

Rekombinant DNA teknolojisi

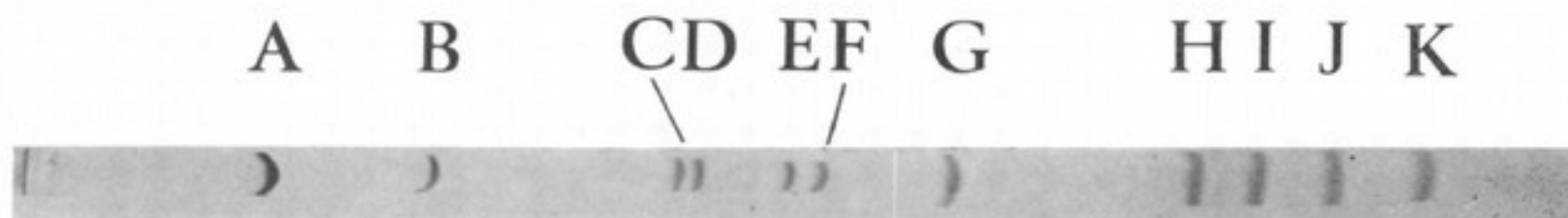
Specific Cleavage of Simian Virus 40 DNA by Restriction Endonuclease of *Haemophilus Influenzae**

(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 μg SV40 DNA'sı, *Haemophilus influenzae* endonükleaz I enzimi ile kesilmiş.

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

Electron microscopy		Distribution of label	Sedimentation analysis	
	Molecular weight	Molecular weight	Molecular weight	Molecular weight
			$\left[\frac{S_2}{S_1} = \left(\frac{M_2}{M_1} \right)^{0.25} \right]$	$\left[\frac{S_2}{S_1} = \left(\frac{M_2}{M_1} \right)^{0.25} \right]$

1 µg SV40 DNA'sı, *Haemophilus influenzae* 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		<i>s</i>	Sedimentation analysis	
	% length ± 1 SD	Molecular weight (× 10 ⁻⁴)	%	Molecular weight (× 10 ⁻⁴)		Molecular weight	Molecular weight
						$\left[\frac{S2}{S1} = \left(\frac{M2}{M1} \right)^{0.33} \right]$ (× 10 ⁻⁴)	$\left[\frac{S2}{S1} = \left(\frac{M2}{M1} \right)^{0.28} \right]$ (× 10 ⁻⁴)
<i>A</i>	21.8 ± 1.6	6.5	24	7.2	10.1 9.8 9.7 9.4	6.1	9.4
<i>B</i>	13.9 ± 1.4	4.2	18	5.4	9.2 8.9 8.9	4.6	7.5
<i>C</i>	10.6 ± 0.7*	3.2*	10.5*	3.2*			
<i>D</i>	10.6 ± 0.7*	3.2*	10.5*	3.2*	8.2 8.2	3.2	5.9
<i>E</i>	7.7 ± 1.4	2.3	7.5†	2.3†	7.6	2.4	4.7
<i>F</i>			7.5†	2.3†			
<i>G</i>			7	2.1	7.3	2.0	4.2
<i>H</i>			3.9	1.2	7.0	1.7	3.6
<i>I</i>			5.3	1.0‡			
<i>J</i>			4.1	0.87‡			
<i>K</i>			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 "mıphar" olından başlırsak :

Tipik TipII restriksiyon endonükleazlar ile sindirme



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 tanımla
Bunların isimlendirme



Malzemeler:

