

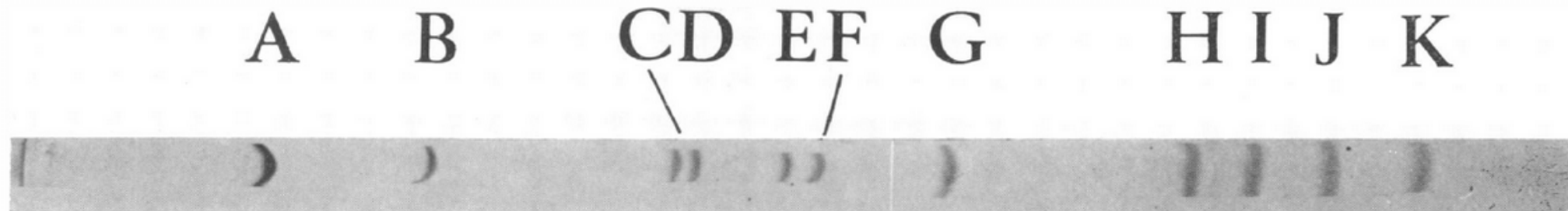
Specific Cleavage of Simian Virus 40 DNA by Restriction Endonuclease of *Hemophilus Influenzae**

(gel electrophoresis/electron microscopy/DNA mapping/DNA fragments/tumor virus)

KATHLEEN DANNA AND DANIEL NATHANS

Department of Microbiology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland 21205

Communicated by Albert L. Lehninger, September 22, 1971



1 μ g SV40 DNA'sı, *Haemophilus influenza* endonükleaz I enzimi ile kesilmiş.

TABLE 1. *Molecular weights of SV40 DNA fragments produced by cleavage with H. influenzae restriction endonuclease*

Product	Electron microscopy		Distribution of label		s	Sedimentation analysis	
	% length ± 1 SD	Molecular weight (× 10 ⁻⁵)	%	Molecular weight (× 10 ⁻⁵)		Molecular weight	Molecular weight
						$\left[\frac{S2}{S1} = \left(\frac{M2}{M1} \right)^{0.255} \right]$ (× 10 ⁻⁵)	$\left[\frac{S2}{S1} = \left(\frac{M2}{M1} \right)^{0.35} \right]$ (× 10 ⁻⁵)
A	21.8 ± 1.6	6.5	24	7.2	10.1 9.8 9.7 9.4	6.1	9.4
B	13.9 ± 1.4	4.2	18	5.4	9.2 8.9 8.9	4.6	7.5
C	10.6 ± 0.7*	3.2*	10.5*	3.2*			
D	10.6 ± 0.7*	3.2*	10.5*	3.2*	8.2 8.2	3.2	5.9
E	7.7 ± 1.4	2.3	7.5†	2.3†	7.6	2.4	4.7
F			7.5†	2.3†			
G			7	2.1	7.3	2.0	4.2
H			3.9	1.2	7.0	1.7	3.6
I			5.3	1.0‡			
J			4.1	0.87‡			
K			3.6	0.74‡			

* These values were obtained with a mixture of C and D. Percent distribution of label was divided by 2.

† These values were obtained with a mixture of E and F. Percent distribution of label was divided by 2.

‡ Molecular weights were estimated from mobilities of the products in a 5% polyacrylamide gel, with A through H as standards (see Fig. 5).

En "meşhur" olandan başlarsak :

Tipik TipII restriksiyon endonükleazlar ile sindirme



Malzemeler:

- Kalıp DNA (palindromik dizi)
- 2 x enzim monomeri
- Mg^{2+} iyonları



Bir çok enzim tanımlanmış durumda
Bunların isimlendirmesinde :

