

А.К. ШИРЯЕВ, В.А. ШАДРИКОВА

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Учебное пособие

Самара
Самарский государственный технический университет
2020



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра «Органическая химия»

А.К. ШИРЯЕВ, В.А. ШАДРИКОВА

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Учебное пособие

Самара
Самарский государственный технический университет
2020

Печатается по решению методического совета химико-технологического факультета (пр. № 6 от 15.06.2020 г.).

УДК 47.963.32 (075.8)

БКК 24.239я73

Ш 647

Ширяев А.К.

Нуклеиновые кислоты: учебное пособие / *А.К. Ширяев, В.А. Шадрикова.* – Самара: Самар. гос. техн. ун-т, 2020. – 97 с.

Рассмотрены основные представления о строении и функционировании нуклеиновых кислот: двойная спираль и её упаковка в хромосому, процессы репликации, транскрипции и трансляции, а также методы исследования нуклеиновых кислот и генома – электрофорез, блоттинг, секвенирование, полимеразная цепная реакция.

Предназначается для студентов, обучающихся по направлению 04.03.01 «Химия», профилю подготовки «Органическая и биоорганическая химия», 19.03.01 «Биотехнология», профилю подготовки «Биотехнология»; по специальности 04.05.01 «Фундаментальная и прикладная химия», специализаций «Органическая химия» и «Фармацевтическая химия»; а также для учащихся магистратуры, обучающихся по программе 04.04.01 «Химия», профиль «Современные методы синтеза и анализа органических веществ».

Рецензенты: канд. хим. наук, доцент *С.Х. Шарипова*,
д-р хим. наук, доцент, профессор *В.А. Осянин*

УДК 47.963.32 (075.8)

БКК 24.239я73

Ш 647

© А.К. Ширяев, В.А. Шадрикова, 2020

© Самарский государственный

технический университет, 2020

ВВЕДЕНИЕ

Нуклеиновые кислоты являются «информационными» молекулами. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) кодирует «инструкции», передающиеся от поколения к поколению, и определяющие строение, внешний вид и функционирование живого организма, а также «траекторию» его развития в течение жизни. Рибонуклеиновые кислоты (РНК) выполняют ту же функцию в некоторых вирусах, например, в вирусе иммунодефицита человека, вирусе гриппа, коронавирусах. Таким образом, нуклеиновые кислоты ответственны за существование всех форм жизни на Земле, и поэтому являются центральным звеном исследований биологов и химиков.

Несмотря на то, что нуклеиновые кислоты являются, по праву, отдельным предметом исследований, их изучение требует использования как химических, так и биологических методов. Невозможно определить строение нуклеиновых кислот без использования химических методов, а для понимания их функционирования необходимо знать общую биологию и биологию клетки. Кроме того, молекулы нуклеиновых кислот огромны, хотя и построены всего из нескольких нуклеотидов, поэтому их свойства определяются последовательностью нуклеотидов, исследование которой невозможно без применения информационных компьютерных технологий. Поэтому в молекулярной биологии концентрируются знания химии нуклеотидов и нуклеиновых кислот, биологии клетки, генетики и информатики, нацеленные на исследование функционирования живой системы.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. ДВА КЛАССА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Существует два класса нуклеиновых кислот. Оба они являются полимерами, цепочка которых образована моносахаридами и фосфатами, чередующимися друг за другом. Полимеры получаются в результате реакции бифункциональных соединений. В моносахаридных остатках нуклеиновых кислот содержится две или три гидроксильных группы. Фосфорная кислота является трёхосновной и образует моно-, ди- и триэфиры со спиртами. Полимерная цепочка получается за счёт этерификации фосфорной кислоты двумя гидроксильными группами двух моносахаридов. При этом каждый моносахарид также связан с двумя фосфатами. Таким образом, нуклеиновая кислота – это полимерный диэфир фосфорной кислоты, и оставшаяся гидроксильная группа фосфата определяет кислотные свойства полимера. К каждому остатку моносахарида присоединено **нуклеиновое основание** – гетероцикл пиримидинового или пуринового ряда (рис. 1).

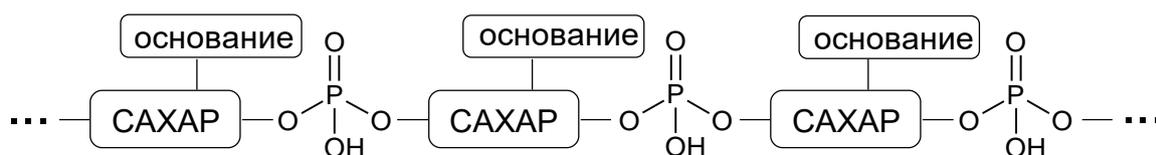


Рис. 1. Цепочка нуклеиновой кислоты

Главное отличие между двумя классами нуклеиновых кислот заключается в структуре моносахарида, образующего полимерную цепь. В полимерной цепочке присутствует либо рибоза (β -D-рибофураноза), либо 2-деоксирибоза (2-дезоксид- β -D-рибофураноза). В первом случае мы имеем дело с **рибонуклеиновой кислотой**, или РНК, во втором – с **дезоксирибонуклеиновой кислотой**, или ДНК (рис. 2).

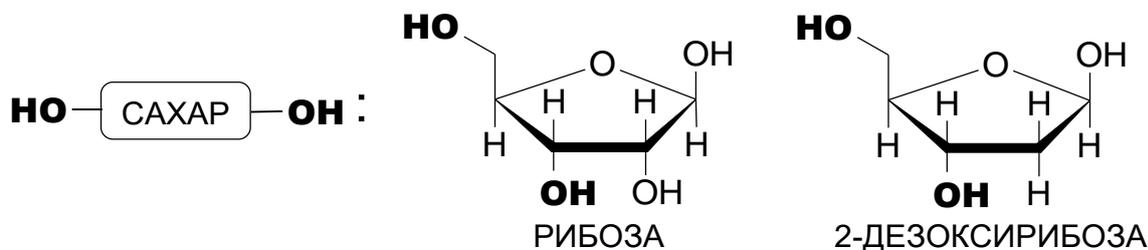


Рис. 2. Сахара, входящие в состав нуклеиновых кислот

К сахару присоединено основание, и в каждом классе нуклеиновых кислот присутствует всего четыре **нуклеиновых основания**. Второе отличие ДНК от РНК заключается в том, что в состав ДНК входит метилированное производное урацила – тимин (рис. 3).

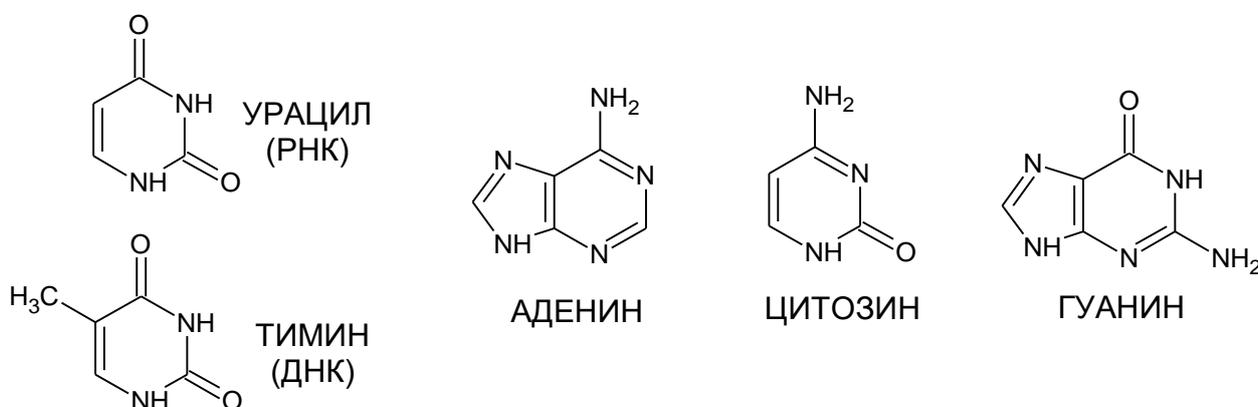


Рис. 3. Гетероциклические основания, входящие в состав нуклеиновых кислот

2. ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

2.1. Открытие ДНК

1. В 1842 г. **Карл Нёгели** (*Karl Nägeli*) обнаружил палочкообразные структуры в ядрах растительных клеток. Сейчас мы называем их хромосомами.

2. В 1866 г. **Эрнст Хекель** (*Ernst Haeckel*) заявил, что ядра клеток ответственны за передачу наследственных признаков.

3. 1869 г. – **Фридрих Мишер** (*Friedrich Miesher*, г. Базель, Швейцария) выделил из гнойных клеток обработкой щелочью водный рас-

твор, при подкислении которого образовывался осадок. Этот осадок не обладал свойствами белка и содержал **фосфор**. Поэтому Мишер решил, что это вещество содержится во внутриклеточных структурах, и назвал его **НУКЛЕИН**. Мишер считал, что нуклеин – резерв фосфора, который необходим для организма. Он умер в 1895 г., так и не узнав роль нуклеина в жизни клетки и всего живого организма.

4. Пол Эрлих (*Paul Ehrlich*) в **1870–1880** гг. разработал метод окрашивания индивидуальных клеточных компонент, сейчас это называется гистохимия. С помощью окрашивания Вальтер Флемминг (*Walter Flemming*) наблюдал интенсивно окрашенный материал в ядре растительной клетки, который он назвал **хроматин**. Он заметил, что хроматин разделяется на две части, каждая из которых отходит в дочернюю клетку при делении материнской клетки.

Было найдено, что хроматин содержит нуклеин и белок, и считалось, что активным компонентом хроматина является белок. В **1900**-х гг. сложилось убеждение, что носителем генетической информации являются хромосомы, состоящие из ДНК и белка. И носителем генетической информации является именно белковая составляющая хромосом, так как белок имеет сложную структуру, вступает во многие реакции, а структура ДНК слишком проста, и она химически инертна.

5. К **1944** г. на бактериях было показано, что именно ДНК ответственна за передачу наследственной информации. В **1920**-х гг. Фредерик Гриффит (*Frederick Griffith*) исследовал бактерии *Streptococcus Pneumoniae*, вызывающие пневмонию. Гриффит (1928 г.) брал два штамма пневмококков: капсульный и бескапсульный. Капсульный – штамм патогенный (вирулентный), при инфицировании таким штаммом мыши погибают, бескапсульный – непатогенный. При введении мышам смеси убитых нагреванием (и, следовательно, потерявших вирулентность) капсульных пневмококков и живых бескапсульных невирулентных бактерий, животные погибали в результате размножения капсульных вирулентных форм. Обнаруженное явление Гриффит интерпретировал как трансформацию.

Трансформация – это приобретение одним организмом некоторых признаков другого организма за счёт захвата части его генетической информации.

В 1944 г. этот эксперимент был повторен Освальдом Эйвери (*Oswald Avery*), Колином Мак-Леодом и Маклином Мак-Карти (*Colin MacLeod, Maclyn McCarty*) в варианте смешивания бескапсульных пневмококков с взятыми от капсульных белками, полисахаридами или ДНК. Было найдено, что превращения одного штамма в другой происходят и в культурах бактерий. Авери с сотрудниками удалось выделить вещество, вызывающее трансформацию. На это вещество действовали реагентами, разрушающими белки, ДНК, полисахариды и липиды. При действии реагента, разрушающего ДНК, вещество не вызывало трансформацию одного штамма в другой. Это доказывало, что ДНК вызывает подобную трансформацию.

В результате этого эксперимента была выявлена природа трансформирующего фактора. **Трансформирующим фактором оказалась ДНК.** Результаты были опубликованы в 1944 г., но некоторые учёные всё-таки считали, что эксперимент был проведён не достаточно тщательно, и ДНК, используемая в трансформациях штаммов, содержала примеси белка.

б. Вопрос о локализации генов в ДНК был окончательно решён в 1952 г. Альфредом Херши (*Hershey*) и Мартой Чейз (*Chase*). Они проводили эксперименты с бактериофагом Т2, размножающимся в бактериях *E. coli* (кишечная палочка). Это простейший вирус, состоящий из цепочки ДНК, упакованной в белковую оболочку. Вопрос заключался в том, какой из компонентов фага проникает в клетку при заражении бактерии. Были созданы штамм фага с белком, меченым радиоактивным изотопом серы ^{35}S , и штамм фага с ДНК, меченной радиоактивным изотопом фосфора ^{32}P . Известно, что в белке нет фосфора, а в ДНК – серы.

Суть опыта: фаги, у которых белковая оболочка была мечена радиоактивной серой (^{35}S), а ДНК – радиоактивным фосфором (P^{32}), инкубировали с бактериями. Затем бактерии отфильтровывали.

В смывных водах не обнаруживали ^{32}P , а в бактериях – ^{35}S . Следовательно, *внутри попала только ДНК*. Через несколько минут из бактерии выходили десятки полноценных фагов, содержащих и белковую оболочку, и ДНК.

Отсюда следовал однозначный вывод о том, что *именно ДНК выполняет генетическую функцию – несет информацию как о создании новых копий ДНК, так и о синтезе фаговых белков*.

Это дало убедительные доказательства, что фаг вводит в бактериальную клетку ДНК, а не белок. При заражении бактериальных клеток одним штаммом, бактерии оказывались радиоактивны, при заражении другим – нет. Это убедило большинство скептиков, что именно ДНК является носителем генетической информации.

7. 1957 г. Опыты Френкеля-Конрата (*Heinz Ludwig Fraenkel-Conrat*).

Френкель-Конрат работал с вирусом табачной мозаики (ВТМ). В этом вирусе содержится РНК, а не ДНК. Было известно, что разные штаммы вируса вызывают разную картину поражения листьев табака. После смены белковой оболочки «переодетые» вирусы вызывали картину поражения, характерную для того штамма, чья РНК была покрыта чужим белком.

Следовательно, *не только ДНК, но и РНК может служить носителем генетической информации*.

2.2. Открытие генов

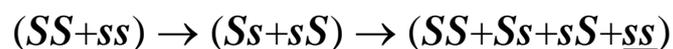
Основные идеи генетики неразрывно связаны с именем Грегора Менделя (*Mendel*). Он родился в Моравии в 1822 г. В юности он изучал естественные и сельскохозяйственные науки. Семья не могла его материально поддерживать, и в 1847 г. он стал монахом в Августинском монастыре города Брно. Но он не потерял интерес к науке, и в 1851–1853 гг. обучался в университете Вены, после чего вернулся в Брно, где в течение 10 лет проводил эксперименты с фасолью.

Мендель наблюдал результаты переопыления фасоли, изучая характеристики потомства переопылённых растений. Он опылял один

сорт растений пылью другого сорта и изучал, какие свойства передавались потомству 1-го поколения (F1) и второго поколения (F2). Например, он брал два вида фасоли – с гладкими и со сморщенными семенами. Он скрестил эти два сорта, и оказалось, что семена растений 1-го поколения все оказались гладкими. Казалось бы, свойство морщинистых семян исчезло. Но... Он их посадил в грядки и позволил им самоопылиться. Из получившихся 7500 семян 2-го поколения точно $\frac{3}{4}$ оказались гладкими, а $\frac{1}{4}$ – сморщенными. И он получил такие же результаты, изучая и другие свойства бобовых.

Мендель пришёл к выводу, что за наследование свойств ответственны какие-то наследственные частицы, которые присутствуют в семени парами. Эти пары разделяются в половых клетках. Сейчас мы называем эти единицы генами. В случае сморщенных и гладких семян, свойство гладкой кожицы является **доминантным**, а сморщенной – **рецессивным**. Поэтому сморщенные семена появляются, только когда объединяются обе частицы рецессивного свойства. Если присутствуют разные частицы, то преобладает свойство гладкой поверхности. Разные формы одного и того же гена называются **аллелями**.

Обозначим ген гладкости S , а ген сморщенности – s (маленькая буква, так как рецессивный). Растения с наборами генов SS и ss называются гомозиготными, а с набором Ss – гетерозиготными. При скрещивании гомозиготных растений получают в 1-м поколении только гладкие бобы, так как ген сморщенных семян – рецессивный. Во втором поколении появляется ровно $\frac{1}{4}$ сморщенных семян у гетерозиготных растений ($Ss = sS$):



Тот же результат Мендель получил при изучении цвета семян, цвета цветков. Изученные Менделем свойства передавались по наследству **независимо** друг от друга. Это объясняется их локализацией в разных хромосомах.

Мендель опубликовал свою работу в 1866 г. в журнале *Proceedings of the Society of Natural Sciences* («Практика общества естественных

наук»), который печатался в Брно. Этой публикацией никто не интересовался в течение 30 (!!!) лет, до начала XX века, когда другие учёные начали проводить аналогичные эксперименты. В течение нескольких лет исследователи осознали, что хромосомы и несут те гены, которые открыл Мендель. Но связь между хромосомами и ДНК ещё не была понятна.

2.3. Молекулярная биология в СССР

В нашей стране в первой половине XX века генетика считалась лженаукой, и «передовые» советские учёные боролись с проявлениями «менделизма-морганизма» в сельскохозяйственной науке, которую возглавлял **Т.Д. Лысенко** (цитаты из его речи на сессии *Всесоюзной Академии сельскохозяйственных наук имени Ленина*, ВАСХНИЛ, 1948 г.:

«Для нас совершенно ясно, что основные положения менделизма-морганизма ложны. Они не отражают действительности живой природы и являют собой образец метафизики и идеализма».

«Вследствие этой очевидности менделисты-морганисты Советского Союза, буквально полностью разделяя основы менделизма-морганизма, часто стыдливо прячут, вуалируют их, прикрывают метафизику и идеализм словесной шелухой. Делают они это из боязни быть высмеянными советскими читателями и слушателями, которые твёрдо знают, что зачатки организмов или половые клетки являются одним из результатов жизнедеятельности родительских организмов».

«Только при замалчивании основных положений менделизма-морганизма людям, детально не знакомым с жизнью и развитием растений и животных, хромосомная теория наследственности может казаться стройной и хотя бы в какой-то степени верной системой. Но стоит только допустить абсолютно верное и общеизвестное положение, а именно, что половые клетки или зачатки новых организмов рождаются организмом, его телом, а не непосредственно той половой клеткой, из которой произошёл данный уже зрелый организм, как вся «стройная» хромосомная теория наследственности сразу же нацело расстраивается»).

В результате такой политики, заведующий отделом генной инженерии Института молекулярной биологии академик А.А. Баев (1904–1994) провёл в лагерях и тюрьмах лучшие годы жизни: 1937–1944 и 1949–1954 гг., а академик Н.И. Вавилов (1887–1943) погиб в саратовской тюрьме в 1943 г.