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

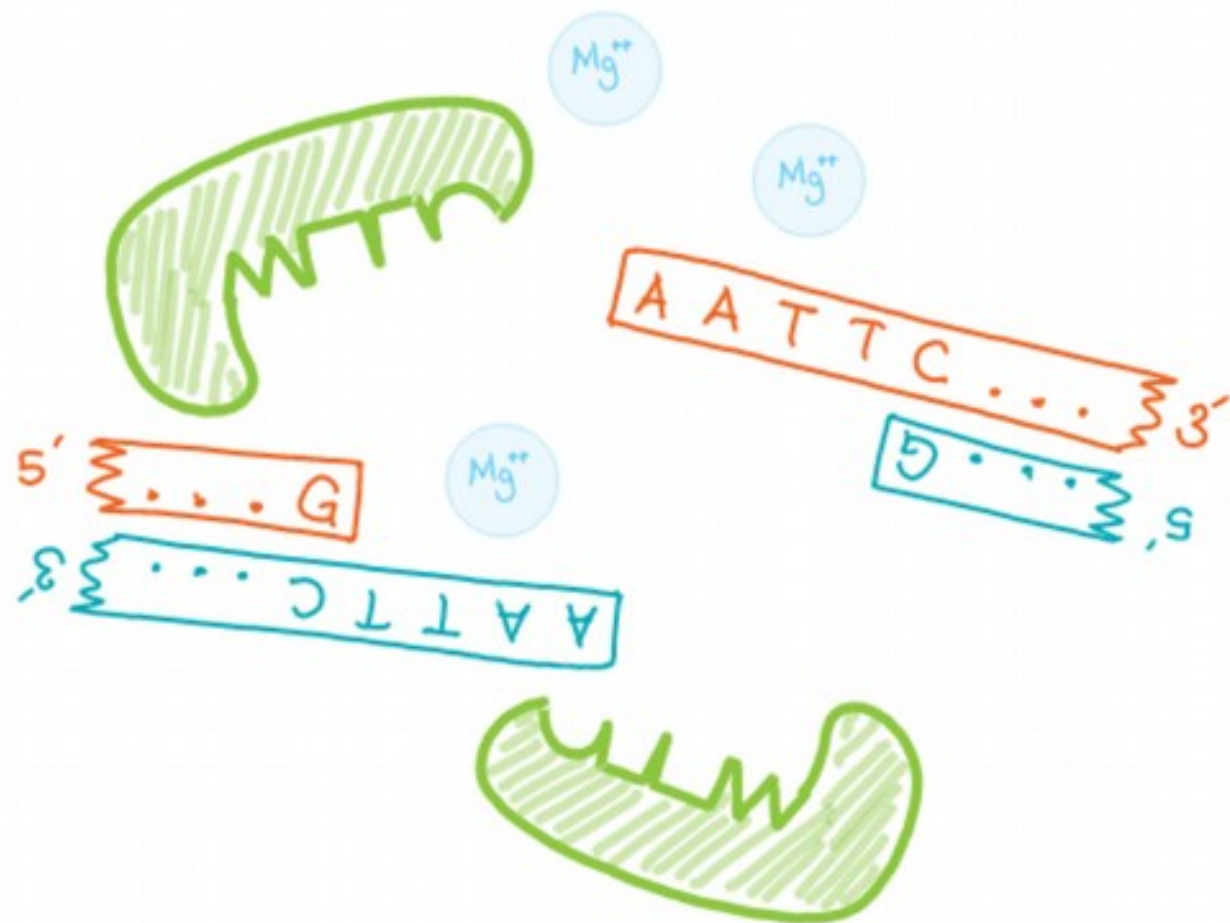


Eco

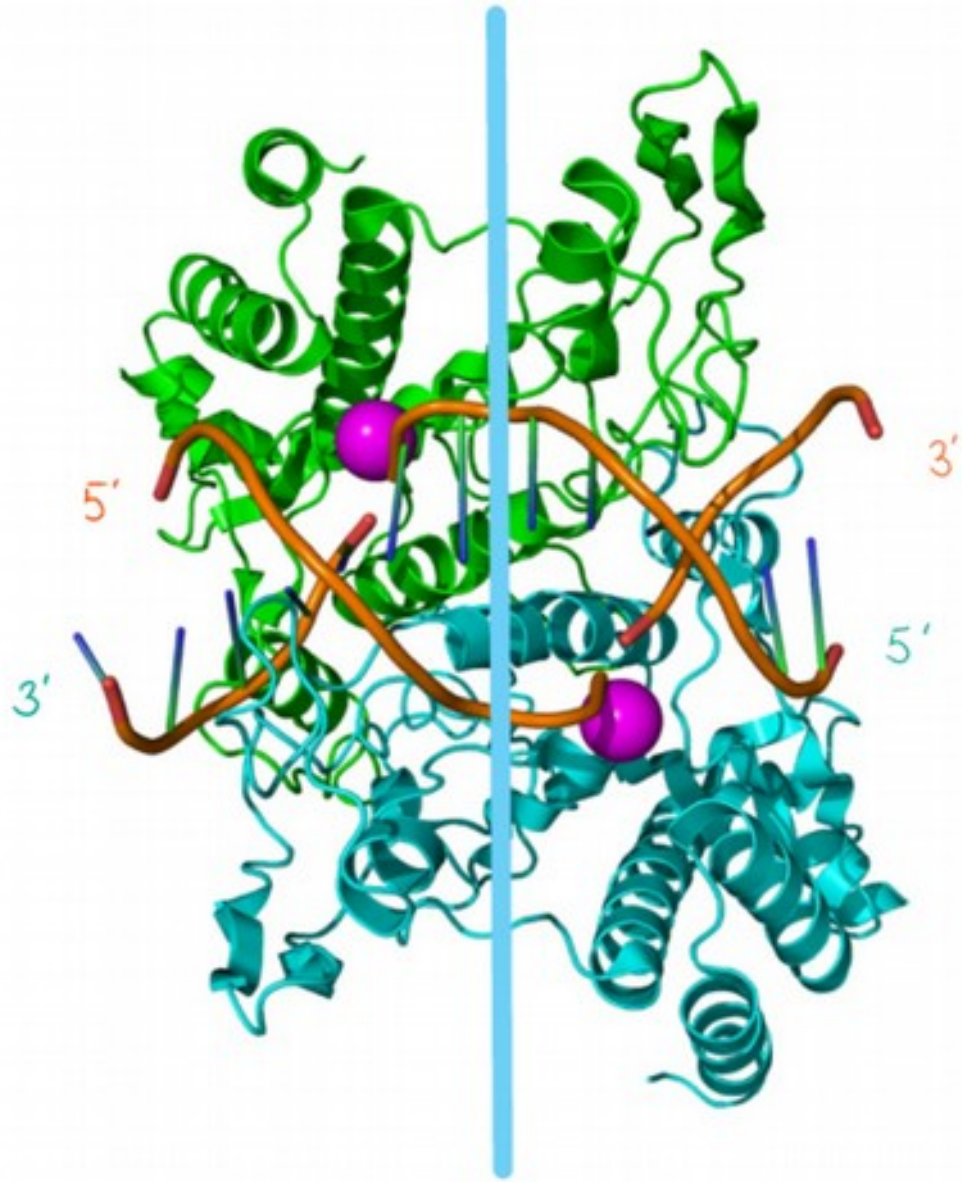
ey edip pide ye



5'
3'



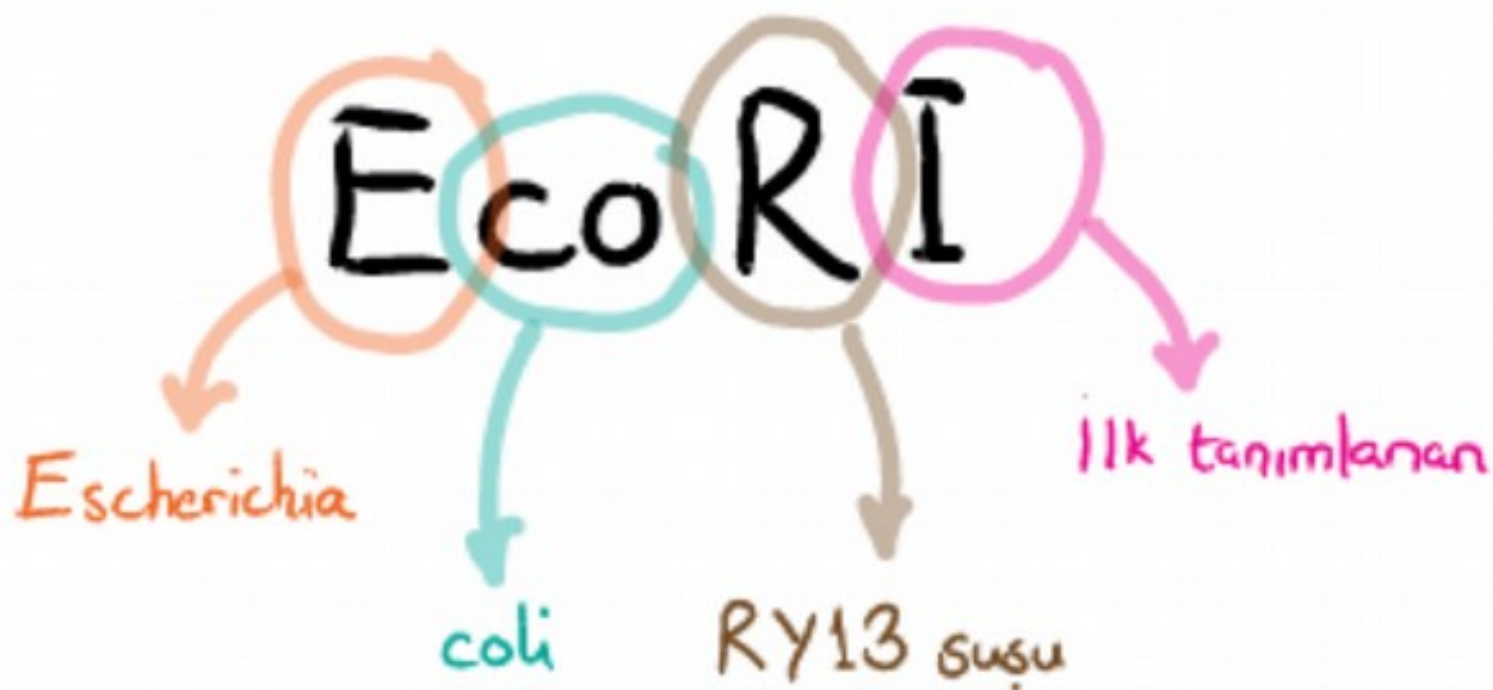
Type II Restriktions Enzyme:



mtan

Bir çok enzim tanımlanmış durumda ...