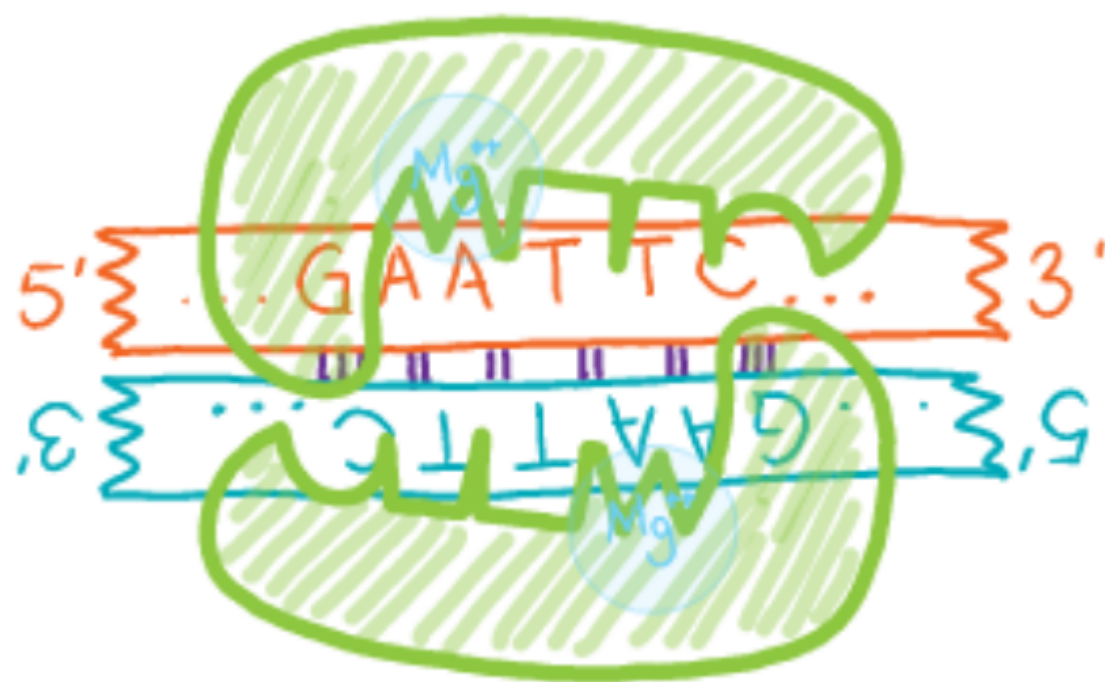


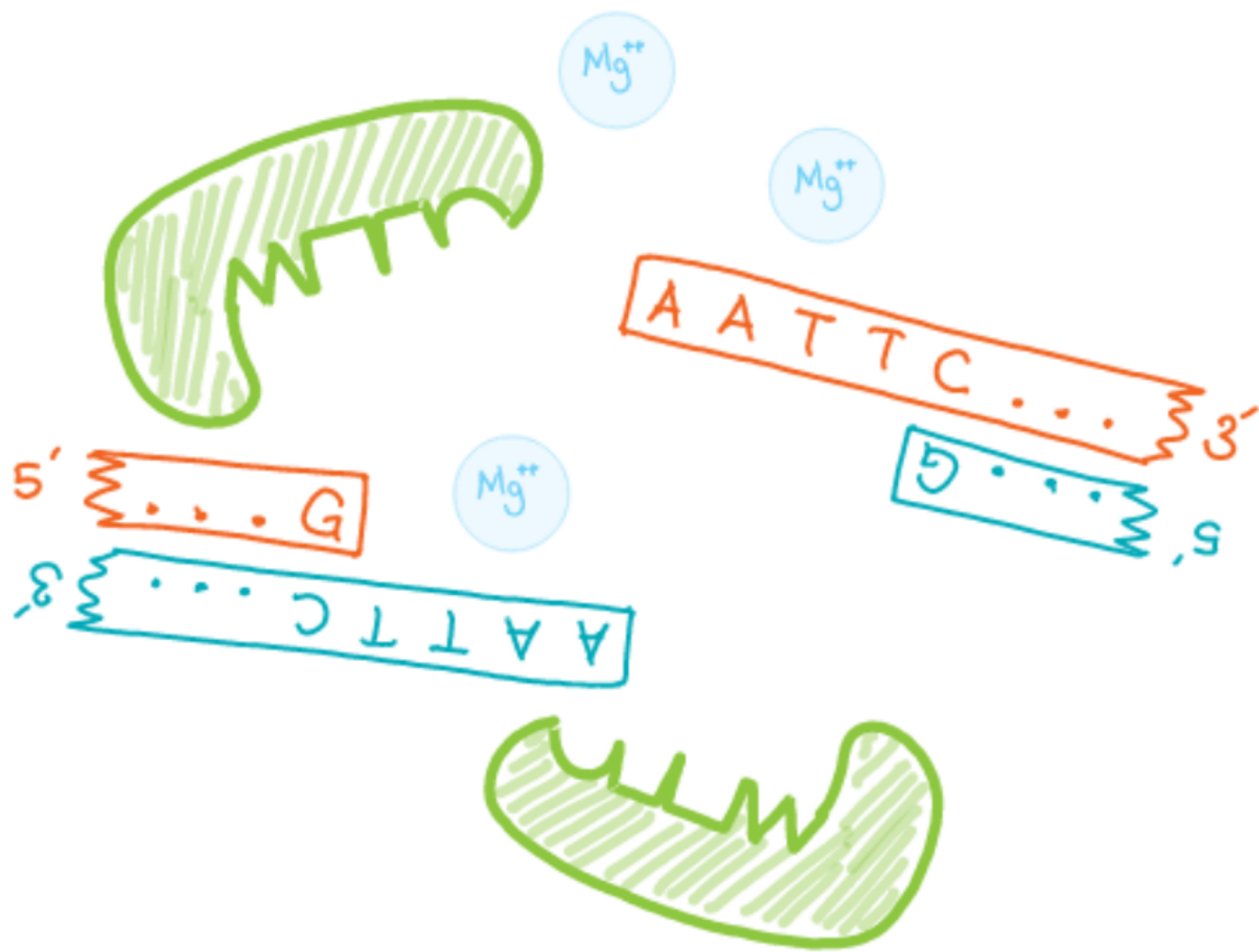
Malzemeler:

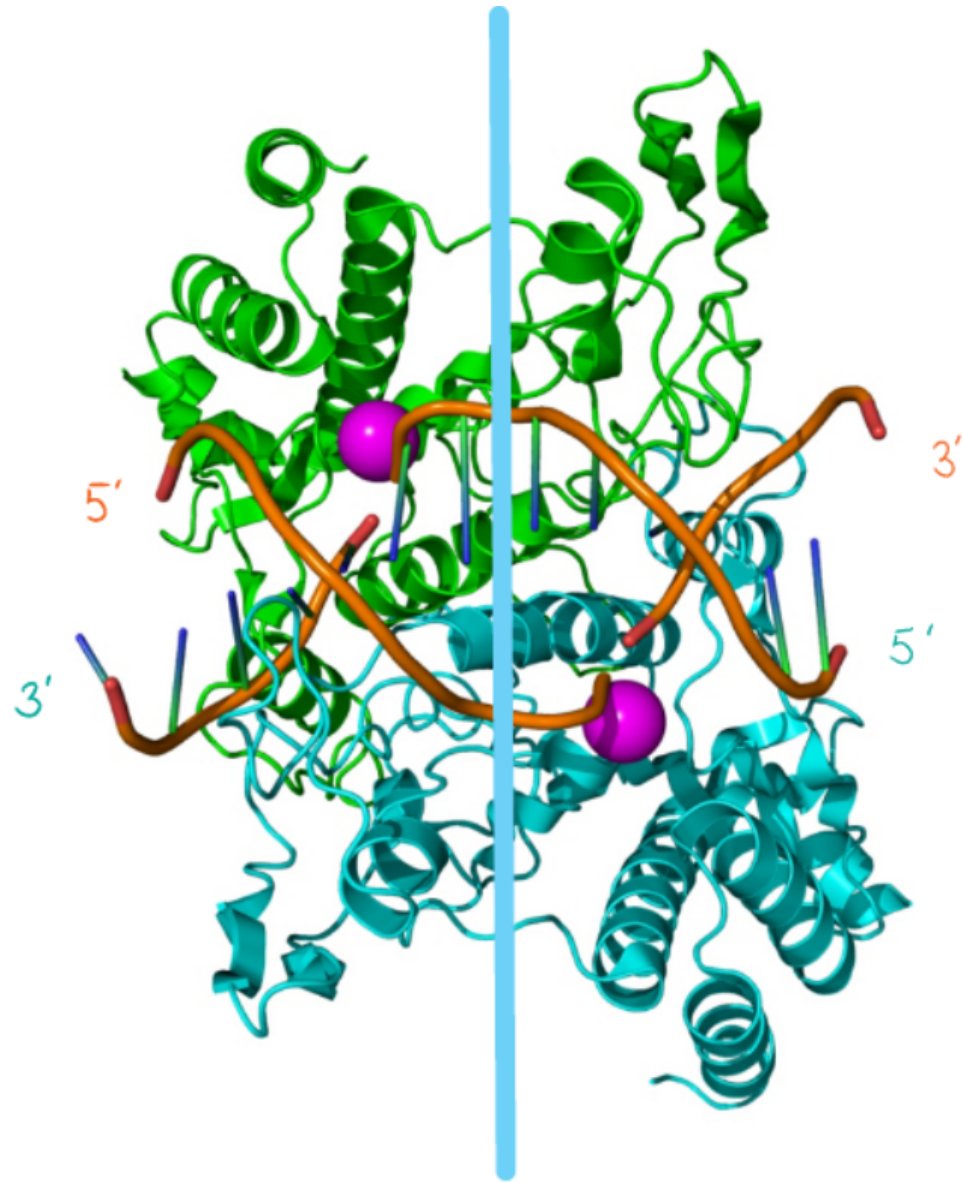
- Kalıp DNA (palindromik dizi)
- 2 x enzim monomeri
- Mg^{2+} iyonları

pipideye









Bir çok enzim tanımlanmış durumda...
Bunların isimlendirilmesinde :



Tip II B restriksiyon enzimleri :

- multimerik yapı
- DNA'ya bağlanma bölgesinin her iki tarafını keserek tanıma bölgesini " çıkarırlar "
- AdoMet + Mg^{2+} kofaktörleri

Bcg I, Bpl II



Tip IIE Restriksiyon Enzimleri :

- Tanıma bölgelerinin iki kopyası ile etkileşime gectikten sonra birini keserler

Tip IIF Restriksiyon Enzimleri :

- Tanıma bölgelerinin iki kopyası ile etkileşime gectikten sonra her ikisini keserler

NgpM IV



Tip II G Restriksiyon Enzimleri :

- Klasik Tip II enzimler gibi tek tip alt ünite içerirler

- AdoMet kofaktör

Eco57I



Tip II M Restriksiyon Enzimleri :

- Metile edilmiş DNA'yı keserler

DpnI

Tip IIS Restriksiyon Enzimleri :

