

Giới thiệu một số enzyme thông dụng trong sinh học phân tử

Nguyễn Hoàng Thiên Phúc
nhtphuc@hcmus.edu.vn

Mục tiêu

- ☐ Hiểu được vai trò, ý nghĩa của một số enzyme dùng trong sinh học phân tử
- ☐ Thiết lập được phản ứng với 1 enzyme
- ☐ Phân tích được kết quả thí nghiệm với enzyme

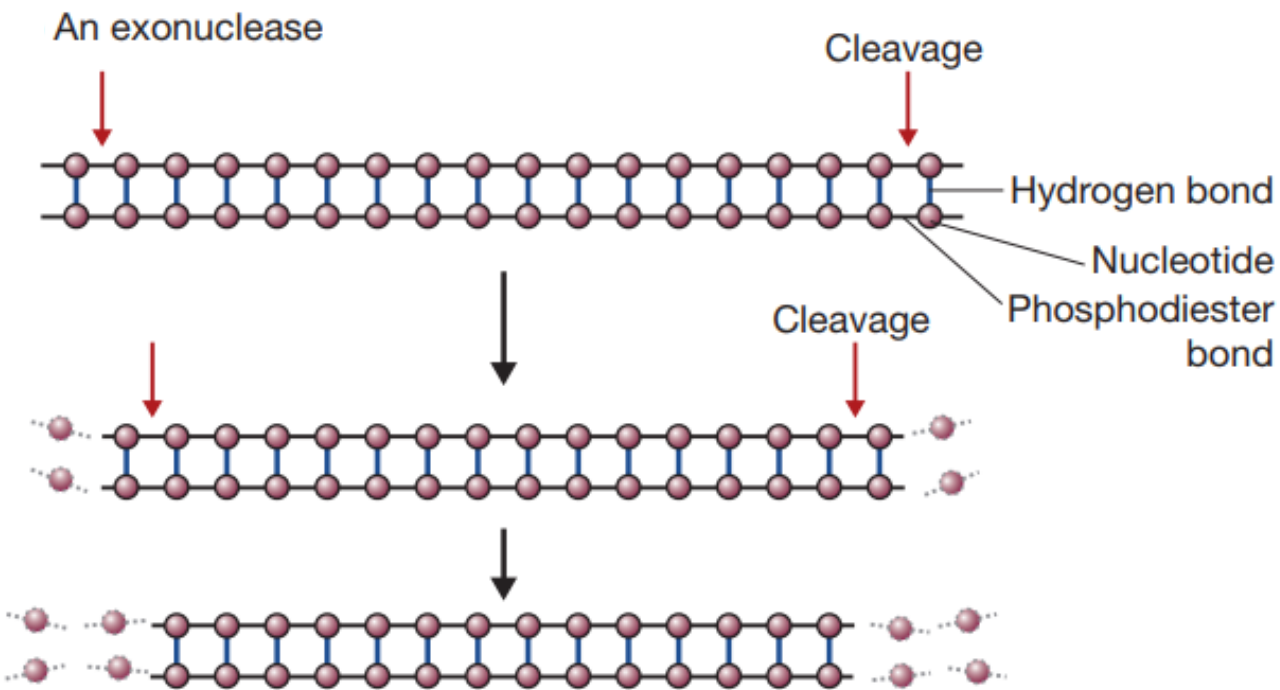
Lý thuyết

- Nuclease
- Polymerase
- Ligase

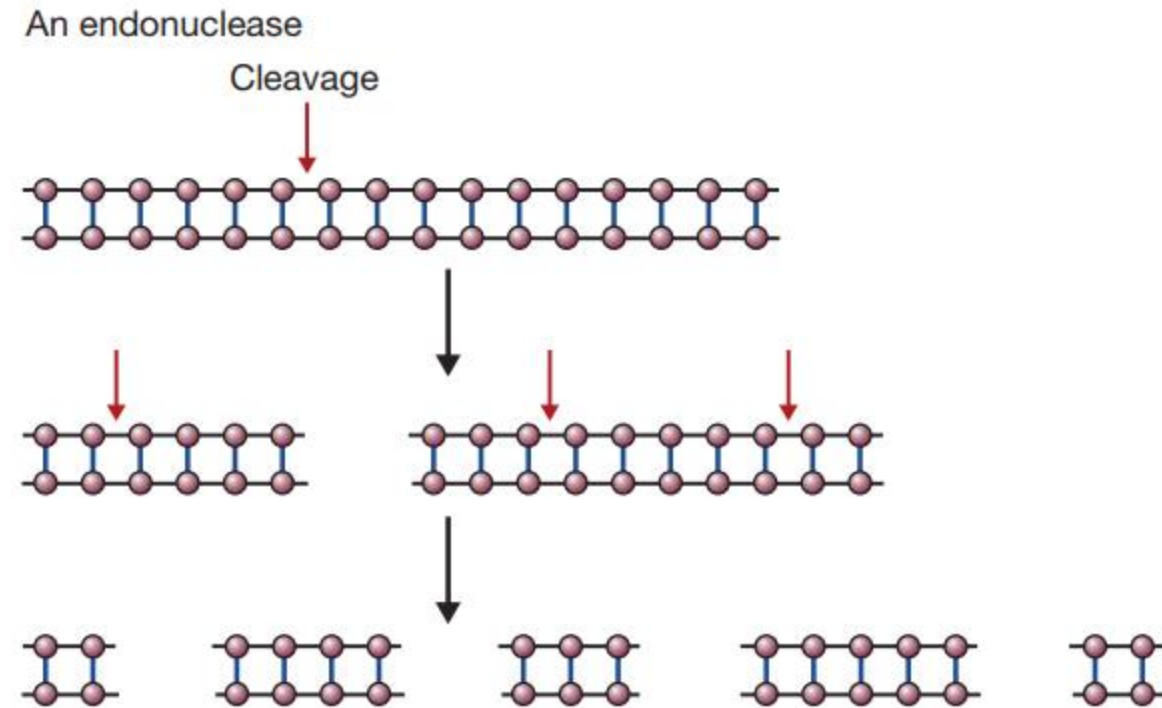
Lý thuyết - nuclease

Nuclease – enzyme phân hủy DNA thông qua việc cắt đứt các liên kết phosphodiester, liên kết nối các nucleotide với nhau trên chuỗi DNA:

exonuclease



endonuclease

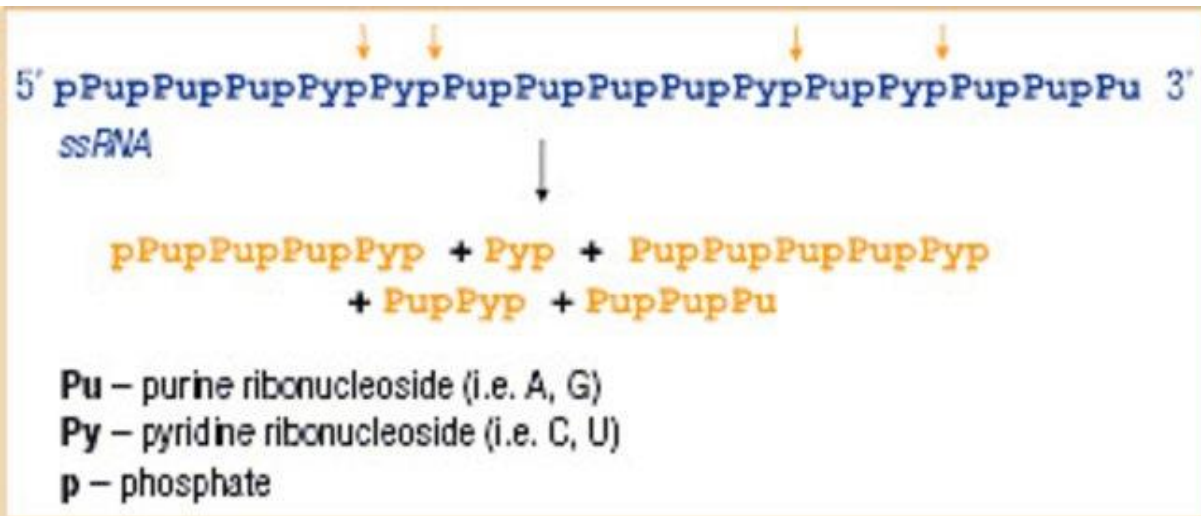


Lý thuyết - nuclease

Trong SHPT, một số enzyme nuclease thường được sử dụng phổ biến:

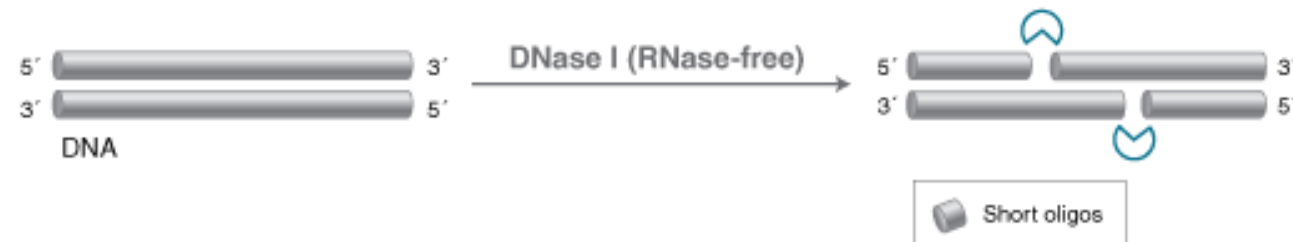
- Rnase
- Dnase
- Enzyme cắt giới hạn (Restriction enzyme –RE)

Rnase A



Phân cắt RNA giúp loại bỏ RNA ra khỏi mẫu

Dnase I



Phân cắt DNA giúp loại bỏ DNA ra khỏi mẫu

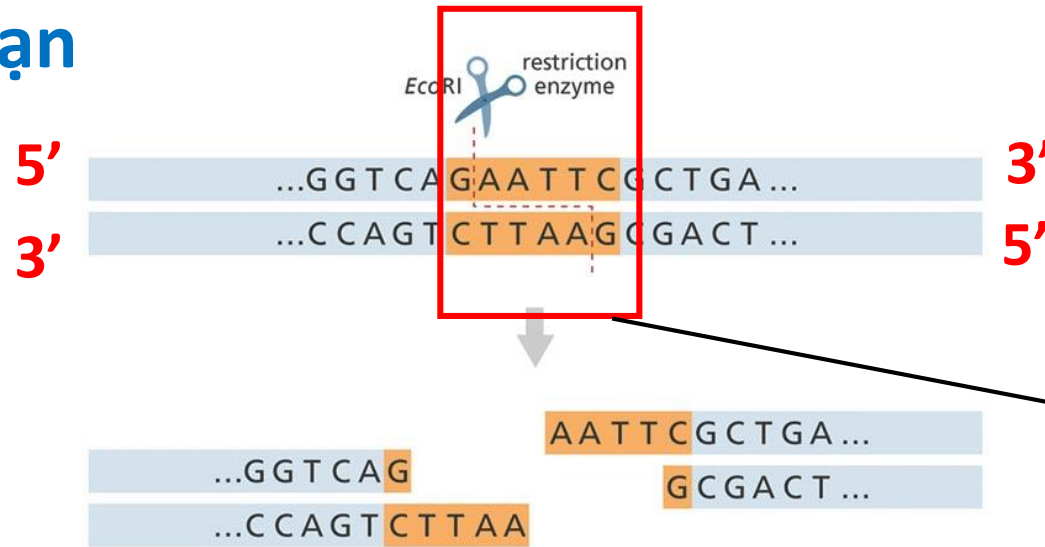
Lý thuyết - nuclease

Enzyme cắt giới hạn

	Type I	Type II	Type III
Vị trí cắt	Ngẫu nhiên, cách vị trí nhận diện khoảng >1000nu	Cắt ngay tại vị trí nhận diện	Vị trí cắt cách vị trí nhận diện khoảng 20nu
Vị trí nhận diện	bipartite	Chủ yếu palindrome	Non-palindrome
Ví dụ	AAC (N ₆) GTGC (N _{>400})/	GCC/GGC	CAGCAG (N) ₂₅₋₂₆ /

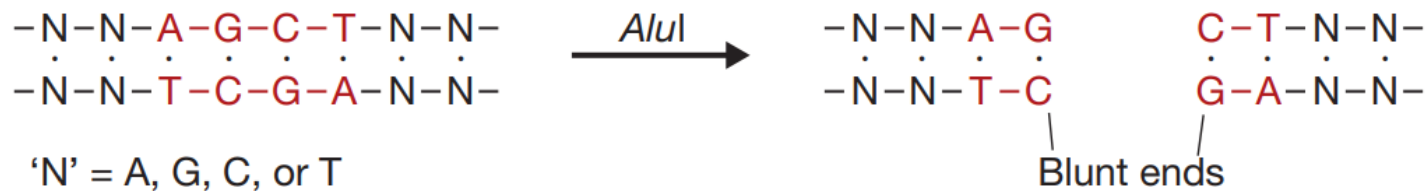
Lý thuyết - nuclease

Enzyme cắt giới hạn



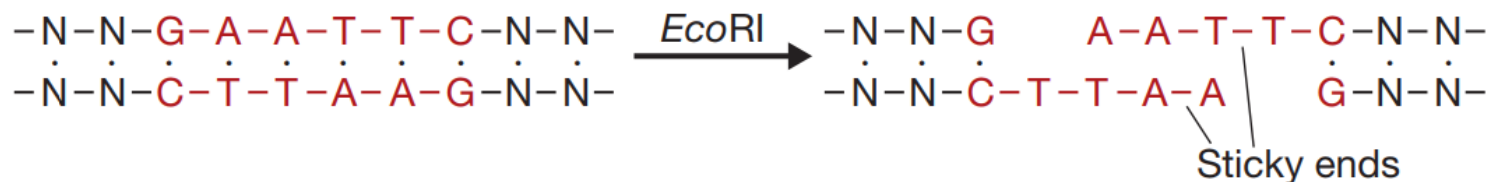
- Vị trí nhận diện RE
- Trình tự palindrome
- Không phụ thuộc loài

(a) Production of blunt ends



Đầu bằng (blunt ends)

(b) Production of sticky ends



Đầu dính/ đầu so le
(sticky ends)

Lý thuyết - nuclease

Enzyme cắt giới hạn

Ví dụ: Enzyme cắt giới hạn *EcoRI*

Viết tắt	Ý nghĩa	Miêu tả
<i>E</i>	<i>Escherichia</i>	Chi (genus)
<i>co</i>	<i>coli</i>	Loài (species)
R	RY13	Chủng
I	1 st	Thứ tự enzyme được phát hiện ở vi khuẩn này

Lý thuyết - nuclease

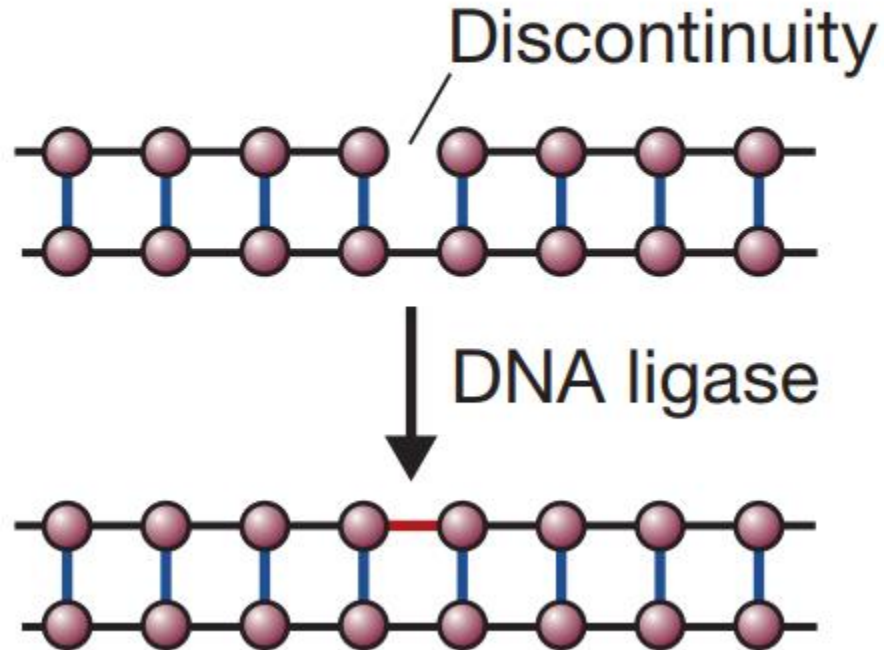
Enzyme cắt giới hạn

ENZYME	ORGANISM	RECOGNITION SEQUENCE*	BLUNT OR STICKY END
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC	Sticky
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GGATCC	Sticky
<i>BglII</i>	<i>Bacillus globigii</i>	AGATCT	Sticky
<i>PvuI</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CGATCG	Sticky
<i>PvuII</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CAGCTG	Blunt
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d	AAGCTT	Sticky
<i>Hinfl</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> R _f	GANTC	Sticky
<i>Sau3A</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	GATC	Sticky
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGCT	Blunt
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	TCGA	Sticky
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GGCC	Blunt
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GCGGCCGC	Sticky
<i>SfiI</i>	<i>Streptomyces fimbriatus</i>	GGCCNNNNNGGCC	Sticky