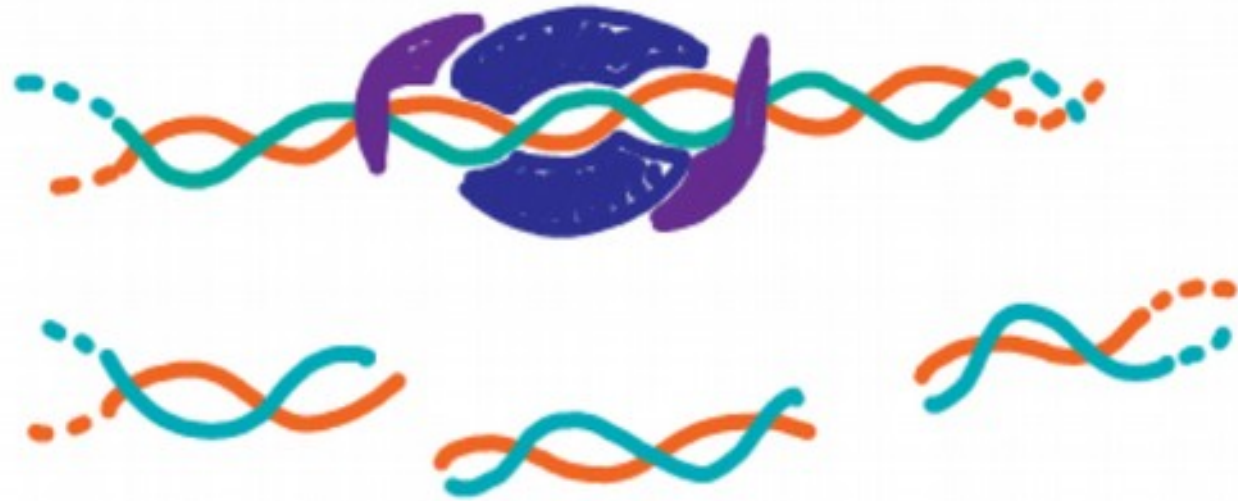
Bunların isimlendirilmesinde :



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



T
-
içer
-
E_c

Tip II E Restriksiyon Enzimleri :

- Tanıma bölgelerinin iki kopyası ile etkileşime geçtikten sonra birini keserler

Tip II F Restriksiyon Enzimleri :

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

NgoMIV

Tip II G Restriksiyon Enzimleri :

Tip I



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

- Metile edilmiş DNA'yı keserler

DpnI

Tip IIS Restriksiyon Enzimleri :

- Non-palindromik / asimetrik dizileri tanıyarak keserler

Fok I

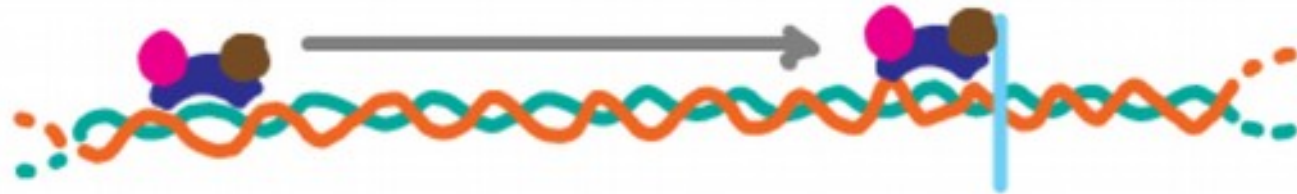
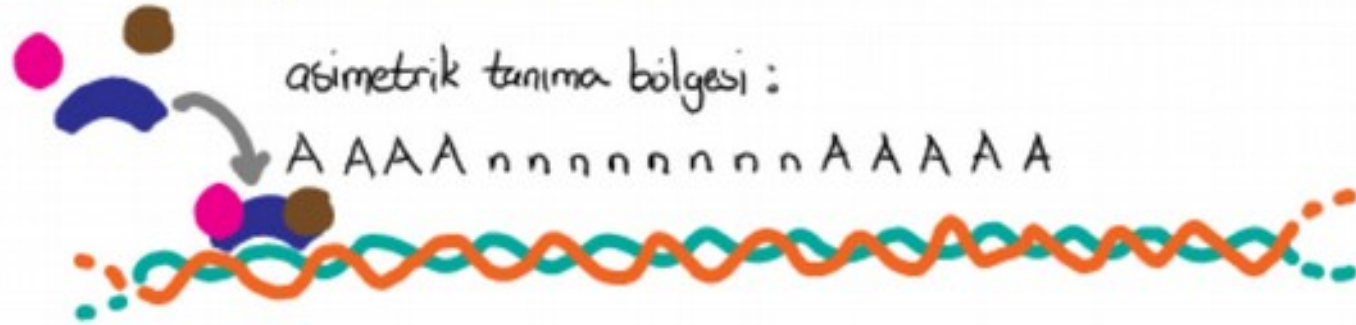
Tip IIT Restriksiyon Enzimleri :

- Palindromik ya da asimetrik dizileri tanıyan

homo/heterodimerik enzimler

Bpu10I, BsiI

Tip I Restriksiyon Endonükleazlar:



> 1000 baz uzaklığa translokasyon
(moleküler motor !)

Multi-fonksiyonel enzim

= Restriksiyon

HsdM : Metiltransferaz



HsdR : Restriksiyon

HsdS : DNA'ya bağlanma

Multi-fonksiyonel enzim :

- Restriksiyon
- Modifikasyon

Kofaktörler:

S-Adenozil - Metiyonin

ATP

Mg^{2+}

Tip III Restriksiyon Endonükleazlar

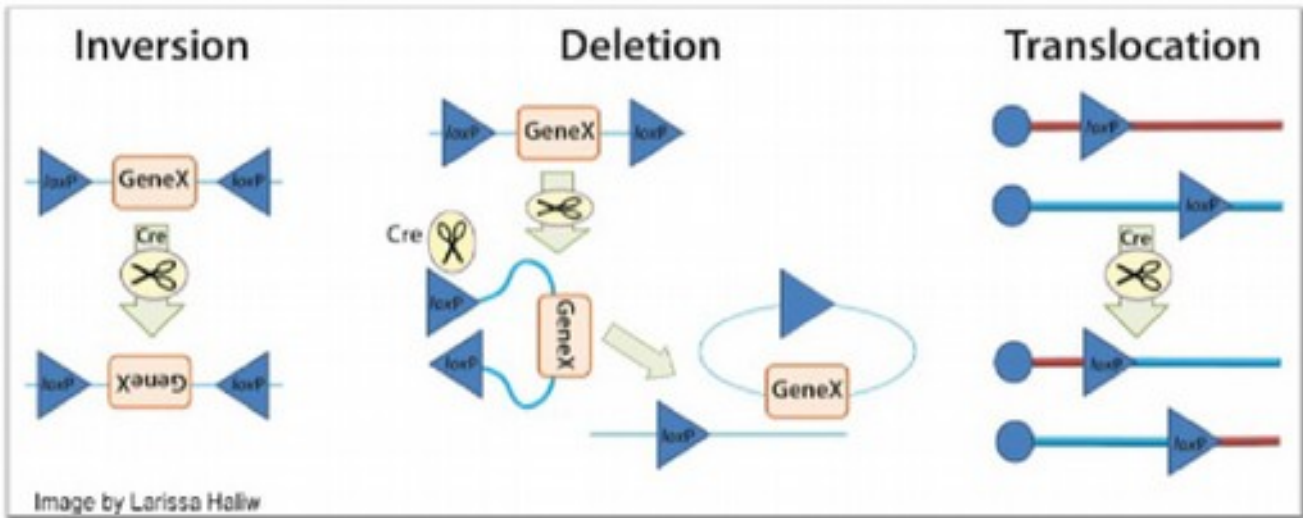
- Tip I enzimlerine benzer tanıma bölgesi
- ~25 baz ilerde kesim bölgesi
- AdoMet + ATP + Mg^{2+} ko-faktörler
- Restriksiyon, Modifikasyon, Substrat bağlama alt üniteleri

