



University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان

آنزیم های محدود کننده و کاربرد آنها Restriction Enzymes



اهداف

۱- بررسی آنزیم های محدود کننده و کاربرد آنها

Restriction Enzyme

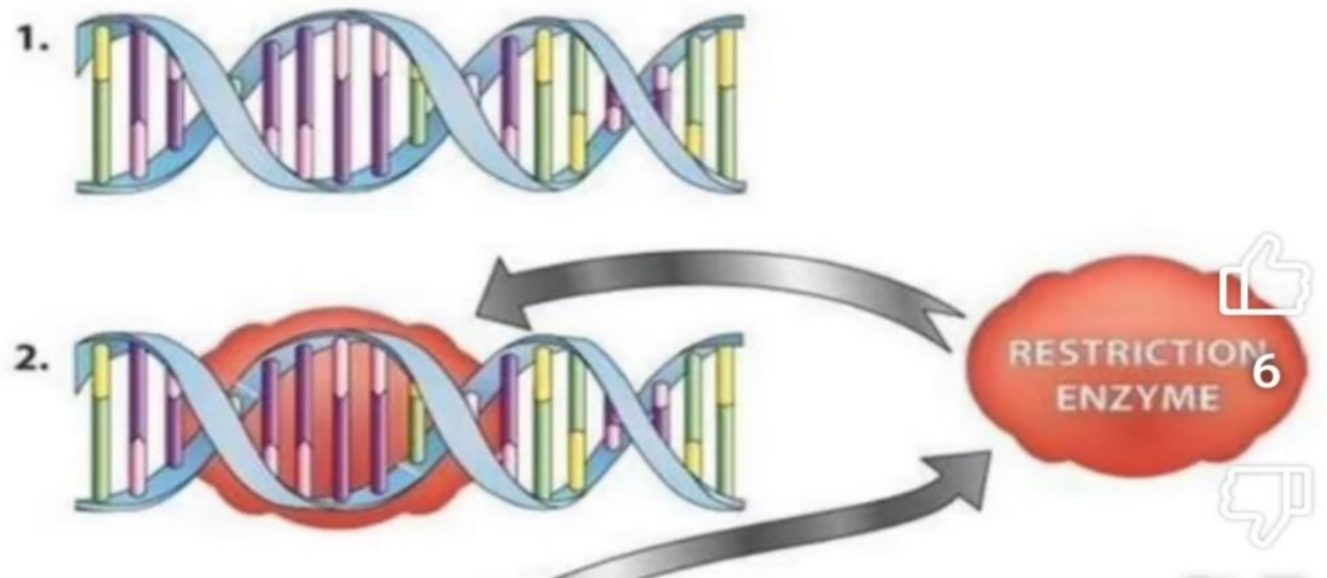
۲- بررسی مفهوم هضم آنزیمی DNA

Enzymatic Digestion

آنزیم‌های برشی و محدودکننده: کلید ویرایش DNA

Restriction Enzyme

Enzyme that binds with a specific sequence of DNA and cleaves the DNA in a specific manner.



مقدمه

آنزیم محدودکننده چیست؟

آنزیم‌های محدودکننده Restriction Enzymes پروتئین‌هایی هستند که توالی‌های خاصی از DNA را شناسایی کرده و در آن نقاط برش ایجاد می‌کنند. این آنزیم‌ها در باکتری‌ها به عنوان سیستم دفاعی در برابر DNA ویروسی (فاژها) عمل می‌کنند و نقش بیولوژیکی آن‌ها مشارکت در دفاع سلولی است.

آنزیم‌های محدود کننده که با نام اندونوکئنازهای محدودکننده Restriction Endonucleases نیز شناخته می‌شوند، به‌طور طبیعی در بسیاری از گونه‌های باکتری‌ها وجود دارند. تاکنون بیش از ۳۰۰۰ آنزیم محدودکننده شناخته شده است که تعداد زیادی توالی نوکلئوتیدی مختلف را شناسایی می‌کنند و حدود ۶۰۰ عدد از آنها بصورت تجاری برای اصلاح DNA در آزمایشگاه‌ها در دسترس می‌باشند.

با وجود تعدد زیاد آنزیم‌های محدود کننده، همگی اساساً به یک روش کار می‌کنند.

آنزیم‌های محدود کننده دارای قسمتی به نام محل تشخیص recognition site هستند. به این معنا که آنزیم یک توالی DNA را شناسایی می‌کند. سپس در تماس با توالی DNA و محل تشخیص آنزیم، آنزیم محدود کننده به دور DNA می‌پیچد و این کار باعث شکستگی رشته DNA می‌شود.

مکان‌های شناسایی معمولاً کوتاه بوده و حاوی 4 الی 8 نوکلئوتید می‌باشند.

بنابراین ویژگی‌های مشترک آنزیم‌های محدودکننده عبارتند از:

1. تخصص در شناسایی توالی‌های خاص:

هر آنزیم محدودکننده یک توالی خاص از DNA را شناسایی می‌کند. این توالی معمولاً بین 4 تا 8 جفت باز یا بیشتر طول دارد.

2. ایجاد برش در DNA:

پس از شناسایی توالی هدف، آنزیم، پیوندهای فسفودی‌استری بین نوکلئوتیدها را قطع می‌کند و باعث ایجاد برش در قطعات DNA می‌شود.

انواع آنزیم‌های محدود کننده

این آنزیم‌ها بر اساس نوع برش، محل برش و نیاز به کوفاکتورهای مختلف در سه گروه دسته‌بندی می‌شوند:

نوع I: شناسایی توالی خاصی از DNA و برش در فاصله‌ای دور از توالی شناسایی شده حدود 1000 bp دورتر انجام می‌شود. این آنزیم‌ها برای عملکرد بعنوان کوفاکتور نیازمند ATP و S-آدنوزیل متیونین (SAM), (Mg^{2+}) می‌باشند.

