Enzymy stosowane w biotechnologii molekularnej

- Wprowadzenie
- Przeczytaj
- Film
- Sprawdź się
- Dla nauczyciela

Rozwój biotechnologii molekularnej nie byłby możliwy bez szeregu różnych enzymów, pozwalających na manipulacje genetyczne. Techniki biotechnologii molekularnej wykorzystują enzymy, naturalnie występujące u mikroorganizmów.
Źródło: Pixabay, domena publiczna.

Biotechnologia jest dziedziną nauki zajmującą się możliwościami wykorzystywania układów biologicznych (wirusów, bakterii, grzybów, roślin i zwierząt) lub ich składników (np. enzymów) do wytwarzania lub modyfikacji produktów w celach użytkowych. Jedną z dyscyplin biotechnologii jest biotechnologia molekularna, zwana też nowoczesną. Wykorzystywane w niej techniki umożliwiają zmienianie genomów organizmów, aby uzyskać ich pożądane cechy.

Twoje cele

- Przedstawisz enzymy stosowane w biotechnologii molekularnej.
- Wyjaśnisz sposób działania enzymów, które wykorzystywane są w metodach biotechnologii molekularnej.
- Wykażesz znaczenie enzymów w biotechnologii molekularnej.

Przeczytaj

Biotechnologia molekularna

W biotechnologii molekularnej wykorzystywane są techniki inżynierii genetycznej umożliwiające izolację materiału genetycznego zawierającego odpowiednie geny, manipulowanie nimi oraz wprowadzanie ich do docelowego organizmu. Manipulacja genetyczna umożliwia uzyskanie komórek o określonych cechach.

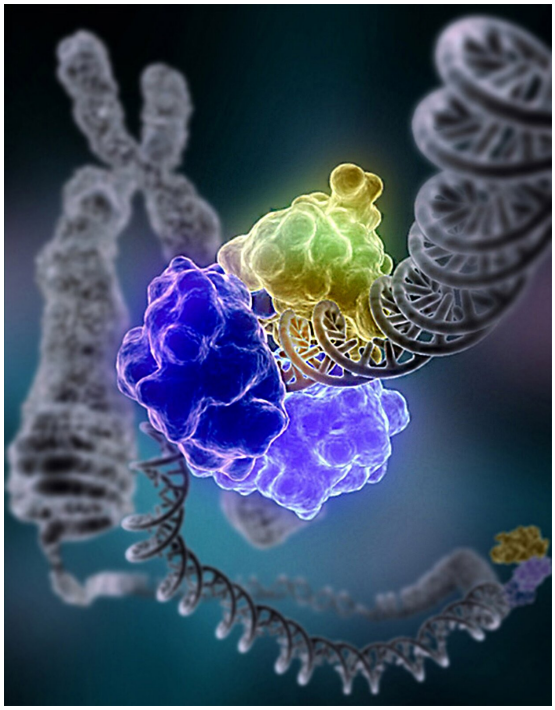
Wprowadzenie zmian w DNA wymaga wykorzystania enzymów. Najczęściej wykorzystywanymi w biotechnologii molekularnej enzymami są polimerazy DNA, enzymy restrykcyjne (należące do klasy enzymów nukleolitycznych) i ligazy.

Enzymy charakteryzują się **specyficznością substratową**. Oznacza to, że mają zdolność do łączenia się z konkretnymi substratami i katalizują reakcje po odpowiednim dopasowaniu substratu do centrum aktywnego enzymu. Efektem tego zjawiska jest dokładniejsza regulacja procesów zachodzących w komórkach.

Metody biotechnologii molekularnej są szeroko wykorzystywane w biotechnologii medycznej, rolniczej oraz przemysłowej.

Więcej o biotechnologii molekularnej w e-materiałach:

- *Biotechnologia – nauka interdyscyplinarna*;
- *Biotechnologia molekularna – historia, cele i perspektywy.*



Graficzne przedstawienie naprawy DNA przez ligazę DNA. Enzym ten łączy przerwane fragmenty DNA, zapobiegając niebezpiecznym uszkodzeniom materiału genetycznego. Właściwości tego enzymu wykorzystywane są podczas prac laboratoryjnych, m.in. w tworzeniu wektorów genetycznych, umożliwiających modyfikacje genetyczne.
Źródło: Tom Ellenberger, Wikipedia Commons, domena publiczna.