Tip IV Restriksiyon Endonükleazlar

- metile edilmiş DNA'yı tanıyarak keserler

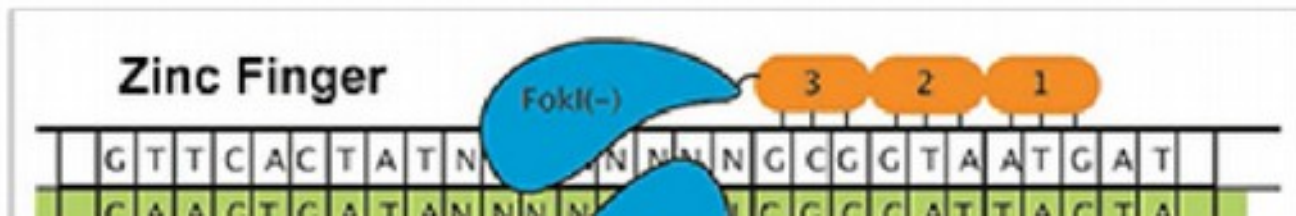
McrBC & Mrr sistemleri

$(G/A)^mC$ — CpG metilasyonu



Cre rekombinaz

Sentetik biy
ve gen/genom



CTRL + C

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

CTRL + C

CTRL + V

CTRL + X

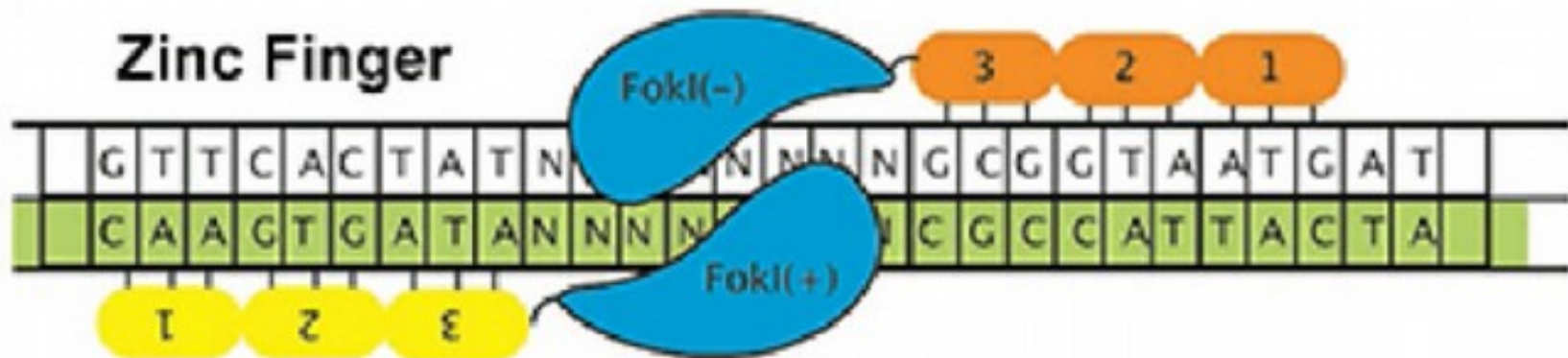


Kesim aracımızı istediğimiz hedef DNA dizisine yönlendirebilsek ne güzel olurdu .

..



Zinc Finger

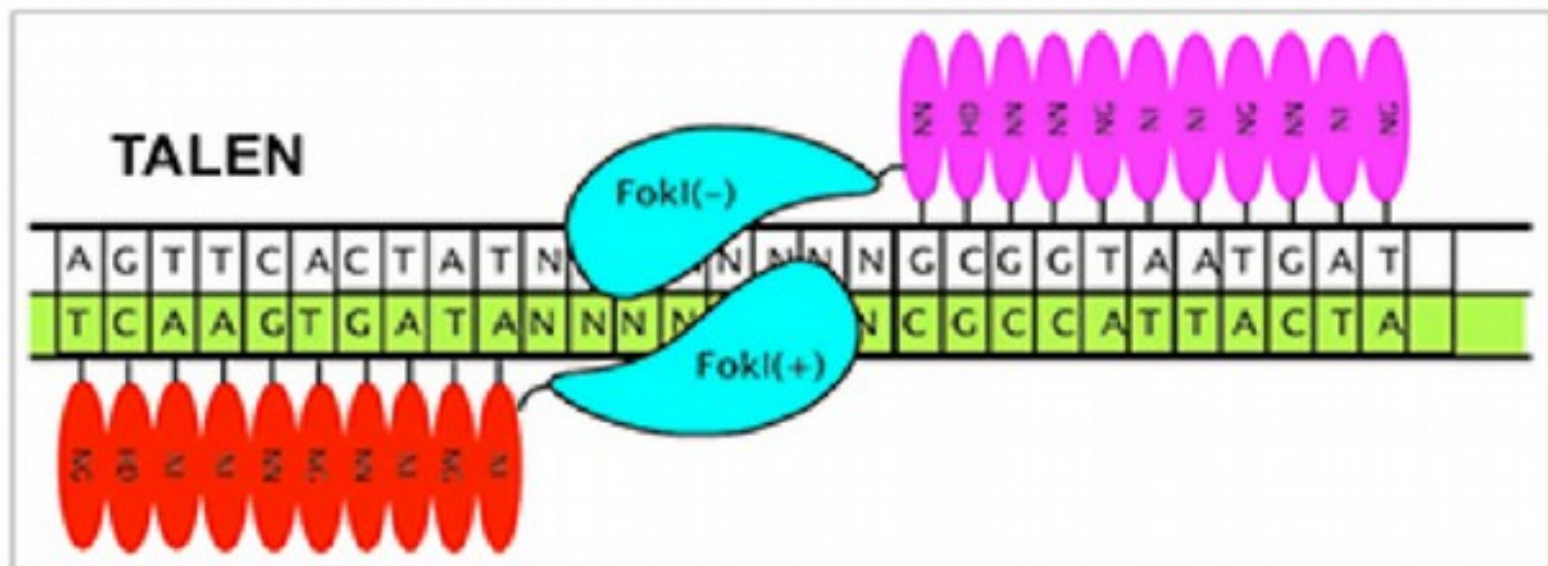


FokI restriksiyon endonükleaz enzimine eklenen "Çinko parmak motifleri", "belirli ölçüde" DNA bağlanma özgülüğü sağlamakta