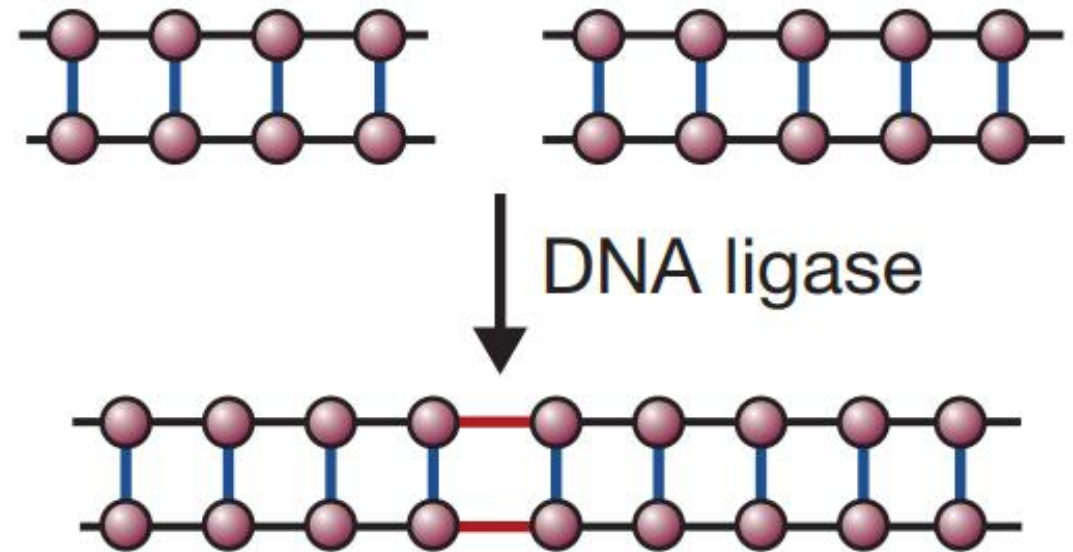
Lý thuyết - ligase

Ligase – enzyme có khả năng nối trình tự mạch đơn không liên tục trên mạch đôi DNA hay nối hai đoạn DNA với nhau thông qua liên kết phosphodiester

(a) Discontinuity repair



(b) Joining two molecules



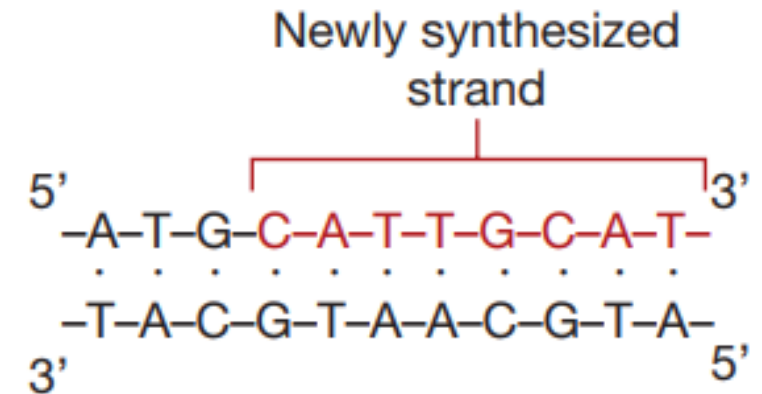
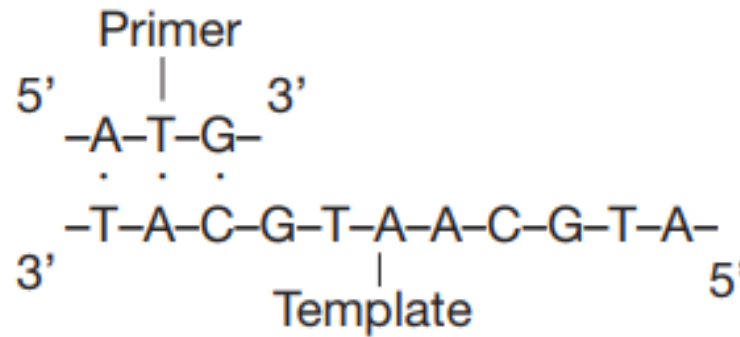
T4 DNA ligase là enzyme được sử dụng thông dụng trong các phản ứng nối gene

Lý thuyết - polymerase

Polymerase – enzyme tổng hợp mạch DNA mới dựa trên mạch bổ sung là trình tự DNA hay RNA

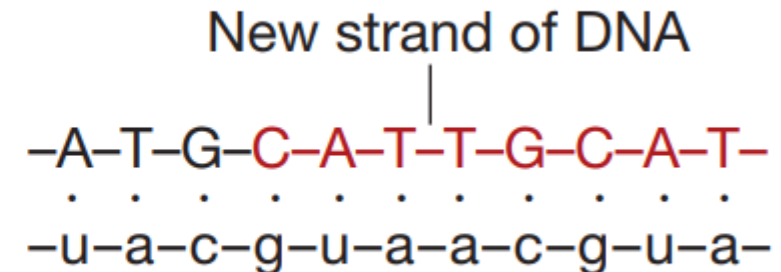
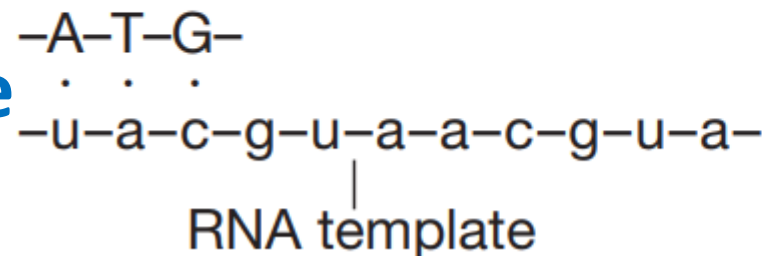
- Tổng hợp dựa trên mạch khuôn DNA

DNA polymerase



- Tổng hợp dựa trên mạch khuôn RNA

Reverse transcriptase



Lý thuyết - polymerase

Enzyme thông dụng trong nhóm này là:

- *tag* polymerase (PCR thông thường)
- pfu polymerase (thu nhận gene)

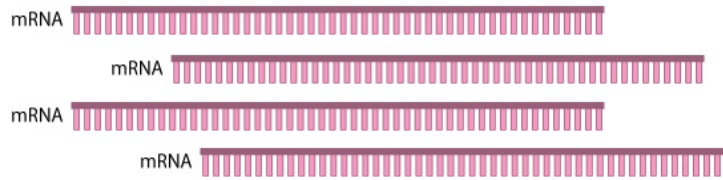
PRODUCT NAME (SUPPLIER)	POLYMERASE FIDELITY (Reported by supplier)	MAXIMUM AMPLICON LENGTH ⁵	EXTENSION TIME ⁵ (For simple templates ⁴)	EXTENSION TIME ⁵ (For complex templates ⁴)
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)	>100X <i>Taq</i> ¹	20 kb simple; 10 kb complex	10 s/kb	10 s/kb (<1 kb) 20–30 s/kb (>1 kb)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)	>50X <i>Taq</i> ¹	20 kb simple; 10 kb complex	15 s/kb	30 s/kb
Accuprime <i>Pfx</i> (Life)	26X <i>Taq</i> ¹	12 kb ³	60 s/kb ³	
<i>PfuUltra</i> II Fusion HS (Agilent)	20X <i>Taq</i> ¹	19 kb ³	15 s/kb (<10 kb ³) 30 s/kb (>10 kb ³)	
<i>PfuUltra</i> High-Fidelity DNA Polymerase (Agilent)	19X <i>Taq</i> ¹	17 kb simple; 6 kb complex	60 s/kb (<10 kb) 120 s/kb (>10 kb)	60 s/kb (<6 kb) 120 s/kb (>6 kb)
Platinum <i>Taq</i> HiFi (Life)	6X <i>Taq</i> ¹	20 kb ³	60 s/kb ³	
KOD DNA Polymerase (EMD)	4X <i>Taq</i> ²	6 kb simple; 2 kb complex	10–20 s/kb	30–60 s/kb