Enzymy wykorzystywane w biotechnologii molekularnej

Polimerazy DNA

Polimerazy DNA katalizują wytwarzanie nowych, komplementarnych nici DNA lub ich naprawę. Działanie tych enzymów wymaga obecności matrycy (odcinka jednoniciowego DNA, który służy jako matryca do syntezy nowego, komplementarnego łańcucha) i przyłączonego do niej krótkiego komplementarnego odcinka kwasu nukleinowego (RNA lub DNA), nazywanego starterem (ang. *primer*). W warunkach naturalnych starter jest syntetyzowany przez enzym prymazę. Do tego odcinka przyłączane są przez polimerazę DNA kolejne nukleotydy, tworzące komplementarną do matrycy nić DNA.

Sekwencje starterów można zaprojektować i dokonać ich syntezy w taki sposób, aby polimeraza DNA syntetyzowała określony fragment DNA w trakcie reakcji łańcuchowej polimerazy z wykorzystaniem polimerazy termostabilnej.

W organizmach żywych występuje kilka typów polimeraz, które odpowiadają za syntezę nici wiodącej, nici opóźnionej, naprawę DNA czy syntezę DNA mitochondrialnego u organizmów eukariotycznych.

Polimerazy DNA można podzielić ze względu na wykorzystywaną matrycę. Polimerazy używane najczęściej w biotechnologii to polimerazy DNA zależne od DNA. Oznacza to, że synteza nowej nici DNA odbywa się na bazie DNA. Występują także polimerazy RNA zależne od DNA. Na bazie nici RNA powstaje wtedy DNA. Przykładem takiego enzymu jest odwrotna transkryptaza, która może zostać użyta do syntezy komplementarnego DNA (cDNA), niezbędnego w analizie ekspresji genów. Polimeraza DNA niezależna od matrycy występuje w stanach patologicznych.

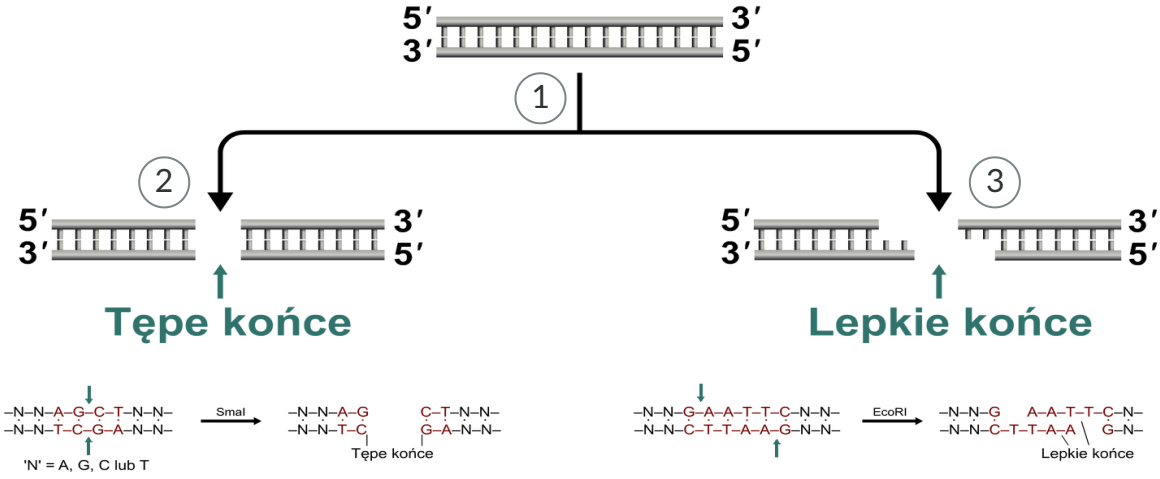
Restryktazy

Ligazy

Wykorzystanie wszystkich opisanych enzymów można przedstawić na przykładzie tworzenia wektorów genetycznych. Zarówno plazmid, stanowiący wektor genetyczny, jak i namnożony w reakcji łańcuchowej polimerazy gen poddaje się reakcji trawienia z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych, tworzących lepkie końce. Prowadzi to do uzyskania liniowych fragmentów DNA, mających fragmenty komplementarne. Użycie ligazy DNA pozwala na połączenie obu elementów. Efektem tych działań jest wektor genetyczny niosący sekwencję wybranego genu. Taki wektor może zostać użyty do wprowadzenia genu np. do komórki bakteryjnej.