— Non-palindromik / asimetrik dizileri tanıyarak keserler

Fok I

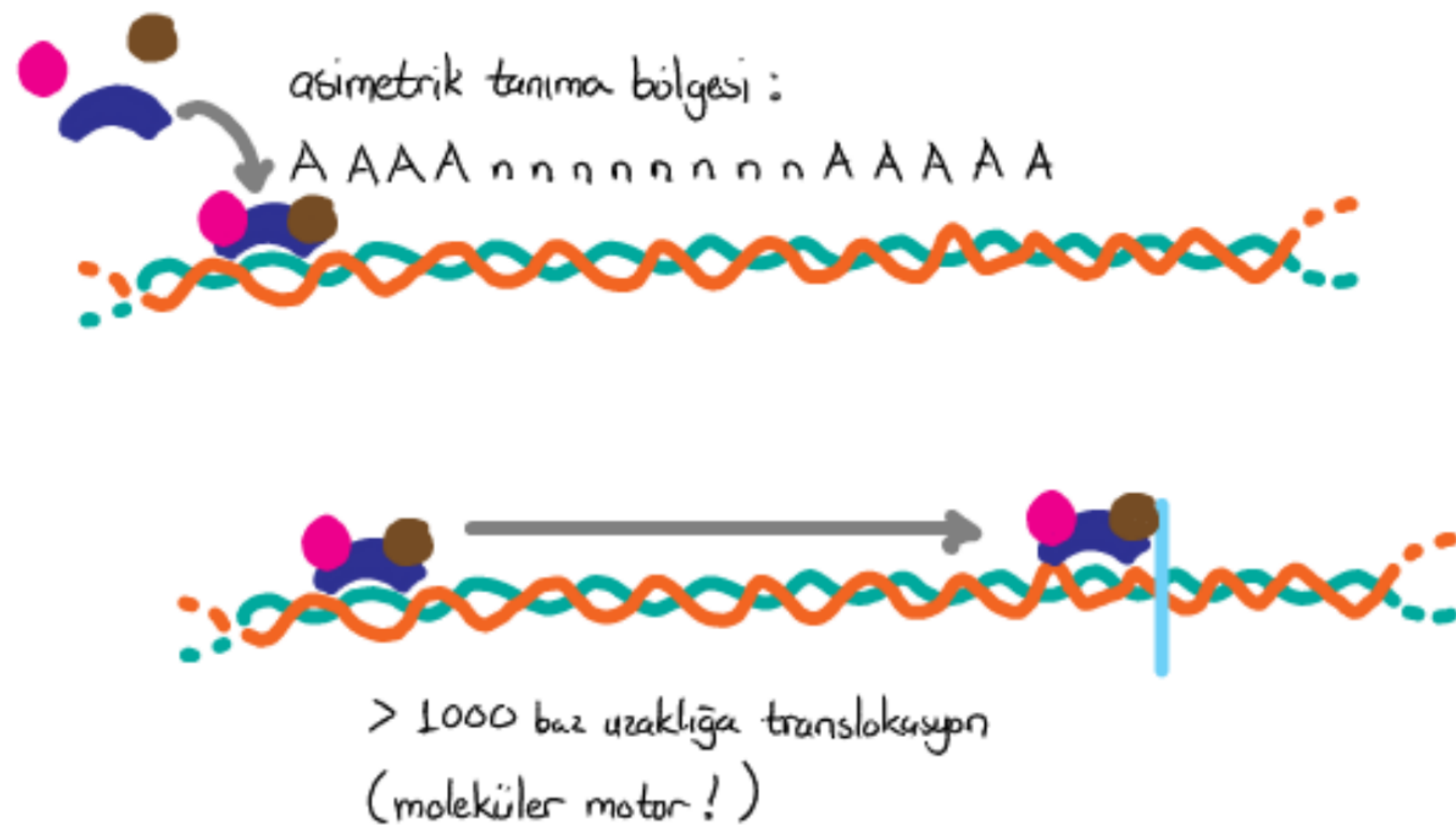
Tip IIT Restriksiyon Enzimleri :

— Palindromik ya da asimetrik dizileri tanıyan

homo/heterodimerik enzimler

Bpu10I, BslI

Tip 3 Restriksiyon Endonükleazlar:



Hsd M : Metiltransferaz



Hsd R : Restriksiyon

Hsd S : DNA'ya bağlanma

Multi-fonksiyonel enzim :

- Restriksiyon
- Modifikasyon

Kofaktörler:

S-Adenozil - Metiyonin

ATP

Mg^{2+}

Tip III Restriksiyon Endonükleazlar

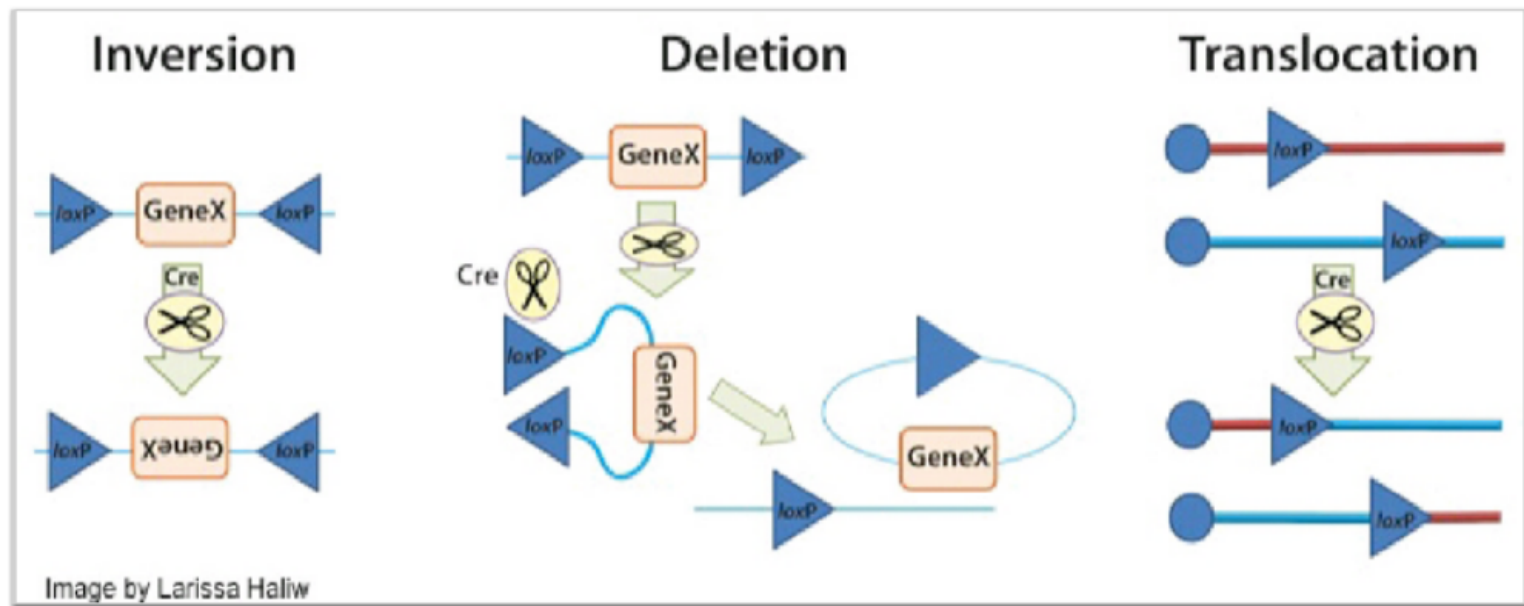
- Tip I enzimlerdekine benzer tanıma bölgesi
- ~25 baz ileride kesim bölgesi
- AdoMet + ATP + Mg^{2+} kofaktörler
- Restriksiyon, Modifikasyon, Substrat bağlama alt üniteleri