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

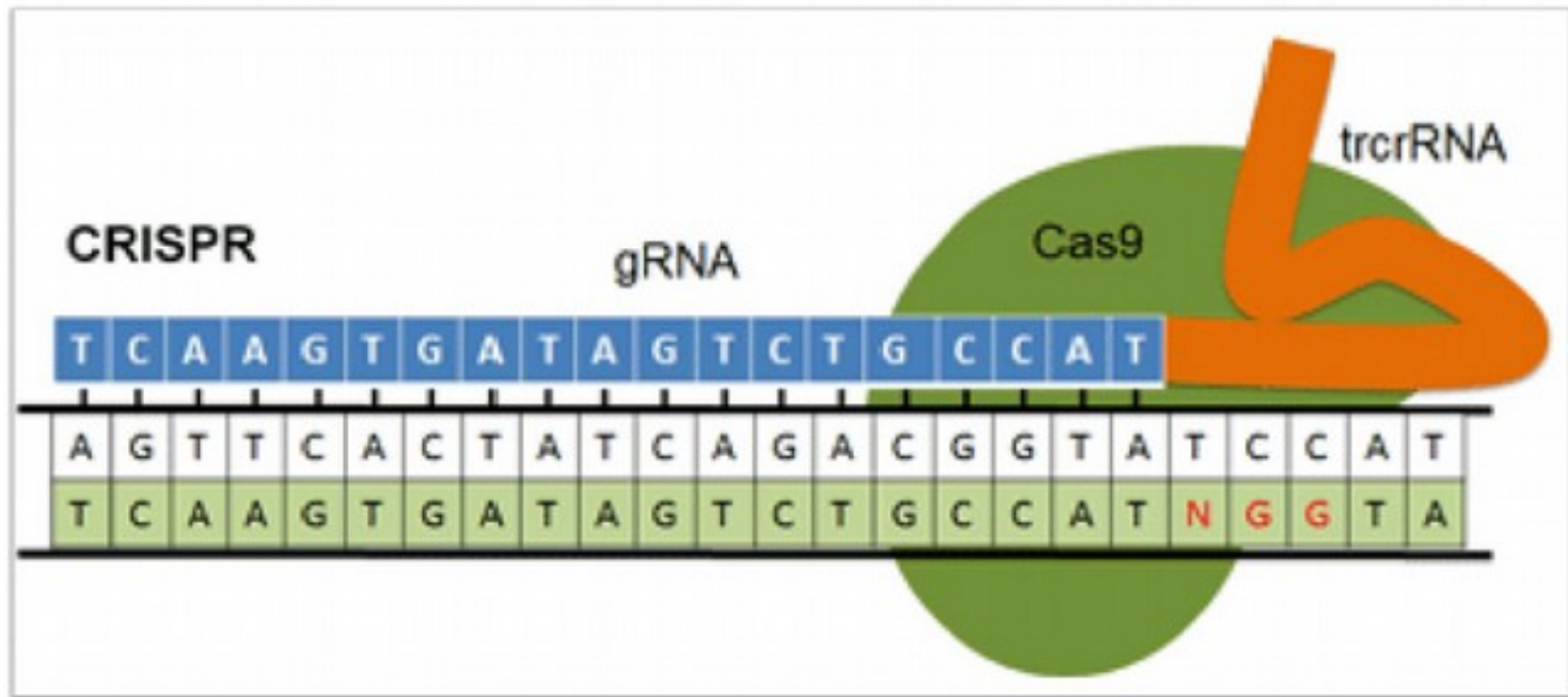


Bilgisayar destekli tasarım araçlarına rağmen, her bölge hedeflenemez :/



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

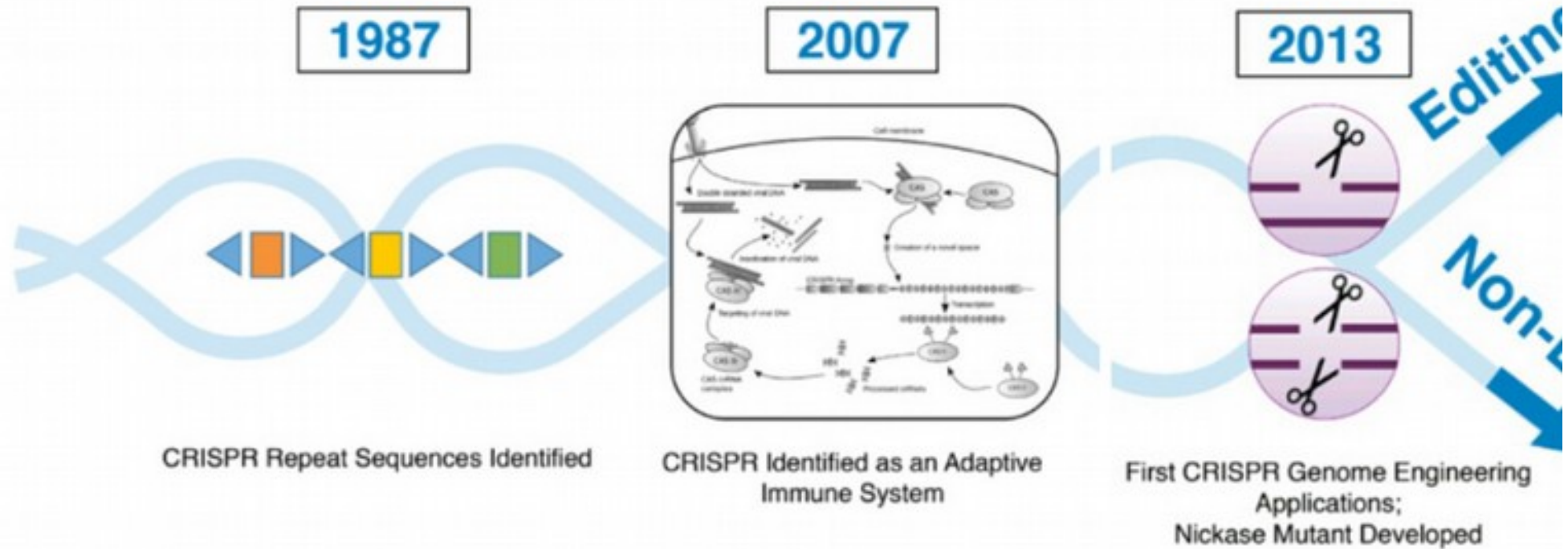
Cas9: kılavuz RNA (gRNA) ile yönlendirilen / hedeflenen ENDONÜKLEAZ