نوع II: این نوع آنزیم‌ها دقیق‌ترین نوع برای مطالعات مولکولی می‌باشند. برش در داخل یا نزدیک توالی شناسایی شده انجام می‌شود. نیازی به ATP ندارند و فقط برای عملکرد به یون منیزیم (Mg^{2+}) نیاز دارند و حدود 4 تا 8 توالی با خصوصیات خاص را برش می‌دهند.

مثال: EcoRI, HindIII, BamHI

نوع III: شناسایی توالی مشخص برش در فاصله‌ای کوتاه از محل شناسایی حدود 20 تا 30 bp دورتر انجام می‌شود. و این آنزیم‌ها برای عملکرد نیازمند ATP و S-آدنوزیل متیونین (SAM), (Mg^{2+}) می‌باشند.

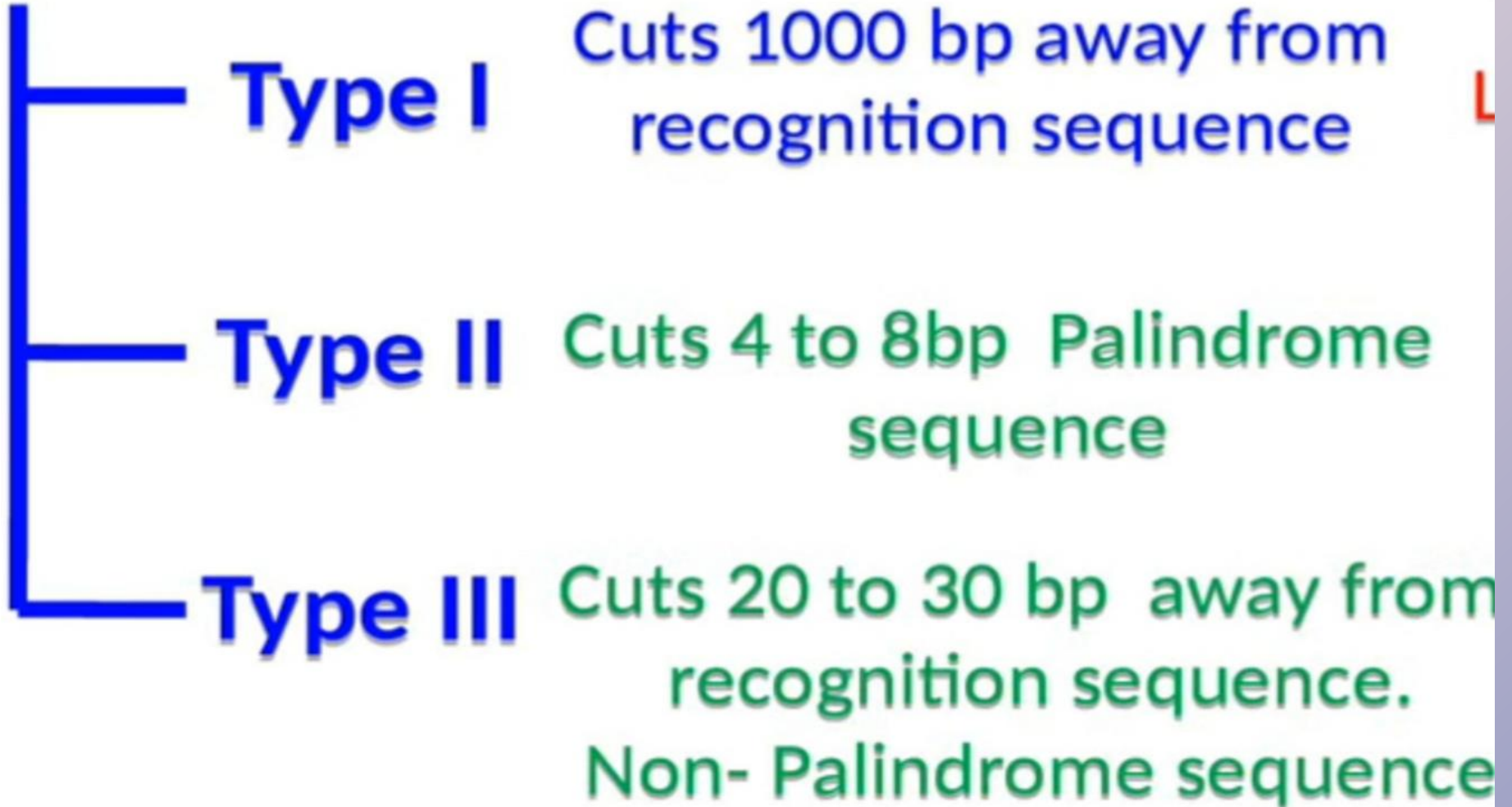
نوع V: فقط توالی متیله شده را شناسایی و در این محل برش انجام می‌دهد. و برای عملکرد نیازمند ATP, GTP می‌باشند.

	Type I	Type II	Type III	Type IV
Nuclease structure	Multimer; heterotrimer	Homodimer	Homodimer	
Recognition site pattern	Two sites, in any orientation	Small (4–8 bp); usually palindromic	Two sites, in head-to-head orientation; non-palindromic	Weak specificity
Cleavage site	Variable distance from recognition site; non-specific cleavage	Cleavage within (Type IIP) or outside (Type IIS) the recognition site	Cleavage of one strand (nicking activity) 24–25 bp from recognition site	Methylated only
Cofactor	ATP, Mg ²⁺ , SAM	Mg ²⁺	ATP, Mg ²⁺ , SAM	ATP, GTP



Type of restriction enzyme

RE



اصول نامگذاری آنزیم های محدود کننده

نام آنزیم های محدود کننده بر اساس منبع میکروارگانیسمی که از آن استخراج می شوند، انتخاب می گردد. به طور خاص، نام شامل جنس، گونه، مخفف سویه و ترتیب کشف در آن سویه است. ترتیب کشف به عنوان یک عدد رومی نشان داده می شود.

