 z sekcji „Sprawdź się”.

Materiały pomocnicze:

- Jane B. Reece i in., „Biologia Campbella”, tłum. K. Stobrawa i in., Dom Wydawniczy REBIS, Poznań 2021.
- „Encyklopedia szkolna. Biologia”, red. Marta Stęplewska, Robert Mitoraj, Wydawnictwo Zielona Sowa, Kraków 2006.

Krzyżówka.

Plik o rozmiarze 116.99 KB w języku polskim

Dodatkowe wskazówki metodyczne:

- Nauczyciel może wykorzystać medium zamieszczone w sekcji „Wirtualne laboratorium (WL-I)” do podsumowania lekcji.