Enzymy restrykcyjne mogą być także wykorzystywane w diagnostyce chorób. Mutacje wprowadzające zmiany sekwencji DNA w miejscach rozpoznawanych przez dane enzymy są widoczne po rozdziale elektroforetycznym strawionych fragmentów DNA.

Tępe i lepkie końce



1

Enzym restrykcyjny rozpoznaje i tnie sekwencję.

2

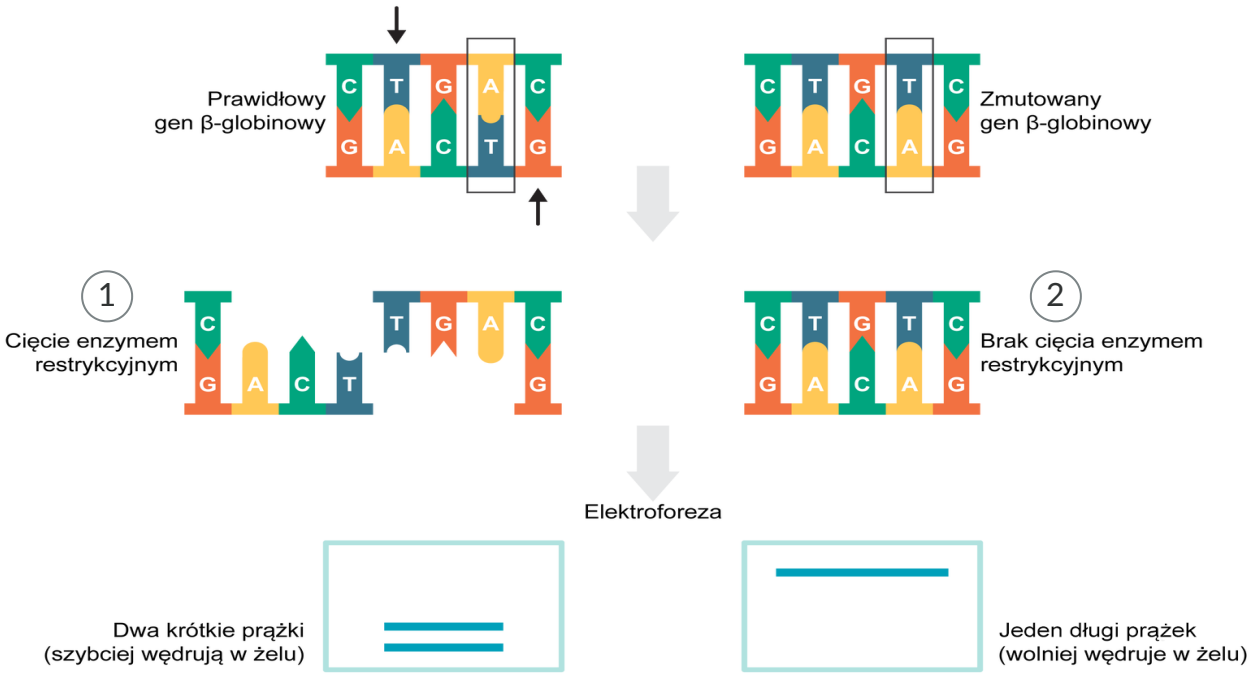
Końce są tępe, gdy przecięcie przechodzi przez te same miejsca obu naprzeciwległych nici DNA.

3

Końce są lepkie, gdy przecięcie jest przesunięte względem siebie np. o kilka nukleotydów.

Schemat przedstawiający działanie enzymów restrykcyjnych.

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



1

U osoby z prawidłowym genem beta-globinowym enzymy restrykcyjne przecięły nić DNA w miejscu wyznaczonym przez specyficzną sekwencję.

2

U osoby ze zmutowanym genem beta-globinowym mutacja spowodowała zniknięcie miejsca restrykcyjnego.

