

MIRACLE Academy

قال تعالى (يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ)

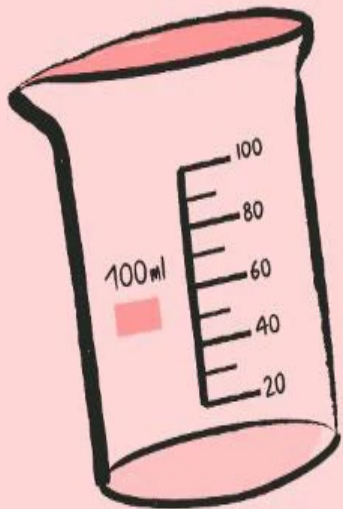
تفريغ البيوتكنو
زميلتكم نهى حسن



لجان الرُفعات

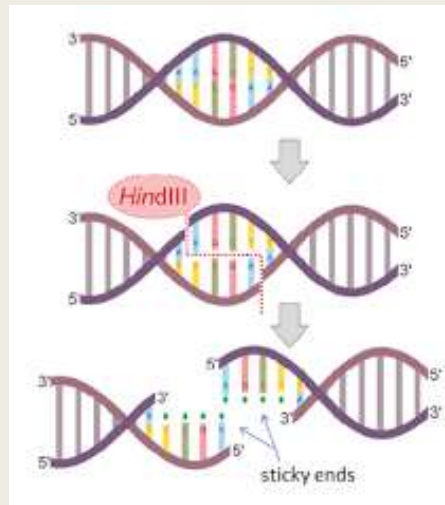


* Biotechnology *



RESTRICTION ENDONUCLEASES

Dr. Iman Mansi



Restriction Enzymes

- ❑ ^{قطع} Restriction enzymes are endonucleases (Endo (inside), nuclease(cuts nucleic acid)), which catalyze the cleavage of the phosphodiester bonds within both strands of DNA.
- ❑ They require Mg^{+2} for activity and generate a 5 prime (5') phosphate and a 3 prime (3') hydroxyl group at the point of cleavage.

from 2 strand

حتى يتم القطع احنا بحاجة ل co-factor الي هم mg
وهو اكثر اشي نستخدمه ويطلع لنا 5 prime
phosphate group and 3 prime hydroxyl
عند عمليه القطع

G↓GATCC

↑ موقع القطع

CCAG↑C

complementary

- The distinguishing feature of restriction enzymes is that they only cut at very specific sequences of bases. This specific DNA sequence is called recognition sequence.

- Restriction enzymes are traditionally classified according to the subunit* composition, cleavage* position, sequence-specificity* and cofactor* requirements.

مثال :-

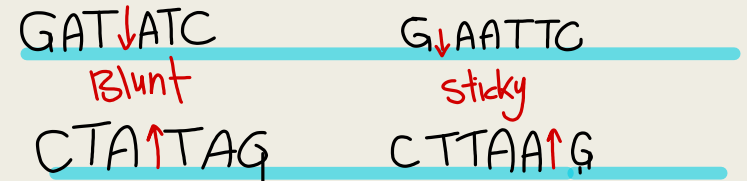
إذا بدي اعمل cloning لجين معين بدي ادور على restriction enzymes مش موجود ضمن هاد الجين وموجود ضمن multiple cloning تبع هاد. Vector (فيه multiple cloning sites 10-15 انزيم مش مكررين يعني ما رح يقطع غير بمكان واحد فلازم ادور ب sequence تبقي انه ما فيه ولا واحد منهم لحتى ما يصير غلط بالقطع ويخرب ال

- ❑ A restriction enzyme requires a specific double stranded recognition sequence of nucleotides to cut DNA.
- ❑ Recognition sites are usually 4 to 8 base pairs in length.
- ❑ Cleavage occurs within or near the site.