به عنوان مثال، آنزیم **EcoRI** دارای توضیحات زیر است:

. جنس: اشرشیا

. گونه: کلای

. R نشان دهنده سویه **RY13** است

. I نشان دهنده ی اولین آنزیم محدود کننده کشف شده

در این سویه است.

مشتق شده از نام **EcoRI**

مخفف	معنی	تشریح
E	<i>Escherichia</i>	جنس
co	<i>coli</i>	گونه های خاص
R	RY13	گونه
I	ابتدا شناسایی شد	ترتیب شناسایی در باکتری

مراحل شناسایی و برش DNA توسط آنزیم‌های محدودکننده عبارتند از:

1. شناسایی توالی هدف:

هر آنزیم محدودکننده یک توالی خاص از DNA را تشخیص می‌دهد که معمولاً پالیندرومیک (Palindromic) است.

توالی پالیندرومیک یعنی توالی‌ای که در دو رشته DNA به صورت معکوس مکمل هم باشد.

مثال: آنزیم EcoRI توالی GAATTC را بصورت زیر تشخیص می‌دهد:

5'- GAATTC - 3'

3'- CTTAAG - 5'

این ساختار باعث می‌شود که هر دو رشته در نقطه یکسانی برش بخورند.

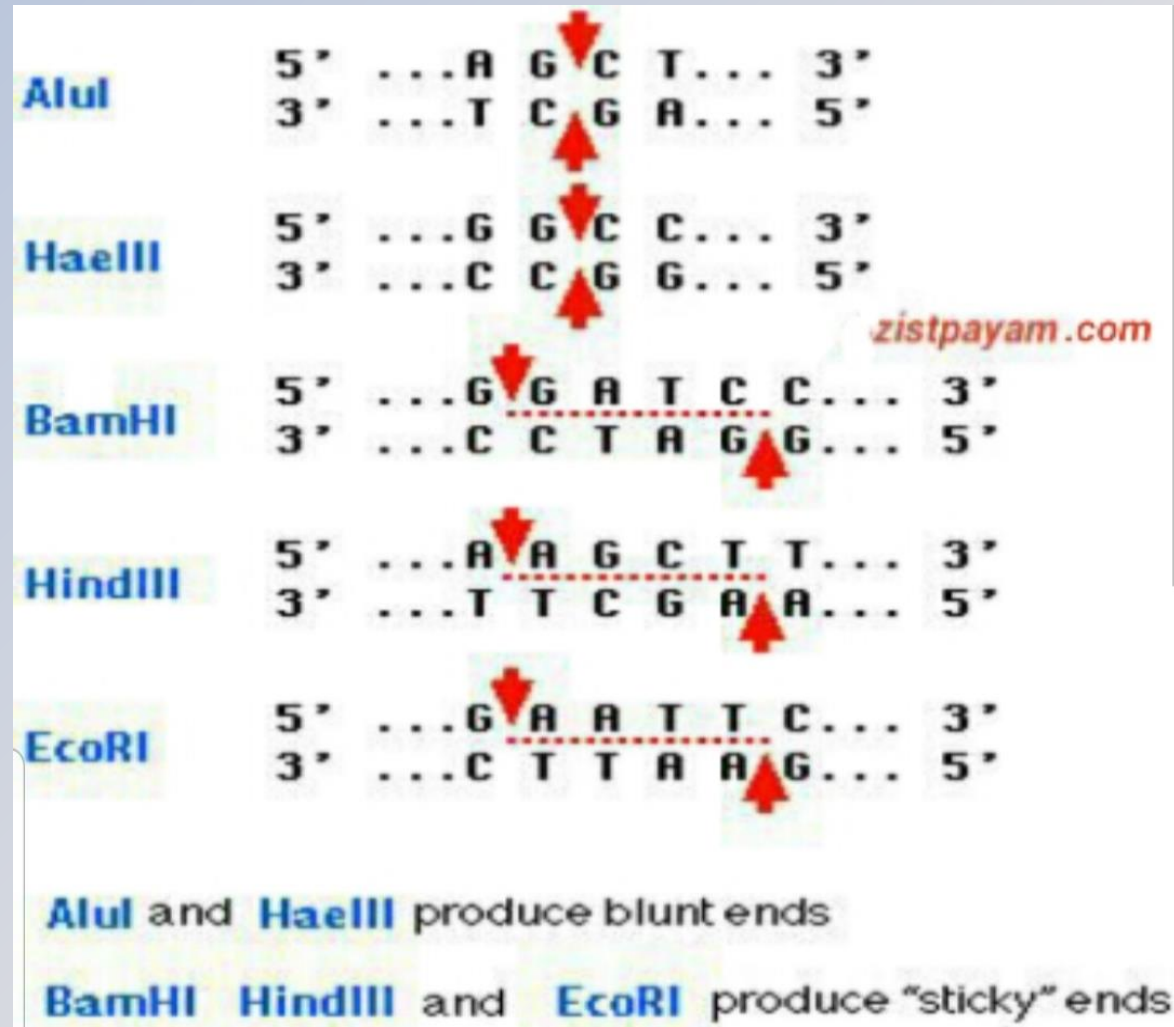
2. اتصال آنزیم به DNA:

آنزیم محدودکننده روی DNA حرکت می‌کند و به دنبال توالی خاص خود می‌گردد. وقتی این توالی را پیدا کرد، به DNA متصل می‌شود.