Zastosowanie enzymów restrykcyjnych do wykrywania mutacji powodującej **anemię sierpowatą**.

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

Ważne!

W 1955 r. Arthur Kornberg odkrył polimerazę DNA (polimeraza DNA I). Odkrycie to było przełomowe. Na podstawie kolejnych badań wykazano rolę polimerazy Kornberga w procesie replikacji i naprawy DNA.

W 1969 r. Thomas Brock odkrył polimerazę DNA Taq. Została ona wyizolowana z bakterii *Thermus aquaticus*, żyjącej w gorących źródłach Yellowstone. Polimeraza Taq nie traci swojej aktywności nawet w 95 °C. Jej termostabilność umożliwiła przeprowadzanie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) w celu powielania łańcuchów DNA.

Thermus aquaticus. Mikroskop elektronowy, powiększenie 1000×.
Źródło: Saperaud, Wikimedia Commons, domena publiczna.

Słownik

elektroforeza DNA

rozdział cząsteczek DNA w żelu pod wpływem pola elektrycznego
fragment Klenowa

fragment polimerazy Kornberga, zachowujący aktywność naprawczą egzonukleazy $3' \rightarrow 5'$ i aktywność polimeryzacyjną polimerazy Kornberga
inżynieria genetyczna

eksperymentalna dziedzina z pogranicza genetyki i biologii molekularnej posługująca się zespołem różnorodnych technik, polegających na manipulowaniu DNA *in vitro* oraz *in vivo* w celu uzyskania dziedzicznych zmian w komórkach lub całych organizmach
izoschizomery

enzymy restrykcyjne, które zawsze rozpoznają taką samą sekwencję DNA i przecinają ją w taki sam sposób
ligacja

połączenie końca 3’ jednego łańcucha polinukleotydowego z końcem 5’ innego łańcucha kowalencyjnym wiązaniem fosfodiestrowym
ligazy

klasa enzymów katalizująca wytwarzanie wiązań pomiędzy dwiema cząsteczkami, połączone z rozpadem wiązania wysokoenergetycznego
neoschizomery

enzymy restrykcyjne, które zawsze rozpoznają taką samą sekwencję DNA, ale tną ją w zupełnie inny sposób

polimeraza Kornberga

polimeraza DNA I odkryta w 1955 r. przez Arthura Kornberga; enzym, który dosyntetyzowuje luki między fragmentami Okazaki

polimerazy DNA

enzymy należące do nukleotydylotransferaz, syntetyzujące z odpowiednich trifosforanów nukleozydów cząsteczki kwasów deoksyrybonukleinowych według wzoru zakodowanego w materiale genetycznym organizmu

reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR)

technika laboratoryjna biologii molekularnej pozwalająca na powielanie wybranego odcinka DNA *in vitro*

restryktazy, enzymy restrykcyjne

enzymy, które rozpoznają określone kilkunukleotydowe sekwencje łańcucha DNA obcego dla komórki i wycinają je, rozkładając hydrolitycznie wiązanie fosfodiestrowe w tych odcinkach łańcucha; przecięcie może być tzw. tępe, gdy przechodzi przez te same miejsca obu naprzeciwległych nici DNA, lub tzw. lepkie, gdy cięcia w obu niciach są przesunięte względem siebie np. o kilka nukleotydów; własny DNA bakterii jest chroniony przed rozkładem

wektor genetyczny

najczęściej koliste cząsteczki DNA plazmidów i wirusów mające zdolność do wnikania i autonomicznej replikacji w danym typie komórki

Film

Film dostępny pod adresem /preview/resource/RmQ1m8sc04ln4

Enzymy stosowane w biotechnologii molekularnej (część 1)

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

Film pod tytułem: Enzymy stosowane w biotechnologii molekularnej (część 1).

Polecenie 1

Na podstawie części pierwszej filmu scharakteryzuj działanie nukleaz.

Polecenie 2

W oparciu o wykład wyjaśnij pojęcia: „tępe” i „lepkie końce”. Oceń, które z nich są łatwiej łączone w reakcji ligacji.

Film dostępny pod adresem /preview/resource/RCc4amueFUWCp

Enzymy stosowane w biotechnologii molekularnej (część 2)

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

Film pod tytułem: Enzymy stosowane w biotechnologii molekularnej (część 2).