Положение изменилось только после 1953 г. В 1959 г. был создан Институт радиационной и физико-химической биологии, впоследствии переименованный в Институт молекулярной биологии, который сейчас он носит имя Энгельгарта. С первых дней работы этого института Александр Баев возглавлял исследовательскую группу в лаборатории Энгельгарта. Основной задачей группы стало установление химического состава нуклеиновых кислот и расшифровка последовательности расположения нуклеотидных звеньев путем деления, дробления длинной цепи на ряд более коротких отрезков, доступных химическому анализу. Это были пионерские работы по секвенированию генома – установлению последовательности нуклеотидов в ДНК. Результаты исследований Александра Александровича Баева и его сотрудников в области молекулярной биологии были в 1969 г. отмечены Государственной премией – первой в области молекулярной биологии.

2.4. Открытие кодирования белков ДНК

Несмотря на открытие генов Менделем, к началу XX века не было понятно, каким образом передаются наследственные признаки. Первые сведения о том, как это происходит, были получены Арчибалдом Гарродом (*Archibald Garrod*). Он работал в госпитале Св. Бартоломею в Лондоне и изучал *алкаптонурию*. *Алкаптонурия* – это явление потемнения мочи на воздухе. Было найдено, что это происходит из-за присутствия в моче гомогентизиновой кислоты (2,5-дигидроксифенилуксусной кислоты). Гаррод обнаружил, что родители больных часто были кровными родственниками. Он предположил, что повреждённый ген является рецессивным. Если оба родителя несут повреждённый ген, то гомозиготное спаривание этого гена

приводит к заболеванию ребёнка. Далее Гаррод предположил, что заболевание вызывается отсутствием какого-то фермента, необходимого для нормального метаболизма. Это предполагало, что гены кодируют ферменты, являющиеся одним из широко распространённых типов белков.

Гаррод оказался прав: алкаптонурия вызывалась отсутствием фермента гомогентизат-оксидазы, который катализирует окисление гомогентизиновой кислоты в процессе метаболизма фенилаланина и тирозина. Схема метаболизма (рис. 4).

Георг Бидл (*Georg Beadle*) и **Эдвард Татум** (*Edward Tatum*), исследуя мутации грибов, пришли к выводу, что одному гену соответствует один белок. Они охарактеризовали около 100 генов, мутации которых приводят к нарушению роста грибов, и за эти работы им была присуждена Нобелевская премия 1958 года.

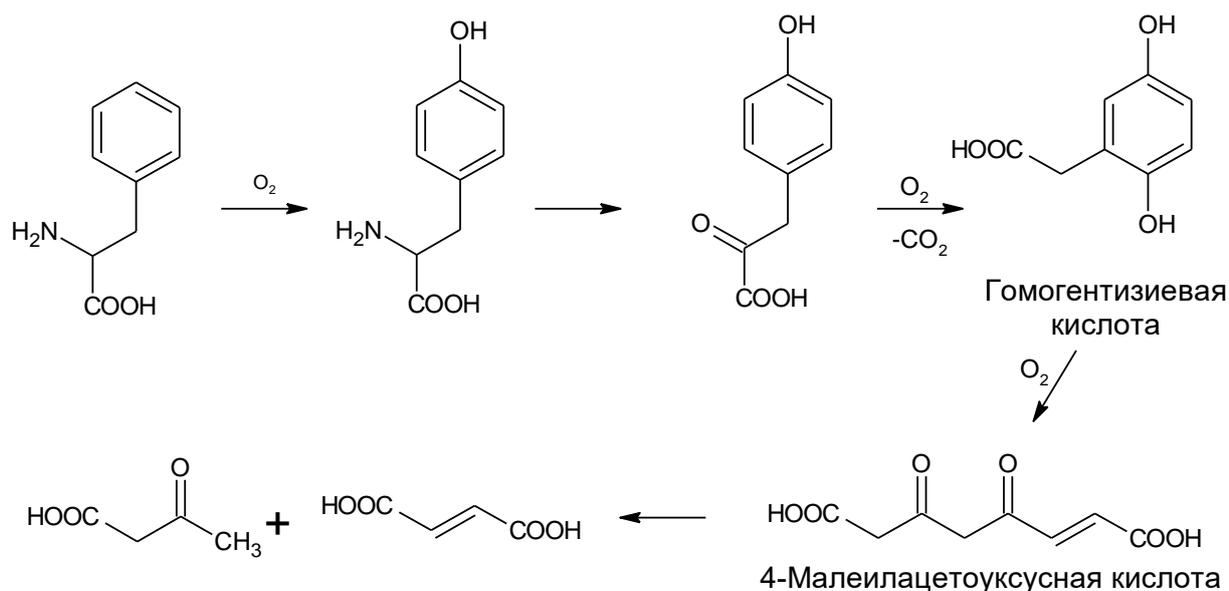


Рис. 4. Метаболизм фенилаланина и тирозина

2.5. Основные открытия

1944 г. *Доказательство генетической роли ДНК.* Освальд Эйвери, Колин Мак-Леод, Маклин Мак-Карти.

1953 г. *Установление структуры ДНК.* Джеймс Уотсон, Френсис Крик.

- 1961 г. *Открытие генетической регуляции синтеза ферментов.* Андре Львов, Франсуа Жакоб, Жак Моно.
- 1962 г. *Расшифровка генетического кода.* Маршалл Нирнберг, Генрих Маттеи, Северо Очоа.
- 1967 г. *Синтез invitro биологически активной ДНК.* Артур Корнберг (неформальный лидер молекулярной биологии).
- 1970 г. *Химический синтез гена.* Гобинд Корана и его группа.
- 1970 г. *Открытие фермента обратной транскриптазы и явления обратной транскрипции.* Говард Темин, Дэвид Балтимор, Ренато Дульбеко.
- 1974 г. *Открытие рестриктаз.* Гамильтон Смит, Даниэль Натанс, Вернер Арбер.
- 1977 г. *Разработка эффективного метода секвенирования ДНК.* Ф. Сангер, А.Р. Коулсон.
- 1978 г. *Открытие сплайсинга.* Филипп Шарп.
- 1982 г. *Открытие автосплайсинга.* Томас Чек.
- 1982 г. Промышленное производство человеческого инсулина с помощью генно-модифицированных бактерий.
- 1988 г. Запатентован метод полимеразной цепной реакции.
- 1990 г. Начат проект «Геном человека».
- 1997 г. Опубликован геном *Escherichia coli*.
- 2003 г. Завершен проект «Геном человека», оценено количество генов у человека – от 20 000 до 25 000.

3. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И БЕЛКИ

Уже было отмечено, что основную массу хромосом составляют белки, а не ДНК. Это наглядно демонстрирует, что не только функционирование нуклеиновых кислот, но и само их существование неразрывно связано с белками. Причём эта связь обоюдна – белки также не могут существовать без нуклеиновых кислот. Поэтому рассмотрим основные представления о строении белков.

Белки, в отличие от нуклеиновых кислот и липидов, являются не сложными эфирами, а амидами. Амидная связь в белковых и пептидных цепочках называется **пептидной**. Необходимо отметить два принципиальных отличия амидной связи от сложноэфирной, которые связаны с наличием неподелённой электронной пары у атома азота. Несмотря на то, что у атома кислорода целых две неподелённые пары, но кислород более электроотрицателен, размеры этих пар меньше, и они не участвуют в каких-либо дополнительных взаимодействиях. Единственная неподелённая пара азота имеет больший размер и эффективно взаимодействует со свободной низколежащей орбиталью соседнего атома углерода.

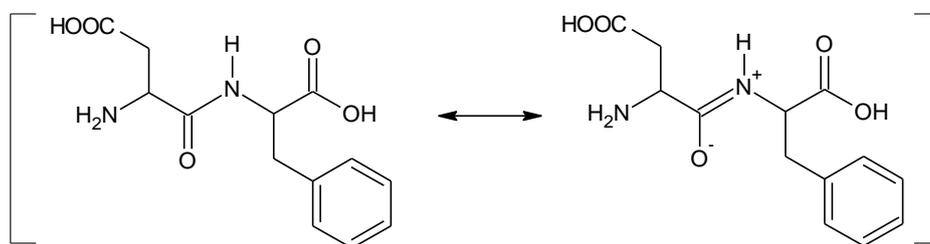


Рис. 5. Аспартилфенилаланин, резонансные структуры:
в правой структуре пептидная связь – двойная

В результате, во-первых, амидная связь оказывается значительно прочнее, чем сложноэфирная, и, во-вторых, амидная связь приобретает частичный двусвязный характер (рис. 5), что делает вращение вокруг этой связи в белках практически невозможным.

Итак, пептидная связь **более прочная**, чем сложноэфирная, и **вращение вокруг неё невозможно**. Белки построены из альфа-аминокислот, в которых присутствует две связи альфа-углеродного атома, вокруг которых возможно свободное вращение. Из стереохимии известно, что для тетраэдрического атома углерода существует три устойчивых, или заторможенных, конформации при вращении вокруг простой связи. У каждой аминокислоты две подобных связи, что даёт 9 возможных конформаций. И мы получаем астрономическое число конформаций белков: 3^{2n} , где n – число аминокислотных остатков в белке. Например, для **нуклеазы** – небольшого белка, состоящего из

124 аминокислотных остатков, количество возможных конформаций оценивается числом 3^{248} . И из всех этих конформаций реализуется единственная, называемая **нативной**. Только в нативной конформации белок становится функциональным, а при нагревании или изменении кислотности происходит **денатурация белка**, обратимая или нет. Единственная природная «рабочая» конформация белка является наиболее термодинамически устойчивой, её формирование называется **фолдингом** [1–3].

В процессе фолдинга формируется вторичная и третичная структура белка. Первичная структура – это последовательность аминокислотных остатков; четвертичная – ассоциация белковых субъединиц. Вторичная структура включает три основных элемента: альфа-спираль, бета-листы и бесструктурные фрагменты. Бесструктурные элементы обеспечивают оптимальную ориентацию альфа-спиралей и бета-листов относительно друг друга при формировании третичной структуры.

Часто третичная структура закрепляется дисульфидными мостиками, образующимися при окислении кислородом тиольных групп цистеина. Схема приведена на рис. 6.

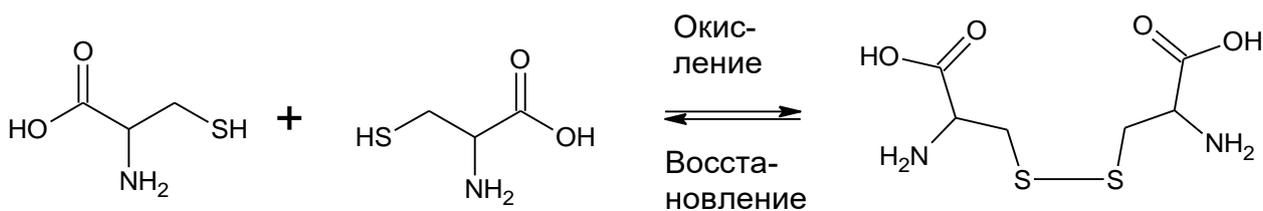


Рис. 6. Окислительно-восстановительные превращения цистеина

Практически все белки состоят из 20 аминокислот, которые для краткости обозначают тремя или одной буквой (табл. 1). Аминокислоты относятся к *L*-ряду, имеют одинаковую конфигурацию асимметрического атома, которая обозначается дескриптором *S* по номенклатуре IUPAC, за исключением *L*-цистеина (*R*-энантиомер).

**Названия аминокислот, аминокислотных радикалов
в пептидах и белках**

Структура, трёх- и однобуквенное обозначение	Название: русское английское	Структура, трёх- и однобуквенное обозначение	Название: русское английское
 Ala A	Аланин Alanine	 Leu L	Лейцин Leucine
 Arg R	Аргинин Arginine	 Lys K	Лизин Lysine
 Asn N	Аспарагин Arginine	 Met M	Метионин Methionine
 Asp D	Аспараги- новая кислота Aspartic Acid	 Phe F	Фенилала- нин Phenylala- nine
 Cys C	Цистеин Cysteine	 Pro P	Пролин Proline
 Gln Q	Глутамин Glutamine	 Ser S	Серин Serine
 Glu E	Глутами- новая кислота Glutamic Acid	 Thr T	Треонин Threonine
 Gly G	Глицин Glycine	 Trp W	Триптофан Tryptophan

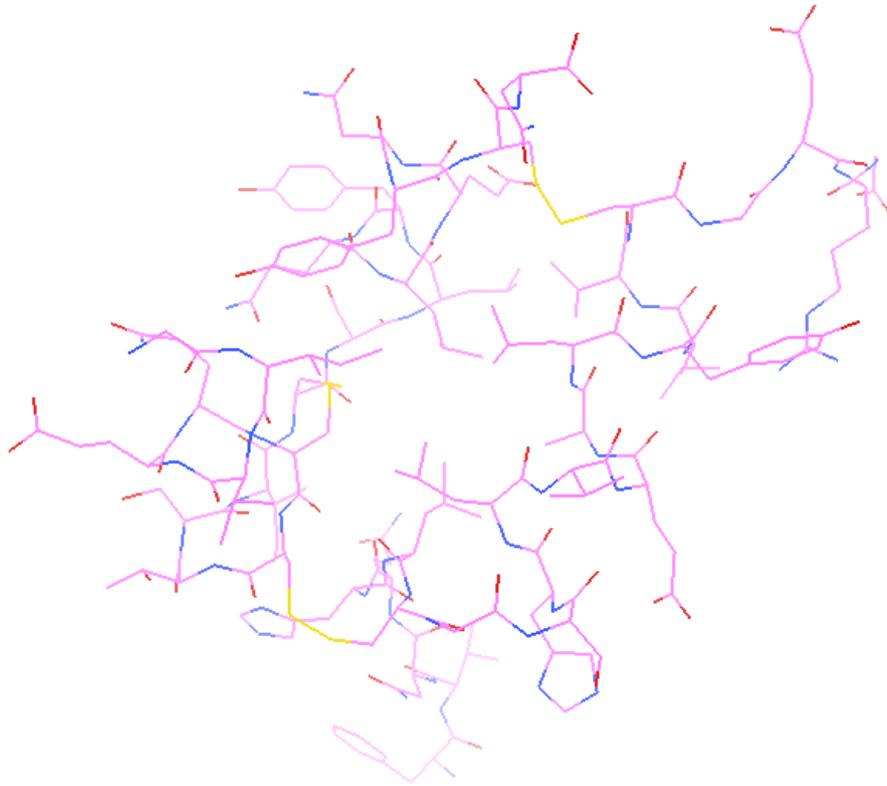


Рис. 8. Пространственная структура молекулы инсулина

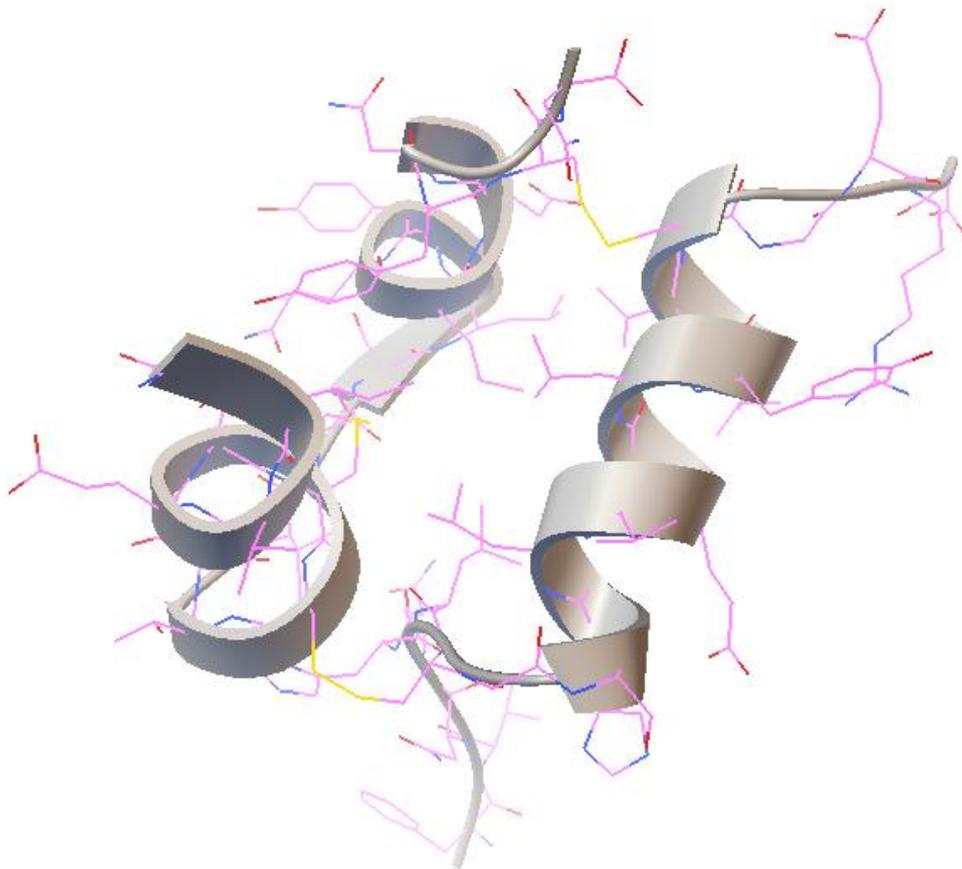


Рис. 9. Вторичная и третичная структура молекулы инсулина

4. ТРАНСЛЯЦИЯ: ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД И СИНТЕЗ БЕЛКА

4.1. Генетический код

Единица информации в кодирующей цепочке ДНК – это три последовательных нуклеотида, или *триплет* нуклеотидов. Четыре разных нуклеотида, А, Т/У, Г и Ц, могут образовать $4^3 = 64$ разных триплетов, чего более чем достаточно для кодирования 20 аминокислот [1–4]. Дублетов для этого не достаточно – их всего 16. Из 64 триплетов 61 кодируют аминокислоты, и их называют *кодонами*, а 3 – нет, и они являются «бессмысленными». Эти три триплета называются *стоп-кодонами*.

Характеристики генетического кода.

1. Код *триплетный*.

2. Код *вырожден* – каждая аминокислота кодируется несколькими триплетами.

3. Код *специфичен* – каждому триплету соответствует одна, и только одна аминокислота.

4. Код *коллинеарен* – последовательность триплетов в экзонах гена совпадает с последовательностью аминокислот в пептидной цепи белка, т. е. линейная последовательность триплетов кодирующей цепи кодирует линейную последовательность аминокислот в первичной структуре белка, в направлении от аминного конца к карбоксильному.

5. Код *непрерывен* (без «запятых») и *не перекрывается* – триплеты следуют один за другим без промежуточных нуклеотидов, и каждый нуклеотид входит только в один триплет.

6. Код *универсален* – у всех видов организмов смысл каждого триплета один и тот же (небольшие отличия присутствуют в коде ДНК митохондрий.)

Кодоны **мРНК** соответствуют триплетам кодирующей цепи ДНК, и именно триплеты мРНК указывают в кодирующей таблице (табл. 2).

