



## Enzymy stosowane w biotechnologii molekularnej

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



## Enzymy stosowane w biotechnologii molekularnej

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

---

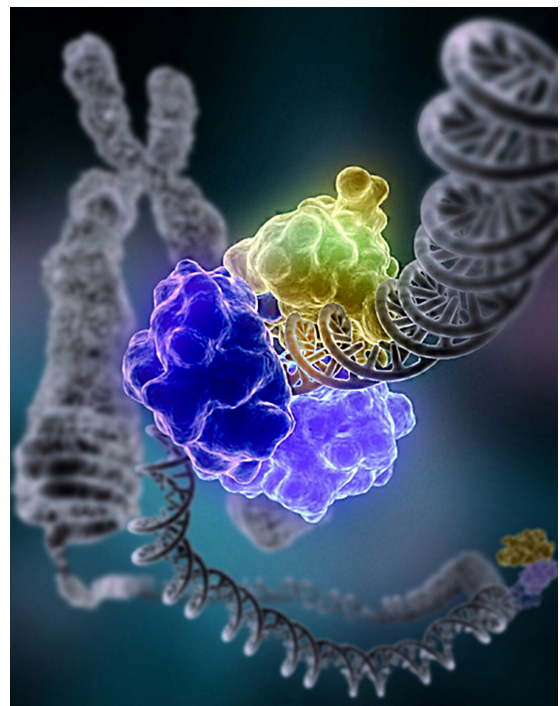
## Biotechnologia molekularna

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.



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.

Więcej o biotechnologii molekularnej

w e-materiałach:

- [Biotechnologia – nauka interdyscyplinarna](#);
- *Biotechnologia molekularna – historia, cele i perspektywy.*

## 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.

Występują także polimerazy DNA zależne od RNA. Enzymy te syntetyzują DNA na matrycy RNA. Przykładem takiego enzymu jest odwrotna transkryptaza, która służy do syntezy komplementarnego DNA (cDNA) na podstawie cząsteczki mRNA. Otrzymane cDNA jest wykorzystywane m.in. w analizie ekspresji genów.

### Restryktazy

### Ligazy

Wykorzystanie wszystkich opisanych enzymów można przedstawić na przykładzie tworzenia [wektorów genetycznych](#). Zarówno plazmid pełniący funkcję wektora, jak i fragment DNA zawierający wybrany gen, uprzednio namnożony metodą PCR, poddaje się trawieniu odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi. Powoduje to powstanie fragmentów DNA z komplementarnymi lepkiymi końcami. Następnie ligaza DNA łączy oba fragmenty, tworząc rekombinowany wektor genetyczny zawierający sekwencję badanego genu. Taki wektor może zostać wykorzystany do wprowadzenia genu do komórki, np. bakteryjnej.

Enzymy restrykcyjne znajdują również zastosowanie w diagnostyce molekularnej. Mutacje zmieniające sekwencje rozpoznawane przez określone restryktazy mogą prowadzić do powstawania fragmentów DNA o różnej długości po trawieniu. Różnice te można wykryć metodą [elektroforezy](#), co umożliwia identyfikację określonych zmian genetycznych.

---

Schemat przedstawiający działanie enzymów restrykcyjnych.

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

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 bakterię *Thermus aquaticus*, żyjącą w gorących źródłach Yellowstone. Z tej bakterii później wyizolowano polimerazę DNA Taq. Enzym ten nie traci aktywności nawet w temperaturze około 95°C. Jego termostabilność umożliwiła opracowanie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), stosowanej do amplifikacji DNA. .



*Thermus aquaticus*. Mikroskop elektronowy, powiększenie 1000×.

Źródło: Saperaud, Wikimedia Commons, domena publiczna.

