Enzimi di restrizione

di Vittorio Scornaienchi

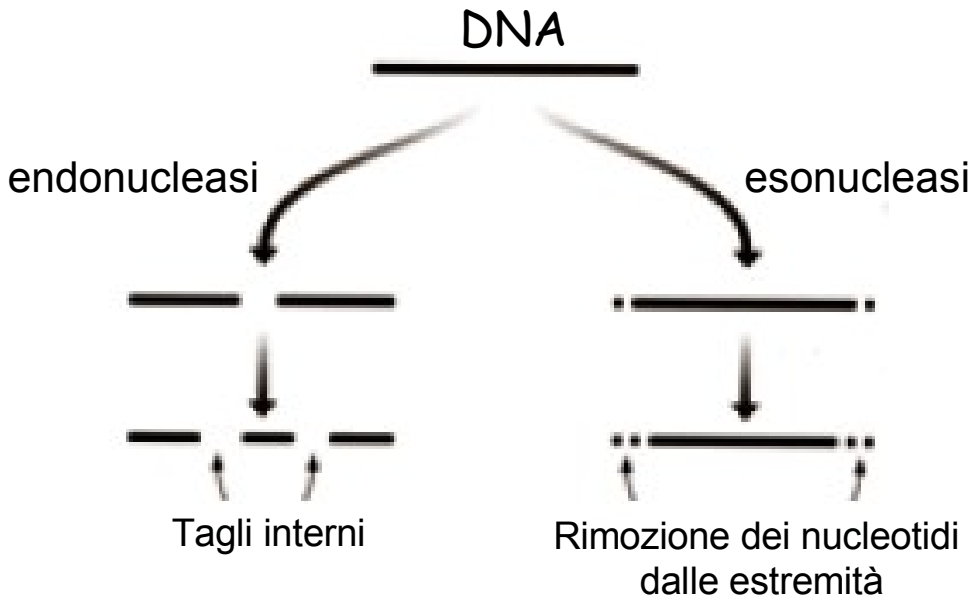
Generalità

Nucleasi

Le nucleasi sono enzimi che tagliano i legami sui filamenti degli acidi nucleici:

5. Le **esonucleasi** aggrediscono una delle estremità libere del DNA e iniziano a tagliare proseguendo verso l'estremità opposta.

7. Le **endonucleasi** invece tagliano i legami interni in una molecola di DNA lineare o circolare.



Endonucleasi di restrizione

Le endonucleasi di restrizione si legano ad una sequenza specifica di DNA (sito di riconoscimento) e tagliano entrambi i filamenti di DNA.

La sequenza riconosciuta **NON E' UNICA**, ma varia da enzima ad enzima.

Esistono però endonucleasi diverse che tagliano la stessa sequenza di DNA (isoschizomeri).

Classi di enzimi di restrizione

Gli enzimi di restrizione sono divisi in tre categorie: **endonucleasi di tipo I,II e III**

Le endonucleasi di tipo I e III necessitano di energia per il taglio e possono anche catalizzare altre reazioni di modificazione del Dna

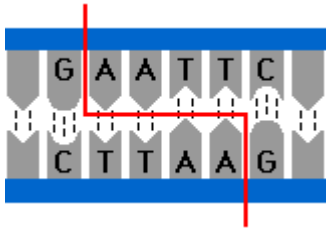
le **endunucleasi di tipo I** tagliano il Dna in punti casuali

le **endonucleasi di tipo III** riconoscono specifici siti bersaglio ed effettuano il taglio in corrispondenza o vicino a questi.

Le **endonucleasi di tipo II**, gli enzimi di restrizione propriamente detti non necessitano di energia per la loro funzione ed il taglio avviene in corrispondenza di sequenze molto specifiche.

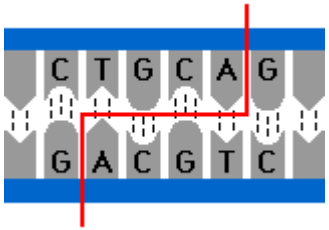
Enzimi di restrizione

Il taglio sulla doppia elica del DNA può essere simmetrico o sfalsato, generando tipi diversi di **estremità**, piatte oppure sporgenti.