Polecenie 3

Na podstawie części drugiej filmu wskaż zastosowanie enzymów restrykcyjnych.

Sprawdź się

Pokaż ćwiczenia:

Ćwiczenie 1

Dokończ zdanie.

Uszkodzenia DNA spowodowane przerwaniem nici naprawiane są przy udziale:

- endonukleaz
- ligaz
- polimerazy DNA
- restryktazy

Ćwiczenie 2

Wskaż poprawny opis działania restryktaz.

- Katalizują przyłączanie się nukleotydów do nici DNA.
- Przecinają DNA i łączą jego fragmenty w dowolnej kolejności.
- Przecinają DNA w miejscu bogatym w pary C:G
- Przecinają DNA w wyznaczonym miejscu przez specyficzną sekwencję, która ma długość 4–8 nukleotydów.

Ćwiczenie 3

Przyporządkuj podanym terminom odpowiednie określenia.

Ligaza	Łączenie fragmentów DNA
Polimeraza	Katalizowanie syntezy DNA
Restryktaza	Cięcie nici DNA

Ćwiczenie 4

Uzupełnij tekst, wybierając właściwe sformułowania.

W biotechnologii klasycznej ☐ molekularnej ☐ wykorzystywane są techniki inżynierii genetycznej. Pożądane cechy uzyskuje się poprzez wprowadzanie zmian w DNA ☐ RNA ☐ enzymach ☐, wykorzystując do tego różne rodzaje DNA ☐ RNA ☐ enzymów ☐. Restryktazy ☐ Ligazy ☐ Polimerazy ☐ używane są do powielania fragmentów DNA, restryktazy ☐ ligazy ☐ polimerazy ☐ tną nić DNA w odpowiednich miejscach, natomiast restryktazy ☐ ligazy ☐ polimerazy ☐ łączą ze sobą porozcinane fragmenty DNA.

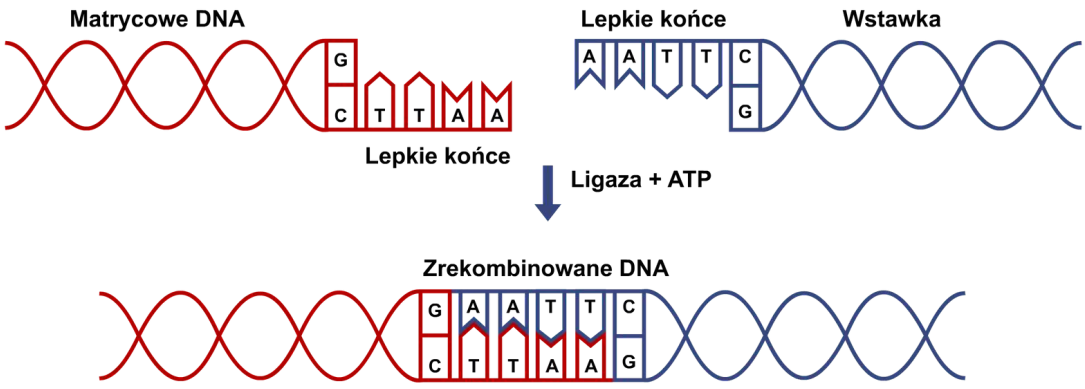
Ćwiczenie 5

Wskaż typ enzymu restrykcyjnego, którego dotyczy poniższy opis.

Enzymy tego typu dokonują cięcia DNA na podstawie rozpoznanych palindromowych sekwencji. Cięcie odbywa się w obrębie rozpoznanej sekwencji lub bezpośrednio przy niej. Enzymy tego typu wymagają obecności jonów magnezu, aby doszło do cięcia nici DNA.