Tip IV Restriksiyon Endonükleazlar

- metile edilmiş DNA'yı tanıyarak keserler

McrBC & Mrr sistemleri

$(G/A)^mC$ — CpG metilasyonu



Cre rekombinaz

Sentetik bi

Sentetik biyoloji , moleküler klonlama
ve gen/genom düzenleme için :

CTRL + C

CTRL + V

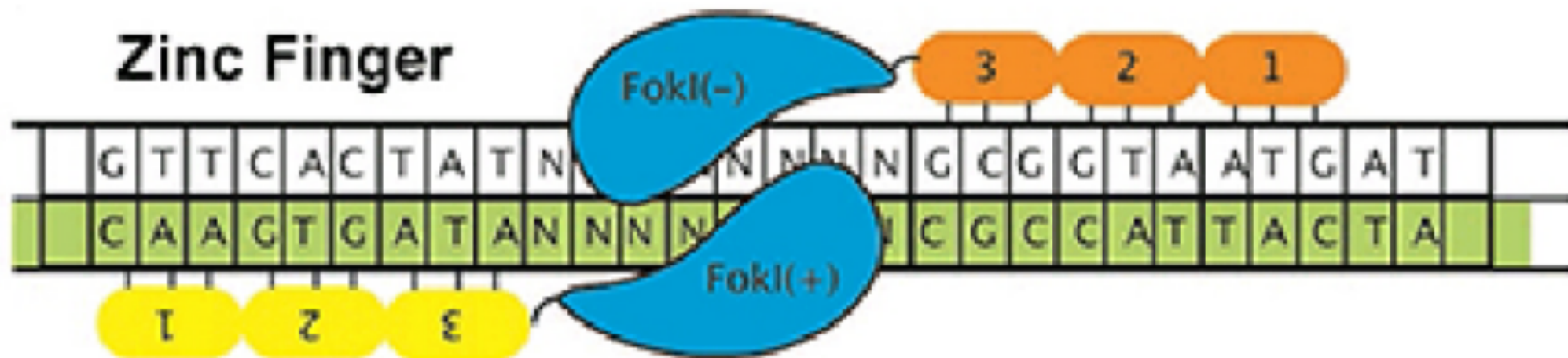
CTRL + X

Kesim aracımızı istediğimiz hedef DNA
dizisine yönlendirebilsek ne güzel olurdu .

..

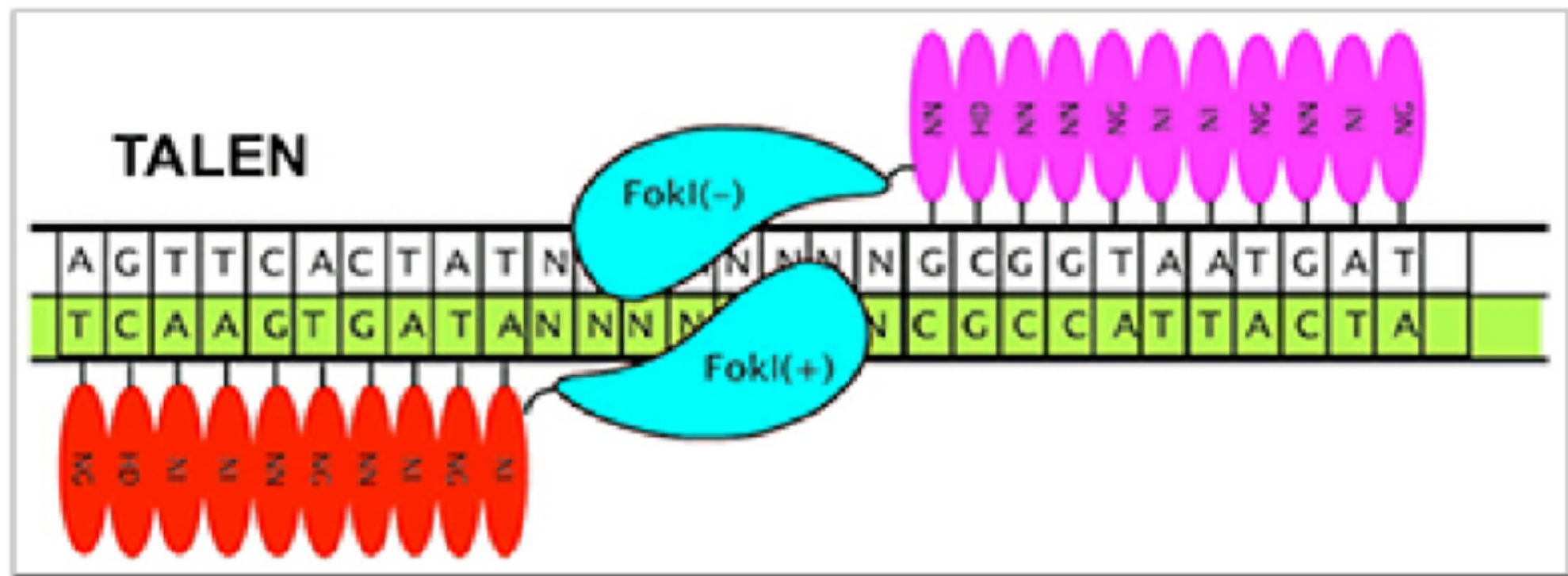


Zinc Finger



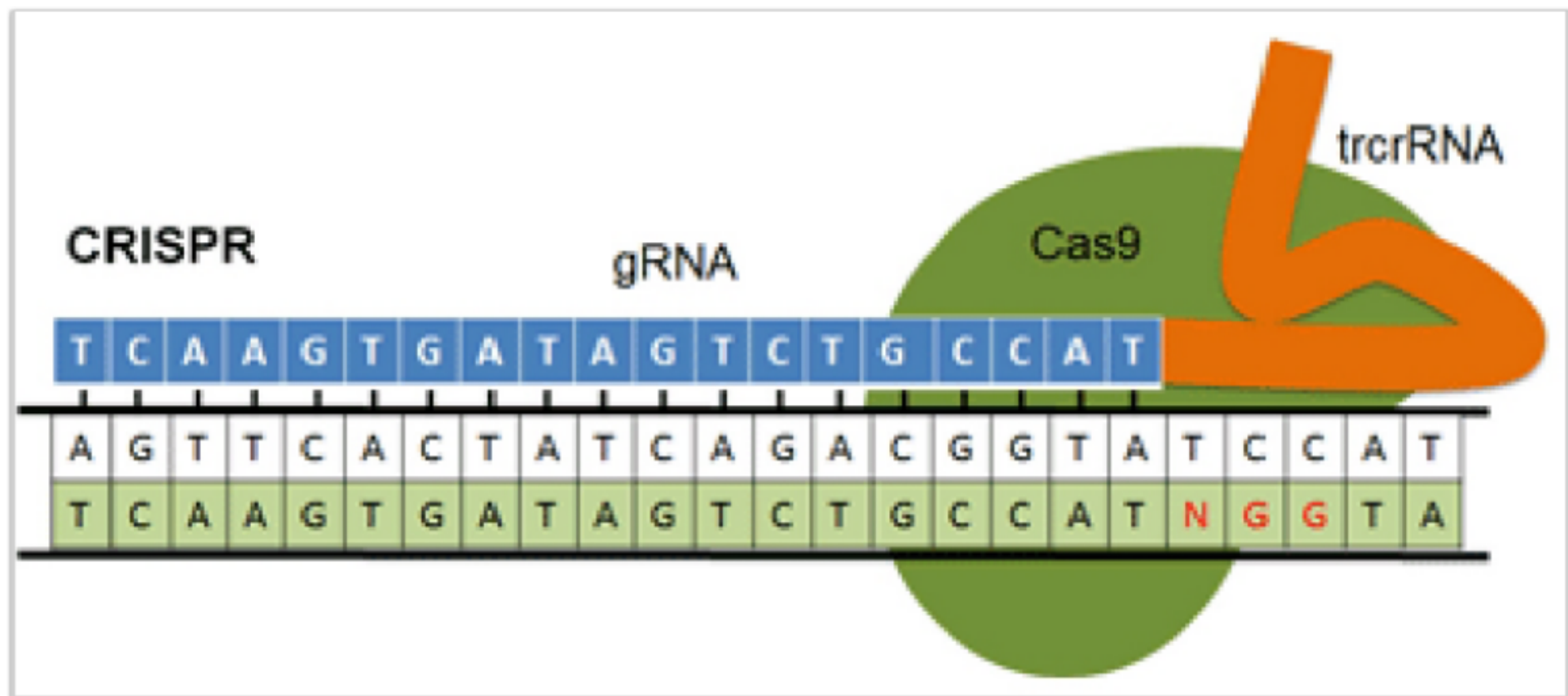
FokI restriksiyon endonükleaz enzimine eklenen "Çinko parmak motifleri", "belirli ölçüde" DNA bağlanma özgülüğü sağlamakta