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

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / Cas9

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

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



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

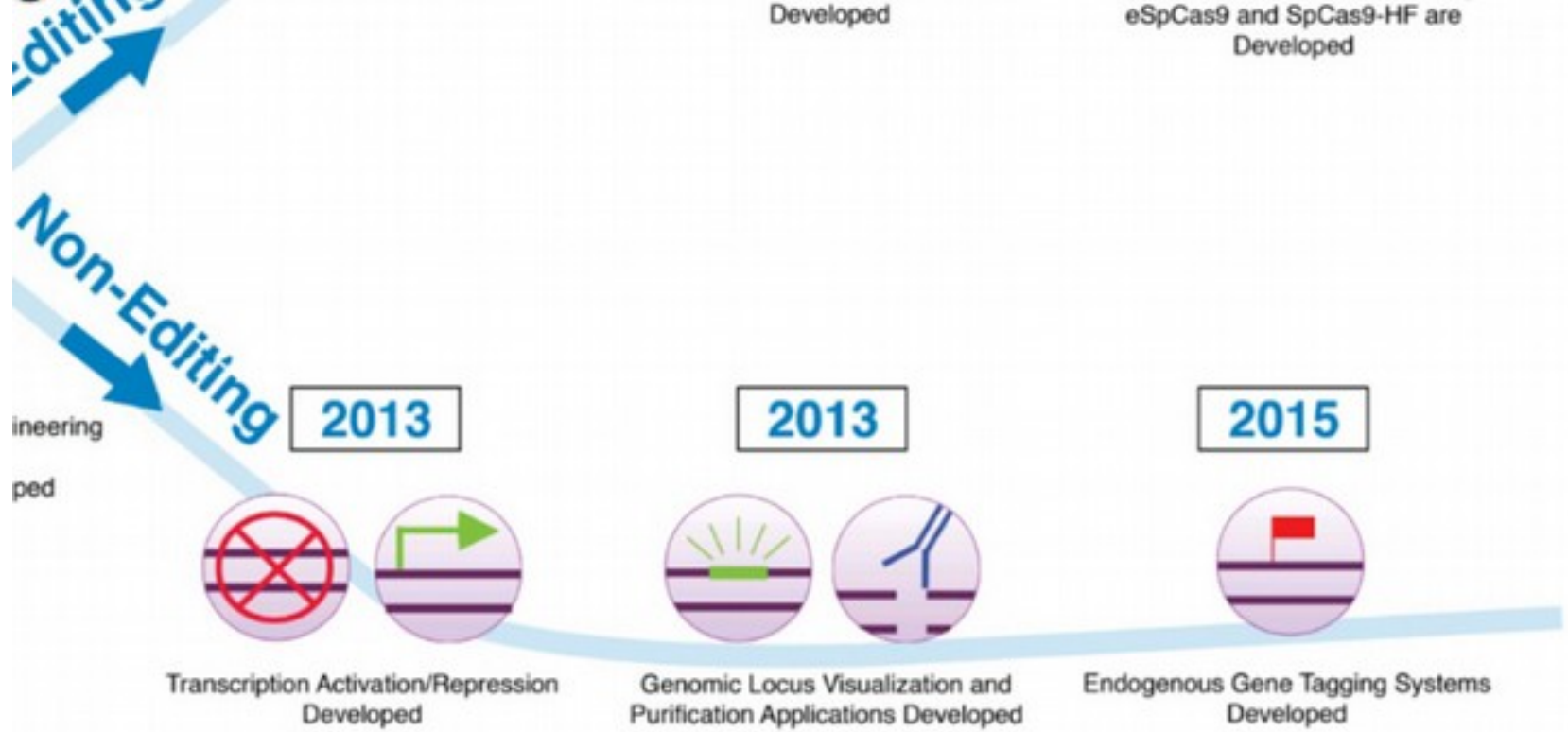
Non-Editing

2013

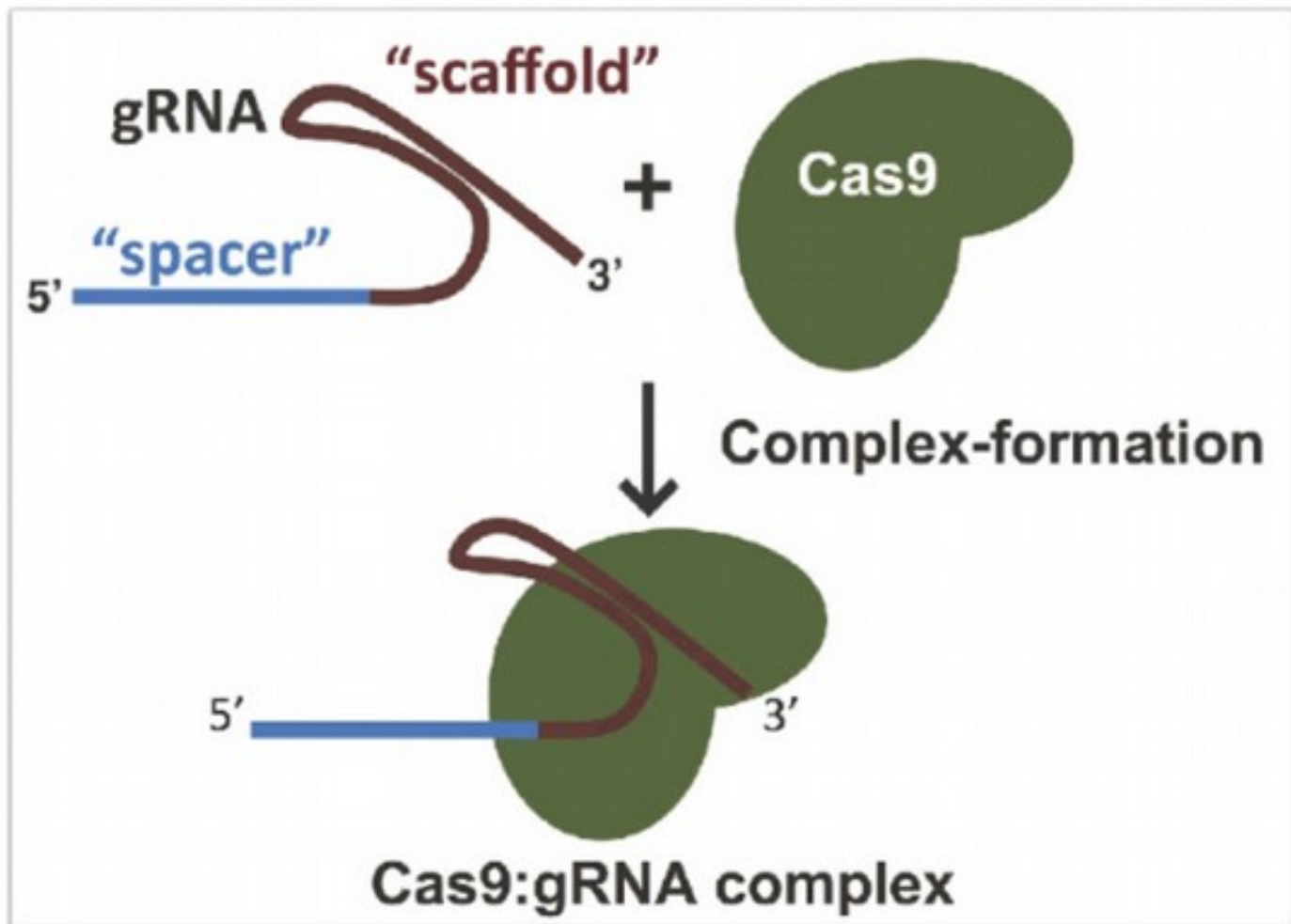
2013

2015

Engineering
; veloned



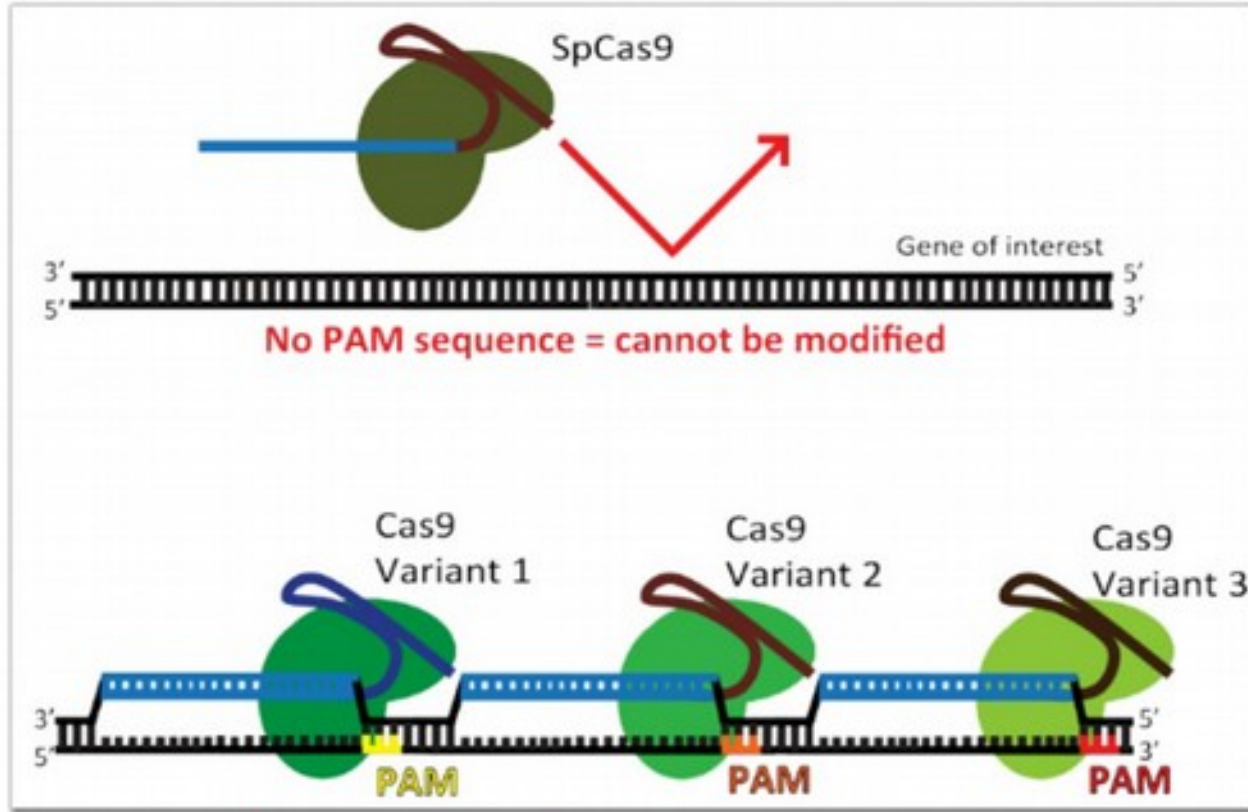
GEREK SINIMLER



3'
5'