Генетический код

Первое основа- ние	Второе основание				Третье основа- ние
	У	Ц	А	Г	
У	УУ Phe	УЦ	УА Tyr	УГ Cys	У Ц А Г
	У Phe	У	У Tyr	У Cys	
	УУ Leu	УЦ	УА <i>Stop</i>	УГ <i>Stop</i>	
	Ц Leu	Ц } Ser	Ц <i>Stop</i>	Ц Trp	
	УУ	УЦ	УА	УГ	
	А	А	А	А	
	УУ	УЦ	УА	УГ	
	Г	Г	Г	Г	
Ц	ЦУ	ЦЦ	ЦА His	ЦГ	У Ц А Г
	У	У	У His	У	
	ЦУ } Leu	ЦЦ } Pro	ЦА Gln	ЦГ } Arg	
	Ц	Ц	Ц Gln	Ц	
	ЦУ	ЦЦ	ЦА	ЦГ	
	А	А	А	А	
	ЦУ	ЦЦ	ЦА	ЦГ	
	Г	Г	Г	Г	
А	АУ Ile	АЦ	АА Asn	АГ Ser	У Ц А Г
	У Ile	У	У Asn	У Ser	
	АУ Ile	АЦ	АА Lys	АГ Arg	
	Ц Met/ <i>Star</i>	Ц } Thr	Ц Lys	Ц Arg	
	АУ <i>rt</i>	АЦ	АА	АГ	
	А	А	А	А	
	АУ	АЦ	АА	АГ	
	Г	Г	Г	Г	
Г	ГУ	ГЦ	ГА Asp	ГГ	У Ц А Г
	У	У	У Asp	У	
	ГУ } Val	ГЦ } Ala	ГА Glu	ГГ } Gly	
	Ц	Ц	Ц Glu	Ц	
	ГУ	ГЦ	ГА	ГГ	
	А	А	А	А	
	ГУ	ГЦ	ГА	ГГ	
	Г	Г	Г	Г	

Из табл. 2 видно, что код действительно вырожден: за исключением **метионина** и **триптофана**, каждая аминокислота кодируется несколькими кодонами. При этом большинство вырожденных кодонов различается только **последним** (третьим) **нуклеотидом**. Различия по второму или первому нуклеотиду наблюдаются тогда, когда аминокислота кодируется более чем четырьмя кодонами, при этом вариации по четвёртому нуклеотиду исчерпаны. У сходных по строению аминокислот кодоны также похожи: совпадают по двум или по одному центральному нуклеотиду (Asp и Gly, Asp и Asn). Возможно, на первых этапах эволюции белки строились из меньшего числа аминокислот, которые кодировались двумя нуклеотидами, но код при этом был триплетным. Триплетность кода, вероятно, связана с размерами активных центров ферментов, катализирующих трансляцию.

Три триплета (УАА, УАГ, УГА) не кодируют никакую аминокислоту и называются **стоп-кодонами**, так как останавливают синтез белка на рибосоме. Триплет, кодирующий метионин (АУГ), всегда начинает синтез белка (**старт-кодон**).

Для «универсальности» кода существуют некоторые исключения. В митохондриях некоторые триплеты имеют отличное от «универсального» значение:

- 1) кодон УГА кодирует триптофан, а не является стоп-кодоном;
- 2) кодоны АГА и АГГ являются стоп-кодонами, а не кодируют аргинин;
- 3) триплеты АУА и АУУ кодируют метионин вместо изолейцина.

4.2. Синтез белка на рибосоме

Связывание аминокислот с тРНК. В синтезе белков (трансляция) участвуют не свободные аминокислоты, а аминокислоты, связанные с тРНК – **аминоацил-тРНК (aa-тРНК** – ацилированные аминокислотами транспортные РНК). При этом аминокислота связана сложноэфирной связью с 3'-гидроксильной группой аденозина, находящегося на 3'-конце молекулы тРНК – в акцепторной ветви.

При образовании аминоксил-тРНК решаются две задачи:

- активация аминокислоты, так как образующийся сложный эфир быстрее реагирует с аминами, чем свободная кислота;
- сопряжение аминокислоты с её антикодоном – самая важная задача.

Никакого соответствия между строением аминокислоты и структурой соответствующей тРНК не наблюдается. Правильное сочетание аминокислоты со «своей» тРНК происходит под действием специфического фермента – **аминоацил-тРНК-синтетазы**. Этот фермент имеет два центра узнавания – для аминокислоты и для тРНК. Кроме того, в процессе реакции расходуется энергия одной молекулы АТФ: сначала АТФ реагирует с аминокислотой, а затем аминокислота переносится на акцепторную ветвь тРНК (рис. 10).

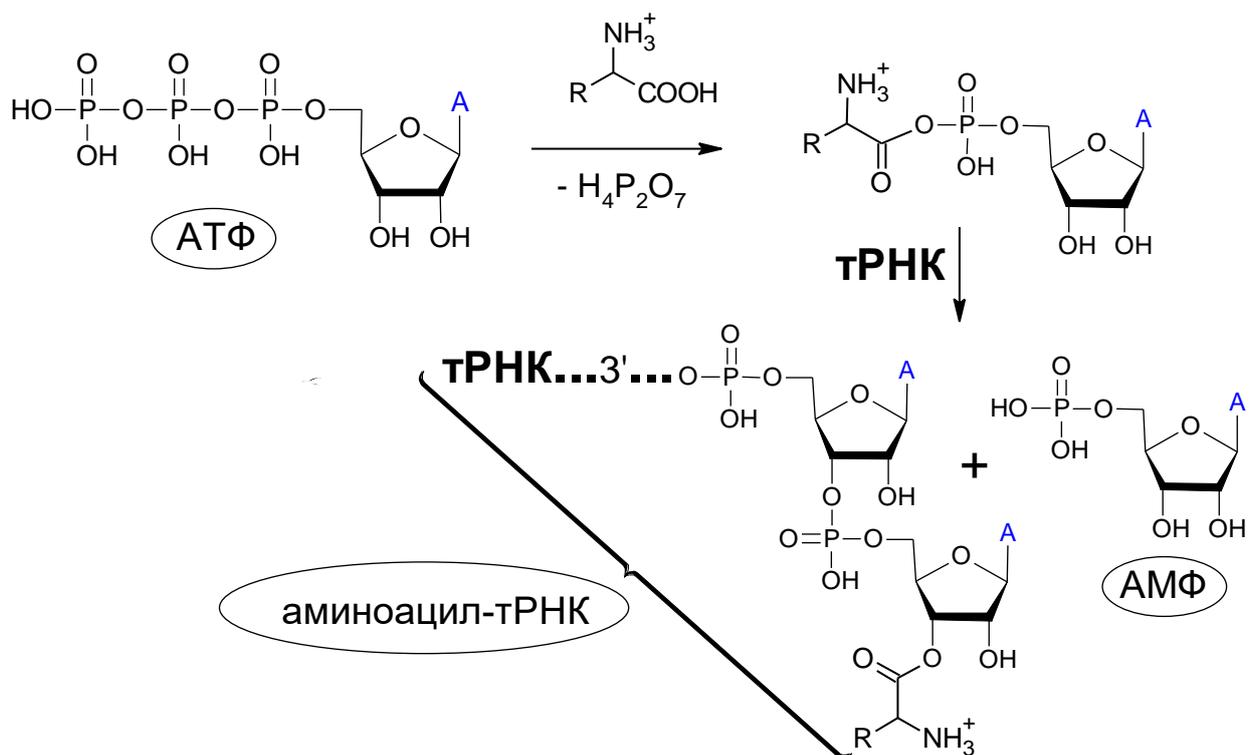


Рис. 10. Схема образования аа-тРНК

Обе эти реакции осуществляются в активном центре аминоксил-тРНК-синтетазы. При этом каждая молекулы тРНК используется многократно: освободившись от аминокислоты на рибосоме, тРНК готова вновь присоединить следующую молекулу той же аминокис-

лоты. Аминокислоты также в принципе могут использоваться многократно после гидролиза белков.

Структура рибосомы. Рибосома состоит из двух субъединиц – малой (40S) и большой (60S); у бактерий, митохондрий и пластид – соответственно 30S и 50S. Рибосома образуется во время начальной стадии трансляции путём объединения большой и малой субъединиц с мРНК. Эта сборка происходит упорядоченным способом, что определяется строением активных центров рибосом. Поэтому сначала необходимо рассмотреть *активные центры рибосом*. Во-первых, активные центры рибосом расположены на контактирующих поверхностях обеих субъединиц. Эта поверхность содержит полости, в которых располагаются участники процесса трансляции: мРНК, пептидил-тРНК и очередная аминоацил-тРНК (aa-тРНК). В полостях находятся центры связывания участников трансляции и центры, катализирующие образование пептидных связей и перемещение рибосомы вдоль мРНК.

Рибосома содержит около 80 макромолекул и фактически является суперферментом, который:

- 1) правильно ориентирует участников процесса трансляции друг относительно друга;
- 2) катализирует реакции между ними.

В качестве упрощения структуры будем рассматривать проекции контактных поверхностей на плоскость, расположенную между субъединицами рибосомы. В этой плоскости располагаются следующие центры (рис. 11, 12):

- 1) центр связывания мРНК, или **М-центр**. Он образован участком 18S рРНК, который комплементарен на протяжении 5–9 нуклеотидов 5'-нетранслируемому участку мРНК;

- 2) пептидильный центр, или **П-центр**. В начале трансляции с ним связывается **инициирующая aa-тРНК**. У эукариот иницирующий кодон всегда кодирует метионин, поэтому иницирующей aa-тРНК является одна из двух видов метиониновых aa-тРНК – Met-тРНК^{Met}_{*i*} (индекс *i* – иницирующая). На следующих стадиях трансляции

в этом центре располагается пептидил-тРНК, содержащая синтезированную часть пептидной цепи;

3) аминокислотный центр, или **А-центр**, – место связывания очередной аа-тРНК;

4) пептидилтрансферазный центр, или **ПТФ-центр**, который катализирует перенос пептидила из пептидил-тРНК на поступившую в А-центр очередную аа-тРНК. В результате этого образуется новая пептидная связь, и пептидная цепочка удлиняется на один аминокислотный остаток.

И в А-центре, и в П-центре антикодоновые петли тРНК обращены в сторону М-центра, что приводит к комплементарному взаимодействию с мРНК. Акцепторные петли этих тРНК обращены в сторону ПТФ-центра, при этом одна акцепторная петля связана с С-концом пептида, а другая – с аминокислотой.

Все четыре активных центра располагаются между малой и большой субъединицами.

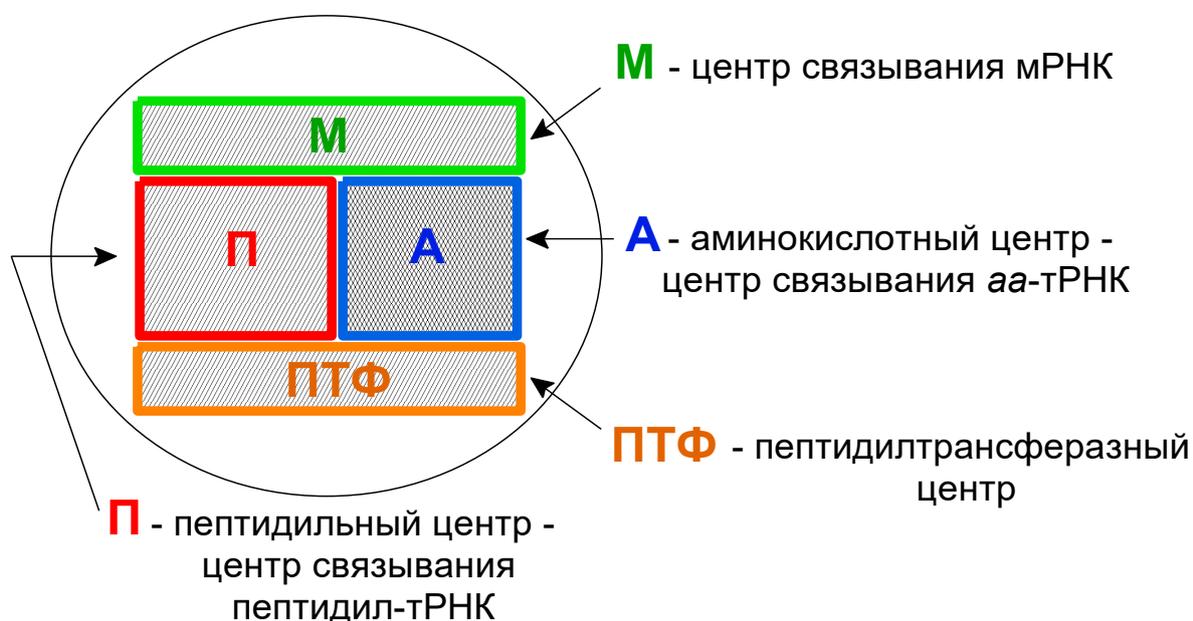


Рис. 11. Каталитические центры рибосомы: проекция функциональных центров рибосомы на плоскость между субъединицами

Малая субъединица содержит 18S-рРНК, с участком которой связывается мРНК, и М-центр расположен на этой субъединице. Кроме того, здесь же находится основная часть А-центра и небольшая часть П-центра.

Большой субъединице принадлежит весь ПТФ-центр. Кроме того, на ней располагается основная часть П-центра и небольшая часть А-центра, а именно участок связывания акцепторной петли тРНК с аминокислотным остатком.

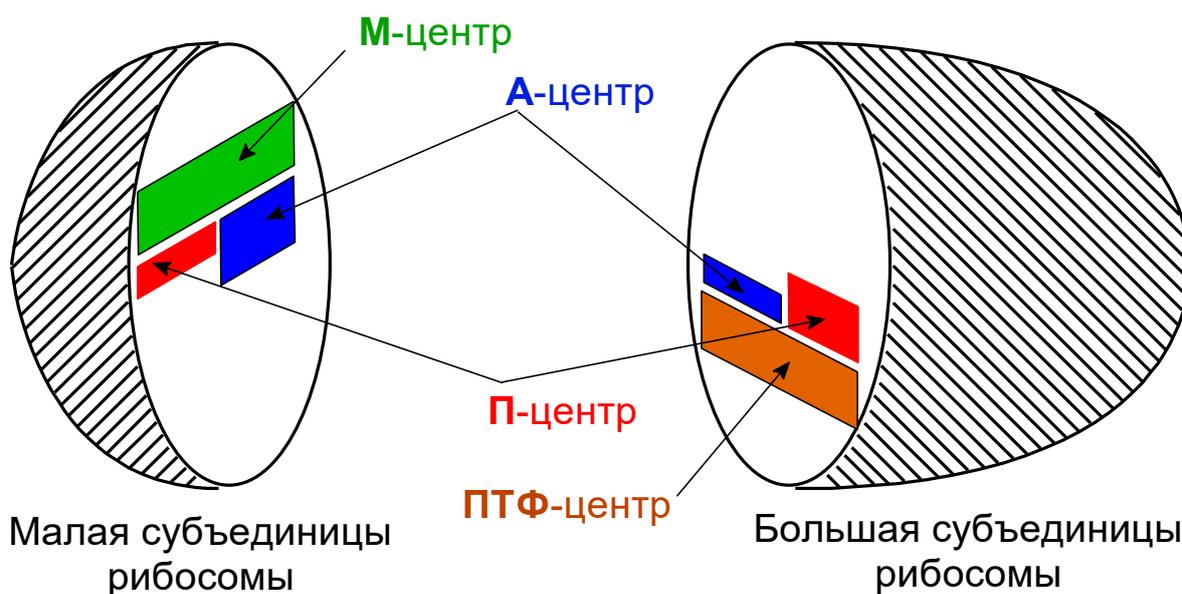


Рис. 12. Распределение функциональных центров рибосомы между субъединицами

4.3. Этапы трансляции

1. Инициация трансляции. При инициации трансляции мРНК с помощью своего 5'-нетранслируемого конца связывается с малой (40S) субъединицей рибосомы. При этом иницирующий кодон (АУГ) оказывается на уровне П-центра будущей рибосомы. Далее с этим кодоном связывается иницирующая аа-тРНК – $Met-tRNA_i^{Met}$. Далее иницирующая аа-тРНК взаимодействует с П-центром большой субъединицы, и в результате происходит сборка рибосомы. При этом рибосома образуется только в комплексе с мРНК и иницирующей

щей aa-тРНК. Кроме того, для сборки рибосомы необходимы и другие молекулы – ГТФ и три белковых фактора – **eIF-1**, **eIF-2** и **eIF-3** (**eucariotic Initiation Factor**).

Фактор eIF-3 присоединяется к свободной малой субъединице, препятствуя преждевременному связыванию с большой субъединицей. Одновременно он способствует связыванию с мРНК.

Фактор eIF-2 способствует связыванию с aa-тРНК, образуя с ней комплекс, в состав которого входит и ГТФ. Последний гидролизуется до ГДФ при размещении *Met*-тРНК^{Met} в П-центре. После этого факторы eIF-3 и eIF-2 покидают рибосому. Фактор eIF-1, вероятно, способствует взаимодействию фактора eIF-2 с иницирующей aa-тРНК. В итоге, в П-центре собранной рибосомы оказывается иницирующий кодон (АУГ), связанный с иницирующей aa-тРНК (*Met*-тРНК^{Met}), которая играет роль пептидил-тРНК при образовании первой пептидной связи.

2. Элонгация трансляции – наращивание пептидной цепочки. При присоединении очередной аминокислоты происходит один и тот же цикл событий (рис. 13):

1) **связывание aa-тРНК со свободным А-центром**. В этом процессе участвуют два фактора элонгации (**EF-1u** и **EF-1s**) и расходуются одна молекула ГТФ. Фактор EF-1u образует комплекс с ГТФ и aa-тРНК, который проникает в рибосому. Если антикодон aa-тРНК этого комплекса не комплементарен кодону мРНК, расположенному в А-центре, то комплекс не задерживается и покидает рибосому. В случае комплементарного взаимодействия антикодона с кодоном, комплекс распадается. При этом гидролизуется ГТФ до ГДФ, и ГДФ вместе с EF-1u покидает рибосому.

Затем фактор EF-1u, при участии фактора EF-1s, обменивает ГДФ на ГТФ и связывается с новой aa-тРНК;

2) **образование пептидной связи.** Пептидил-тРНК (в П-центре) и aa-тРНК (в А-центре) располагаются так, что их акцепторные ветви вместе с пептидной цепочкой и активированной аминокислотой оказываются в ПТФ-центре. Этот центр катализирует **пептидилтрансферазную реакцию** – перенос пептидила с её тРНК на аминокислотную группу задержавшейся в А-центре aa-тРНК. При этом пептидная цепочка растёт от N-конца к С-концу. ПТФ-реакция идёт с небольшим выделением энергии, и дополнительного источника в виде АТФ ли ГТФ не нужно.