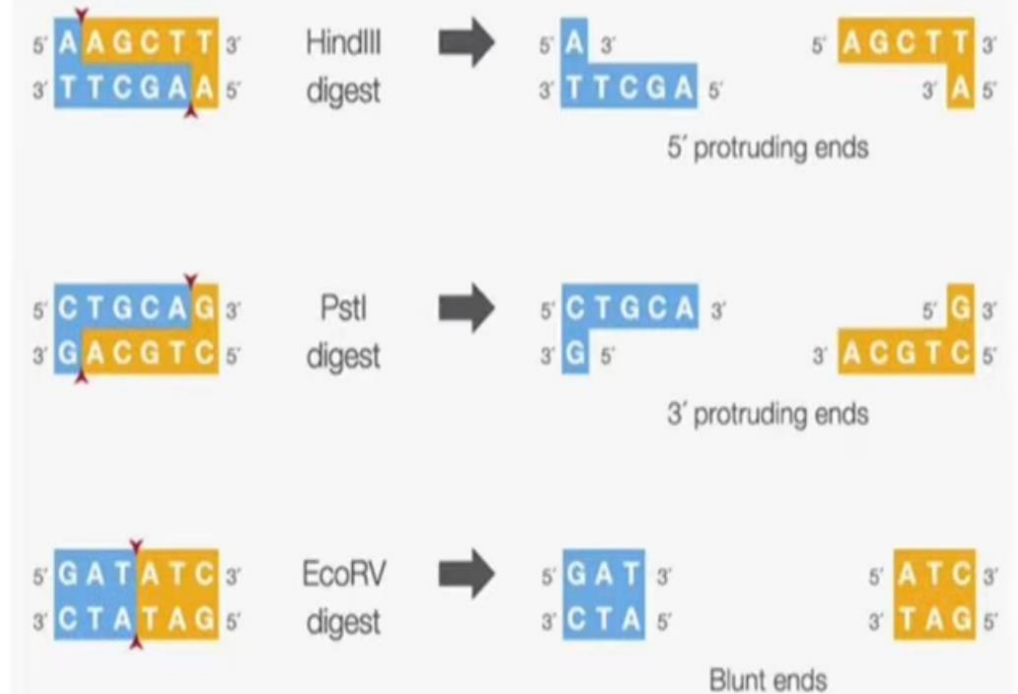
3. ایجاد برش در جایگاه خاص:

آنزیم در محل مشخصی از توالی هدف پیوندهای فسفودی استری Phosphodiester Bonds بین نوکلئوتیدها را می‌شکند.

نحوه شناسایی و برش جایگاه توسط آنزیم‌های محدودکننده

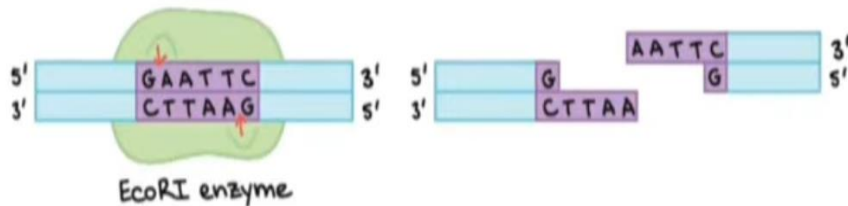


Restriction Enzyme



Restriction Enzyme

- Sticky End: One strand is longer than the other. Allows for ends to easily rebind.



انواع برش‌های ایجاد شده توسط آنزیم
های محدود کننده:

برش چسبنده (Sticky Ends) :

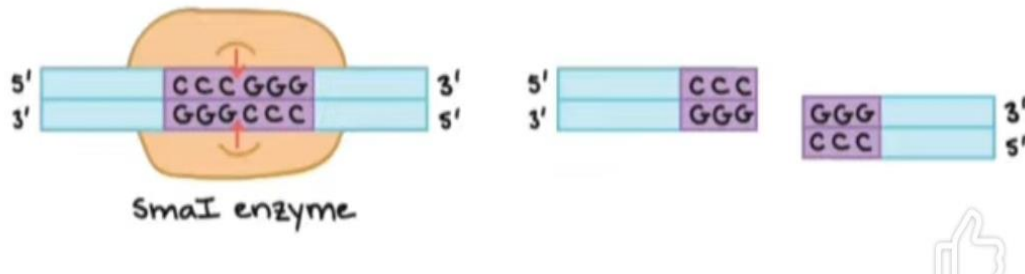
در این نوع، آنزیم دو رشته را به طور نامساوی قطع کرده
و انتهای تکرشته‌ای تولید می‌کند که می‌تواند به راحتی با
قطعات مکمل متصل شود.

مثال: آنزیم EcoRI



Restriction Enzyme

- Blunt End: Both strands are of equal length, difficult to rebind.