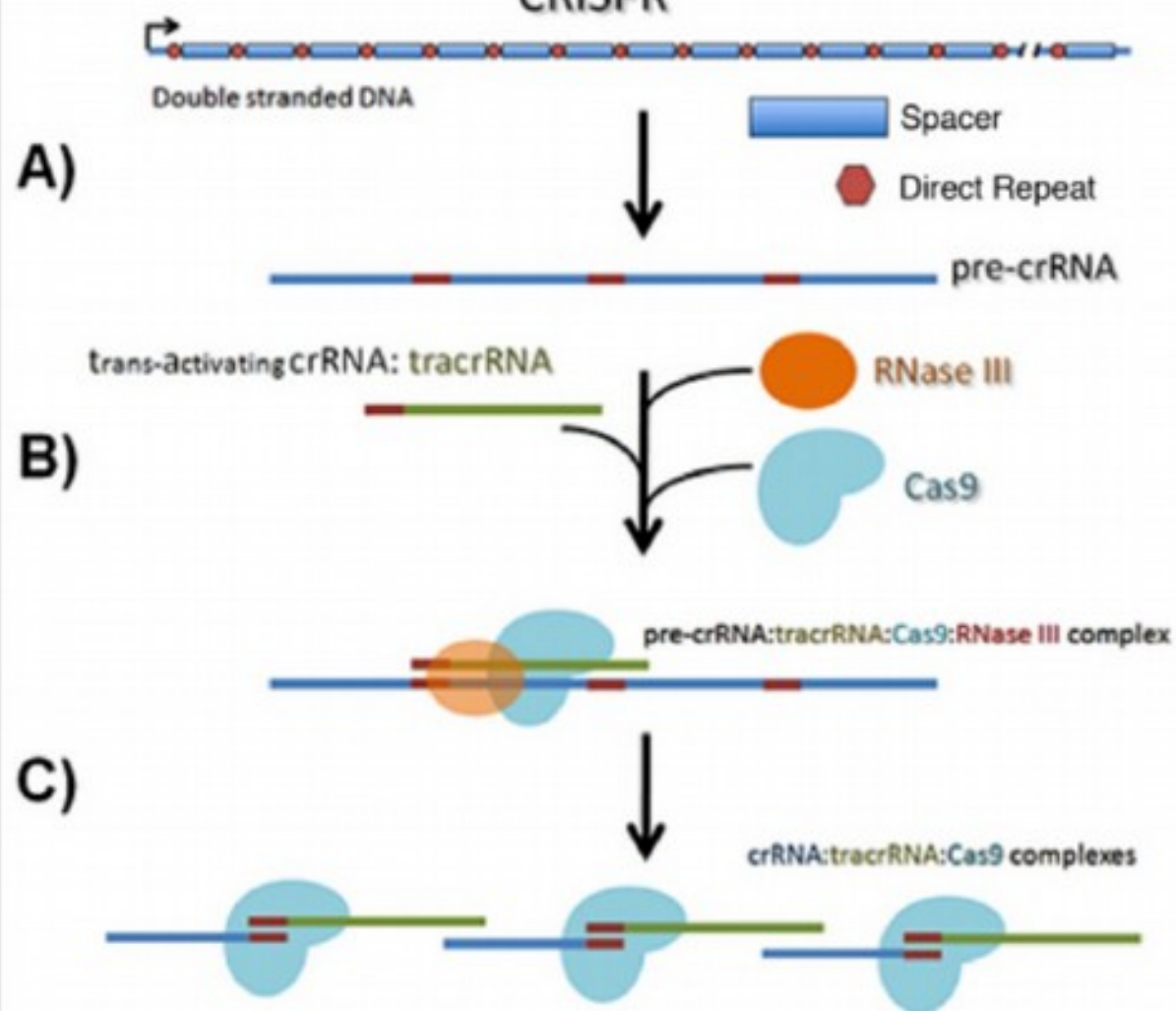
3'
5'

ation

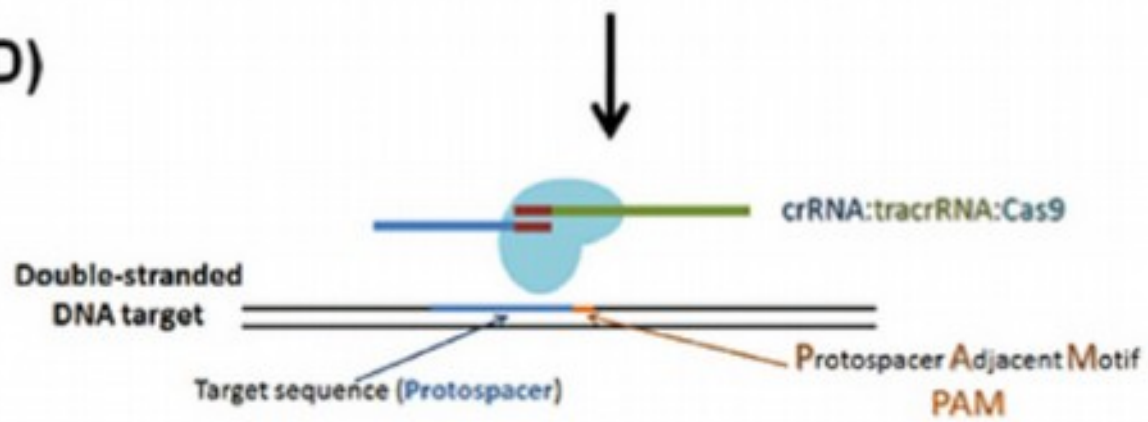


Hedef DNA dizisi "sonsuz" esneklikte değil!
Protospacer Adjacent Motif (PAM) hedef DNA bölgesine
bağlanmak için gerekli
Streptococcus pyogenes Cas9 enzimi için 5'-NGG-3'

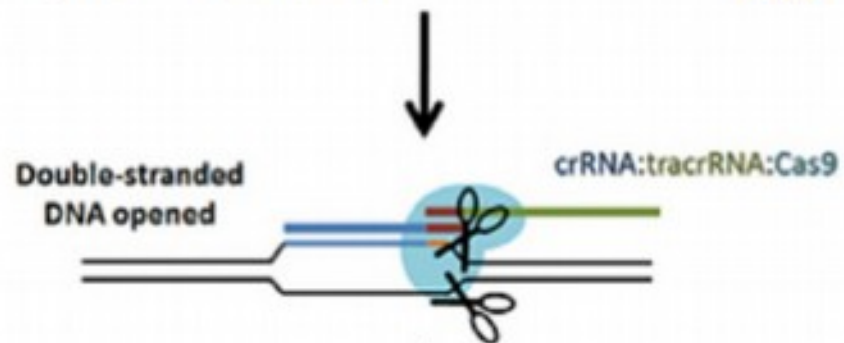
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Array: CRISPR