Düzenlenecek DNA bölgesini hedefleyecek tasarımları yapmak zor!
Bilgisayar destekli tasarım araçlarına rağmen, her bölge hedeflenemez :/



FokI endonükleazına *Xanthomonas* türlerinde bulunan TAL DNA bağlayan efektör modüllerinin eklenmesi ile TALEN...

Zinc Finger Nükleazlara göre çok daha kolay özelleştirilebilir !
Kesilecek hedef DNA'ya yönelik tasarımlar geliştirmek çok daha kolay



Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / Cas9

Cas9: kılavuz RNA (gRNA) ile yönlendirilen / hedeflenen ENDONÜKLEAZ

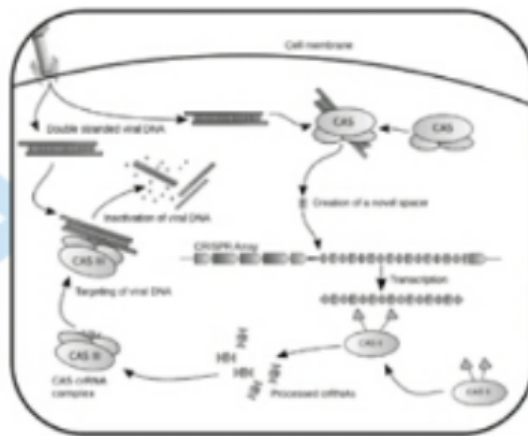
Endonükleazın hedeflenmesinde gRNA'nın kullanılması büyük kolaylık sağlamakta . . .