مرات هاد sequence يتم قطعه من وراه. وممكن. لا واذا قطع من النص بالضبط اسمه blunt ends (الأطراف غير اللاصقه يتم قطع ال DNA بشكل مستقيم ومتساو وصعب اربطهم مع بعض) واذا كان قاطع قبل او بعد بكون عندي. زوائد من طول DNA نسميهم sticky ends اذا تقو بلزقو اسرع وهاد خيار افضل من blunt

Enzyme Activity

Scanning



GGACGCTAGCTGAT**GAATTC**GCATCGGATCCGAATCCGCTCTTTCAA
CCTGCGATCGACTA**CTTAAG**CGTAGCCTAGGCTTAGGCGAGAAAGTT

Recognition Sequence

GGACGCTAGCTGAT**GAATTC**GCATCGGATCCGAATCCGCTCTTTCAA
CCTGCGATCGACTA**CTTAAG**CGTAGCCTAGGCTTAGGCGAGAAAGTT

Cleavage

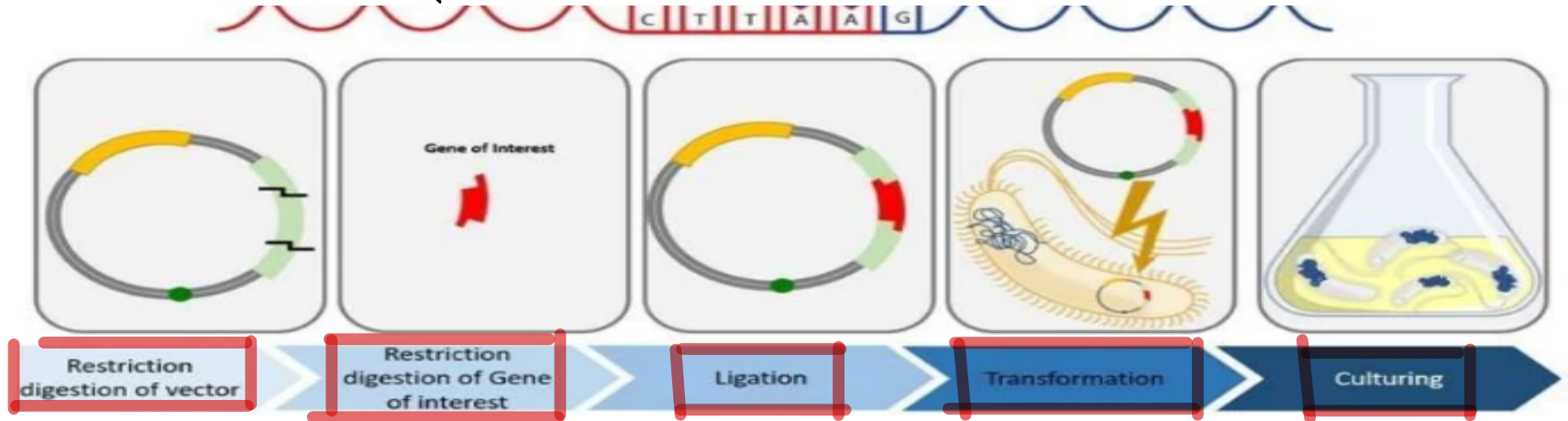
GGACGCTAGCTGAT**G** **AATTC**GCATCGGATCCGAATCCGCTCTTTCAA
CCTGCGATCGACTA**CTTAA** **G**CGTAGCCTAGGCTTAGGCGAGAAAGTT

sticky

Biological Function

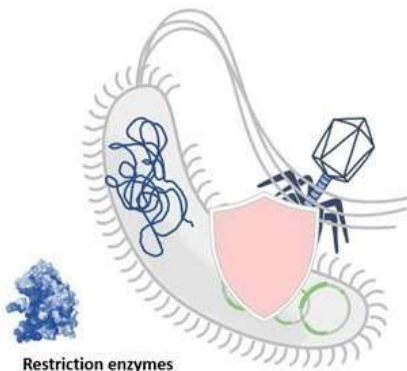
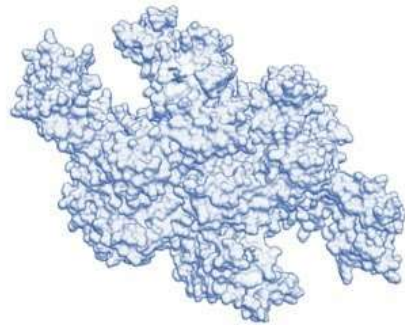
- ❑ Restriction enzyme is part of the cell's restriction-modification system in bacteria. احنا علوانا دخل كدو شغل البكتيريا
- ❑ The phenomenon of restriction modification in bacteria is a small scale immune system for protection from infection by foreign DNA.
- ❑ [عن هون اجت الفكرة] Bacteria can protect themselves only after foreign DNA has entered their cytoplasm (as bacteriophages).

