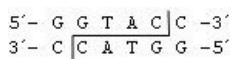


Polymorfismus délky restričních fragmentů

Mezi nejstarší a doposud nejrozšířenější techniky používané v DNA diagnostice patří bezesporu **restriční analýza** (restriction fragment length polymorphism, **RFLP**). Využívá bakteriálních endonukleas (restriktas), které dokáží štěpit DNA, pokud obsahuje určitou přesně definovanou sekvenci nukleotidů. Bakterie se pomocí těchto enzymů brání před infekcí viry: virová DNA může být snadno rozštěpena, na rozdíl od vlastní nukleové kyseliny, která je před degradací chráněna methylocí.

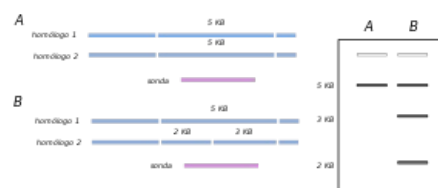
Úsek DNA, který bude endonukleasou rozpoznán a štěpen, je dlouhý zpravidla jen několik párů bazí a často jde o palindromickou sekvenci. Díky tomu může vytvořit smyčku, kterou enzym snáze najde a odstříhne. Pokud jedna alela určitého genu obsahuje rozpoznávací sekvenci, zatímco jiná nikoliv, bude DNA první alely rozštěpena, zatímco DNA druhé alely zůstane vcelku. Při elektroforéze fragmentů pak pro rozštěpenou sekvenci nalezneme dva kratší úseky, kdežto nerozštěpená DNA vytvoří v gelu jen jeden proužek odpovídající delší sekvenci o původní délce.

Příkladem může být endonukleáza KpnI. Jejím zdrojem je bakterie *Klebsiella pneumoniae* OK8. Sekvence, kterou tato endonukleáza dokáže rozpoznat, je GGATCC (všimněte si, že jde o palindrom), přičemž oba řetězce dvoušroubovice přerušuje mezi cytosiny (tj. dvoušroubovice DNA bude mít po rozštěpení „nerovný konec“):



V tabulkách restričních enzymů bude obvykle charakterizována zápisem GGTAC[^]C.

Jednotlivé endonukleasy se liší podmínkami, za nichž optimálně pracují. Mnoho z nich pracuje při vyšších teplotách, v roztocích s vyšším obsahem solí apod. Např. Tail je endonukleasa izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* Cc1-331. Její rozpoznávací sekvence je ACGT[^] (opět jde o palindrom). Ke své práci vyžaduje teplotu kolem 65 °C a pufr s vyšší iontovou silou. Informace o jednotlivých restričních endonukleázách, mikroorganismech, ze kterých byly izolovány, cílových sekvencích apod. shromažďuje REBASE (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>) (The Restriction Enzyme Database).



Endonukleáza nenaštěpila ani jednu alelu u A, zatímco u B naštěpena jedna alela. Na elektroforéze se restriční segmenty objeví jako dvě nové linie.

Externí odkazy

- RFLP na NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrf1p/>)
- RFLP na stránkách Genetika - Biologie (<http://www.genetika-biologie.cz/rflp>)