Taq polymerase error rate $\sim 10^{-6}$

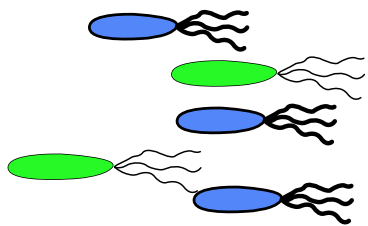
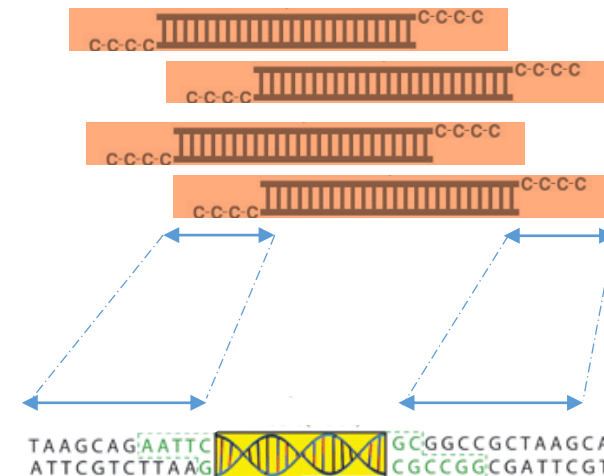
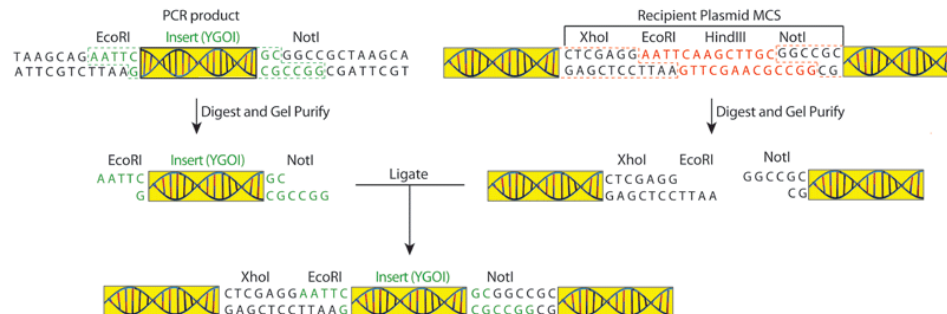
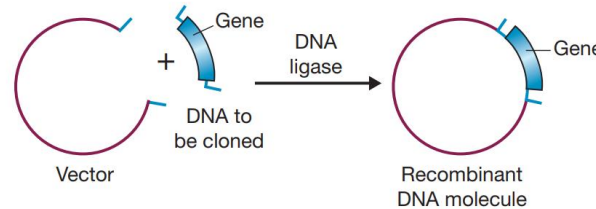
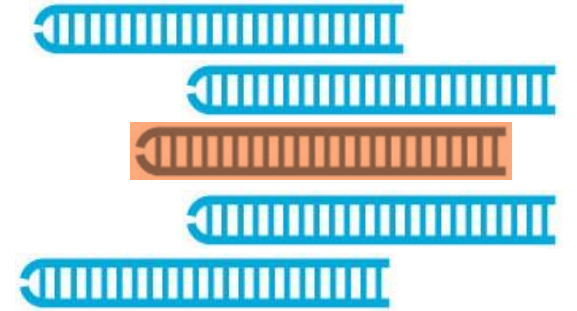
Lý thuyết - Ứng dụng các enzyme trong sinh học phân tử

Thu nhận biểu hiện yếu tố đông máu la
(**antihemophylic la**)

Tế bào gan



mRNA tổng số



Vi khuẩn *E.coli*

Thực hành – Thiết lập phản ứng

Nguyên tắc thiết lập phản ứng với enzyme:

- Enzyme
- Bản mẫu
- Lưu ý về thiết lập phản ứng

Thực hành – Thiết lập phản ứng

Thiết lập phản ứng cắt bằng enzyme cắt giới hạn *EcoRI* để cắt 400ng plasmid DNA. Biết:

- plasmid** có nồng độ là 100 $\mu\text{g/ml}$
- Dung dịch đệm (buffer) nồng độ stock là 10X
- Enzyme nồng độ 10 unit/ μl . Một unit enzyme thì thủy giải được 40ng DNA plasmid
- Tổng thể tích thiết lập phản ứng là 20 μl

Thành phần	Nồng độ	Thể tích cần hút
Plasmid	100 $\mu\text{g/ml}$	
Dung dịch đệm <i>EcoRI</i>	10X	
Nước	-	
Enzyme	10 unit/ μl	
Tổng thể tích		20 μl

Thực hành – Thiết lập phản ứng

Enzyme – ví dụ EcoRI



PRODUCT INFORMATION

EcoRI

#ER0275 10000 U

Lot: ____ **Expiry Date:** __

5'...G↓A A T T C...3'

3'...C T T A A↑G...5'

Concentration: 10 U/μL

Source: *E.coli* that carries the cloned *ecoRI* gene from *Escherichia coli* RY13

Supplied with: 4x1 mL of 10X Buffer EcoRI
1 mL of 10x Buffer Tango

Store at -20°C



In total 6 vials.

BSA included

www.thermoscientific.com/onebio

RECOMMENDATIONS

1X Buffer EcoRI (for 100% EcoRI digestion)

50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl,
0.02% Triton X-100, 0.1 mg/mL BSA.

Incubation temperature

37°C.

Unit Definition

One unit is defined as the amount of EcoRI required to digest 1 μg of lambda DNA in 1 hour at 37°C in 50 μL of recommended reaction buffer.

Dilution

Dilute with the Dilution Buffer (#B19): 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 at 25°C), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mg/mL BSA and 50% glycerol.

Double Digests

Thermo Scientific Tango Buffer is provided to simplify buffer selection for double digests. 98% of Thermo Scientific restriction enzymes are active in a 1X or 2X concentration of Tango™ Buffer. Please refer to www.thermoscientific.com/doubledigest to choose the best buffer for your experiments.

1X Tango Buffer: 33 mM Tris-acetate (pH 7.9 at 37°C), 10 mM magnesium acetate, 66 mM potassium acetate, 0.1 mg/mL BSA.

Rev.9.

Thực hành – Thiết lập phản ứng

Enzyme – ví dụ

Storage Buffer

EcoRI is supplied in: 10 mM potassium phosphate (pH 7.4 at 25°C), 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mg/mL BSA, 0.15% Triton X-100 and 50% glycerol.

Recommended Protocol for Digestion

- Add:

nuclease-free water	16 µL
10X Buffer EcoRI	2 µL
DNA (0.5-1 µg/µL)	1 µL
EcoRI	0.5-2 µL*,**
- Mix gently and spin down for a few seconds.
- Incubate at 37°C for 1-16 hours**.

The digestion reaction may be scaled either up or down.

Recommended Protocol for Digestion of PCR Products Directly after Amplification

- Add:

PCR reaction mixture	10 µL (~0.1-0.5 µg of DNA)
nuclease-free water	18 µL
10X Buffer EcoRI	2 µL
EcoRI	1-2 µL*,**
- Mix gently and spin down for a few seconds.
- Incubate at 37°C for 1-16 hours**.

* This volume of the enzyme is recommended for preparations of standard concentrations (10 U/µL), whereas HC enzymes (50 U/µL) should be diluted with the Dilution Buffer to obtain 10 U/µL concentration.

** See Overdigestion Assay.

Thermal Inactivation

EcoRI is inactivated by incubation at 65°C for 20 min.

ENZYME PROPERTIES

Enzyme Activity in Thermo Scientific REase Buffers, %

EcoRI	B	G	O	R	Tango	2X Tango
100	0-20	NR	100	100*	NR	100

*Star activity appears at a greater than 5-fold overdigestion (5 U × 1 h).
NR – buffer is not recommended, because of high star activity.

Methylation Effects on Digestion

Dam: never overlaps – no effect.
Dcm: never overlaps – no effect.
CpG: may overlap – cleavage impaired.
EcoKI: never overlaps – no effect.
EcoBI: may overlap – no effect.

Stability during Prolonged Incubation

A minimum of 0.2 units of the enzyme is required for complete digestion of 1 µg of lambda DNA in 16 hours at 37°C.