بعد ما نقطعهم نرووح نربطه باشي ثاني مثلا مع البلازميد. وبقطع البلازميد بنفس الانزيم وبعدين افصله واوخذ الي مقطوعين بنفس الانزيم واحط معهم ligase enzymes) يربط قطع ال DNA عنريق تكوين رابطه فوسفودايستر بين النيوكليوتيدات بالمختصر هو صمغ يربط القطع مع بعض)

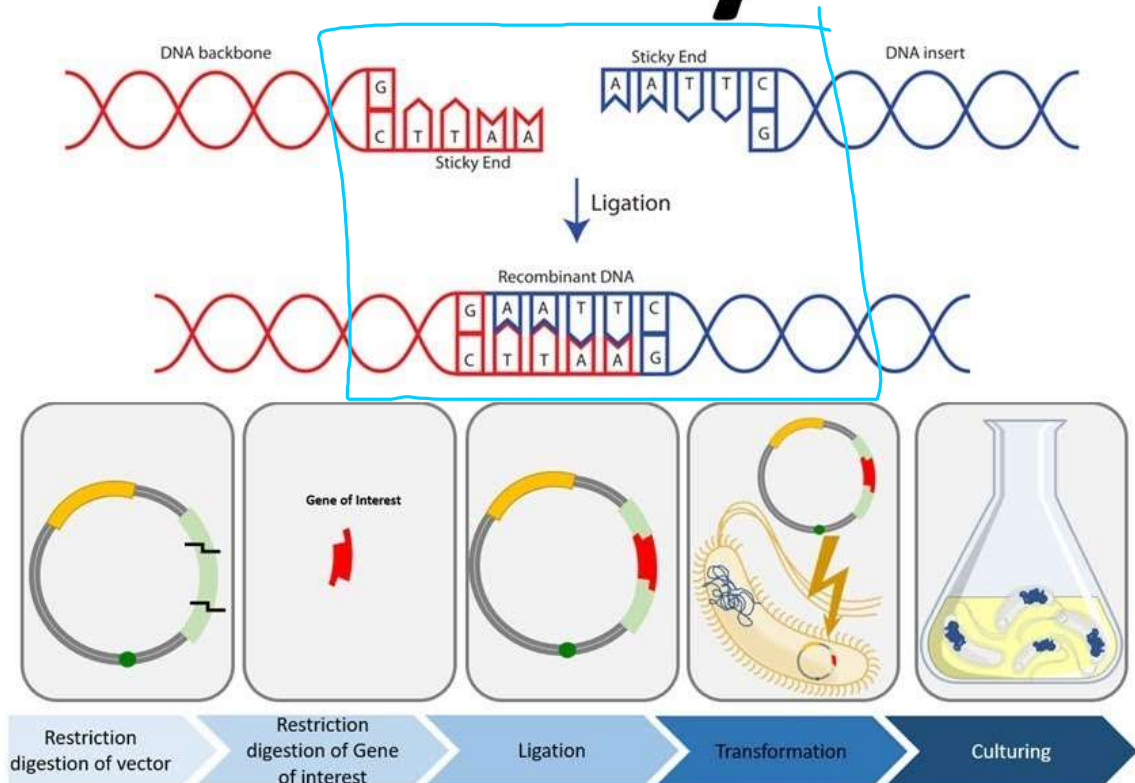


Biological Function

Restriction enzyme



Restriction enzymes



Biological Role of RE

- ❑ Restriction Modification System -restriction enzymes are paired with methylases.
- ❑ Methylases are enzymes that add methyl groups to specific nucleotides within the recognition sequence. The methylation prevents recognition by the restriction enzyme.
- ❑ Therefore, the restriction enzyme within a cell doesn't destroy its own DNA. However the restriction enzyme can destroy foreign DNA which enters the cell such as bacteriophage.