В результате ПТФ-реакции, пептидил переносится на новую аминокислоту, связанную с другой тРНК. Её антикодоновая петля находится в области А-центра рибосомы, а акцепторная ветвь – в П-центре. Это, вероятно, создаёт стерические затруднения, так как рядом в П-центре ещё находится тРНК, с которой был связан пептидил. «Хвост» этой тРНК уже начинает смещаться в сторону выхода из П-центра;

3) **транслокация** – завершающая стадия цикла, в процессе которой происходит перемещение мРНК и вновь образованной пептидил-тРНК на один кодон относительно рибосомы. Или, другими словами, рибосома перемещается на один кодон в сторону 3'-конца мРНК. Движущей силой перемещения является, вероятно, стерическое напряжение в структуре новой пептидил-тРНК. Пептидил, зафиксированный в П-центре, втягивает сюда и новую тРНК. Последняя связана с кодоном мРНК, и в результате рибосома смещается на один кодон.

В этом процессе участвуют ГТФ и белковый фактор элонгации EF-2, который называется также **транслоказой**. В результате транслокации в П-центре оказывается новая тРНК с пептидильным «хвостом», а освободившаяся тРНК вытесняется из рибосомы. А-центр оказывается пустым и готовым к приёму новой aa-тРНК, антикодон которой должен быть комплементарен новому кодону мРНК, появившемуся в А-центре.

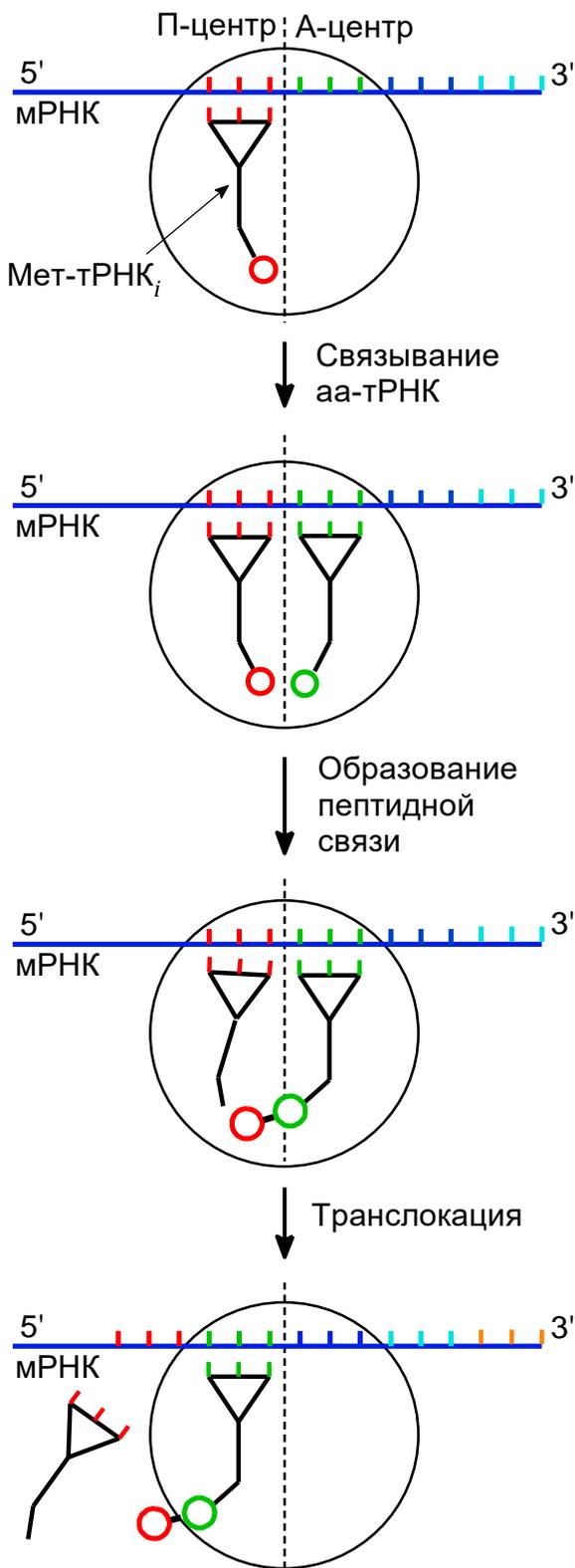


Рис. 13. Этапы синтеза белка на рибосоме

3. Терминация трансляции.

Сигналом окончания трансляции служит появление в А-центре одного из нетранслируемых триплетов мРНК – УАА, УАГ или УГА.

Этот триплет узнаётся не антикодомом аа-тРНК, а **белковыми факторами терминации eRF** (eucariotic **R**eleasing **F**actor) (рис. 14).

Известно два подобных фактора – один узнаёт последовательность **УАПур** (т. е. **УАА** и **УАГ**), а другой – последовательность **УПурА** (т. е. **УАА** и **УГА**). Узнав свой кодон, фактор eRF стимулирует гидролитическую активность пептидилтрансферазного центра. В ПТФ-центре происходит гидролиз связи пептидила с тРНК, для чего не требуется ни дополнительного фермента, ни энергии ГТФ или АТФ. В результате пептидная цепочка, тРНК и мРНК диссоциируют от рибосомы, и обе её субъединицы разъединяются и становятся готовы к новому процессу трансляции.

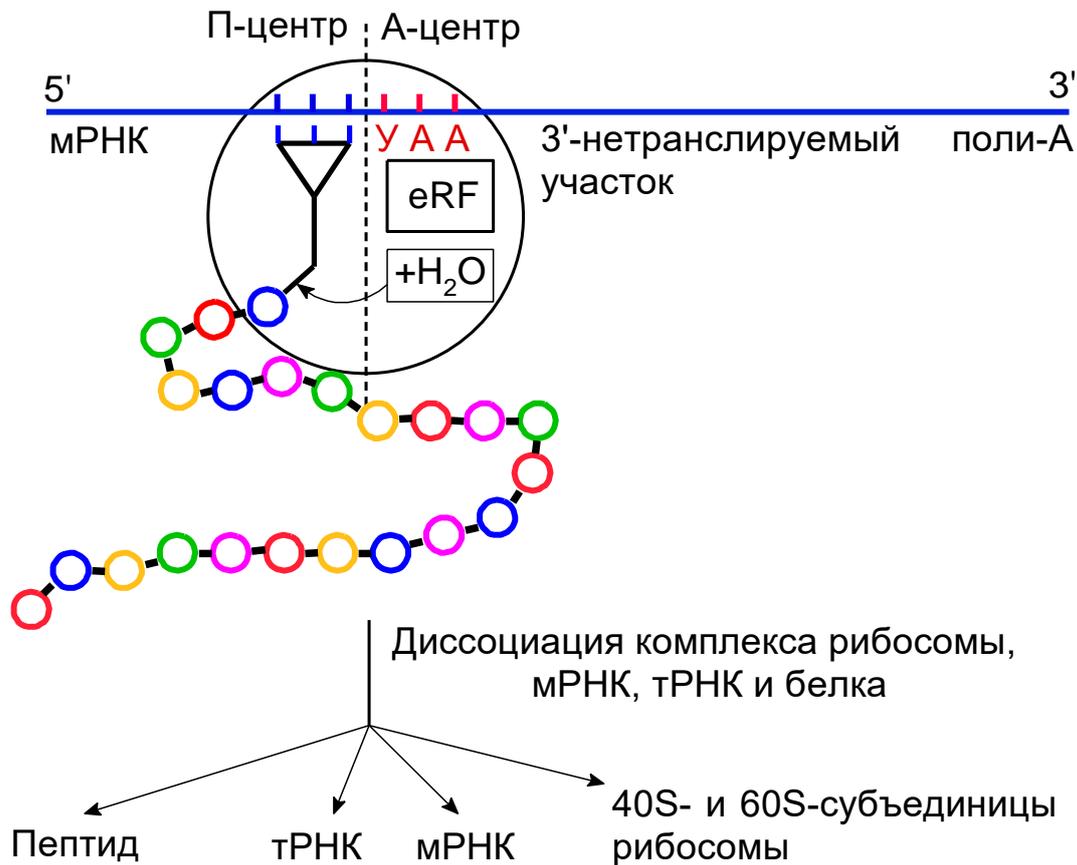


Рис. 14. Терминация трансляции

Полисомы (или **полирибосома**) образуются при синтезе белка сразу несколькими рибосомами на одной молекуле мРНК. Как только очередная рибосома продвинулась в сторону 3'-конца на несколько десятков нуклеотидов, с 5'-концом связывается следующая рибосома. В результате молекула мРНК выглядит как нить с бусами-рибосомами. Расстояние между рибосомами составляет несколько десятков нуклеотидов, скорость продвижения у эукариот – 2–15 нуклеотидов / с, у прокариот – 30–50 нуклеотидов / с. Таким образом, полисома содержит до 10 рибосом.

При смещении на три нуклеотида пептидная цепочка наращивается на один аминокислотный остаток. Это даёт скорость синтеза белка 1–2 аминокислотных остатка в секунду у эукариот и 10–15 – у прокариот. Время синтеза одной молекулы белка у эукариот составляет от 1 до нескольких минут, у прокариот – на порядок меньше.

5. ТРАНСКРИПЦИЯ: СИНТЕЗ мРНК

5.1. Локализация генов в хромосомах

Участки ДНК, в которых записана информация о белках и РНК, называются *генами* и *цистронами*. Ген – участок ДНК, кодирующий один белок. Цистрон – участок ДНК, кодирующий одну полипептидную цепочку. При этом одна полипептидная цепочка часто не эквивалентна одному белку.

Если белок состоит из нескольких субъединиц (цепей), то ген включает несколько цистронов. Обычно у бактерий цистроны следуют один за другим в цепочке ДНК. В отличие от бактерий, гены эукариот содержат не только кодирующие участки – *экзоны*, но и некодирующие – *интроны*. Эти участки перемежаются друг с другом, что придаёт гену разорванную структуру (рис. 15). Кроме того, экзоны одного и того же гена могут располагаться в разных частях хромосомы и даже в разных хромосомах. Они могут также перемещаться в пределах хромосомы. Интроны и экзоны имеются только в генах эукариот.

Кроме белков, гены кодируют четыре вида рРНК и несколько десятков видов тРНК. При этом гены трёх (из четырёх) рРНК объединены в кластер, который считывается в виде одного цистрона, который может иметь до 200 копий на диплоидный набор хромосом. Гены других РНК также имеют множество повторов.

Кодирующая и матричная цепи. Две цепочки ДНК принципиально отличаются по своим функциям: одна является *кодирующей*, а другая – *матричной*, и по этой матрице синтезируются мРНК в процессе *транскрипции*. Но в результате транскрипции синтезируется не сама мРНК, а её предшественник – *пре-мРНК*. Эта *пре-мРНК* далее модифицируется, и этот процесс называется *созреванием* или *процессингом*. Одним из преобразований при созревании является *сплайсинг* – вырезание из пре-мРНК интронов и сшивание экзонов в единую цепь [1, 2].

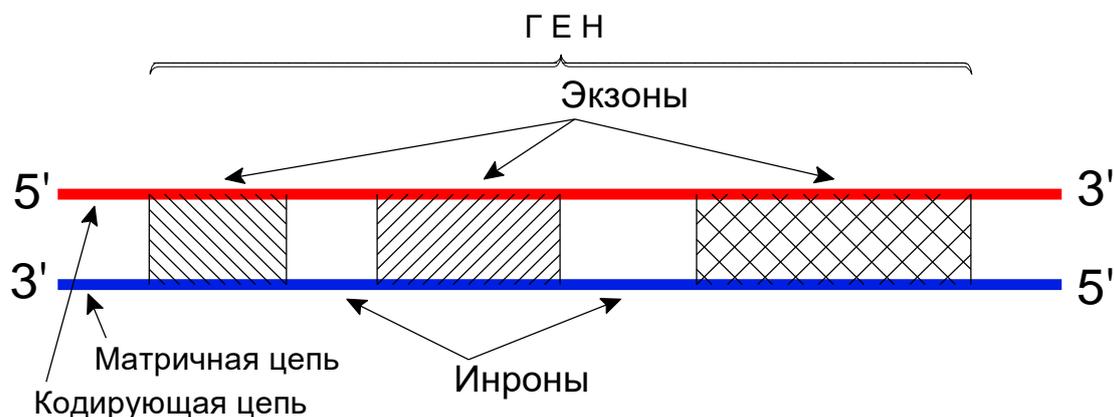


Рис. 15. Структура гена

Последовательность нуклеотидов в мРНК совпадает с таковой в кодирующей цепи ДНК (с учётом замены Т на У), т. е. с помощью матричной цепи ДНК в мРНК воспроизводится генетическая информация кодирующей (смысловой) цепи. Ген принято изображать так, чтобы кодирующая цепь находилась **сверху**, а её 5'-конец был **слева** (рис. 16).

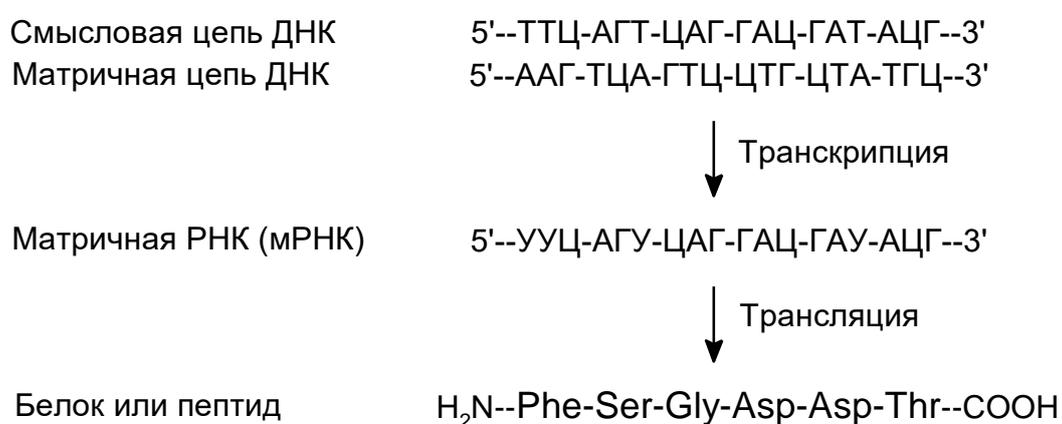


Рис. 16. Экспрессия генетической информации

5'-конец кодирующей (смысловой) цепи принято считать **началом гена**, так как синтез РНК происходит при движении от 3'-к 5'-концу матричной цепи в ходе **транскрипции**. При этом считывание информации и синтез РНК происходит от 5'- к 3'-концу (слева направо). В этом же направлении идёт и **трансляция** – синтез белка на рибосоме по матрице мРНК.

На одной цепочке ДНК находится несколько тысяч генов, и, как правило, кодирующей для них является одна и та же цепочка ДНК. Если разные гены кодируются разными цепями, то они и считываются в противоположных направлениях. Например, у дрозофилы гены двух гистонов записаны на одной цепи, а трёх остальных – на другой; и направления прочтения их противоположны.

Пре-мРНК созревает в ядре, и после этого она в комплексе с белками транспортируется в цитоплазму. Здесь происходит заключительный этап экспрессии гена – синтез белка на рибосоме по матрице мРНК, или **трансляция** генетической информации. В этом процессе участвуют тРНК, и его суть заключается в определении очередности, с которой аминокислоты включаются в пептидную цепь. Участие тРНК заключается в образовании активированного комплекса с аминокислотами – аминоацил-транспортных РНК (**aa-тРНК**). Рибосомы – это просто молекулярные машины, обеспечивающие правильное взаимодействие участников процесса трансляции (катализаторы, но очень непростые).

5.2. Спейсерные отделы ДНК

Кроме генов и теломер, ДНК содержит обширные участки, которые ничего не кодируют. Функции этих участков у эукариот пока не известны. У прокариот некодирующие участки имеют существенно меньшие размеры. Небольшие некодирующие участки между генами называются **спейсерами**. Они имеются как у эукариот, так и у прокариот. Спейсеры содержат специальные участки (локусы), регулирующие считывание генетической информации.

Локусы связывания РНК-полимеразы называются **промоторами**. Они либо вплотную прилегают к началу гена, либо отделены от него какими-либо другими локусами (**аттенюатор**, рис. 17). Характерный компонент промоторов кишечной палочки – **бокс Прибнова**, находящийся за 15 нуклеотидных пар (5 триплетов) от стартовой точки транскрипции:

(5')---ТАТААТ---(3')

(3')---АТАТТА---(5')

У эукариот промотор может включать несколько участков ДНК, расположенных далеко друг от друга в первичной структуре. Это вызвано тем, что связывание РНК-полимеразы с ДНК происходит, только если РНК-полимераза образует комплексы с белками – *общими факторами транскрипции* (см. рис. 17). Последние также связываются с отдельными участками ДНК. У эукариот промотор содержит аналог бокса Прибнова – **ТАТА-бокс**.

Участки связывания регуляторов у бактерий располагаются после промоторов и называются *операторами*. С оператором связывается белок-**репрессор**, который блокирует движение РНК-полимеразы в сторону гена.

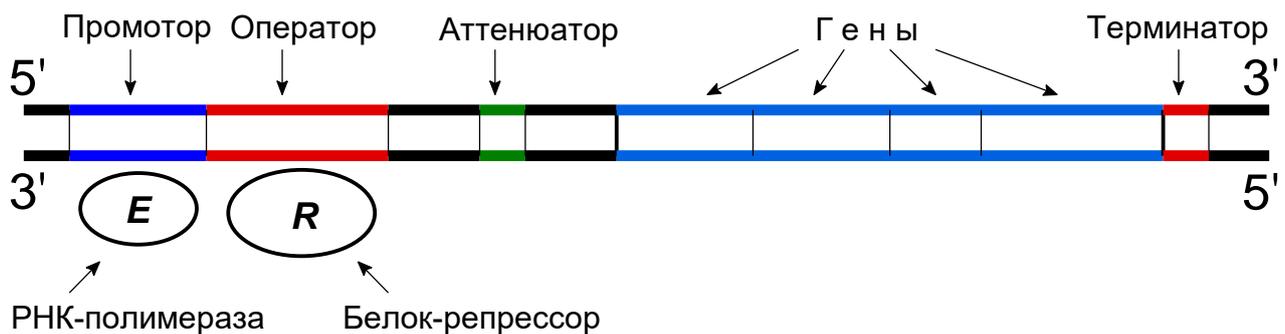


Рис. 17. Регуляторный отдел ДНК прокариот

У эукариот прочтение генов регулируют не только белки-репрессоры, но и белки-активаторы – *общие факторы транскрипции* и *транскрипционные факторы*. Транскрипционные факторы (ТФ1-3) связываются с локусами ДНК, называемыми *энхансерами* (рис. 18).

Энхансеры могут располагаться далеко в первичной структуре от регулируемого гена, но в пространстве они оказываются рядом, что аналогично образованию активных центров ферментов. В состав транскрипционных комплексов могут входить белки-репрессоры (белки-**супрессоры**), понижающие их активность.