Digestion of Agarose-embedded DNA

A minimum of 5 units of the enzyme is required for complete digestion of 1 µg of agarose-embedded lambda DNA in 16 hours.

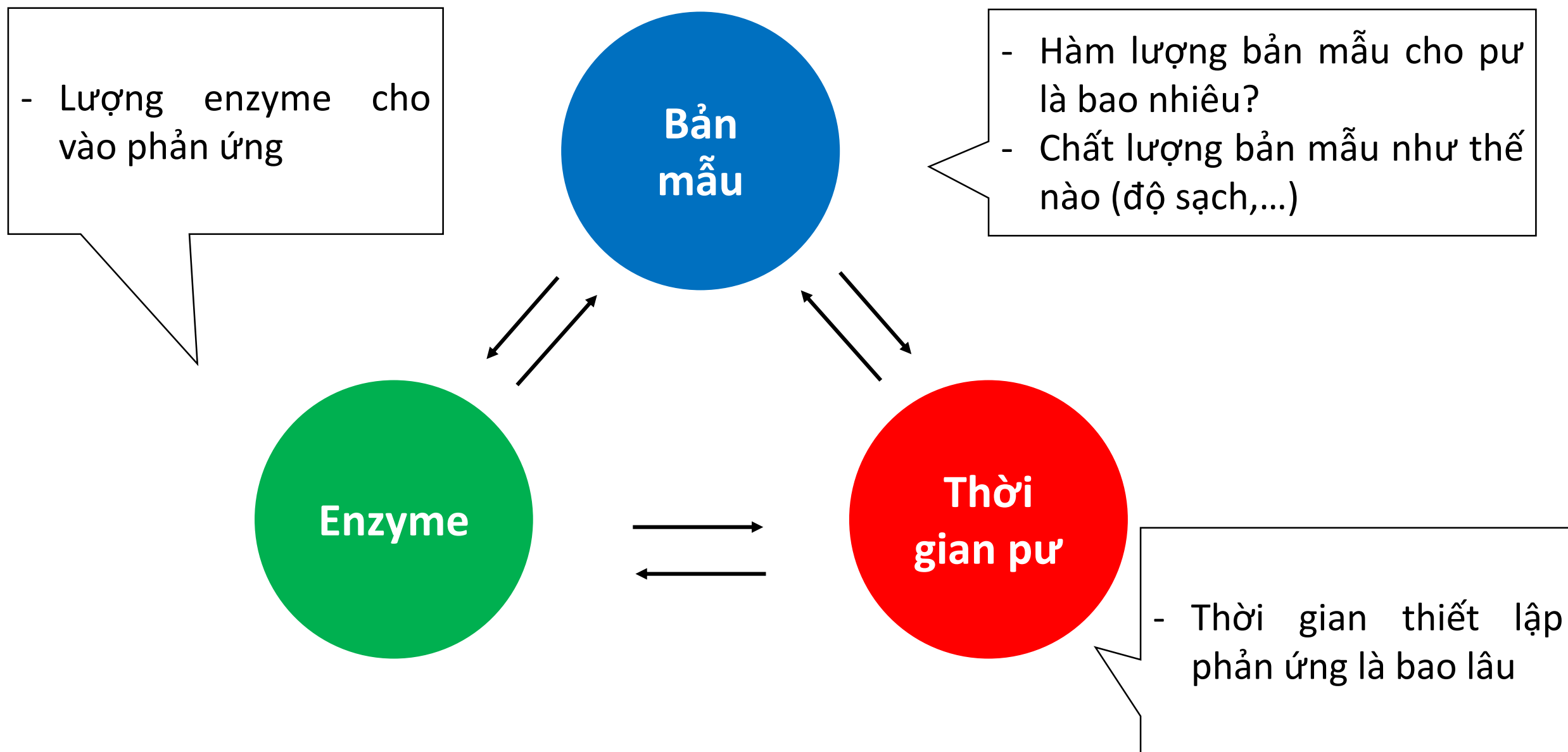
Compatible Ends

XapI, MunI, TasI

Number of Recognition Sites in DNA

λ	ΦX174	pBR322	pUC57	pUC18/19	pTZ19R/U	M13mp18/19
5	0	1	1	1	1	1

Thực hành – Thiết lập phản ứng



Thực hành – Thiết lập phản ứng

Enzyme – Ví dụ ligase (Thermo) 5U/ul

Control Reaction for T4 DNA Ligase Activity

Unsuccessful ligation may be a result of inactivated ligase or inhibition of ligation reaction by impurities in sample DNA. To assess the activity of T4 DNA ligase we recommend to perform ligation reaction with control DNA, e.g. Lambda DNA/HindIII DNA Marker.

1. Prepare the control ligation mixture:

Lambda DNA/HindIII DNA Marker (#SM0101)	1 µl (0.5 µg)
10X T4 DNA Ligase Buffer	2 µl
T4 DNA Ligase	1 u
Water, nuclease-free	to 20 µl
Total volume	to 20 µl

2. Mix thoroughly, spin briefly to collect all drops and incubate at 22°C for 10 min.
3. Prepare the loading mixture:

Ligation reaction product	10 µl
6X DNA Loading Dye & SDS Solution	2 µl

1. Prepare the following reaction mixture:

Linear DNA	10-50 ng
10X T4 DNA Ligase buffer	5 µl
T4 DNA Ligase	5 u
Water, nuclease-free	to 50 µl
Total volume	50 µl

2. Mix thoroughly, spin briefly and incubate:
 - sticky-ends for 10 min at 20°C,
 - blunt-ends for 1 hour at 22°C.

Bản mẫu

- Độ tinh sạch bản mẫu
- Nồng độ của bản mẫu
- Bản chất của mẫu

Thực hành – Thiết lập phản ứng

Lưu ý thiết lập phản ứng

- Enzyme là thành phần cuối cùng cho vào phản ứng
- Tổng thể tích enzyme cho vào phản ứng $\leq 1/10$ tổng thể tích phản ứng
- Nồng độ dung dịch đệm (buffer) cuối cùng trong phản ứng 1X
- Điều kiện phản ứng
- Các thành phần phản ứng nằm trong hỗn hợp đồng nhất

Thực hành – Thiết lập phản ứng

Bài tập

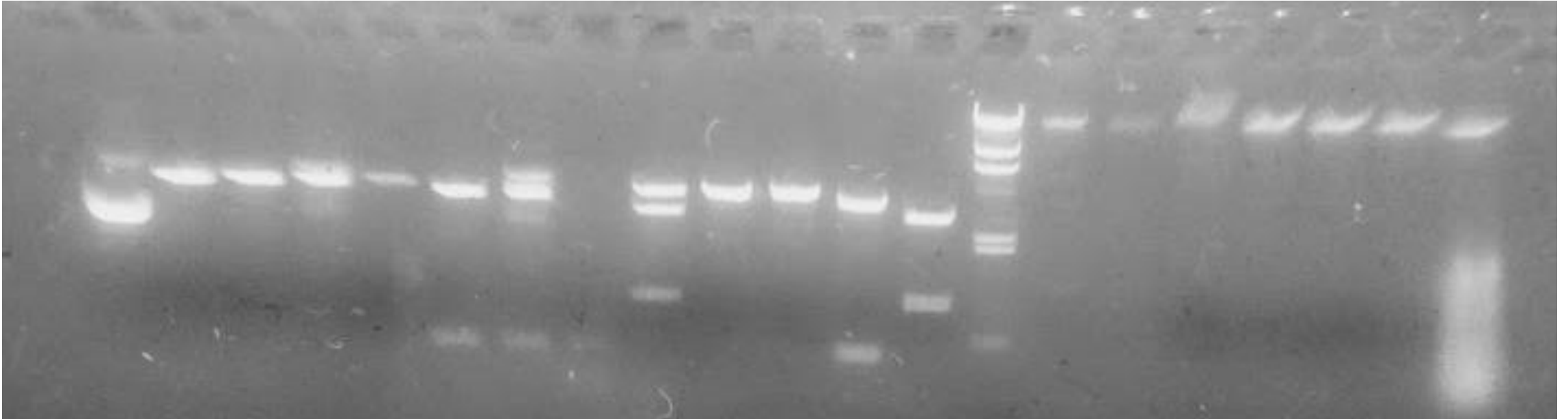
Thiết lập phản ứng thủy giải 180 ng DNA plasmid pUC-19, bằng 2 enzyme *Bam*HI, *Hind*III. Biết:

- Dung dịch plasmid pha loãng 10 lần có OD₂₆₀ là 0.12. Tỉ số OD₂₆₀/280 nằm trong khoản chấp nhận và plasmid không nhiễm DNA hay RNA khác.