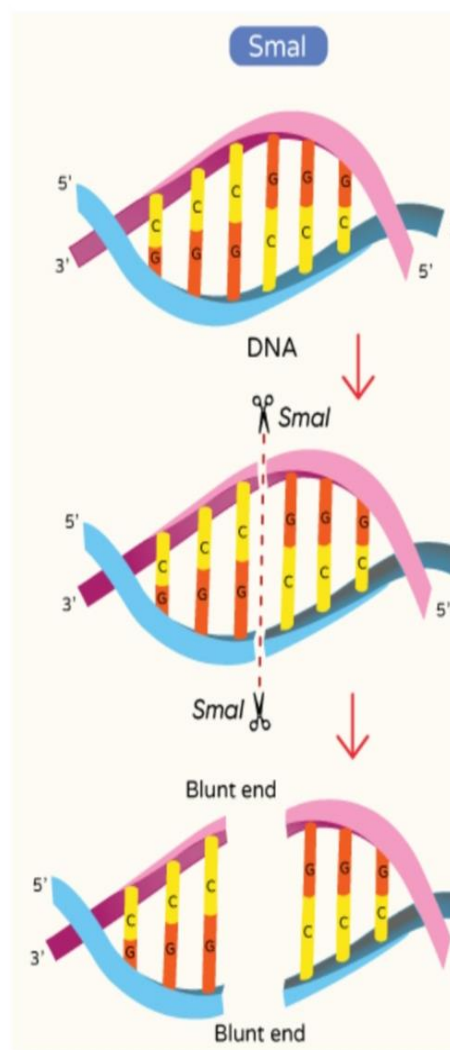
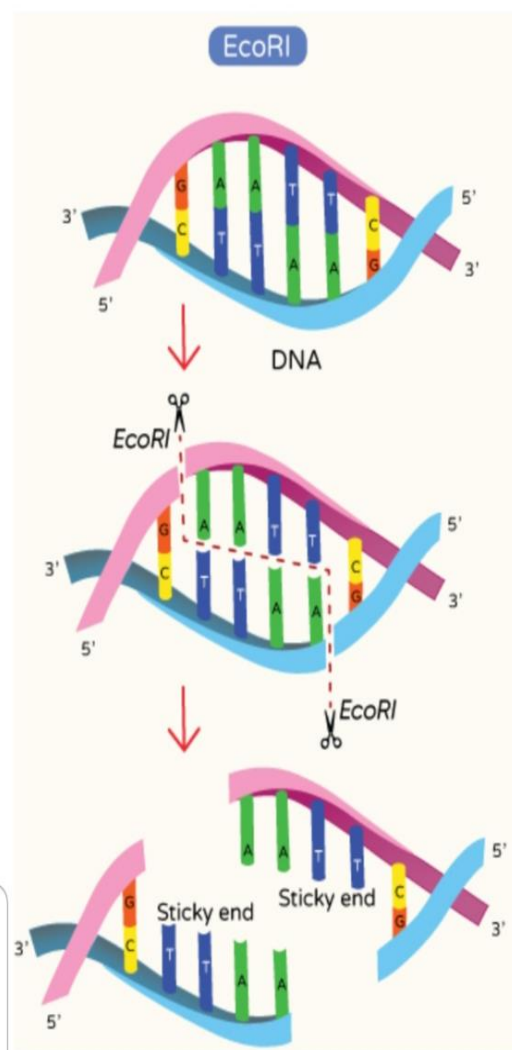


برش صاف (Blunt Ends) :

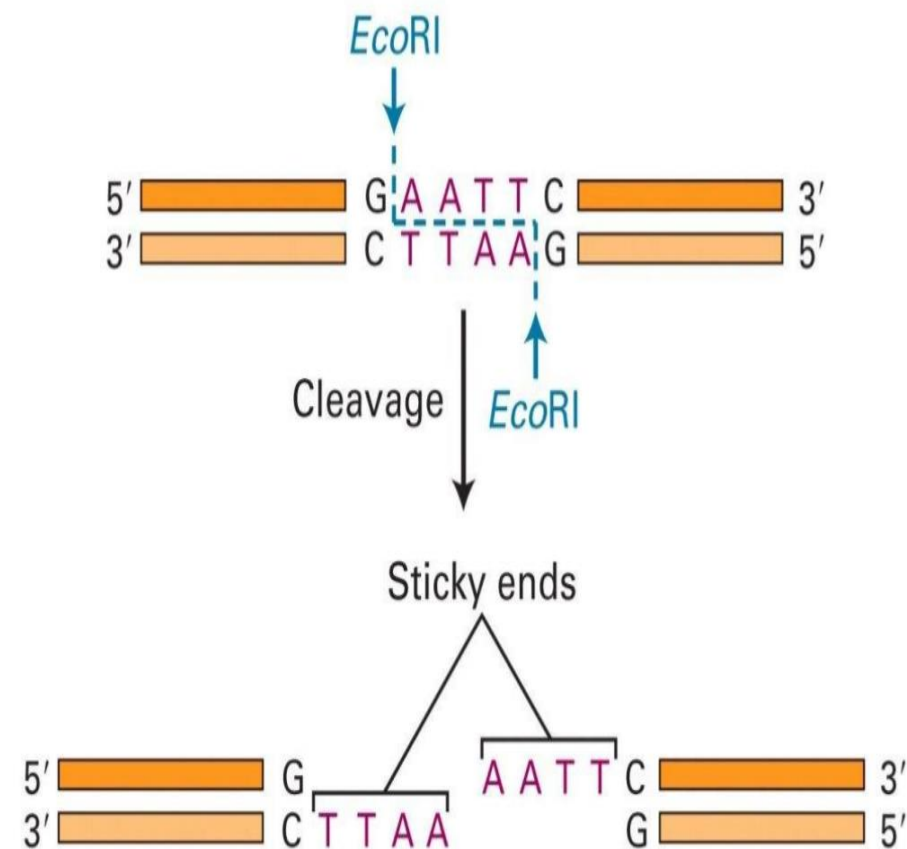
در این نوع، آنزیم، دو رشته DNA را به طور مساوی قطع کرده و انتهای بدون چسبندگی ایجاد می کند.