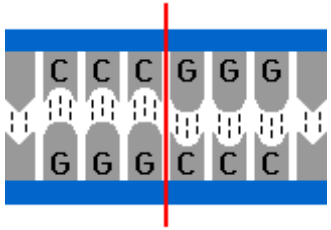
EcoRI

Estremità sporgenti



PstI

Estremità sporgenti



SmaI

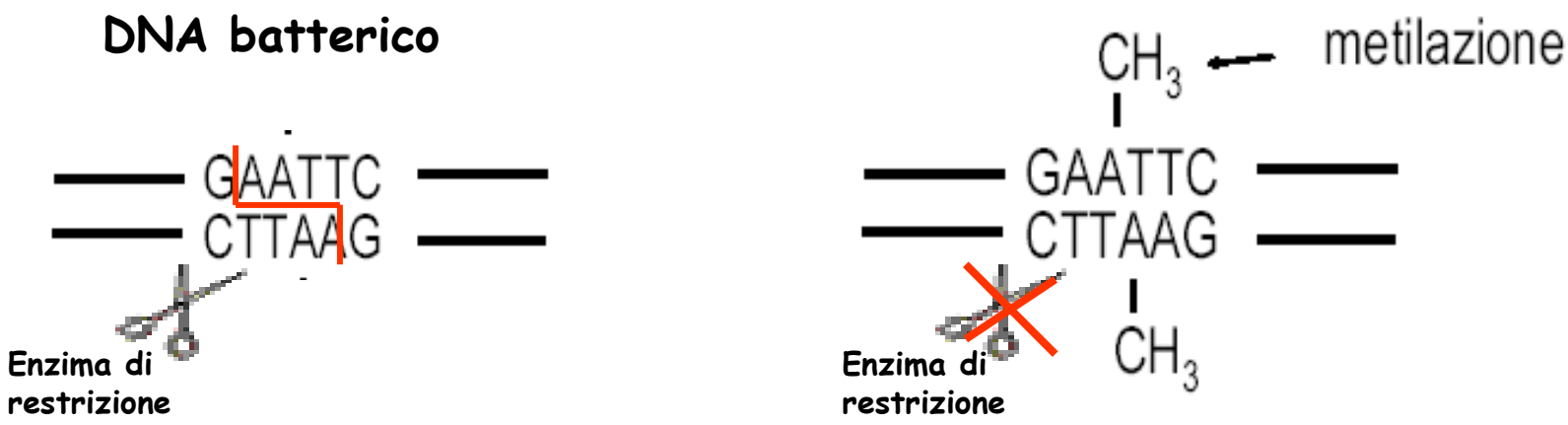
Estremità piatte

Endonucleasi di restrizione

Molti batteri producono enzimi di restrizione che tagliano il DNA a livello di specifiche sequenze di nucleotidi.

In natura, gli enzimi di restrizione difendono i batteri dall'attacco dei virus, tagliando il DNA del virus stesso.

Per evitare che anche il proprio DNA venga attaccato dagli enzimi di restrizione, i batteri ospiti hanno adottato un sistema di protezione chimico, attaccando gruppi metilici (- CH_3) ad alcune basi del proprio DNA, che disattivano l'azione enzimatica.



Endonucleasi di restrizione

Molti enzimi di restrizione tagliano tratti di DNA palindromi, cioè che si leggono allo stesso modo in una direzione, su un filamento, e nella direzione opposta, sull'altro filamento.

Nel linguaggio un palindromo (dal greco: palin [= indietro] dromw [= corro]) è un verso che, letto da sinistra verso destra o da destra verso sinistra, ha lo stesso significato.

Ad esempio parole come: **AMA, ORO, ANNA, ...**
alcune brevi frasi: **ARTE TETRA, AI LATI D'ITALIA, …**

Inoltre, il DNA viene tagliato tra le stesse due basi su entrambi i filamenti: nel caso illustrato in figura, tra G e A. Si ottengono cosi due frammenti di DNA, uno con un estremità di un filamento singolo che si legge TTAA e l'altro con un'estremità anch'essa di filamento singolo che si legge AATT (estremità adesive)

Nomenclatura degli enzimi di restrizione

Per assegnare in modo chiaro ed univoco un **codice** ad un enzima di restrizione si è deciso che:

1. Le prime tre lettere, scritte in corsivo, sono prese dalla nomenclatura del batterio di origine.

2. Tipi differenti dello stesso organismo sono identificati da una quarta lettera minuscola (Es. *Hin**d***, *Hin**f***).

3. Segue una lettera maiuscola o un numero, che identificano un ceppo particolare di quel batterio, ove fosse necessario.

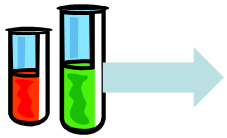
4. Un numero romano indica l'ordine di scoperta, qualora dallo stesso batterio vengano isolati enzimi diversi.

Esempi

Enzima	Organismo di origine	Sequenza consenso	Taglio
EcoRI	*Escherichia coli*	5'---GAATTC---3' 3'---CTTAAG---5'	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'
BamHI	*Bacillus amyloliquefaciens*	5'---GGATCC---3' 3'---CCTAGG---5'	5'---G GATCC---3' 3'---CCTAG G---5'
HindIII	*Haemophilus influenzae*	5'---AAGCTT---3' 3'---TTCGAA---5'	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A---5'
TaqI	*Thermus aquaticus*	5'---TCGA---3' 3'---AGCT---5'	5'---T CGA---3' 3'---AGC T---5'
AluI	*Arthrobacter luteus*	5'---AGCT---3' 3'---TCGA---5'	5'---AG CT---3' 3'---TC GA---5'

Analisi di restrizione: un esempio…

DNA individuo 1



PCR

Amplificazione di un frammento di DNA con 2 siti di taglio per l'enzima Alu I

5'----------AGCT----------AGCT-------3'
3'----------TCGA----------TCGA-------5'

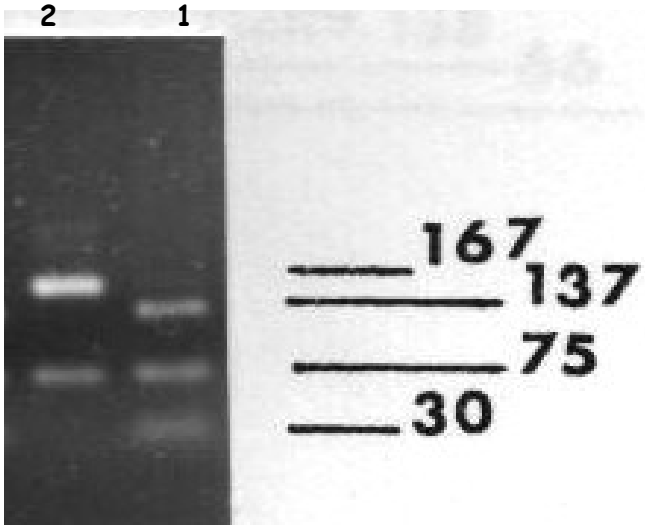
Lunghezza: 242 bp

DNA individuo 2

PCR

Amplificazione di un frammento di DNA con 1 sito di taglio per l'enzima Alu I

5'----------AGCT----------3'
3'----------TCGA----------5'

Lunghezza: 242 bp

Digestione dei frammenti con l'enzima Alu I