1987



CRISPR Repeat Sequences Identified

2007



CRISPR Identified as an Adaptive Immune System

2013



First CRISPR Genome Engineering Applications;
Nickase Mutant Developed

2013-2015



SpCas9 Orthologs Identified

2014



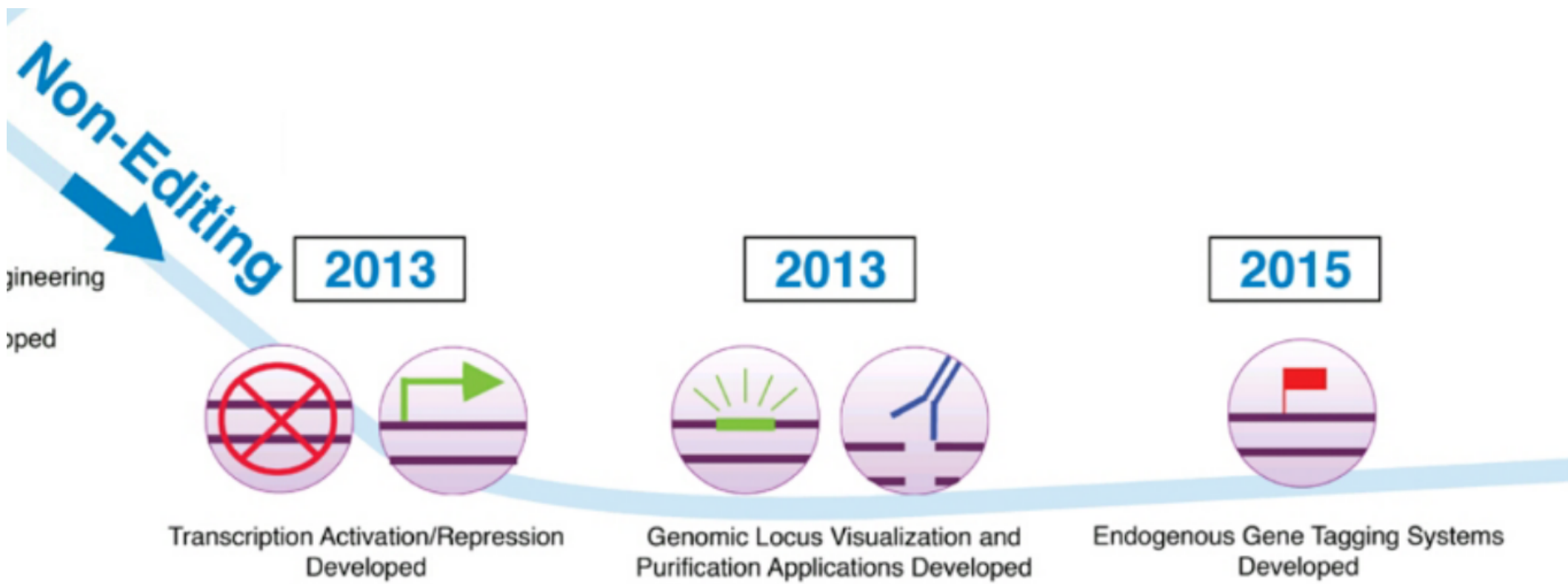
CRISPR Genome-Wide Screens
Developed

2015

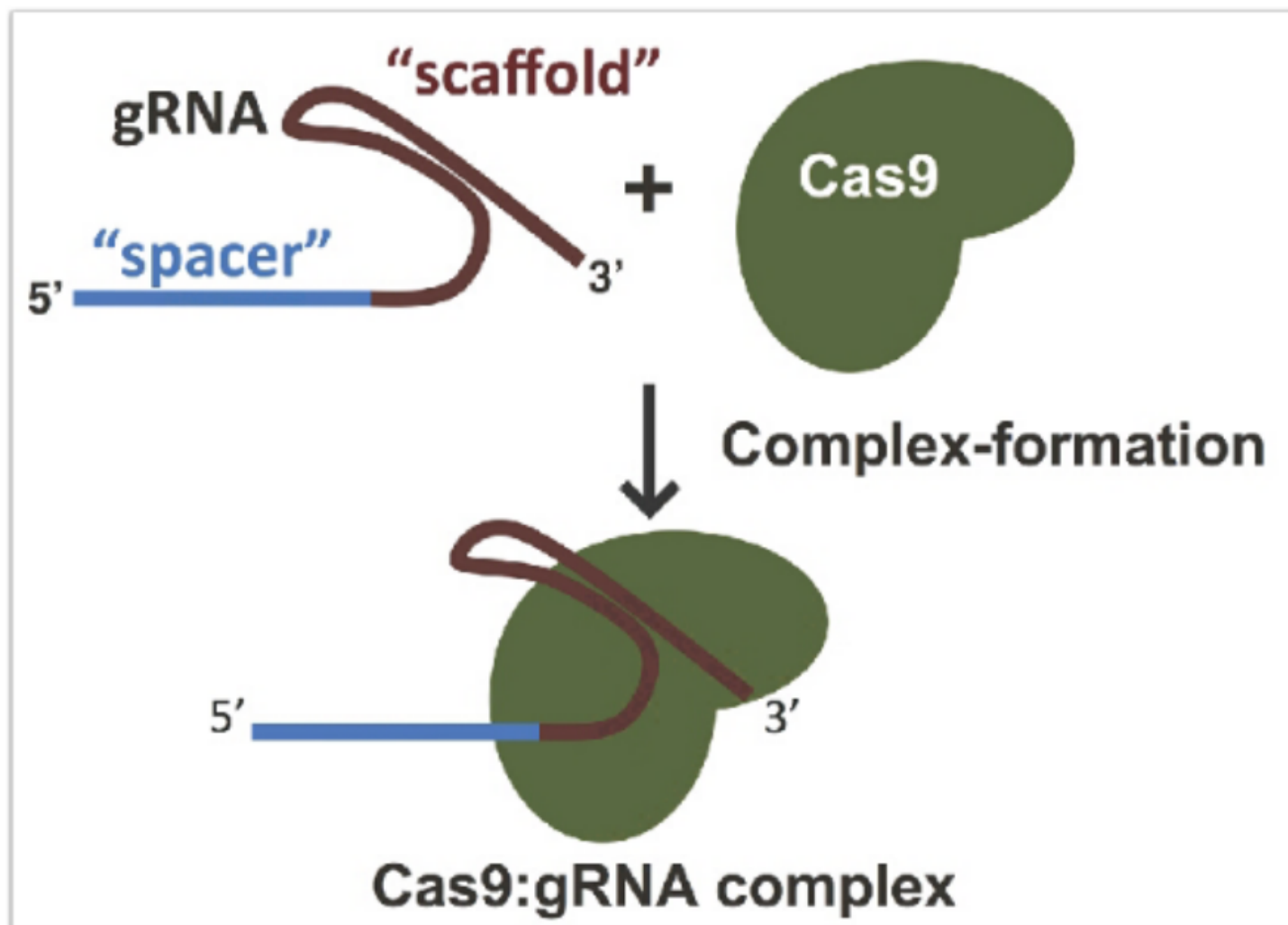


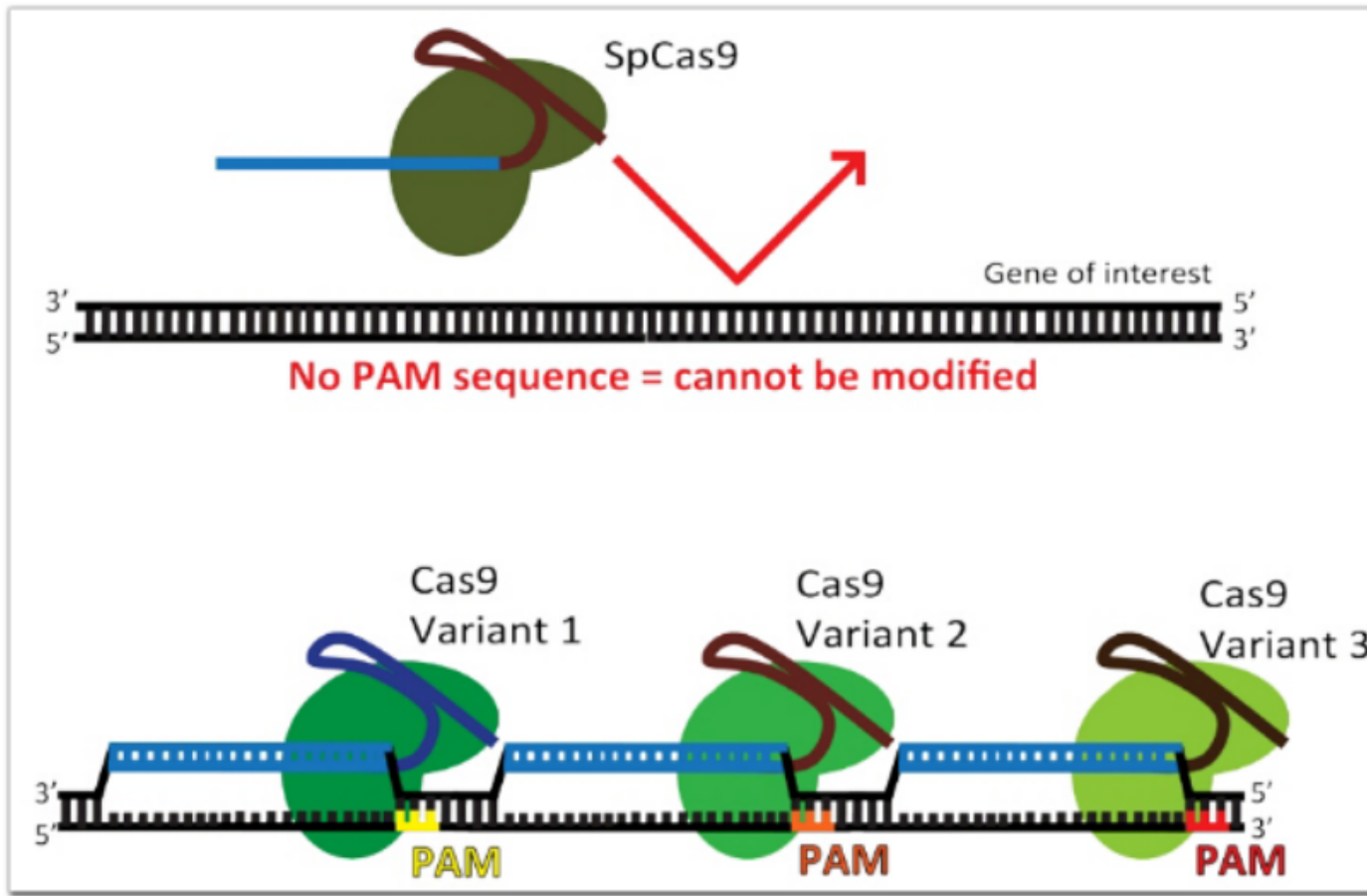
Cpf1 is used for Genome Editing
eSpCas9 and SpCas9-HF are
Developed