مثال: آنزیم HpaI

RESTRICTION ENZYMES



اصول کلونینگ با آنزیم محدودکننده



pishgam-bio.ir

نمونه‌هایی از آنزیم‌های برشی معروف

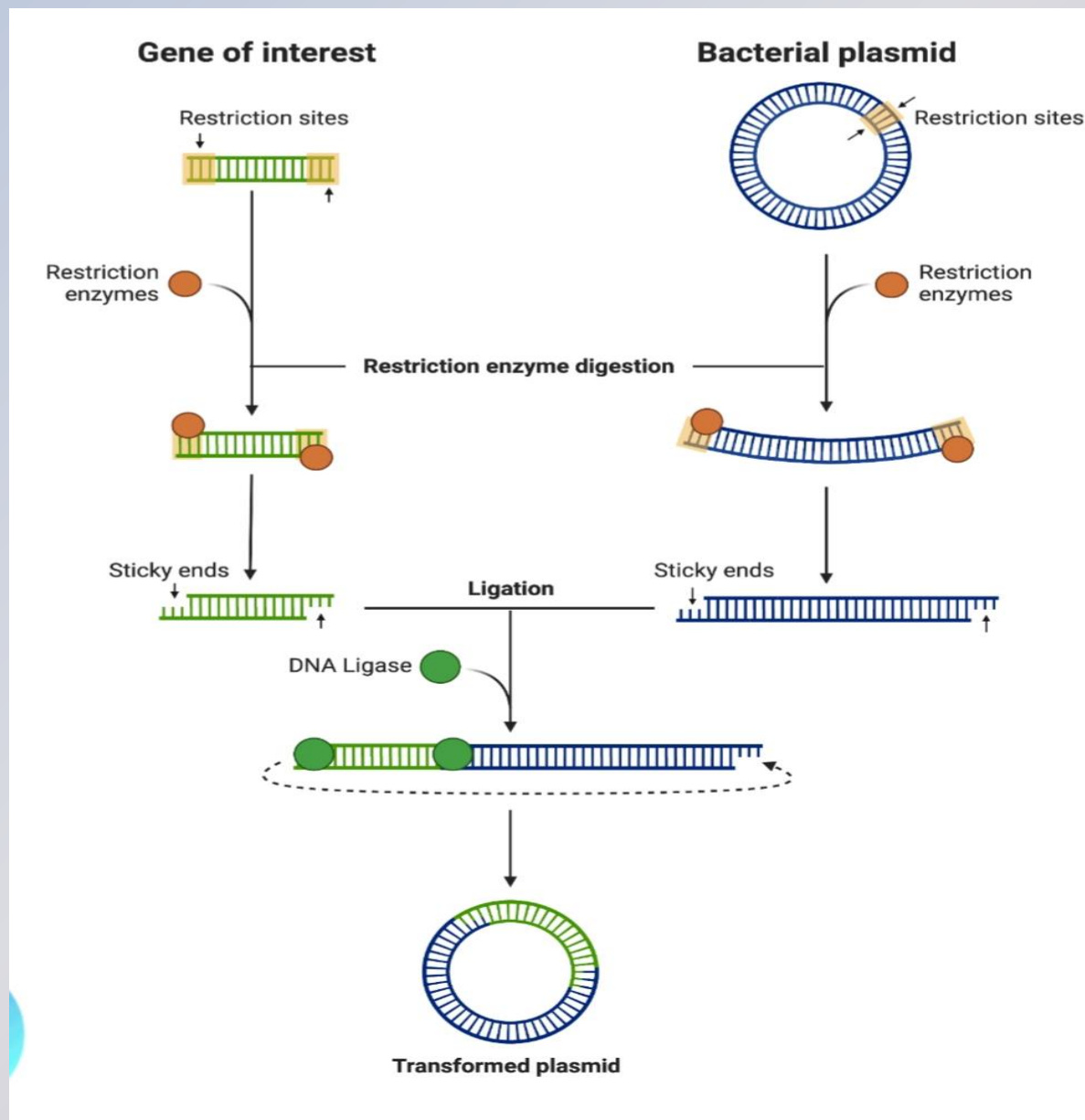
نام آنزیم	توالی شناسایی	نوع انتها
EcoRI	GAATTC	چسبنده
HindIII	AAGCTT	چسبنده
BamHI	GGATCC	چسبنده
HaeIII	GGCC	صاف

اندونوکلیازهای محدودکننده انتخاب شده و ویژگیهای توالی آنها

Endonuclease	Sequence Cleaved	Bacterial Source
<i>BamHI</i>	↓ G G A T C C C C T A G G ↑	<i>Bacillus amylo-liquefaciens</i> H
<i>BglII</i>	↓ A G A T C T T C T A G A ↑	<i>Bacillus globigii</i>
<i>EcoRI</i>	↓ G A A T T C C T T A A G ↑	<i>Escherichia coli</i> RY13
<i>EcoRII</i>	↓ C C T G G G G A C C ↑	<i>Escherichia coli</i> R245
<i>HindIII</i>	↓ A A G C T T T T C G A A ↑	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d
<i>HhaI</i>	↓ G C G C C G C G ↑	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
<i>HpaI</i>	↓ G T T A A C C A A T T G ↑	<i>Haemophilus para-influenzae</i>
<i>MelII</i>	↓ C C T N A G G G G A N T C C ↑	<i>Microcoleus</i> strain
<i>PstI</i>	↓ C T G C A G G A C G T C ↑	<i>Providencia stuartii</i> 164
<i>TaqI</i>	↓ T C G A A G C T ↑	<i>Thermus aquaticus</i> YTI

کاربردهای تکنیک هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودکننده

1. در مهندسی ژنتیک و کلونینگ ژنی: برای بریدن DNA و وارد کردن ژن‌ها به وکتورها یا حامل‌هایی مانند پلاسمیدها استفاده می‌شود.
2. در تشخیص جهش‌های ژنتیکی: برخی جهش‌ها باعث تغییر توالی برش آنزیم‌ها می‌شوند و می‌توان با بررسی الگوی برش، جهش را شناسایی کرد.
3. در نقشه‌برداری از ژنوم (DNA Mapping): برای شناسایی جایگاه‌های مختلف روی DNA از این آنزیم‌ها استفاده می‌شود. و آنالیز ژنومی برای مطالعه ساختار ژنوم‌ها.
4. در تکنیک‌های زیست‌شناسی مولکولی مانند RFLP و CRISPR: در تجزیه و تحلیل تفاوت‌های ژنتیکی و ویرایش ژنوم.