## Słownik

### elektroforeza DNA

rozdziół cząsteczek DNA w żelu pod wpływem pola elektrycznego

### fragment Klenowa

fragment polimerazy Kornberga, zachowujący aktywność naprawczą egzonukleazy 3' → 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 fosfodiesterowym

### **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 dosyntetyzuje 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 fosfodiesterowe 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



Ćwiczenie 2



Ćwiczenie 3



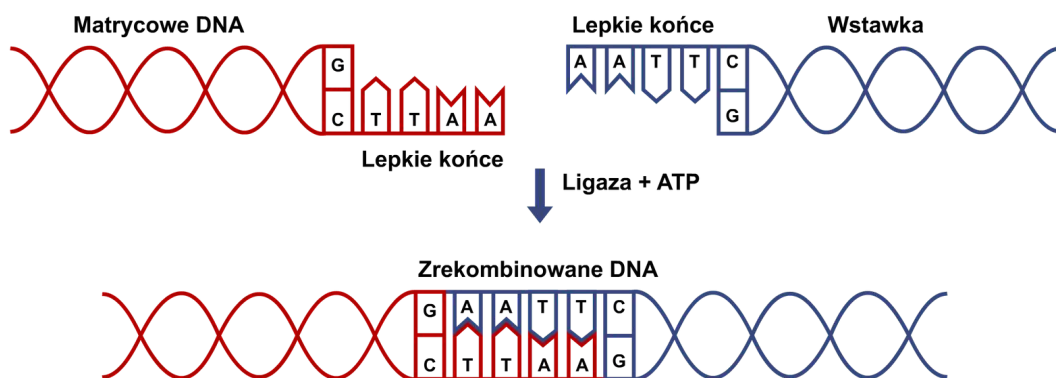
Ćwiczenie 4



Ćwiczenie 5



Ćwiczenie 6

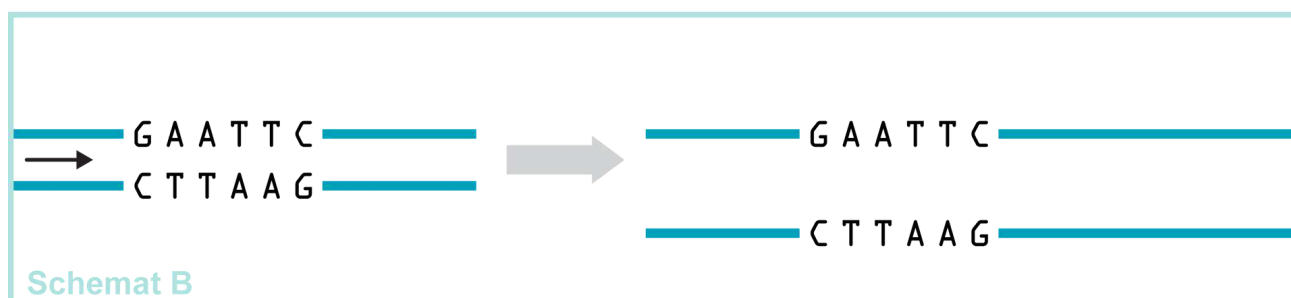
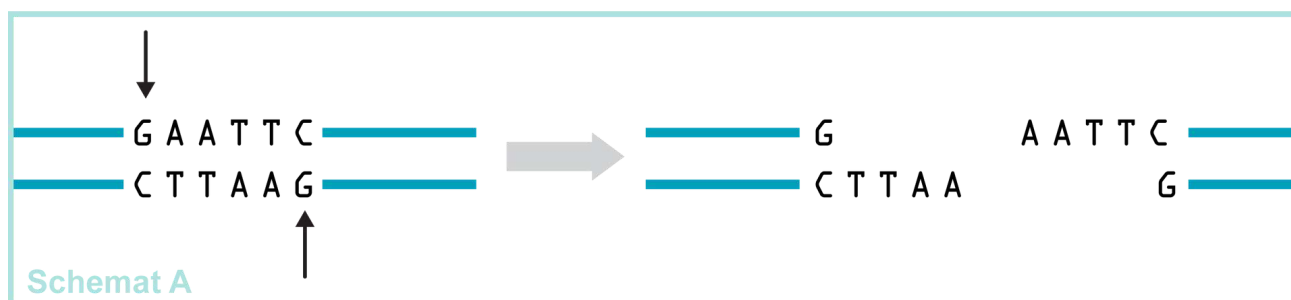


Źródło: Englishsquare.pl Sp. z o.o., licencja: CC BY-SA 3.0.

## Ćwiczenie 7



Na schematach przedstawiono cząsteczki DNA po działaniu różnych enzymów.



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

## 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.

# 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 multimediami zamieszczonymi w sekcji „Film”, aby przygotować się do późniejszej pracy na zajęciach.