В ДНК содержатся также короткие участки (локусы), сигнализирующие об окончании транскрипции. У бактерий подобные локусы могут находиться перед группой совместно регулируемых генов, и называются **аттенюаторами**. Если они располагаются после группы генов, то называются **терминаторами**. Если транскрипция заканчивается на аттенюаторе, то ген не считывается, если на терминаторе, то считывается. В отличие от бактерий, у эукариот терминаторные участки транскрибируются РНК-полимеразой, которая только после этого прекращает свою работу.

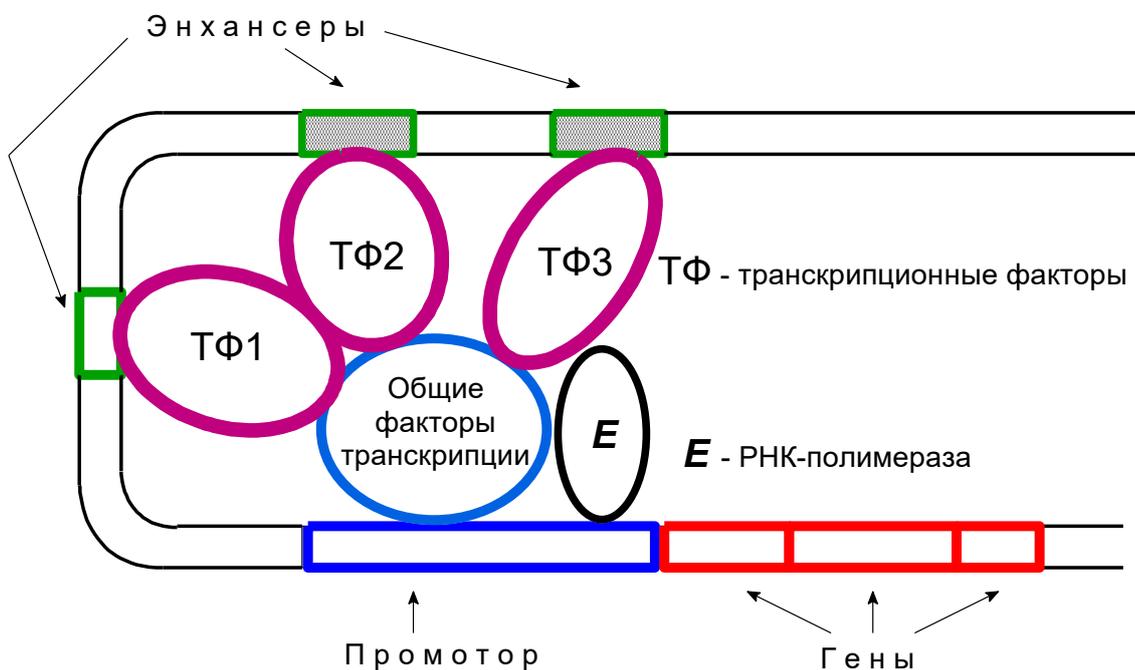


Рис. 18. Регуляторный отдел ДНК эукариот

5.3. Транскрипционные факторы

Транскрипционные факторы – это один из видов белков, участвующих в регуляции работы генов. Транскрипционный фактор может выполнять функции репрессора и наоборот. Кроме того, активность регуляторных белков может зависеть от их взаимодействия друг с другом или с прочими веществами. В конечном итоге, регуляторное действие на гены оказывается очень сложным и определяется многими факторами. В регуляторные цепочки вовлечены не только белки, непосредственно взаимодействующие с ДНК, но и белки-рецепторы

(внутри- и внеклеточные), внеклеточные сигнальные вещества – гормоны, внутриклеточные сигнальные вещества – медиаторы.

5.3.1. Типы структур белков, связывающихся с ДНК

Рассмотрим четыре типа структур белков, связывающихся с ДНК.

1. Белки, содержащие мотив «*спираль – поворот – спираль*», – две альфа-спирали, соединённые петлёй. Одна из этих спиралей связывается с участком ДНК, имеющим определённую нуклеотидную последовательность. В белке две одинаковых субъединицы, и он связывается с **палиндромной последовательностью** (с учётом полярности цепей, рис. 19). Подобное строение имеют белки-репрессоры бактерий.



Рис. 19. Белок, связанный с палиндромной последовательностью ДНК

2. Белки, содержащие *гомеодомены*, – это белки, ответственные за эмбриональное развитие, кодируемые гомейотическими генами. Они включают одни гены и выключают другие в период эмбрионального развития. У них содержатся однотипные домены, гомеодомены, – фрагменты с относительно самостоятельной пространственной структурой. В состав гомеодомена входит примерно 60 аминокислотных остатков, и он образует мотив «*спираль – поворот – спираль*», который взаимодействует с определённой нуклеотидной последовательностью ДНК. Гомеодомены одного семейства белков очень похожи друг на друга, и, вероятно, они произошли от белков-репрессоров прокариот.

3. Белки, содержащие «**цинковые пальцы**». Эти белки имеют пальцеобразные структуры, стабилизированные ионами цинка (рис. 20).

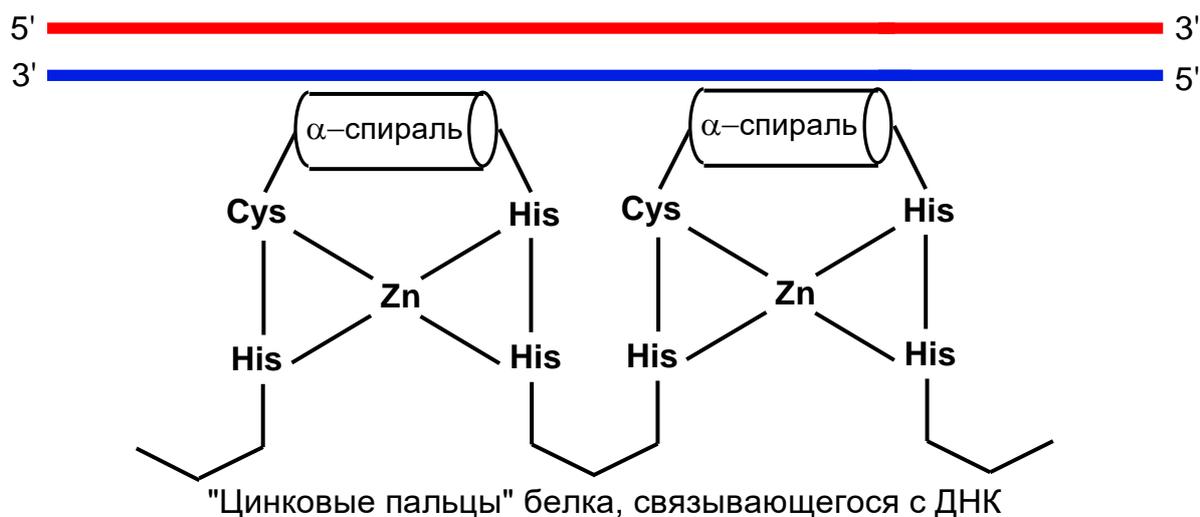


Рис. 20. Цинковые «пальцы»

Каждый ион образует четыре связи – две с остатками цистеина и две – с остатками гистидина. На внешней поверхности «пальца» находится альфа-спираль, специфически взаимодействующая с определённым участком ДНК. У одного белка может содержаться до нескольких десятков «пальцев». К данному классу относятся, например, внутриклеточные белки-рецепторы стероидных гормонов.

4. Белки, содержащие **лейциновую «застёжку»** (рис. 21). Эти белки состоят из двух субъединиц, содержащих богатые лейцином участки. Субъединицы объединены в пары за счёт гидрофобных взаимодействий данных участков. В участках связывания с ДНК белок обогащён остатками основных аминокислот – лизина и аргенина.



Этот белок, вероятно, распознаёт определённую пространственную структуру участка ДНК и связывается с ним. К данному типу белков относятся многие транскрипционные факторы эукариот и белки-

репрессоры бактерий. Чем тоньше регуляция, тем большее значение имеет пространственная структура регулируемого участка хромосомы.

5.3.2. Общие факторы транскрипции

Транскрипционные факторы необходимы для связывания РНК-полимеразы с ДНК. При этом транскрипционные факторы также связываются с ДНК. Связывание происходит с определённой нуклеотидной последовательностью промотора. Наиболее часто (в 80 % промоторов эукариот) такой последовательностью является **ТАТА-бокс**, реже – ГЦ и ЦААТ-боксы; чередование ТАТА-боксов и ГЦ-боксов может варьироваться.

Сначала с ТАТА-боксом связывается **ТВР-белок** (TATA-binding protein). Это инициирует присоединение восьми и более **ТАФ-белков** (TBP-Associated Factors). Белки ТВР и ТАФ называют **общими факторами транскрипции**. Они присутствуют во всех клетках и необходимы для транскрипции большинства генов. Комплекс белков ТВР и ТАФ обозначают **TFIID** (Transcriptional Factor D for polymerase II, рис. 22), а комплекс белков ТВР, ТАФ и РНК-полимеразы II называется **основным инициаторным комплексом**.

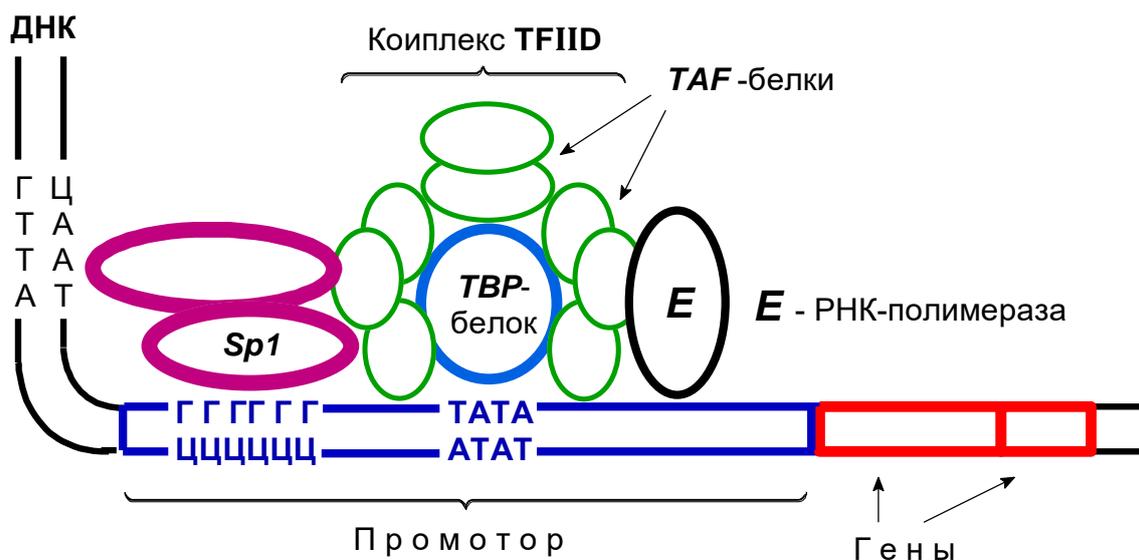


Рис. 22. Общие факторы транскрипции: комплекс TFIID

Если ген транскрибируется не ДНК-полимеразой II, а ДНК-полимеразой I или III, то его промотор содержит не ТАТА-бокс, а другую нуклеотидную последовательность. Например, большое число генов регулируется посредством цикло-АМФ (цАМФ). В промоторной области этих генов содержится бокс **TGACGTCA** (палиндром! – в белке – мотив «спираль-поворот-спираль»). Этот бокс называется цАМФ-чувствительными элементами – **CRE** (**cAMP response elements**). Белки, связывающиеся с этими боксами, называются **CREB**-белками (**cAMP response element binding proteins**).

Регуляция посредством цАМФ осуществляется следующим образом. Сродство **CREB**-белков к промотору проявляется только после фосфорилирования их специфической протеинкиназой **ПК-А**. Эта киназа активируется молекулами цАМФ, которые образуются из АТФ под действием *аденилатциклазы*. Причины активации аденилатциклазы в разных клетках различны.

Для связывания **CREB**-белков с боксами промоторной области необходимы ещё **активирующие транскрипционные факторы**. К ним относятся белки **СВР** (**CAAT-binding protein**) и **p300**. Комплекс белков **p300+СВР** ацетилюет гистоны, что, вероятно, способствует вытеснению нуклеосом из промоторной области.

Более тонкая регуляция активности генов осуществляется другими транскрипционными факторами, которые связываются с ДНК вне промотора – с **энхансерами**, которые являются регуляторными участками ДНК, располагающимися вне промоторной области (см. рис. 19).

5.4. Опероны

Бактериальные системы устроены проще эукариотических. У бактерий часто гены объединены в единый кластер, который регулируется одним спейсером, включающим промотор, оператор и, в некоторых случаях, аттенуатор (рис. 23).

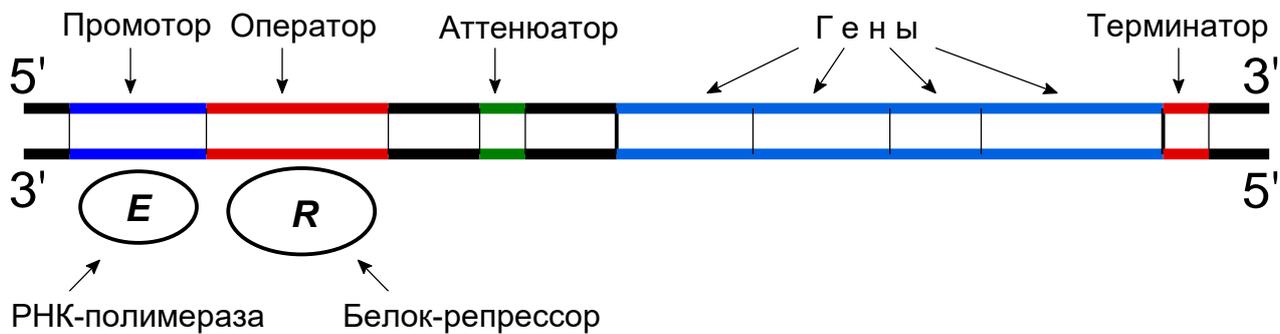


Рис. 23. Общая схема оперона

Общую систему регуляции имеют те гены, которые «работают» одновременно, например, катализируют одно цепочку последовательных реакций в клетке. Совокупность генов и спейсера, регулирующего их активность, называется *опероном*. Если белки, продуцируемые генами оперона, катализируют распад какого-либо субстрата (катаболизм), то оперон активируется появлением этого субстрата и называется *индуцибельным*. Если белки, продуцируемые генами оперона, катализируют синтез какого-либо продукта (анаболизм), то оперон пассивируется появлением этого продукта и называется *репрессибельным*. В качестве примера рассмотрим лактозный и триптофановый опероны.

5.4.1. Индуцибельный лактозный оперон

В лактозном опероне регулируется как связывание РНК-полимеразы с промотором, так и её перемещение по оператору. В этом опероне сосредоточены гены белков, катализирующие гидролиз лактозы до глюкозы и галактозы (рис. 24). Он включает:

- ген **пермиазы**, которая необходима для проникновения лактозы в клетку из внешней среды, причём даже при «выключенном» опероне в клетке содержится небольшое количество пермиазы,
- ген **галактозидазы**, которая катализирует гидролиз гликозидной связи лактозы, и при «выключенном» опероне в клетке также содержится небольшое количество этого фермента,
- ген **трансацетилазы**, катализирующей ацетилирование тиога-лактозида, причина присутствия которого в опероне пока не ясна.

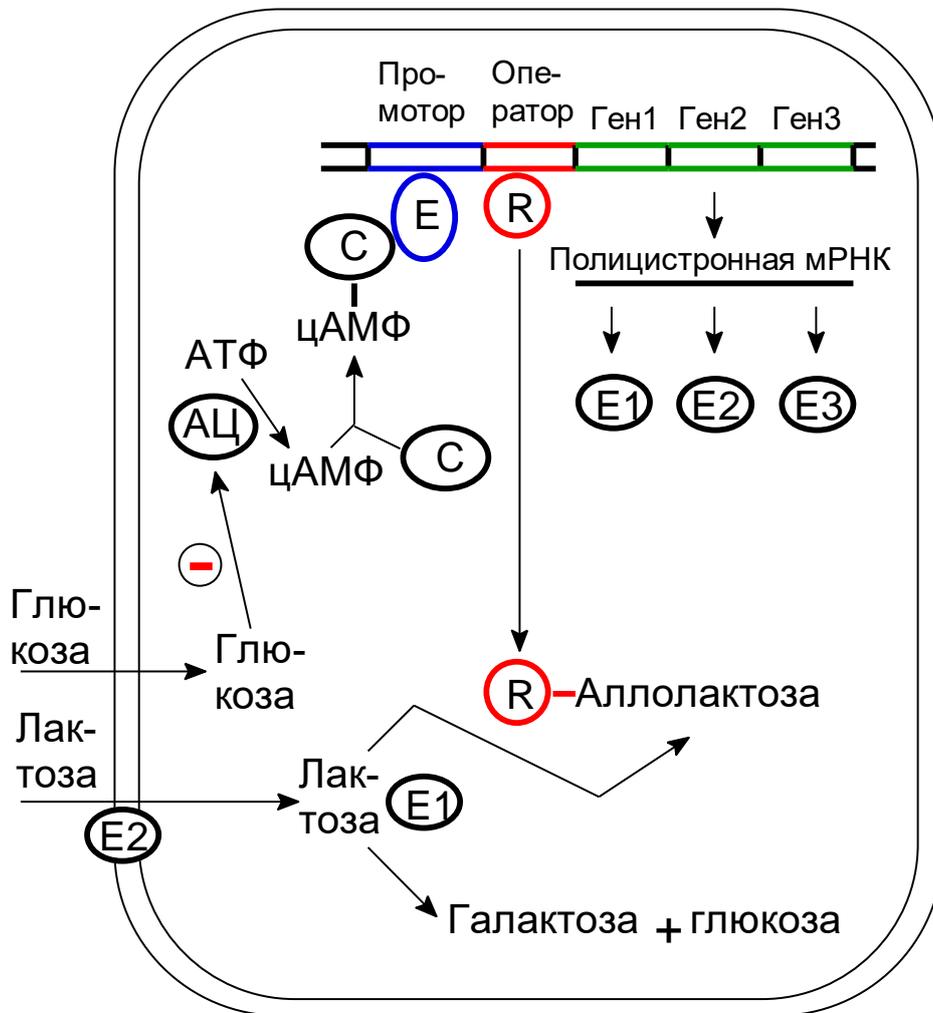


Рис. 24. Схема функционирования лактозного оперона

Фермент – **галактозидаза** – не только гидролизует -гликозидную связь лактозы, но и изомеризует лактозу в **аллолактозу** (1-6-гликозид). И именно **аллолактоза** служит регулятором активности оперона.

Появившаяся в клетке аллолактоза связывается с белком-репрессором, в результате чего его сродство к оператору снижается. Это снимает блокировку оперона, он начинает «работать», и в клетке появляются ферменты утилизации лактозы.