Naming of Restriction enzymes

- Restriction enzymes are named according to the organism from which they are isolated.
- This is done by using the first letter of the genus followed by the first two letters of the species and additional letter or number represent the strain or serotypes.
- Only certain strains or sub-strains of a particular species may produce restriction enzymes.



Example of restriction enzymes

التسميه تبعثهم اول حرف ويكون capital هو Genus والي بعدها ويكون حرفين small هو species وممكن يكون في additional letter ممكن يكون موجود وممكن يكون لا وتكون تحكي عن serotypes or strain والرقم يدل على عدد الانزيم المكتشف من هاد النوع

EcoRI *Escherichia coli* R

G/AATTC

BamHI *Bacillus amyloliquefaciens* H

G/GATCC

HindIII *Haemophilus influenzae* Rd

A/AGCTT

PstI *Providencia stuartii*

CTGCA/G

PmeI *Psuedomonas mendocina*

GTTT/AAAC

Recognition Sequences

EcoRI G/AATTC

PmeI

stickiness

BamHI G/GATCC

Blunt

HindIII A/AGCTT

PstI CTGCA/G

PmeI GTTT/AAAC

HincII GTY/RAC

FunII G/AATTC

Digestion Conditions

■ XbaI

- Buffer 2: (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7.9 at 25 °C.
- 100 µg/ml BSA — يستخدم مع أغلب البروتينات
- Incubate at 37°
- 1 Unit digest 1 µg DNA in 1 hour
- Heat inactivate 65° for 20min

أو أكثر عن 90° لمدة 10 دقائق

DNA متأثر بالحرارة
فقط الانزيم

Typical RE Reaction

20 μ l reaction.

ففكره اضافته الماء
هسا ال buffer دائما بكون 10x ف اذا بحط كل volume الي
هو 10 microliter ف نظر نحط 1 من bsa واذا 20 بحط 2

10 μ l DNA (~1 μ g total)

7 μ l water

2 μ l 10X reaction buffer

1 μ l RE 10units/ μ l

Incubate 1 hour at appropriate temperature

Note:

1. 10 fold excess enzyme ensures complete digestion.
2. Enzyme should never exceed 1/10th of reaction.
3. BSA is often recommended because it stabilizes the enzyme.
add 0.2 μ l of BSA stock for 20 μ l reaction.
4. For plasmid minipreps – add 1 μ l RNase the last 5 min of digestion.

لحصى الانزيمه عن التلف

Double Digest

Enzyme		Supplied NEBuffer	% in B1	% in B2	% in B3	% in B4
SacI		NEBuffer 1 + BSA	100	50	10	100
SacII		NEBuffer 4	25	75	10	100
SalI		NEBuffer 3 + BSA	0	0	100	0
SapI		NEBuffer 4	75	50	0	100
Sau3AI		NEBuffer 1 + BSA	100	50	10	100
Sau96I		NEBuffer 4	50	100	100	100
SbfI		NEBuffer 4	75	50	0	100

Double Digest Option

1. Mix the enzymes in the same compatible buffers
2. Conduct sequential digest

Caution: some enzymes display star activity in certain buffers which causes them to digest the DNA at sites other than the standard recognition site

الفكره من الجدول انه من خلاله انه استخدم انزيمين مختلفين لقطع DNA في مواقع متعدده في نفس الوقت بدل من انزيم واحد
الاعمده الي فيهم أرقام بتدلنا على نسبة نشاط كل انزيم في كل نوع من المحاليل

100 ممتاز شغله

50-75% كويس

25-10 ضعيف جدا

0 ما يشتغل

فكره اني اخلط انزيمين مع بعض شرط يكون نسبة buffer عندهم الاثنين هي أكثر او تساوي 50%
مثال افضل اخلط sbf1 مع sau961 ب 4 buffer مثال sbf1 مع ssp1 في B4 and B1