Restriction Enzymes Cloning

مثالی از عملکرد آنزیم : HpaI در ژن بتاگلوبین

HpaI توالی GTTAAC را شناسایی و در وسط آن برش ایجاد می‌کند:

5' - GTT|AAC - 3'

3' - CAA|TTG - 5'

آنزیم‌های محدودکننده مثل قیچی مولکولی عمل می‌کنند و بر اساس توالی مشخصی، DNA را برش می‌دهند.

این عمل فرآیندی است که در آن آنزیم‌های اندونوکئاز محدودکننده DNA را در توالی‌های خاصی برش می‌دهند و این تکنیک یکی از روش‌های کلیدی در زیست‌شناسی مولکولی و مهندسی ژنتیک است و برای جداسازی و تحلیل DNA و برش در توالی‌های خاص در مهندسی ژنتیک، کلونینگ، و تحلیل ژنتیکی کاربرد گسترده‌ای دارد.

مراحل انجام هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودکننده

1. انتخاب آنزیم محدودکننده مناسب: آنزیم باید توالی موردنظر را شناسایی کند.

2. آماده‌سازی واکنش شامل: DNA هدف (معمولاً پلاسمیدی ژنومی) / آنزیم محدودکننده مناسب / بافر مناسب (برای حفظ فعالیت آنزیم) / آب DNase/RNase-Free (برای تنظیم حجم نهایی واکنش).

3. انکوباسیون: مخلوط واکنش معمولاً در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ تا ۶۰ دقیقه قرار داده می‌شود. برخی آنزیم‌ها دمای بهینه متفاوتی دارند (مثلاً TaqI در ۶۵ درجه سانتی‌گراد فعال است).

4. غیرفعال‌سازی آنزیم: با گرما دادن (۶۵ یا ۸۰ درجه سانتی‌گراد، بسته به آنزیم). یا با روش‌های شیمیایی (برخی آنزیم‌ها نیاز به غیرفعال‌سازی ندارند).

5. بررسی نتایج هضم:

با انجام الکتروفورز ژل آگارز برای مشاهده قطعات DNA برش‌خورده بررسی نتایج صورت می‌گیرد.

انواع هضم آنزیمی

۱. هضم منفرد (Single Digestion): فقط از یک آنزیم محدودکننده استفاده می‌شود.

۲. هضم دوگانه (Double Digestion): دو آنزیم محدودکننده به‌طور هم‌زمان استفاده می‌شوند.
برای کلونینگ و تهیه قطعات خاصی از DNA استفاده می‌شود.

۳. هضم جزئی (Partial Digestion): مقدار آنزیم یا زمان انکوباسیون کاهش داده می‌شود تا برخی از سایت‌های
برش حفظ شوند.
در نقشه‌برداری ژنومی به کار می‌رود.

وسائل مواد و تجهیزات مورد نیاز



وسایل و مواد مورد نیاز



1. DNA هدف: DNA ژنومی، پلاسمیدی یا قطعه PCR شده

2. آنزیم محدودکننده مناسب: به میزان ۵ تا ۱۰ واحد آنزیمی

3. بافر آنزیمی (10X): متناسب با آنزیم مورد استفاده

4. آب DNase/RNase-Free برای تنظیم حجم نهایی واکنش

5. میکروتیوب ۰,۲ یا ۱,۵ میلی‌لیتری استریل

5. سمپلر (P1000 ، P200، P20،P10) و نوک سمپلر استریل

6. حمام آب (Water Bath یا ترموبلاک): برای انکوباسیون در دمای

۳۷ یا ۶۵ درجه سانتی‌گراد

7. سانتریفیوژ میکروتیوب: برای جمع‌آوری محتویات واکنش در ته لوله

8. بلوک‌های یخی یا استند نگهداری میکروتیوب روی یخ: برای جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها در طول آماده‌سازی

9. هیتز (در صورت نیاز به غیرفعال‌سازی آنزیم با حرارت)

10. ژل آگارز و بافر الکتروفورز: برای بررسی نتایج برش DNA

11. رنگ‌آمیزی DNA (اتیدیوم بروماید یا SYBR Safe)

12. ترانس‌ایلو میناتور UV: برای مشاهده باندهای DNA در ژل



Preparation of reaction mixture

Sr. No.	Ingredients	Volume in ul
1	DNA Sample	15ul
2	10X Assay Buffer	3.0ul
3	Molecular Biology Grade Water	10ul
4	EcoRI	1ul
5	PstI	1ul
	Total volume	30ul

روش کار



مراحل انجام هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودکننده:

1. انتخاب آنزیم مناسب: بررسی توالی DNA و انتخاب آنزیم محدودکننده متناسب
2. آماده‌سازی واکنش در میکروتیوب استریل:
DNA هدف: ۵۰۰ نانوگرم تا ۱ میکروگرم
آنزیم محدودکننده: ۵ تا ۱۰ واحد آنزیمی
بافر 10X: مقدار ۲ میکرولیتر (در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر)
آب DNase/RNase-Free: برای تنظیم حجم نهایی تا ۲۰ یا ۵۰ میکرولیتر
3. انکوباسیون واکنش: قرار دادن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد
مدت زمان: ۱۵ تا ۶۰ دقیقه (بسته به آنزیم)
در صورت نیاز به دمای بالاتر تنظیم دما روی ۶۵ درجه سانتی‌گراد