- Typ I ☐
- Typ II ☐
- Typ III ☐

Ćwiczenie 6



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

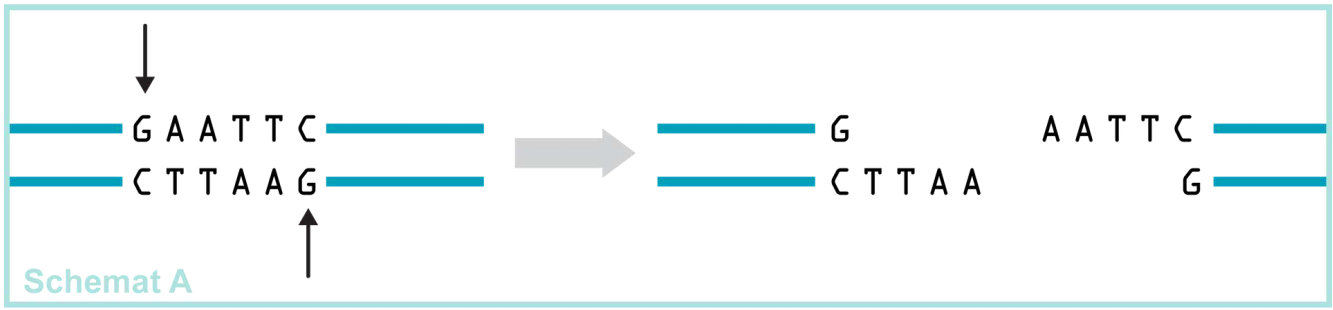
Przeanalizuj schemat i wskaż nazwę procesu, który przedstawia.

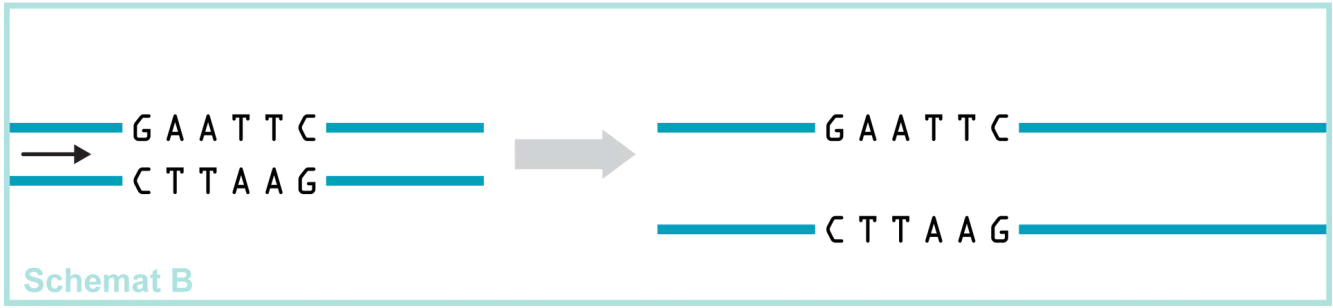
- Translacja
- Ligacja
- Hydroliza
- Transkrypcja

Wyjaśnij, dlaczego proces przedstawiony na schemacie przebiega łatwiej, kiedy fragmenty DNA zakończone są lepkimi końcami.

Ćwiczenie 7

Na schematach przedstawiono cząsteczki DNA po działaniu różnych enzymów.





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

Rozpoznaj schemat, który przedstawia cząsteczkę rozciętą enzymami restrykcyjnymi.

Uzasadnij swój wybór.

Ćwiczenie 8

Mutacja w genie beta-globiny powoduje anemię sierpowatą. Od dwóch pacjentów (A i B) z podejrzeniem anemii sierpowatej pobrano krew, a następnie wyizolowano materiał genetyczny. W celu wykrycia mutacji powodującej anemię sierpowatą zastosowano odpowiednie enzymy restrykcyjne, o których było wiadomo, jakie sekwencje nukleotydowe przecinają. Na obrazie uzyskanym po przeprowadzeniu elektroforezy próbki pobranej od pacjenta A zaobserwowano dwa krótkie prążki, natomiast u pacjenta B – jeden długi prążek.

Wskaż pacjenta, u którego wykryto mutację w genie beta-globiny oraz wyjaśnij, na jakiej podstawie można stwierdzić, że występuje ona właśnie u niego.