- 1 unit *Bam*HI/*Hind*III thủy giải được 90 ng DNA plasmid
- Bam*HI/*Hind*III sử dụng có nồng độ 1u/μl
- dung dịch đệm thích hợp cho 2 enzyme 10X

Thực hành – Phân tích kết quả

Plasmid	Xử lí <i>Sa/I</i>	Xử lí <i>NdeI</i>	Xử lí <i>HindIII</i>	Xử lí <i>Sa/I</i> và <i>NdeI</i>	Chứng cho các nghiệm thức x. lý RE	Thang	Nối ligase	Chứng nối ligase	Chứng Xử lí Rnase	Xử lí Rnase	DNA nhiễm RNA
---------	-------------------	-------------------	----------------------	-------------------------------------	--	-------	------------	---------------------	-------------------	-------------	------------------



Phân tích kết quả ????

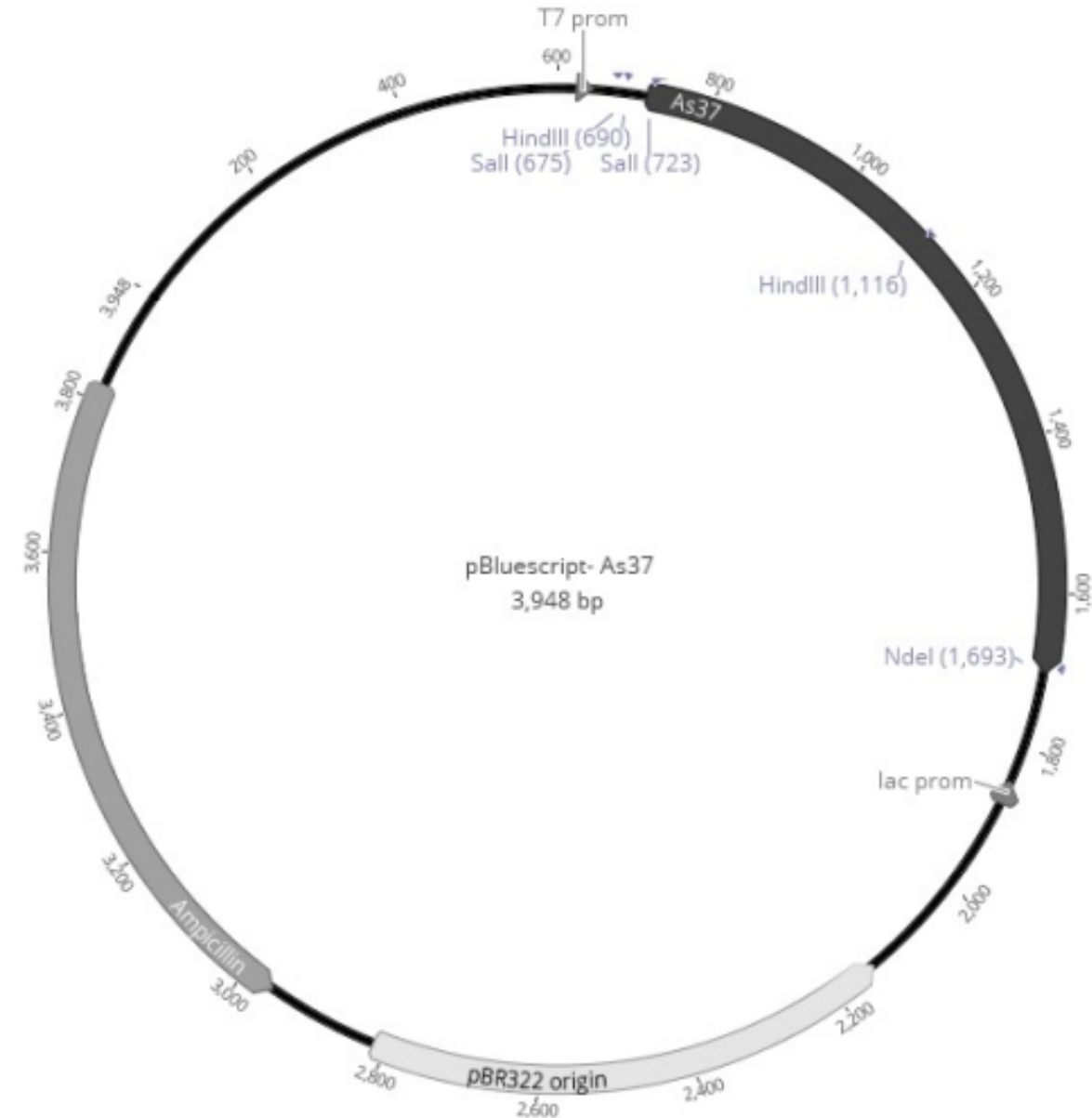
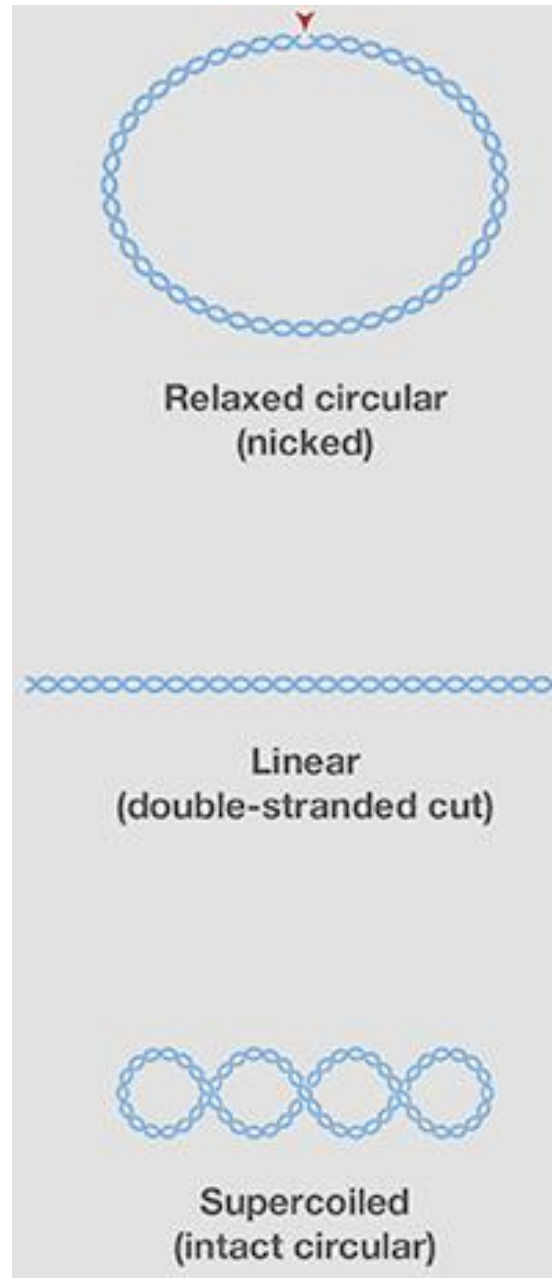
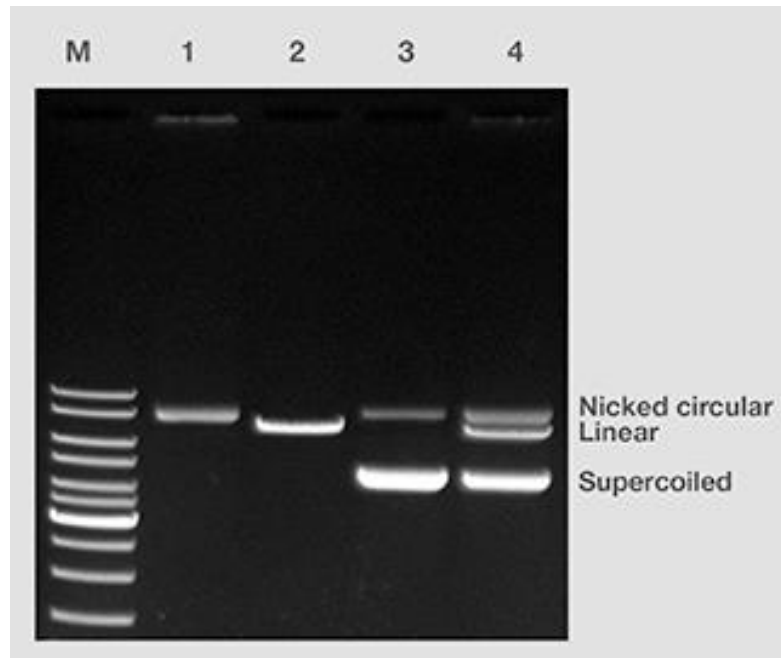
Thực hành – Phân tích kết quả

Thiết lập phản ứng với enzyme

- Phản ứng có xảy ra hay không?
- Phản ứng xảy ra hoàn toàn hay không hoàn toàn?
- Giải thích?