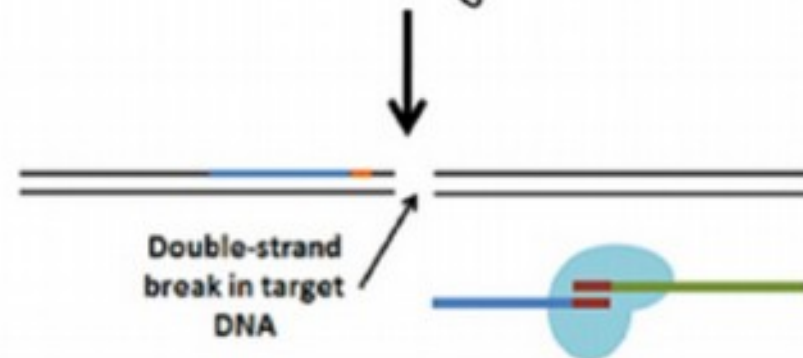
D)

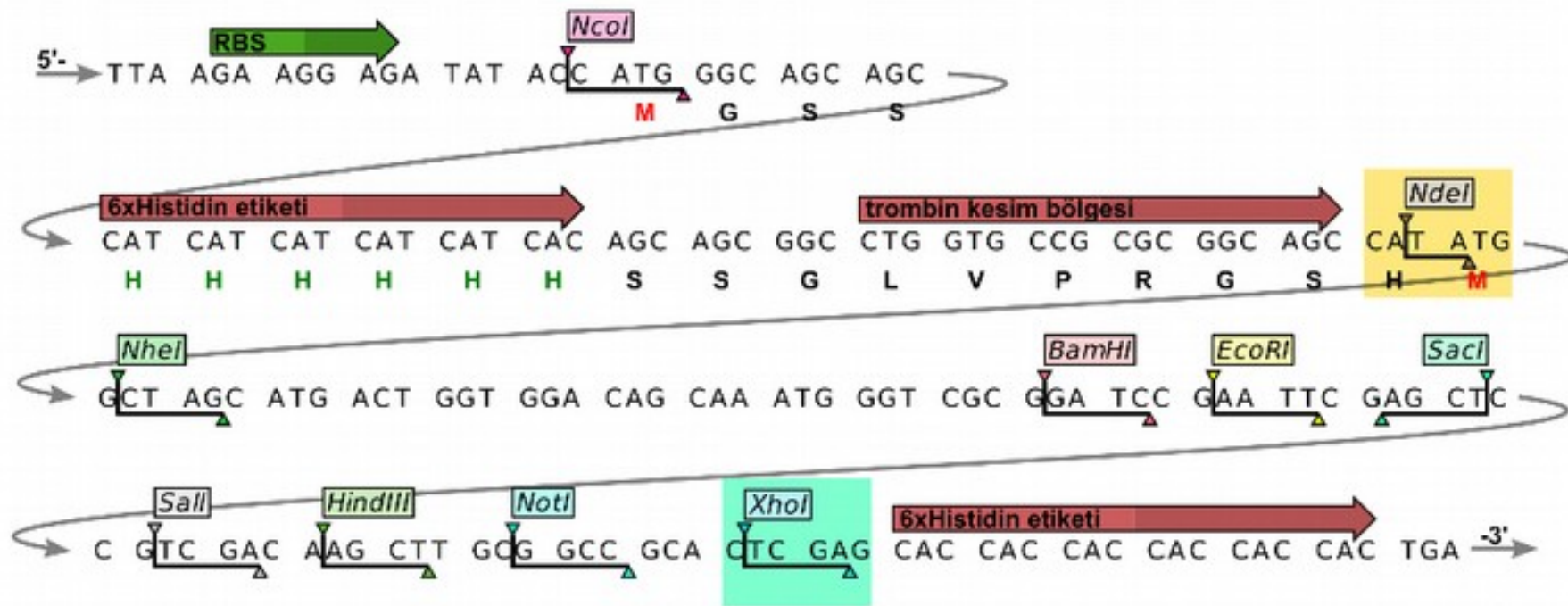


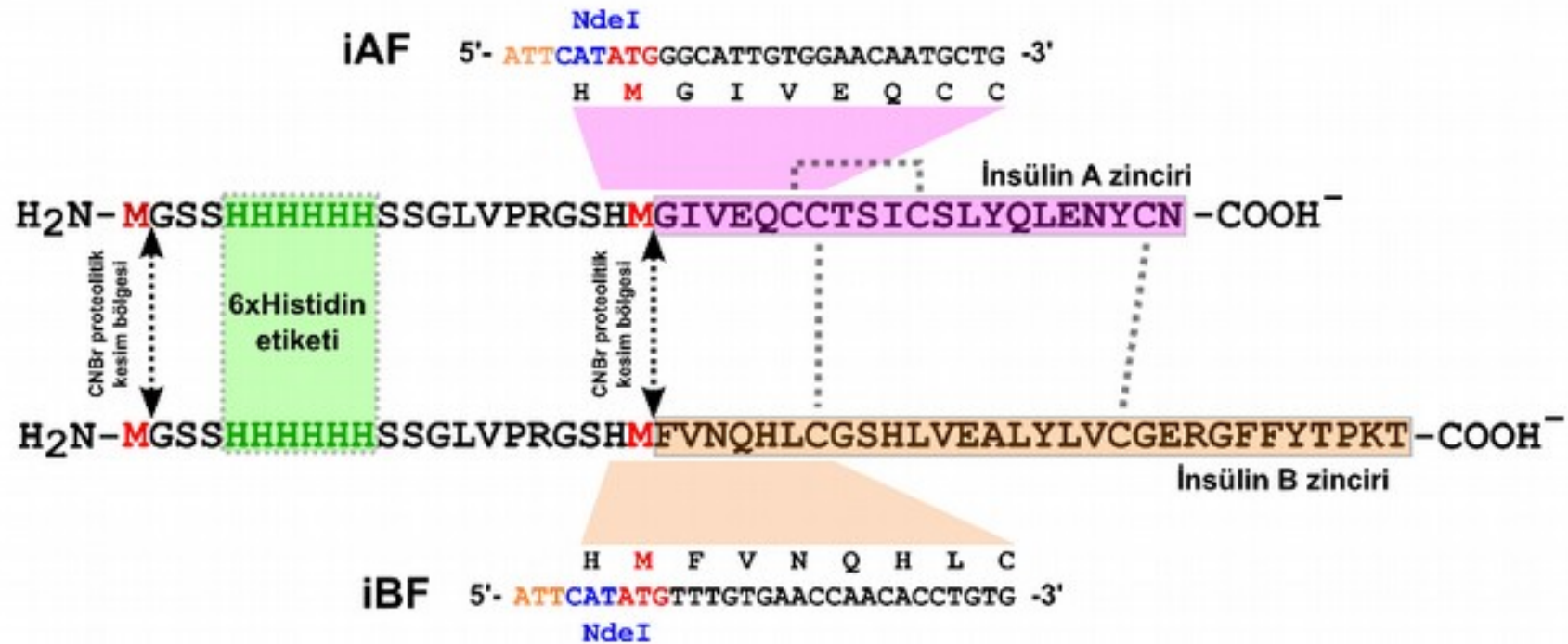
E)



F)







Double-digest için uygun çiftler

Kesim bölgeleri / yapışkan uçları farklı

Tampon koşulları benzer

aynı sıcaklıkta aktif

Aynı anda vs Ardışık 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.