Dla nauczyciela

Autor: Anna Juwan
Przedmiot: Biologia

Temat: Enzymy stosowane w biotechnologii molekularnej

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

Podstawa programowa:

Zakres rozszerzony

Treści nauczania – wymagania szczegółowe

XV. Biotechnologia. Podstawy inżynierii genetycznej. Uczeń:

3) przedstawia narzędzia wykorzystywane w biotechnologii molekularnej (enzymy: polimerazy, ligazy i enzymy restrykcyjne) i określa ich zastosowania;

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):

- Przedstawisz enzymy stosowane w biotechnologii molekularnej.
- Wyjaśnisz sposób działania enzymów, które wykorzystywane są w metodach biotechnologii molekularnej.
- Wykażesz znaczenie enzymów w biotechnologii molekularnej.

Strategie nauczania:

- konstruktywizm;
- konektywizm.

Metody i techniki nauczania:

- odwrócona klasa;
- z użyciem komputera;
- rozmowa kierowana;

- ćwiczenia interaktywne;
- praca z filmem;
- mapa myśli.

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 prosi wybranego lub chętnego ucznia o wyjaśnienie pojęcia enzymu. Następnie wprowadza uczniów w temat lekcji, mówiąc, że rozwój biotechnologii nie byłby możliwy, gdyby nie odkrycia z 1970 r. – wtedy Hamilton Smith i Kent Wilcox wyizolowali pierwszy enzym, wykorzystywany do dziś. Pochodził on od bakterii żyjącej w ludzkim jelicie grubym, czyli pałeczki okrężnicy (*E. coli*).

Faza realizacyjna:

1. **Praca z multimedium („Film") – kula śniegowa.** Uczniowie zapoznają się z filmami zawartymi w e-materiale. Następnie wykonują polecenia od 1 do 3, pracując metodą kuli śniegowej. Nauczyciel objaśnia wspomnianą wyżej metodę i wynikające z niej kolejne etapy pracy:
   – najpierw uczniowie będą indywidualnie opracowywać odpowiedzi na zadane pytania;
   – potem połączą się w pary i porównają swoje propozycje, a na osobnej kartce zapiszą wspólne odpowiedzi;
   – kolejnym krokiem będzie połączenie się par w czwórki, które – jak poprzednio – skonfrontują swoje odpowiedzi;

– uczniowie utworzą 8-osobowe zespoły i znów porównają swoje propozycje;
– przedstawiciele poszczególnych zespołów 8-osobowych zaprezentują na forum klasy uzgodnione w grupie odpowiedzi.

2. **Mapa myśli.** Nauczyciel dzieli uczniów na trzy grupy. Każda z nich opracowuje mapę myśli na temat zastosowań enzymów w biotechnologii molekularnej. Grupy prezentują wyniki swojej pracy. Nauczyciel uzupełnia brakujące informacje, koryguje ewentualne błędy.
3. **Utrwalenie wiedzy i umiejętności.** Uczniowie samodzielnie wykonują ćwiczenie nr 8 (w którym mają za zadanie wskazać pacjenta, u którego wykryto mutację w genie beta-globiny, oraz wyjaśnić, na jakiej podstawie można stwierdzić, że występuje ona właśnie u niego) z sekcji „Sprawdź się". Następnie w 4-osobowych grupach omawiają prawidłowe rozwiązanie. Po upływie wyznaczonego czasu wskazany przez nauczyciela przedstawiciel grupy prezentuje odpowiedź wraz z jej uzasadnieniem. Klasa ustosunkowuje się do niej. Nauczyciel udziela uczniom informacji zwrotnej.

Faza podsumowująca:

1. Uczniowie wykonują ćwiczenie nr 4, polegające na uzupełnieniu tekstu na temat wykorzystania enzymów w biotechnologii molekularnej.
2. Nauczyciel wyświetla treści zawarte w sekcji „Wprowadzenie" i na ich podstawie dokonuje podsumowania najważniejszych informacji przedstawionych na lekcji. Wyjaśnia także wątpliwości uczniów.

Praca domowa:

1. Wykonaj ćwiczenia od 1 do 3 oraz od 5 do 7.

Materiały pomocnicze:

- Jane B. Reece i in., „Biologia Campbella", tłum. K. Stobrawa i in., Dom Wydawniczy REBIS, Poznań 2021.

Dodatkowe wskazówki metodyczne:

- Uczniowie mogą przed lekcją zapoznać się z multimedium zamieszczonym w sekcji „Film", aby przygotować się do późniejszej pracy na zajęciach.