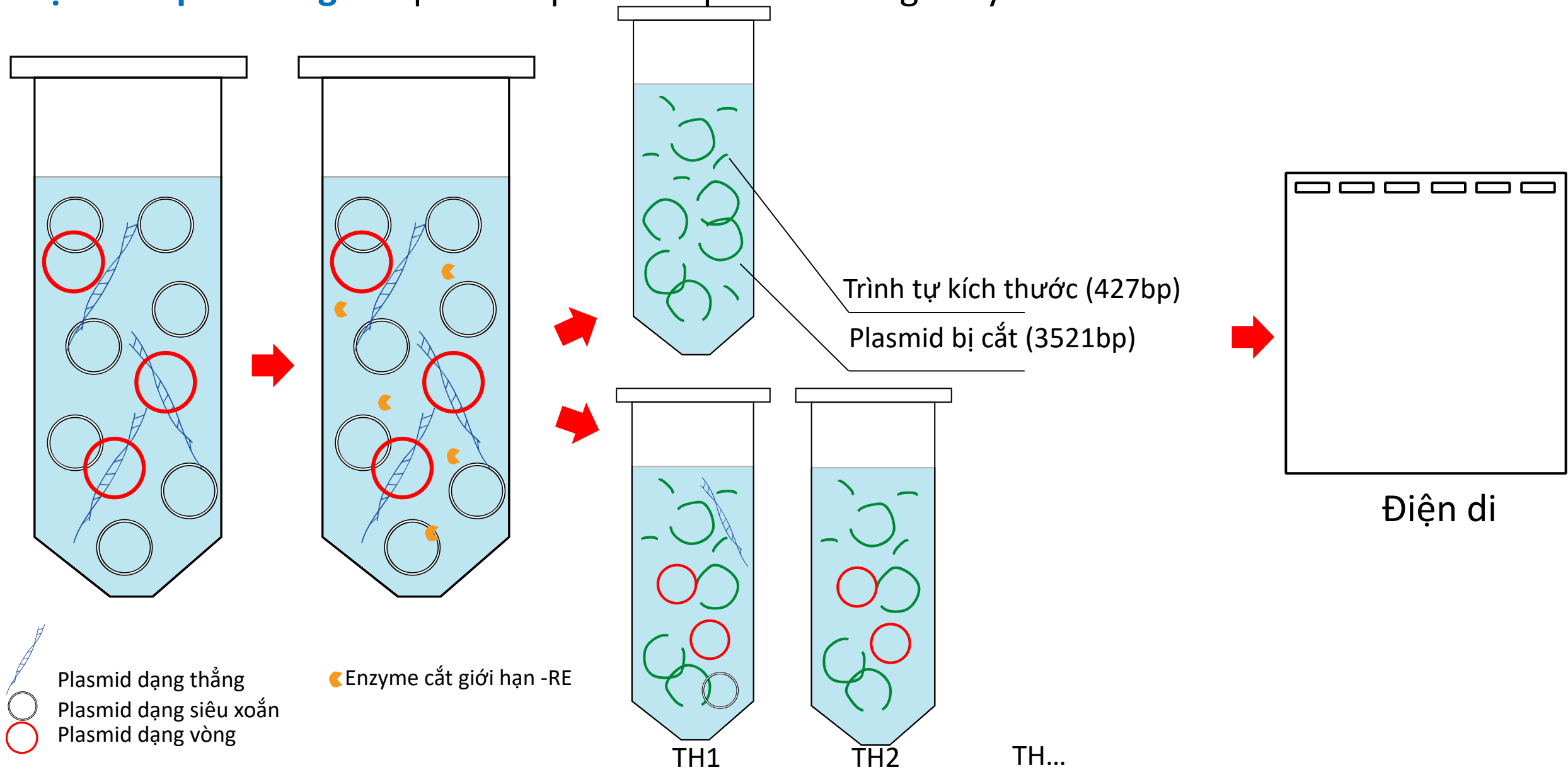
Thực hành – Phân tích kết quả

Enzyme cắt giới hạn



Thực hành – Phân tích kết quả

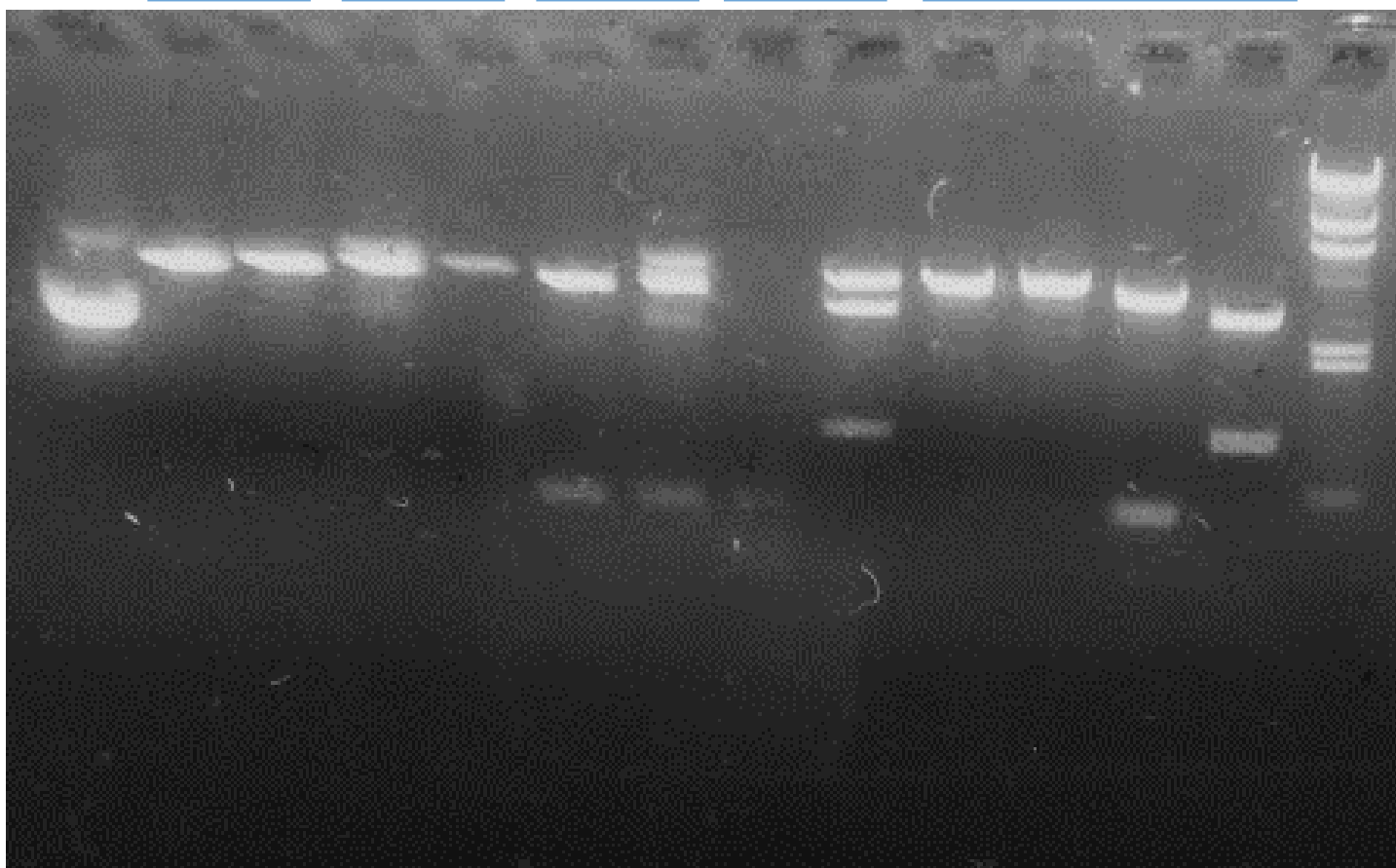
Hiệu suất phản ứng Cắt plasmid pBlueScript-As37 bằng enzyme *Hind*III