Но это происходит при отсутствии во внешней среде глюкозы. Глюкозу использовать более выгодно, и она препятствует активации лактозного оперона даже в присутствии больших количеств лактозы. Это достигается путём влияния на связывание РНК-полимеразы с промотором. Промоторная область лактозного оперона достаточно большая, и с ней

может связываться также и особый белок **CAP** (catabolite gene activator protein) – белковый активатор катаболизма. В отсутствие CAP, РНК-полимераза плохо связывается с промотором. CAP изменяет структуру промотора, и его сродство к РНК-полимеразе резко возрастает, т. е. CAP играет в бактериальных клетках ту же роль, что и общие факторы транскрипции у эукариот, но он участвует в регуляции только нескольких оперонов. Но CAP связывается с промотором только тогда, когда он находится в комплексе с 3',5'-цикло-АМФ (**цАМФ**). А цАМФ образуется из АТФ под действием фермента **аденилатциклазы**.

В отсутствие глюкозы активность аденилатциклазы высока, что повышает концентрацию цАМФ. Комплекс CAP+цАМФ связывается с промотором, что ускоряет присоединение к нему РНК-полимеразы, и оперон «работает» – ферменты утилизируют лактозу.

В присутствии глюкозы активность аденилатциклазы снижается (глюкоза токсична!). Промотор остаётся без CAP и теряет сродство к РНК-полимеразе. Лактозный оперон «не работает», и в клетке утилизируется глюкоза.

5.4.2. Репрессибельный триптофановый оперон

Как и в лактозном опероне, в триптофановом также имеется двойной механизм регуляции. Регулируется, во-первых, перемещение РНК-полимеразы по оператору и, во-вторых, окончание транскрипции на аттенюаторе, который располагается между оператором и генами. Как правило, опероны, имеющие аттенюаторы, являются репрессибельными и контролируют синтез (анаболизм) какого-либо вещества.

Триптофановый оперон включает 5 цистронов, кодирующих 4 фермента заключительного этапа синтеза триптофана. При этом последний фермент содержит субъединицы двух видов и кодируется двумя цистронами.

После промотора и оператора находится лидерный отдел (Л), который заканчивается аттенюатором. В процессе транскрипции этого отдела образуется лидерный участок мРНК, который тут же связывает рибосому, и начинается трансляция лидерного пептида (ЛП, рис. 25).

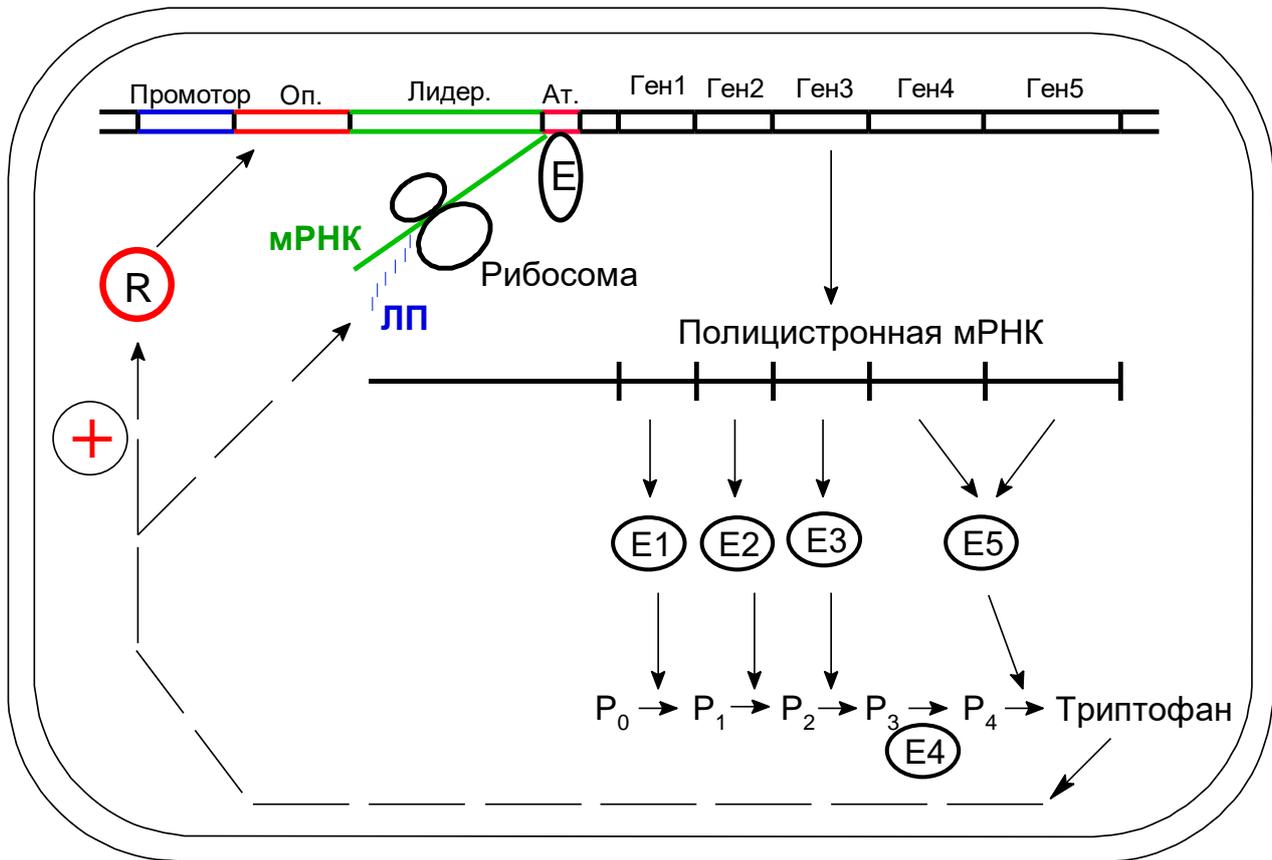


Рис. 25. Схема функционирования триптофанового оперона

Особенностью строения лидерного пептида является содержание **двух остатков триптофана** из 14 аминокислотных остатков (аналогично, в лидерном пептиде фенилаланинового оперона из 15 остатков – 7 фенилаланиновых, в лидерном пептиде гистидинового оперона – подряд 7 остатков гистидина).

Если в клетке достаточно триптофана, то синтез лидерного пептида (ЛП) идёт без задержки: рибосома не отстаёт от РНК-полимеразы. В этих условиях РНК-полимераза, достигнув аттенюатора, диссоциирует от ДНК и гены не считываются. Таким образом, триптофан, быстро включаясь в лидерный участок пептида, блокирует через аттенюаторный механизм синтез ферментов, необходимых для его образования.

Если концентрация триптофана в клетке небольшая, то рибосома отстаёт от РНК-полимеразы, которая с большой вероятностью пропускает аттенюаторный участок из-за изменения конформации ДНК-цепочки или лидерного отдела РНК. В результате этого гены

транскрибируются, и синтезируются ферменты, необходимые для пополнения запаса триптофана.

Итак, триптофан подавляет активность «своего» оперона, но не до конца. Полное подавление активности происходит при высокой концентрации триптофана. При этом реализуется более общий механизм регуляции: триптофан связывается со специфическим белком-репрессором и повышает его сродство к оператору триптофанового оперона. Это полностью блокирует данный оперон.

6. РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

6.1. Структурная организация ДНК в хромосомах

В каждой соматической клетке человека находится 46 хромосом (диплоидный набор), и общая длина ДНК в них 218 см. При этом размер клетки порядка 20 мкм (0.02 мм). Как можно набор молекул длиной 218 см упаковать в клетку диаметром 0.02 мм? Общая длина ДНК превышает диаметр клетки в 100 000 раз! Но ДНК находится в ядре, которое меньше клетки, а самые мелкие клетки, тромбоциты, имеют размер 1 мкм! Всё это свидетельствует о сложной организации хромосом. Способы «упаковки» ДНК разделяют на **три** уровня:

- нуклеосомный (эухроматин);
- нуклеосомный + нуклеомерный + хромомерный (гетерохроматин);
- нуклеосомный + нуклеомерный + хромомерный + хроматидный (хромосомы клеток, находящихся в мета- и анафазах).

1. На стадии эухроматина хромосома имеет один уровень организации – нуклеосомный. Нуклеосома – это октамер из 4 пар гистонов – $(2 \times H2A) + (2 \times H2B) + (2 \times H3) + (2 \times H4)$. Вокруг этой глобулы двойная спираль ДНК делает ДВА оборота, образуя **нуклеосому**. Гистон H1 связан с ДНК между нуклеосомами и препятствует диссоциации ДНК от белкового октамера вследствие связывания с входящей и выходящей с нуклеосомы нитями ДНК. С одной нуклеосомой ассоциировано около 200 нуклеотидных пар ДНК.

Одна молекула ДНК участвует в образовании в среднем 600 000 нуклеосом, которые образуют **нуклеотяж**. Нуклеосомы нуклеотяжа различимы в виде бусинок при электронной микроскопии эухроматина, их диаметр равен около **10 нм**.

2. На стадии гетерохроматина образуется **нуклеомерная нить** (хроматиновая фибрилла, хроматиновая нить) путём закручивания нуклеотяжа в спираль за счёт взаимодействия гистонов H1 друг с другом. Диаметр нуклеомерной нити – около **30 нм**. На этой стадии ДНК не доступна для ферментных комплексов и не может участвовать в транскрипции. Далее нуклеомерная нить образует комплексы с негистоновыми белками, формируя наборы петель, каждый из которых связан с одним белковым центром. Эта цепочка розеток называется **хромомерами**.

3. Далее петли и розетки нуклеомерной нити тесно прилегают друг к другу, в результате чего появляются спирализованные или складчатые структуры, образующие **хроматиды** толщиной **700 нм**. Хроматида – это одна из двух половинок метафазной хромосомы, хорошо видимой в световой микроскоп.

При хромосомной организации длина «упаковки» ДНК меньше длины самой ДНК примерно в 10 000 раз. Это число называют «фактором упаковки».

6.2. Клеточный цикл

Репликация (удвоение) ДНК происходит перед началом деления клетки, и именно репликация обеспечивает передачу наследственной информации из поколения в поколение. Параллельно репликации происходит синтез хромосомных белков, и удвоение хромосом включает оба эти процесса.

Существует два способа деления клетки – **митоз** и **мейоз** (рис. 26). Митоз – обычное деление клеток. Мейоз – особенный способ деления, который используется только для двух последних делений при образовании половых клеток. И при митозе, и при мейозе

сначала происходит удвоение ДНК и хромосомных белков. При этом количество хромосом остаётся диплоидным, но каждая из них содержит две хроматиды (две молекулы ДНК), и по количеству ДНК клетка становится тетраплоидной ($4n$).

Отличие мейоза от митоза:

– при первом мейотическом делении в дочерние клетки расходятся не хроматиды, а хромосомы с диплоидным набором хроматид;

– перед вторым делением ДНК не реплицируется, а расходятся хроматиды каждой из 23 хромосом;

– репликация ДНК перед митозом занимает 10–15 ч., перед мейозом – 100 ч.

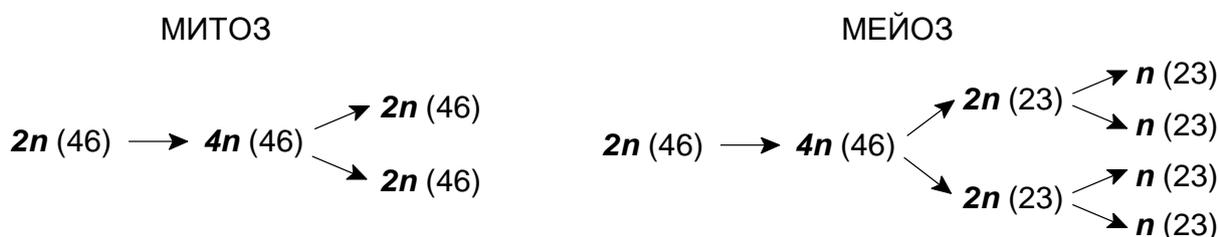


Рис. 26. Деление клетки: митоз и мейоз

Митотический цикл клетки длится около суток и включает следующие четыре периода:

- 1) G_1 – постмитотический или пресинтетический (9 ч.);
- 2) S – синтетический (10 ч);
- 3) G_2 – постсинтетический или премитотический (4.5 ч.);
- 4) M – митоз (0.5 ч.).

Период G_1 длится от образования клетки до начала репликации ДНК и удвоения ядерных белков. В этот период клетка проходит **точку рестрикции** – момент времени, когда решается, вступает ли клетка в митотический цикл или нет, и в последнем случае происходит её дифференцировка и / или смерть. Во время S -периода происходит репликация ДНК и удвоение ядерных белков, а также дупликация центриолей, располагающихся вблизи ядра.

Период G_2 длится от окончания репликации до начала митотического деления клетки, в это время синтезируется ряд веществ, необходимых для деления – белок тубулин, образующий микротрубочки веретена деления, и др. Митоз включает ряд стадий (про-, мета-, ана- и телофаза) и заканчивается образованием двух дочерних клеток с диплоидным набором хромосом.

По способности к делению клетки подразделяют на:

- 1) **митотические** (постоянно делящиеся);
- 2) **условно постмитотические** (не делящиеся, но сохранившие способность к делению);
- 3) **постмитотические** (не делящиеся и окончательно потерявшие способность к делению).

Клетки, вышедшие из митотического цикла, вступают в период G_0 , включающий различные стадии дифференцировки и заканчивающийся либо возвращением в митотический цикл после первой стадии дифференцировки, либо гибелью клетки (рис. 27).

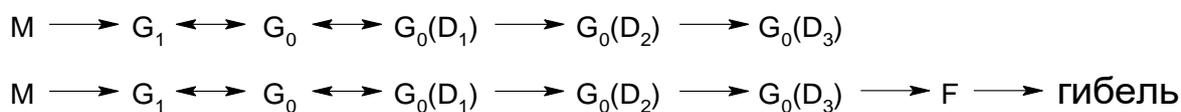


Рис. 27. Стадии жизни клетки

6.3. Основные характеристики репликации ДНК

Процесс репликации характеризуется следующими свойствами:

- 1) субстратами, из которых синтезируется ДНК, являются 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты (дНТФ);
- 2) репликация является **матричным процессом**: при построении дочерней цепи родительская цепь молекулы ДНК используется в качестве матрицы;
- 3) репликация является **симметричным процессом** – обе родительские цепи используются в качестве матрицы (в отличие от транскрипции – синтезе РНК по матрице ДНК);

4) цепь ДНК всегда наращивается от 5'-конца к 3'-концу ($5' \rightarrow 3'$), что обусловлено реакцией 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфата (дНТФ) с 3'-гидроксильной группой наращиваемой цепи;

5) растущая цепь антипараллельна вновь синтезируемой, и родительская матричная цепь считывается в направлении $3' \rightarrow 5'$;

6) репликация осуществляется сложным **ферментным комплексом**, насчитывающим 15–20 различных ферментов; при этом в репликации одной цепочки участвует большое число комплексов;

7) **скорость репликации** у бактерий (прокариоты) 500–750 нукл. пар/с, у эукариот – 30 нукл. пар / с (при времени репликации 15 ч. на одной цепи работает около 40 ферментных комплексов);

8) в каждой точке репликации начинают работать сразу два ферментных комплекса, один перемещается по цепи ДНК в одну сторону, другой – в противоположную, образуя две **репликативные вилки**; при этом каждый комплекс реплицирует ОБЕ цепочки ДНК (но цепи антипараллельны, и как соблюдается при этом принцип считывания $3' \rightarrow 5'$?); в конечном итоге зоны репликации сливаются, и вся ДНК становится удвоенной (рис. 28);

9) ферментный комплекс работает так, что одна цепь, лидирующая, растёт с некоторым опережением по сравнению с другой, отстающей или запаздывающей; запаздывающая цепь синтезируется в виде коротких фрагментов по 1000–1500 нукл. пар, называемых **фрагменты Оказаки**, и направление её синтеза противоположно движению ферментного комплекса и репликативной вилки;

10) ферментный комплекс начинает работу с синтеза **РНК-затравки (праймера)** из 10–15 рибонуклеотид-5'-трифосфатов; синтез происходит по матрице ДНК в соответствии с принципом комплементарности (почему для начала репликации используется РНК-цепочка?);

11) после репликации праймеры удаляются, и на их место встраиваются ДНК-последовательности, но на 5'-концах это сделать нельзя, поэтому происходит **репликативное укорочение** ДНК

(и хромосом); репликативное укорочение преодолевается двумя способами: с помощью специального фермента, **теломеразы**, или с помощью **альтернативного механизма**.

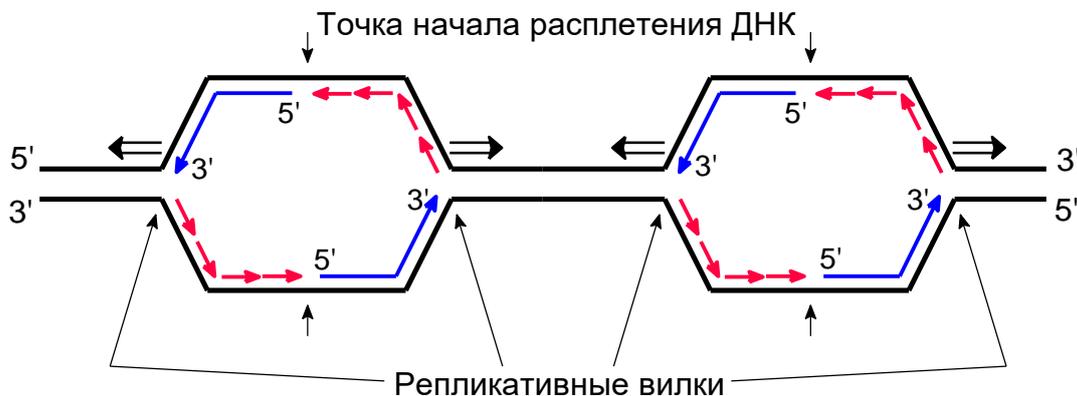


Рис. 28. Репликативные «вилки» и «глазки»

6.3.1. Ферментный комплекс

В состав ферментного комплекса входит 15–20 белков, и мы рассмотрим эти белки в порядке работы комплекса при репликации.

1. Узнающие белки. Сначала нужно определить место в молекуле ДНК, к которому присоединятся два ферментных комплекса. Точки начала репликации имеют специфическую нуклеотидную последовательность, богатую парами А-Т (вспомните, что пара А-Т удерживается только **двумя** водородными связями). Процесс репликации начинается с того, что с каждой такой точкой связываются **узнающие белки**, которые для бактерий обозначаются **DnaA**.

Узнающие белки связываются с ДНК, вероятно, по следующим причинам:

- 1) появление узнающих белков в ядре;
- 2) отсоединение блокирующих белков от точек начала репликации;
- 3) появление в ядре каких-то белковых факторов, необходимых для связывания узнающих белков с ДНК.

Далее узнающие белки, вероятно, перемещаются по цепочке ДНК вместе с ферментным комплексом.