Editing



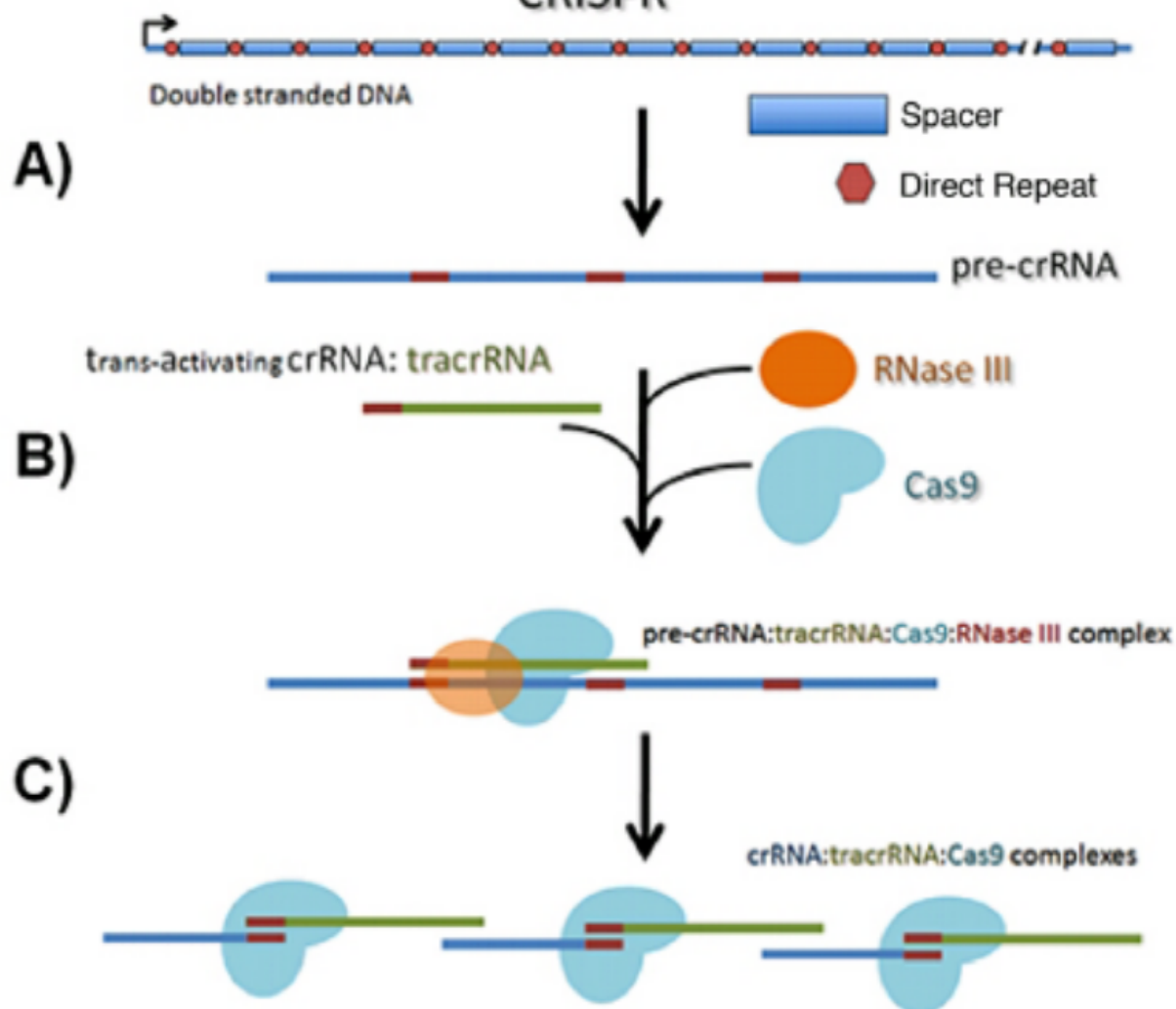
GEREKSİNİMLER





Hedef DNA dizisi "sonsuz" esneklikte değil!
Protospacer Adjacent Motif (PAM) hedef DNA bölgesine
bağlanmak için gerekli
Streptococcus pyogenes Cas9 enzimi için 5'-NGG-3'

Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats Array: CRISPR



D)

Double-stranded
DNA target

Target sequence (*Protospacer*)

crRNA:tracrRNA:Cas9

Protospacer Adjacent Motif
PAM

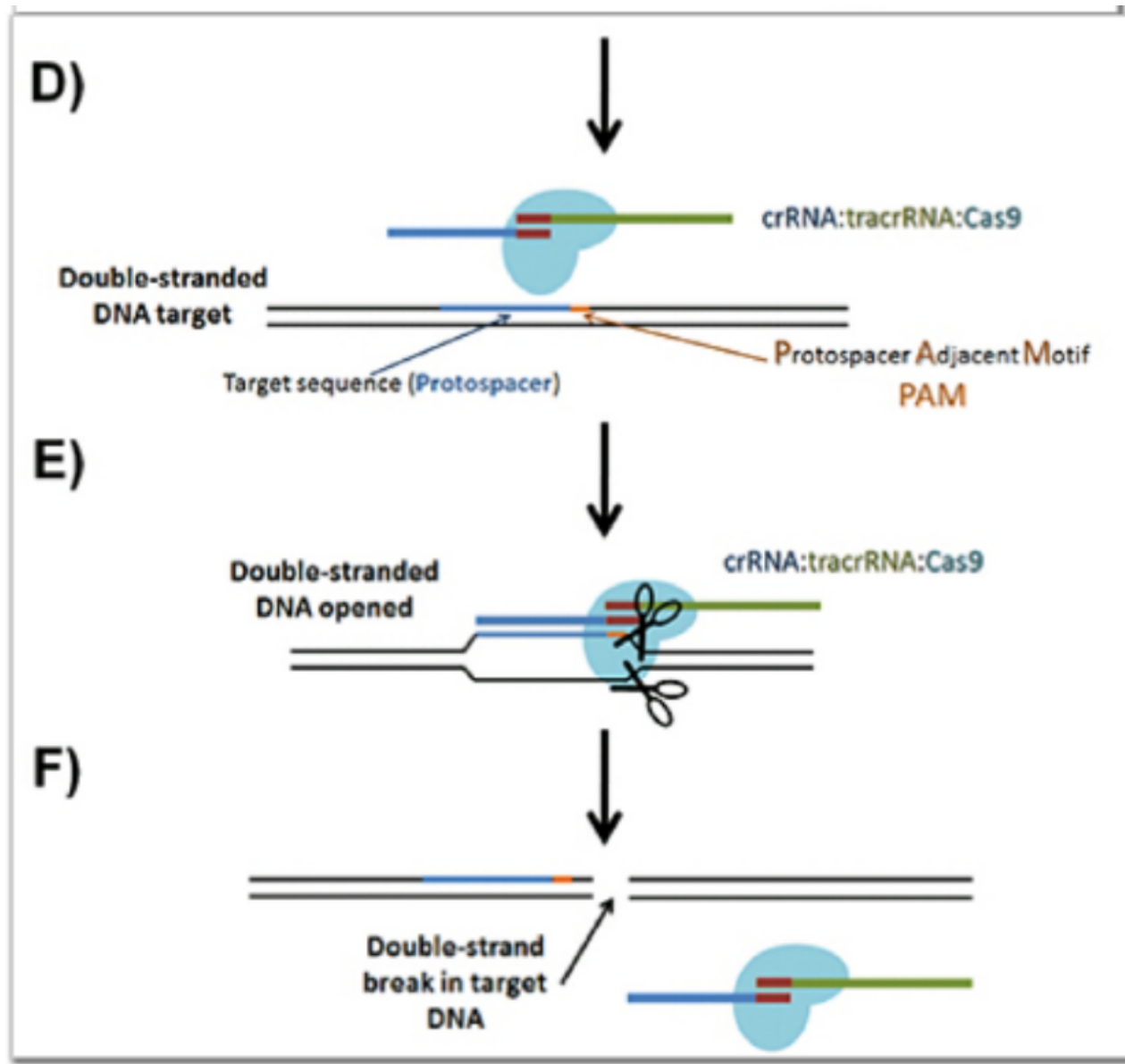
E)