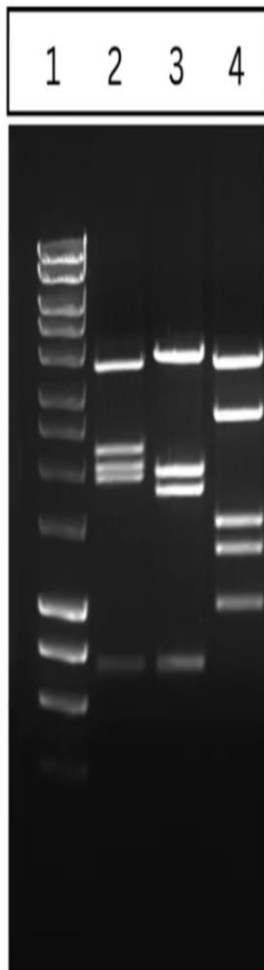
Observe Results

Lane 1: 1 kb DNA ladder

Lane 2: Reference Sample 1

Lane 3: Reference Sample 2

Lane 4: Reference Sample 3



4. غیرفعال سازی آنزیم:

روش حرارتی: ۶۵ یا ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه

روش شیمیایی (در صورت نیاز): استفاده از مواد مهارکننده آنزیم

5. بررسی نتایج با الکتروفورز ژل آگارز: استفاده از ژل آگارز ۱ تا ۲٪

رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید یا SYBR Safe

مشاهده الگوی برش با UV ترانس ایلومیناتور

تحلیل و تفسیر نتایج هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودکننده

1. بررسی الگوی باندهای DNA روی ژل آگارز:

پس از انجام هضم آنزیمی، محصولات برش‌یافته روی ژل آگارز الکتروفورز شده، نتایج بررسی و تحلیل نتایج بر اساس موارد زیر انجام می‌شود:

وجود باندهای مجزا و مشخص نشان‌دهنده برش کامل DNA توسط آنزیم محدودکننده است.

مشاهده یک باند مشابه DNA دست‌نخورده: احتمالاً هضم به‌درستی انجام نشده است (عدم فعالیت آنزیم، مشکلات بافر، یا غلظت پایین آنزیم).

حضور باندهای غیرمنتظره:

ممکن است به دلیل برش غیراختصاصی، وجود جایگاه‌های ناشناخته در توالی DNA، یا تخریب DNA باشد.

2. مقایسه با مارکر:

باندهای حاصل از هضم باید با اندازه‌های مورد انتظار (Cutter) پیش‌بینی شده در مارکر، مطابقت داشته باشند.

اگر اندازه باندها مطابق انتظار نیست، ممکن است دلایل زیر بررسی شوند:

برش ناکامل DNA به علت کمبود آنزیم یا زمان ناکافی انکوباسیون

فعالیت آنزیم‌های دیگر (ناخالصی در آنزیم)

مقاومت برخی جایگاه‌های برش در DNA

3. بررسی نیاز به هضم مجدد:

در صورتی که برش ناکامل باشد یا نتایج غیرمنتظره مشاهده شود، ممکن است لازم باشد:

غلظت آنزیم افزایش داده شود.

مدت زمان انکوباسیون طولانی‌تر شود.

دمای انکوباسیون و شرایط واکنش مجدداً بررسی گردد.

توجه: Star Activity چیست؟

به فعالیت غیرمنتظره و ناخواسته یک آنزیم محدودکننده اشاره دارد که معمولاً به دلیل شرایط غیرمناسب (مانند تغییرات pH، دما، یا غلظت نمک) در حین واکنش‌های محدودکننده اتفاق می‌افتد. این شرایط می‌تواند منجر به برش‌های غیرقابل پیش‌بینی در DNA شود که باعث ایجاد قطعات اضافی و غیرطبیعی می‌شود.

علت‌های Star activity:

1. دمای بالا: آنزیم‌های محدودکننده ممکن است در دماهای بالاتر از محدوده بهینه خود شروع به فعالیت غیرطبیعی کنند.
2. pH نامناسب: تغییرات در pH محیط می‌تواند باعث تغییر ساختار آنزیم‌ها و افزایش فعالیت اشتباهی آن‌ها شود.
3. غلظت‌های بالا یا پایین نمک: غلظت زیاد یا کم نمک در بافر می‌تواند بر فعالیت آنزیم اثر بگذارد.
4. زمان طولانی: طولانی شدن زمان انکوباسیون می‌تواند به فعال شدن آنزیم‌های محدودکننده غیرطبیعی منجر شود.

اثرات Star activity:

بریدن نواحی غیرمنتظره: Star activity ممکن است باعث برش در سایت‌های غیرهدف شود که به تغییرات ناخواسته در الگوی قطعات برش خورده منجر می‌شود.

نتایج نادرست: این فعالیت غیرعادی می‌تواند باعث تفسیر اشتباه نتایج آزمایش‌هایی مانند RFLP یا restriction digestion شود.

برای جلوگیری از Star activity معمولاً توصیه می‌شود که:

آنزیم‌های محدودکننده در شرایط دمایی و شیمیایی بهینه نگهداری شوند.

از بافرهای مناسب و غلظت‌های درست استفاده شود.

زمان انکوباسیون تنظیم شود تا از فعال شدن ناخواسته آنزیم‌ها جلوگیری شود.

در واقع، Star activity نشان‌دهنده رفتار غیرمنتظره آنزیم محدودکننده است که می‌تواند نتایج آزمایشات مولکولی را مختل کند.