2. Геликаза. Далее к месту начала репликации присоединяется фермент **геликаза** (от *helix* – спираль), который расплетает двойную

спираль в районе репликативной вилки. При этом образуются одноцепочечные участки. Для разъединения каждой комплементарной пары (А-Т и Г-Ц) затрачивается энергия двух молекул АТФ. Одновременно происходит вытеснение с данного участка ДНК гистонов и других белков.

3. Топоизомеразы. При расплетении ДНК перед репликативной вилкой образуется участок **суперспирализации**. Напряжение на этом участке препятствует дальнейшему расплетению спирали. Кроме того, молекула ДНК закреплена в ядерном матриксе и не может свободно вращаться. Поэтому проблема суперспирализации решается специальными ферментами – **топоизомеразы I и II**. **Топоизомераза I** разрывает одну цепь ДНК, присоединяя проксимальный конец к себе (рис. 29).

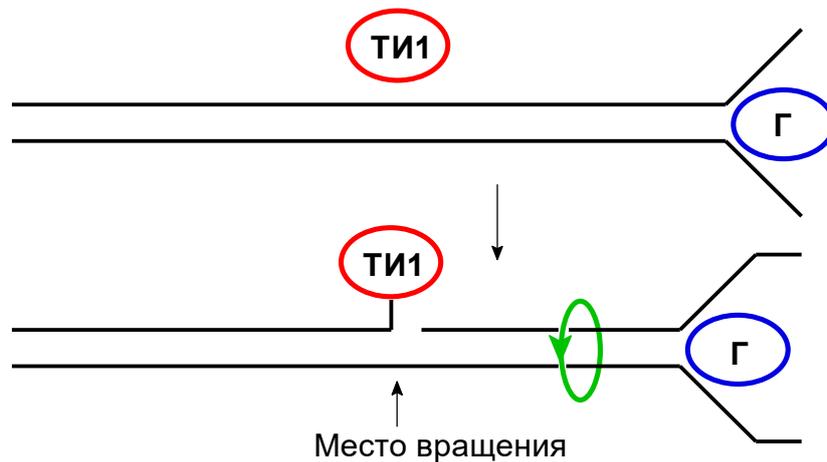


Рис. 29. Устранение витков суперспирализации топоизомеразой I

Свободный (дистальный) конец остаётся со стороны репликативной вилки, и он свободно вращается, устраняя суперспирализацию двойной спирали. После этого разорванные концы вновь соединяются (реакция разрыва одной цепочки ДНК-топоизомеразой I обратима).

Проблему суперспирализации решает также фермент **топоизомераза II** (для бактерий – **гираза**). Он разрывает сразу две цепочки ДНК, перенося оба соответствующих конца на себя. После раскручивания суперспирали связи восстанавливаются. В отличие от **топоизомеразы I**, при работе **топоизомеразы II** затрачивается энергия 1 молекулы АТФ (табл. 3).

Топоизомеразы

Топоизомеразы	IA	IB	IIA	IIB
Необходимость ионов металлов	Да	Нет	Да	Да
Зависимость от АТФ	Нет	Нет	Да	Да
Одно- или двухцепочечный разрыв	Оц	Оц	Дц	Дц
Конец прикрепления	5'	3'	5'	5'
Изменение числа супервитков	± 1	± 1	± 2	± 2

4. SSB-белки (Single Strand Binding proteins). После расплетения двойной спирали и устранения суперспирализации необходимо предотвратить самопроизвольное «слипание» одиночных цепей в двойную спираль. Для этого с каждой одиночной цепью связываются **SSB-белки**. Они обладают повышенным сродством к одноцепочечным участкам и тем самым их стабилизируют.

5 + 6. Праймаза и её активатор. После образования репликативной вилки, специальный белок активирует **праймазу**, которая на матрице одноцепочечной ДНК синтезирует РНК-затравку (**праймер**).

7 + 8. ДНК-полимеразы. Праймер необходим для работы ДНК-полимеразы, которая не может катализировать начало полимеризации ДНК, а способна только продолжать полимеризацию. У эукариот известно 5 разных ДНК-полимераз: α - и δ -полимеразы участвуют в репликации ядерной ДНК, γ -полимераза – в репликации митохондриальной ДНК, а β - и ϵ -полимеразы участвуют в репарации ДНК. У бактерий в репликации участвует **ДНК-полимераза III**, молекула которой является димером.

Предполагают, что α -полимераза связана с праймазой и с δ -полимеразой, а последняя – с **белком PCNA** (Proliferating Cell Nuclear Agent). Этот белок исполняет роль «прищепки», которая прикрепляет комплекс полимераз к реплицируемой цепи. В «застёгнутом» состоянии этот комплекс охватывает одиночную цепь ДНК как кольцо. Комплекс ДНК-полимераз присоединяет нуклеотиды к растущей це-

почке комплементарно материнской матричной цепи. У бактерий белок PCNA образует комплекс с ДНК-полимеразой III.

Кроме полимеразной активности, ДНК-полимеразный комплекс обладает ещё и **3'→5'-экзонуклеазной активностью**, т. е. он может отщеплять нуклеотидный остаток с 3'-конца цепи (*экзо* – с конца, *эндо* – в середине цепи). Эта активность включается в том случае, если в дочернюю цепь встроился некомплементарный нуклеотид. Тем самым ДНК-полимеразный комплекс проверяет комплементарность нуклеотидов дочерней и материнской цепей и исправляет ошибки.

У бактерий в состав ДНК-полимеразного комплекса входит ДНК-полимераза III и белок PCNA. У эукариот – α - и δ -ДНК-полимеразы и белок PCNA.

9. ДНК-полимераза I у бактерий; ДНК-полимераза β и нуклеаза – у эукариот. Процесс остановки полимеризации ДНК лучше исследован для бактерий. Когда ферментный комплекс доходит до РНК-затравки соседнего участка, то он останавливается. При этом «прищепка» из белка PCNA слетает и полимеразный комплекс покидает родительскую ДНК. После этого в действие вступает **ДНК-полимераза I** (в случае бактерий), присоединяясь к 3'-концу растущего фрагмента. Этот фермент обладает не двумя, а **тремя** активностями:

1) **5'→3'-экзонуклеазная активность**, или «передняя» активность – последовательное отщепление нуклеотидов с 5'-конца РНК-затравки соседнего участка;

2) **ДНК-полимеразная активность** – присоединение дезоксирибонуклеотидов к 3'-концу своего участка на освободившееся от РНК-затравки место;

3) **3'→5'-экзонуклеазная активность**, или «задняя» активность – проверка комплементарности нуклеотидов материнской и дочерней цепей.

У эукариот РНК затравка удаляется специальной **нуклеазой**, а заделку бреши и проверку комплементарности выполняет **ДНК-полимераза β** , участвующая также в репарации ДНК.

10. Синтез запаздывающей цепи. Направление синтеза запаздывающей цепи противоположно направлению движения репликативной вилки. Существует две гипотезы устранения этого противоречия:

1) ферментный комплекс периодически прекращает синтез ДНК по матрице лидирующей цепи и переходит на запаздывающую, синтезируя по ней очередной фрагмент Оказаки; затем он вновь возвращается на лидирующую и продолжает синтез (рис. 30);

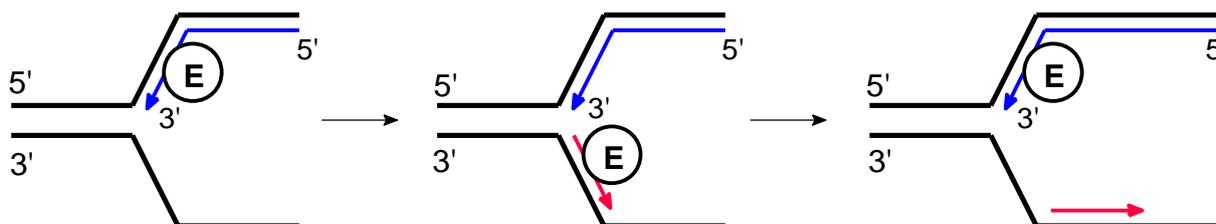


Рис. 30. Перемещение ферментного комплекса с лидирующей цепи на запаздывающую и обратно

2) на запаздывающей цепи периодически формируется петля, движение по которой совпадает с направлением движения репликативной вилки; при этом ферментный комплекс одновременно реплицирует обе цепи – лидирующую и запаздывающую, но последнюю – в виде фрагментов Оказаки (рис. 31).

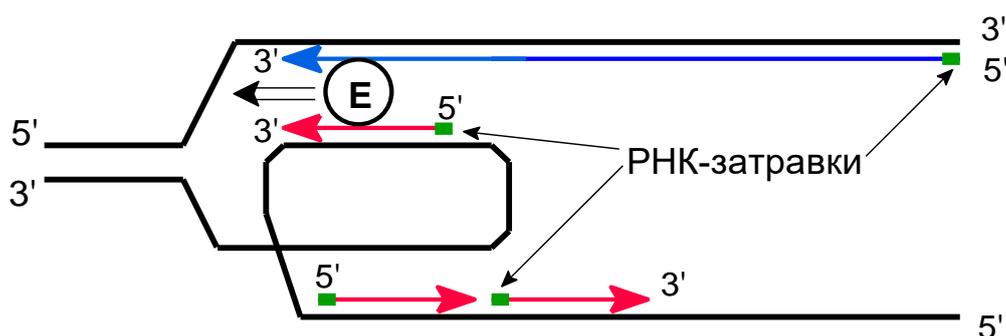


Рис. 31. Формирование петли на запаздывающей цепи

Вторая гипотеза подтверждается тем фактом, что бактериальная ДНК-полимераза III является димером, а у эукариот ДНК-полимеразы α и δ образуют единый комплекс.

11. Лигаза. В результате работы ферментного комплекса вновь синтезированная цепь ДНК оказывается состоящей из следующих фрагментов: по 1 000 000 нуклеотидов во фрагменте лидирующей цепи и по 1500 – в отстающей. Их необходимо «сшить», что и выполняет **ДНК-лигаза**. Она потребляет энергию 1 молекулы АТФ на образование эфирной связи между 5'-**моно**фосфатом одного фрагмента и 3'-гидроксильной группой другого. Лигаза сшивает только те одноцепочечные фрагменты, которые находятся в составе двухцепочечной ДНК. ДНК-полимераза это выполнить не может, так как её субстраты – нуклеозид**три**фосфаты.

Таким образом, структуру ферментного комплекса можно представить в виде следующей схемы (рис. 32).

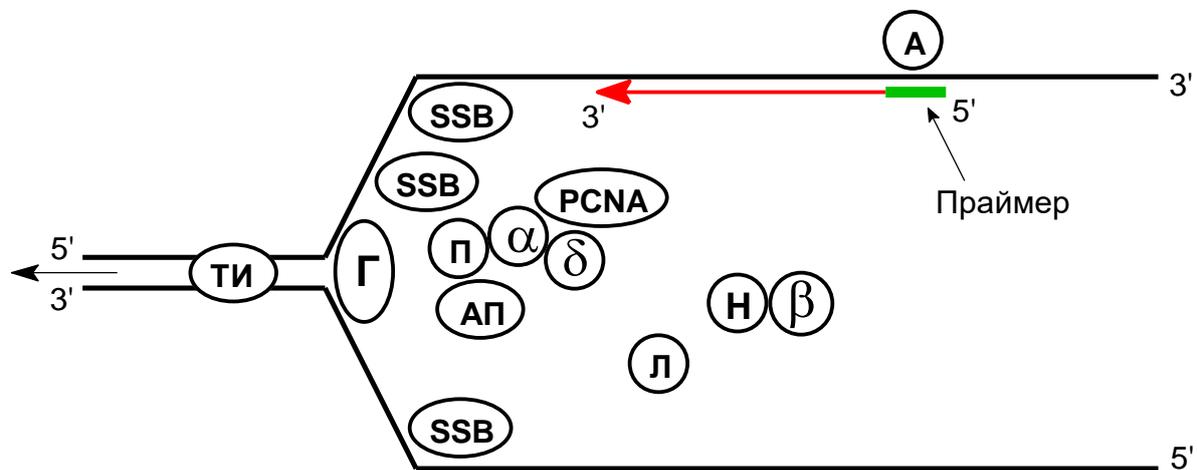


Рис. 32. А – узнающий белок; Г – геликаза; ТИ – топоизомераза; SSB – SSB-белок; П – праймаза; АП – активатор праймазы; α, δ, β – α-, δ- и β-ДНК-полимеразы; PCNA – PCNA белок; Н – нуклеаза; Л – лигаза

12. Теломераза. Ферментный комплекс не может заделать «бреши» после удаления праймеров с 5'-конца цепи, так как полимеризация идёт путём фосфорилирования 3'-гидроксильной группы 5'-нуклеозид**три**фосфатом. Поэтому 5'-концы дочерних цепей остаются недореплицированными на длину РНК-праймера. Концы ДНК имеют особенную структуру: они содержат повторяющиеся последовательности, т. е. являются **теломерами**. Следовательно, фермент, восстанавливающий длину 5'-концов, называется **теломеразой**.

6.3.2. Репликация теломерных концов ДНК

Если делящаяся клетка не содержит теломеразу, то 5'-концы дочерних ДНК так и остаются недореплицированными. При этом хромосомы немного укорачиваются. В двойной спирали ДНК 5'-концы оказываются короче 3'-концов. Такие концы ДНК с разной длиной цепей называются **острыми**, или **оверхенгами**. Их также называют **липкими** концами.

Длина РНК-затравки – 10–15 нуклеотидов, а укорочение 5'-конца при репликации оказывается значительно больше – 50–65 нуклеотидов. Почему? Вероятно, недорепликация 5'-конца не оказывает влияние на образование острых концов (оверхенгов)? Какова роль теломер и оверхенгов?

После репликации **3'-конец оказывается значительно длиннее** 5'-конца либо вследствие дополнительного укорочения последнего, либо вследствие удлинения 3'-конца. Этот удлинённый конец называется оверхенгом. Зачем он нужен?

Оказывается, формирование оверхенгов необходимо для того, чтобы система репарации (восстановления) ДНК не разрушала ДНК с её свободных концов. Разрушению ДНК системой репарации препятствует образование **Т-петель** оверхенгами 3'-концов. Т-петли образуются путём спаривания концов оверхенгов с одним из своих предыдущих участков (рис. 33).



Рис. 33. Т-петли оверхенгов 3'-концов ДНК

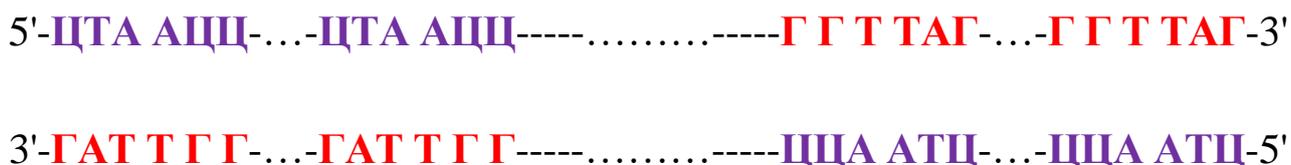
Одни системы репарации воспринимает ровный, без оверхенгов, конец ДНК как двухцепочечный разрыв и начинает его с чем-нибудь сшивать. Другие воспринимают острые концы как одноцепочечные разрывы и также пытаются их устранить. Присутствие **Т-петли** на

теломерном конце ДНК защищает её от обоих типов репарационных систем. Сама **Т-петля** недостаточно устойчива, и она дополнительно стабилизируется комплексом из 6 белков **шелтеринов**.

В отсутствие теломеразы длинные оверхенги формируются за счёт укорочения 5'-концов как дочерней, так и родительской цепи ДНК, поэтому она становится короче на 50–65 нуклеотидных пар. Средняя длина ДНК человека составляет 120 млн нуклеотидных пар, и укорочение на 50–65 пар составляет всего лишь 0.00005 %! Тем не менее если бы не существовало механизма восстановления длины теломер, то в процессе эволюции хромосомы бы исчезли. Проблема укорочения и удлинения теломер имеет огромное биологическое значение и связана с такими вечными проблемами, как **старение** и **канцерогенез**. Поэтому мы остановимся подробнее на строении теломер и на функциях теломеразы.

6.3.3. Теломеры

Теломеры – это протяжённые концы хромосомной ДНК, которые не несут никакой генетической информации. Каждая такая последовательность образована многократным повторением блока из 6 нуклеотидных пар:



Вся эта последовательность сводится к одному гексануклеотиду, многочисленные повторы которого располагаются на 3'-конце:



При этом 3'-конец называют Г-теломерной цепью, а 5'-конец – Ц-цепью. В клетках человека протяжённость теломерного конца составляет 10–15 тыс. НП, и на обе теломерные последовательности приходится около 0.2 % средней длины ядерной ДНК. Поэтому утра-

та части теломерной последовательности не влияет или почти не влияет на функционирование генома, т. е. теломера выполняет функцию **буфера**.

На конце каждой теломеры образуется T-петля, которая стабилизируется комплексом из 6 белков **шелтеринов**. Их функции:

- 1) стабилизируют теломерные концы;
- 2) препятствуют действию теломеразы на теломерные концы;
- 3) контролируют работу теломеразы при удлинении теломер в S-периоде клеточного цикла;
- 4) стабилизируют концы случайно разорвавшихся хромосом;
- 5) прикрепляют концы хромосом к ядерной ламине, фиксируя их на внутренней поверхности внутренней мембраны ядра.

Одна из важных функций теломер – **влияние на активность близлежащих генов**. Изменение конформации теломеры снижает активность вплоть до полного её исчезновения – «молчание» гена, или **сайленсинг**. При сильном укорочении теломеры этот эффект частично или полностью пропадает. Детали механизма не ясны, но этим эффектом объясняют гибель клеток после определённого числа делений: укорочение теломеры снимает дезактивацию гена, вызывающего смерть клетки.

6.3.4. Восстановление длины теломер с помощью теломеразы

Теломераза начинает работать, если она присутствует в клетке, после репликации ДНК. При этом она **удлиняет** не более короткую дочернюю, а **материнскую цепь!** Это опять же связано со способом синтеза ДНК – фосфорилированием 3'-гидроксила нуклеозид-5'-трифосфатом. А более длинный материнский конец как раз и является 3'-концом (рис. 34).

Итак, теломераза пристраивает к 3'-концу несколько десятков или сотен гексануклеотидов **ГГТТАГ**. После этого удлинённая Г-цепь выступает в качестве матрицы синтеза фрагмента Оказаки Ц-цепи, что происходит по описанному ранее механизму. На конце новой це-

пи праймаза синтезирует РНК-затравку, к которой ДНК-полимераза β присоединяет нуклеотиды комплементарно старой цепи до конца дочерней цепи. Далее ДНК-лигаза сшивает фрагменты и эндонуклеаза удаляет РНК-затравку с конца дочерней цепи. В результате теломера становится длиннее. Процесс заканчивается формированием оверхенга и Т-петли.