Thực hành – Phân tích kết quả

Enzyme cắt giới hạn

Plasmid	Xử lí <i>Sa</i> II	Xử lí <i>Nde</i> I	Xử lí <i>Hind</i> III	Xử lí <i>Sa</i> II và <i>Nde</i> I	Chứng cho các nghiệm thức x. lý RE	Thang
---------	--------------------	--------------------	-----------------------	------------------------------------	------------------------------------	-------

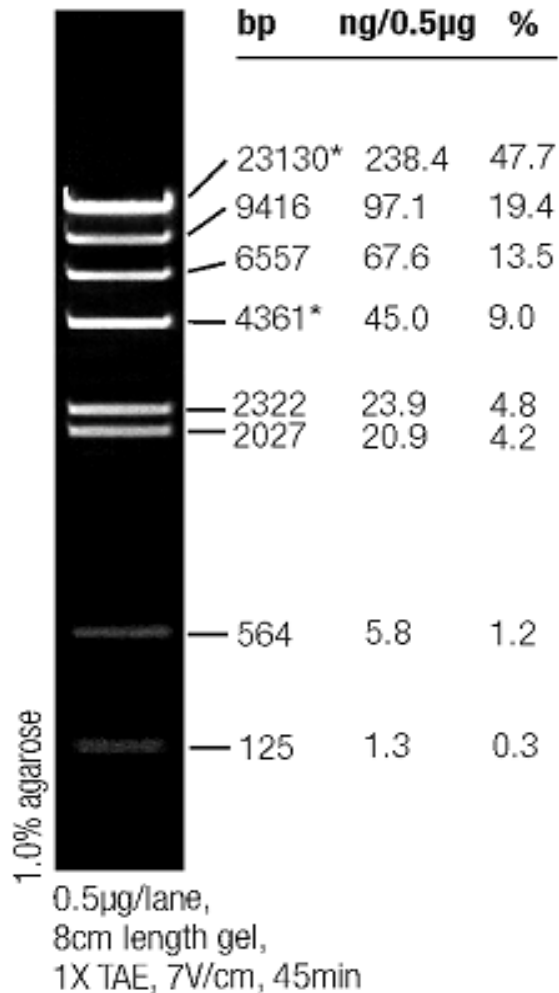


Trước khi xử lí

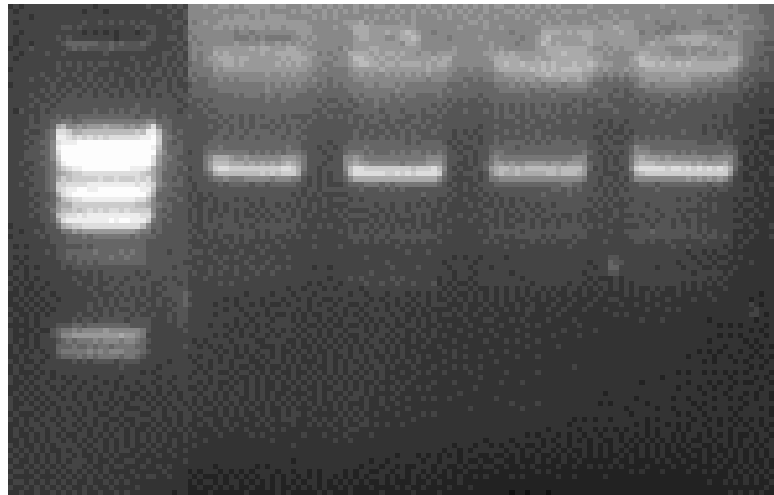
Sau khi xử lí

Thực hành – Phân tích kết quả

Ligase



(1) (2) (3) (4)



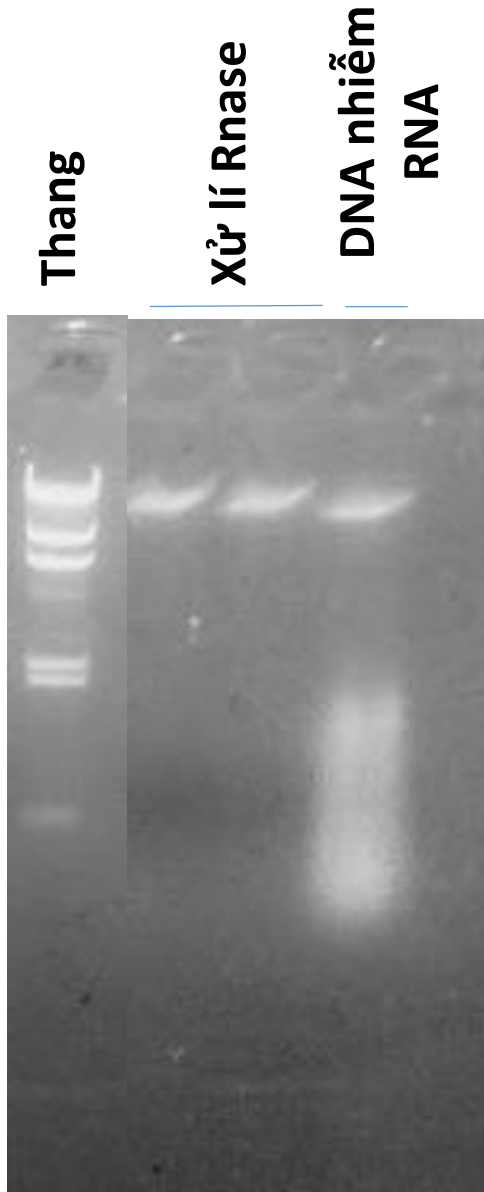
Trước khi xử lí

Sau khi xử lí

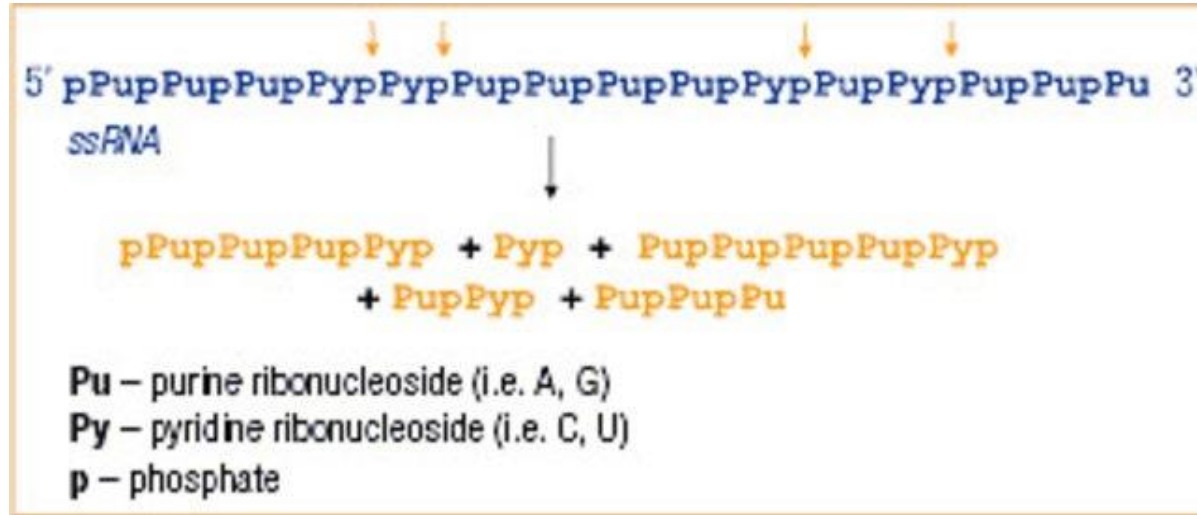
- Pư hoàn toàn
- Pư không hoàn toàn

Thực hành – Phân tích kết quả

Rnase



Rnase A



- Pư hoàn toàn
- Pư không hoàn toàn

Trước khi xử lí

Sau khi xử lí

Đánh giá

Lý thuyết

- Nắm được lý thuyết liên quan đến enzyme
- Tính toán thiết lập được phản ứng

Thực hành

- Lấy đúng hóa chất
- Thao tác thiết lập được phản ứng
- Tuân thủ nguyên tắc sử dụng pipette
- Tuân thủ đúng nguyên tắc thiết lập phản ứng enzyme

Phân tích kết quả - Giải thích và phân tích được kết quả thiết lập phản ứng với enzyme