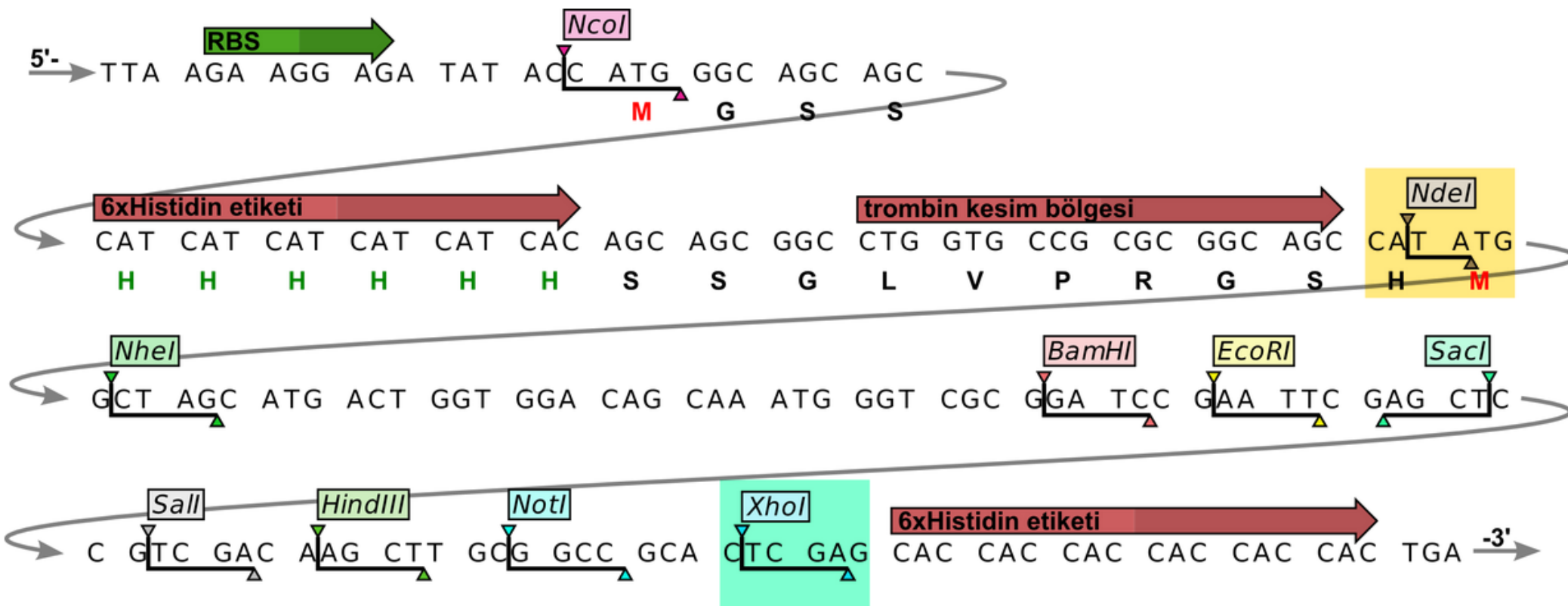
Double-stranded
DNA opened

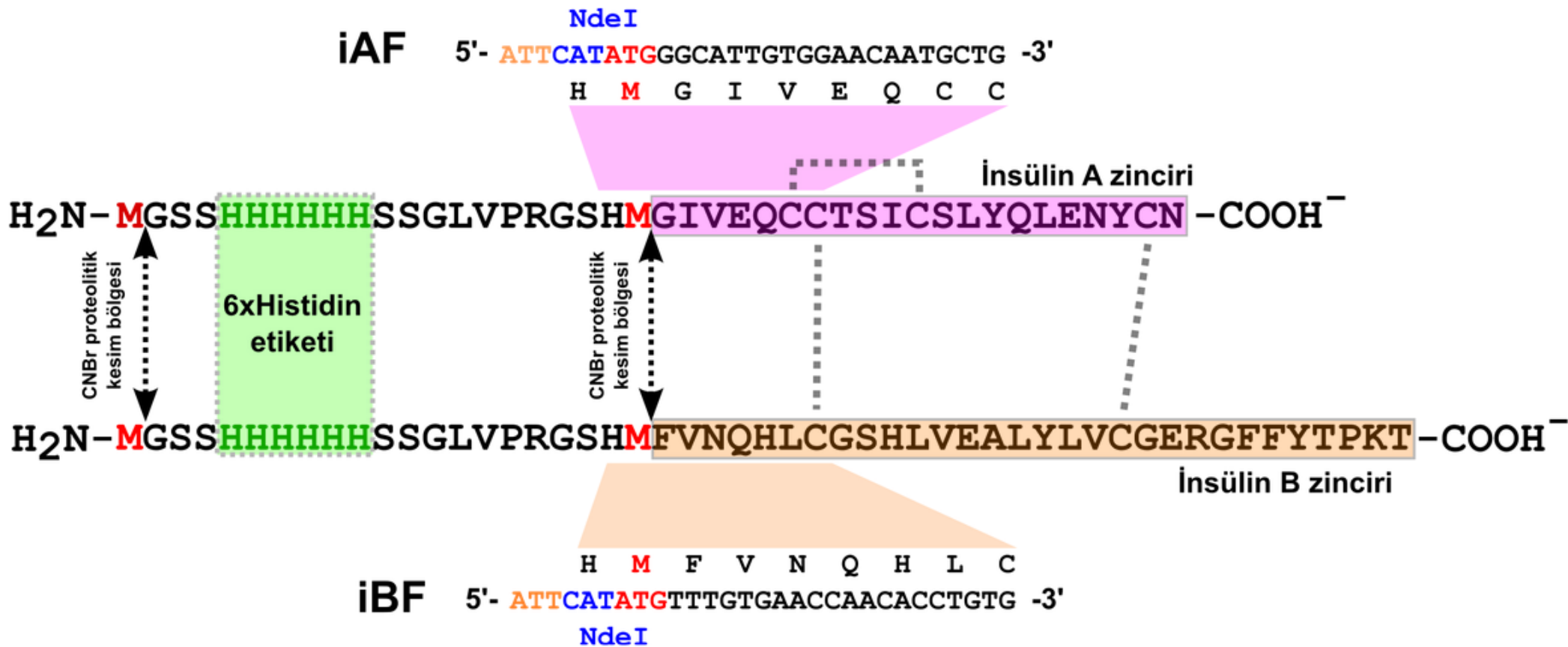
crRNA:tracrRNA:Cas9

F)

Double-strand
break in target
DNA







Double-digest için uyumlu çiftler

Kesim bölgeleri / yapışkan uçları farklı

Tampon koşulları benzer

aynı sıcaklıkta aktif

Aynı anda vs Ardaşık Sindirme

Isı ile inaktive edilebilme

Safleştirme yine de gerekli! (Önerilir)

Double Digest Finder

Use this tool to guide your reaction buffer selection when setting up double digests, a common timesaving procedure. Choosing the right buffers will help you to avoid star activity and loss of product. [Learn more information about double digests](#), including how to set up a reaction.

Select 1st enzyme

NdeI

Select 2nd enzyme

XhoI

Go

Enzyme	Cat #	Temp	Supplied NEBuffer	Supplements	% Activity in NEBuffer			
				SAM	1.1	2.1	3.1	CutSmart
NdeI 	R0111	37°C	CutSmart® Buffer	no	75	100	100	100
XhoI 	R0146	37°C	CutSmart® Buffer	no	75	100	100	100

Double Digest Recommendations for NdeI + XhoI:

- Digest in CutSmart® Buffer at 37°C.