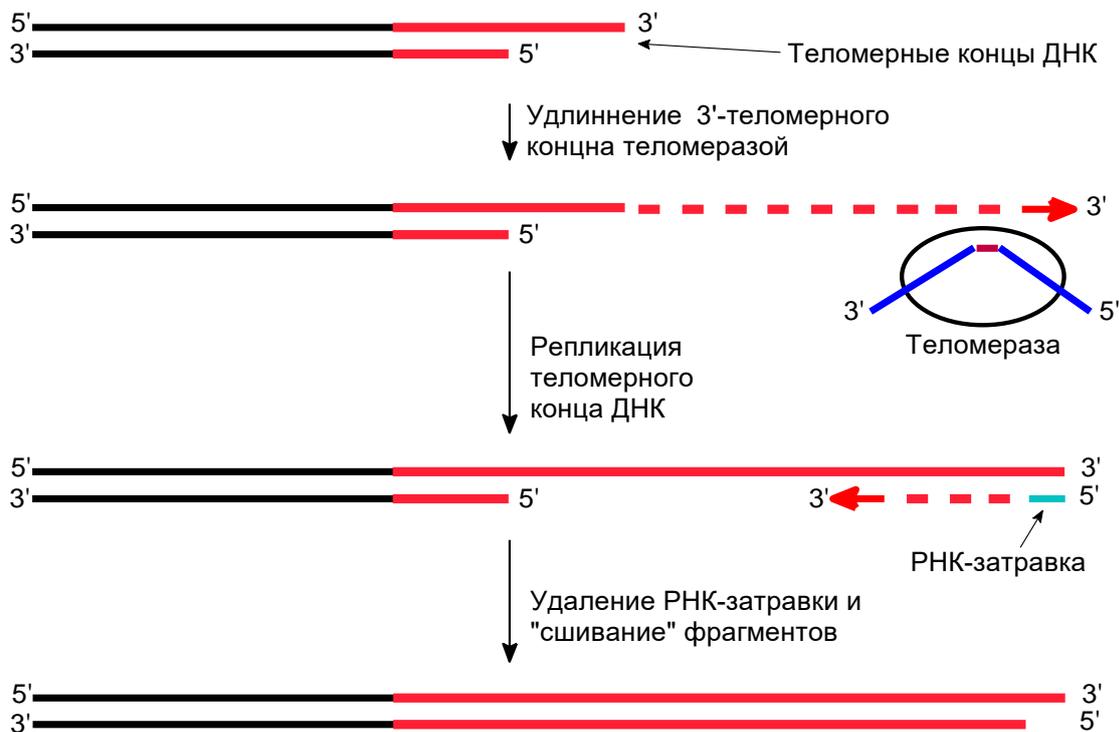


Рис. 34. Восстановление теломерных концов теломеразой

6.3.5. Альтернативный механизм восстановления длины теломер

Альтернативным механизмом (**Alt**) восстановления длины теломер является **рекомбинация** между теломерными участками разных хромосом. Для этого *теломера одной ДНК должна быть значительно длиннее теломеры другой*. В образующихся гибридных теломерах короткие концы достраиваются ДНК-полимеразным комплексом, при этом отстающая цепь синтезируется в виде фрагмента Оказаки. После этого восстанавливается негибридная структура теломер, формируются оверхенги и Т-петли (рис. 35).

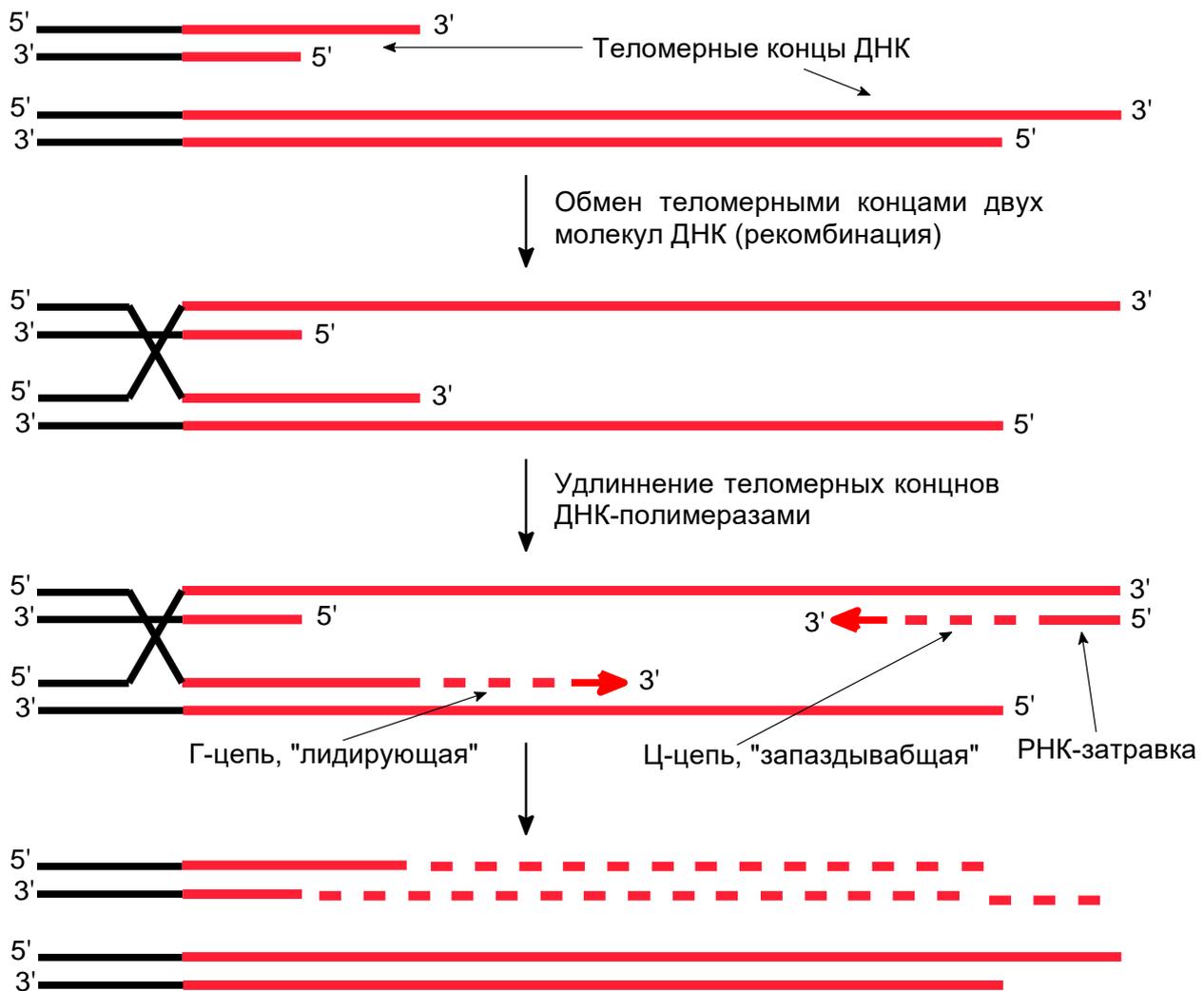


Рис. 35. Альтернативный механизм (**Alt**-механизм) восстановления длины теломерных концов

6.3.6. Структура теломеразы

Теломеразный комплекс состоит из двух основных компонент:

- теломеразная РНК (**TER –Telomerase RNA**) длиной около 450 нуклеотидов, служащая матрицей синтеза теломерных повторов;
- теломеразная обратная транскриптаза (**hTERT – human Telomerase Reverse Transcriptase**), катализирующая синтез ДНК по матрице РНК.

Кроме того, в состав теломеразы входят белковые субъединицы (дискерины), которые обеспечивают взаимодействие фермента с теломерой и регулируют его активность.

Матричная роль теломеразной РНК (**TER**) определяется коротким участком из 9 нуклеотидов, находящимся в середине цепи из 450 нуклеотидов:



Этот участок комплементарен **полутора** теломерным повторам. Первые три нуклеотида с 3'-конца используются для комплементарного связывания со второй половиной крайнего теломерного повтора Г-цепи ДНК. Оставшиеся два триплета выполняют функцию матрицы для удлинения Г-цепи на один теломерный повтор (рис. 36).

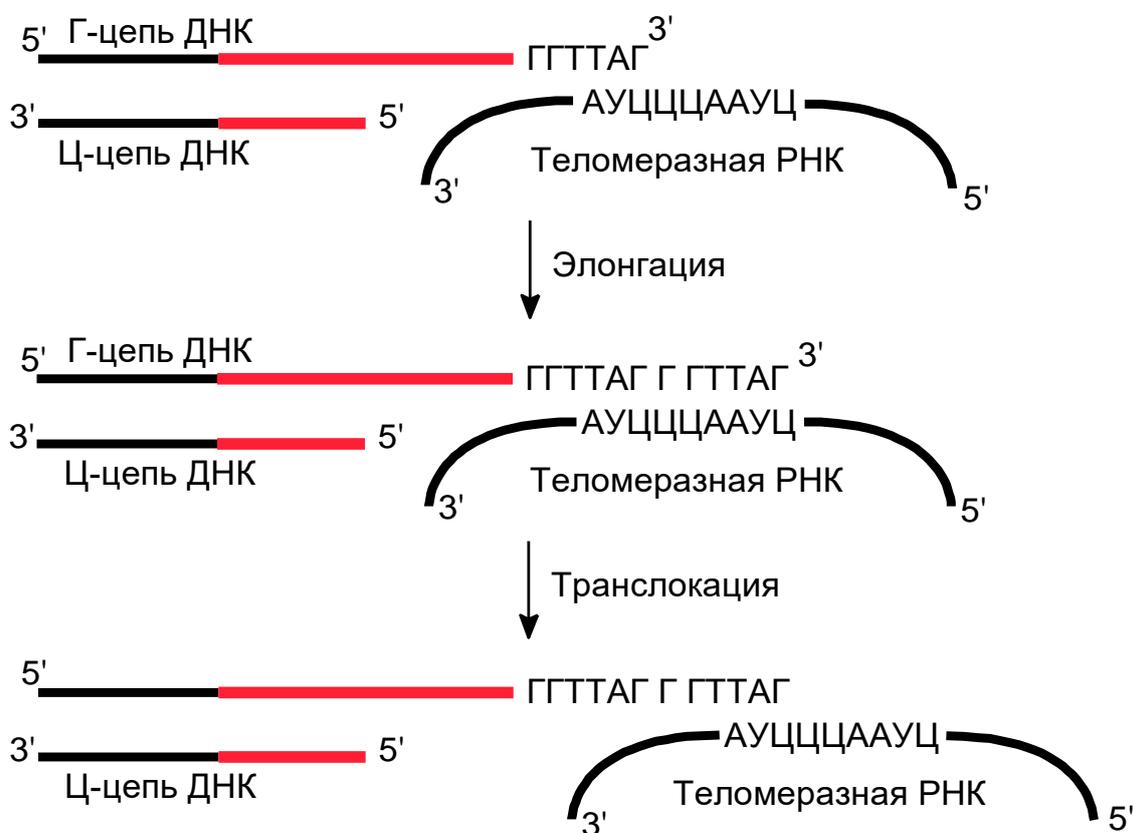


Рис. 36. Удлинение теломеры теломеразой

Теломеразная обратная транскриптаза (**hTERT**) состоит из 1100 аминокислотных остатков и осуществляет несколько процессов:

– катализирует последовательное включение 6 нуклеотидов теломерного повтора в Г-цепь (в направлении 5'→3'), что называется **элонгацией**;

– домены ферментного комплекса теломеразы осуществляют **транслокацию**, перемещая весь фермент на один повтор левее (в сторону 3'-конца); при этом РНК фермента теряет связь с ДНК и вновь образует её с крайней половинкой только что синтезированного повтора. Далее процессы элонгации и транслокации повторяются.

Сигналом прекращения удлинения теломеры, вероятно, является либо (1) исчерпание ресурсов – пространственных (объём ядра), строительных (пул нуклеозидтрифосфатов), энергетических (АТФ), либо (2) действие какого-то регулятора.

На основе изменения длины теломер и активности теломеразы разрабатывают различные теории старения и онкогенеза. Известно, что раковые клетки способны делиться неограниченное число раз, поэтому они должны содержать теломеразу. И действительно, экспериментально установлено, что в 85 % злокачественных новообразований обнаруживается теломеразная активность; частота обнаружения теломеразы в доброкачественных опухолях соответствует таковой в нормальных тканях – 27 %. Таким образом, присутствие теломеразы в ткани служит маркером злокачественных опухолей. Но содержание теломеразы в клетке настолько мало, что для его определения используют достаточно сложные методы.

7. АНАЛИЗ ДНК И СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМА

Геном человека был «прочитан» к 2000 году в результате реализации специальной исследовательской программы. С тех пор произошёл колоссальный прогресс в области исследования ДНК, её секвенирование проводится всё быстрее и быстрее, и скоро оно превратится в рутинный анализ. Секвенирование генома отдельного человека позволяет выявить генетические предрасположенности к тем или иным заболеваниям и много другое, связанное со здоровьем. Секвенирование генома и манипуляции с ДНК стали возможны благодаря развитию новых технологий электрофореза, блоттинга, полимеразной цепной реакции и др. [5, 6].

7.1. Электрофорез

Электрофорез ДНК в геле – это ключевая технология анализа и очистки ДНК, а также выделения отрезков с отдельными генами. Электрофорез основан на движении заряженных молекул в электрическом поле. Молекулы движутся через жидкую гелевую фазу, и скорость их движения зависит от размера молекулы, что позволяет разделять отрезки нуклеиновых кислот разной длины. Гель готовят из агарозы или полиакриламида. Агароза – полисахарид, выделяемый из водорослей, и состоящий из повторяющихся фрагментов дисахарида, в состав которого входят остатки β -D-галактопиранозы (слева, рис. 37) и 3,6-ангидридо- α -L-галактопиранозы.

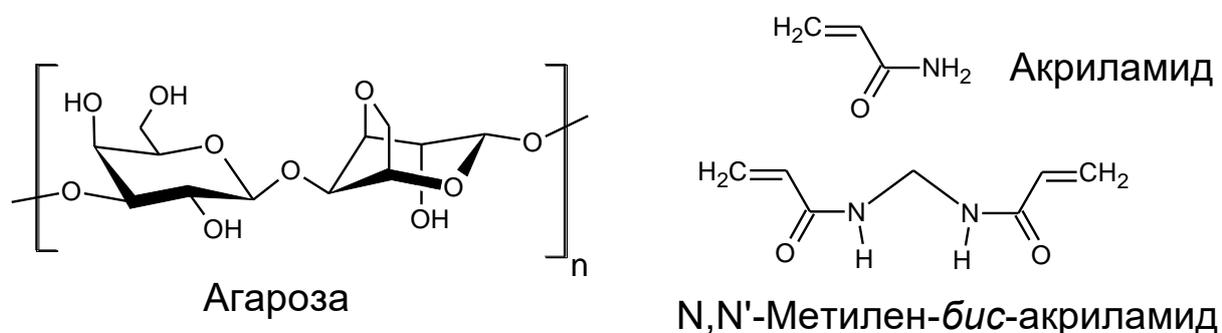


Рис. 37. Структурные элементы для гелей при проведении электрофореза

Агарозу растворяют в тёплой воде, и после остывания этого раствора (примерно 1 % агарозы в воде) до комнатной температуры образуется гель. Альтернатива этому гелю – сетчатый сополимер акриламида и N,N'-метилен-бис-акриламида, где доля последнего компонента определяет размер пор полимерного геля.

В обоих случаях гель готовят в буферном растворе при нейтральных или щелочных значениях pH, так как в этих условиях нуклеиновые кислоты отрицательно заряжены. Гель располагают между металлическими пластинами, и на краю геля делают углубления для нанесения образцов. На пластины подают напряжение: отрицательное – на верхнюю, положительное – на нижнюю. Нуклеиновые кислоты начинают двигаться вниз сквозь гель в зависимости от размера молекул: неболь-

шие молекулы движутся быстрее, большие – медленнее. Гель также располагают горизонтально, и молекулы ДНК движутся от «минуса» к «плюсу». Длина пути, пройденного молекулой нуклеиновой кислоты, линейно зависит от логарифма длины молекулы.

После окончания электрофореза нужно сделать видимыми участки геля с ДНК, для чего существует несколько способов. Наиболее простой – проводить электрофорез в растворе этидийбромид с последующим отмыванием от него. Этидийбромид встраивается (**интеркалирует**) между основаниями ДНК, чему благоприятствует его плоская структура и наличие по краям двух катионных центров. Молекула этидийбромид обладает флуоресцентными свойствами, и флуоресцирующие полосы наблюдают в УФ свете. На одну пластину обычно наносят 20 и более образцов ДНК, и получается соответствующее количество дорожек из полосок индивидуальных молекул (рис. 38).

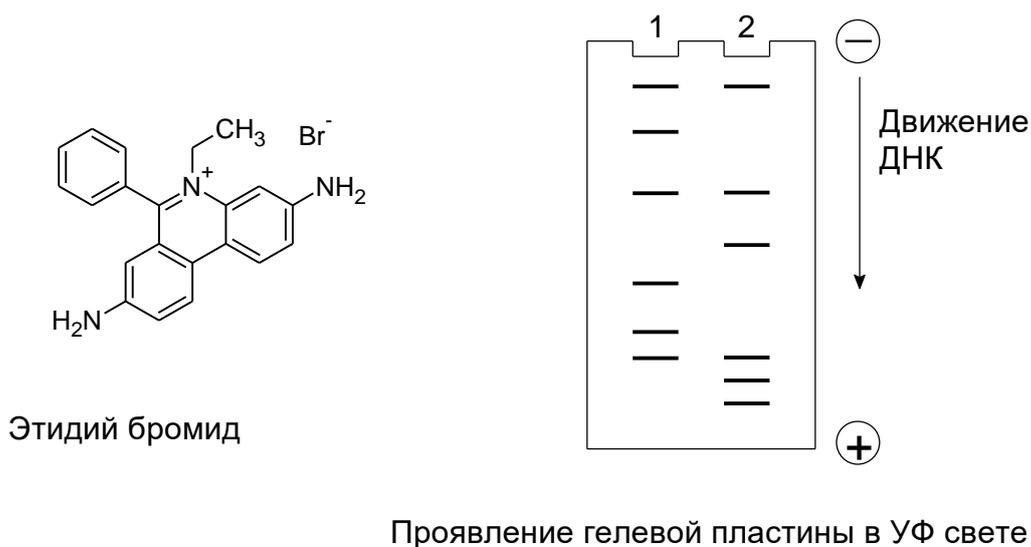


Рис. 38. Электрофорез в агарозном геле

7.2. «Ножницы» для ДНК

ДНК – очень длинная молекула, и исследовать её непосредственно практически невозможно. Поэтому ДНК разрезают на более короткие отрезки, состоящие из нескольких сотен оснований, которые выделяют, размножают и далее используют для определения последовательности нуклеотидов или для встраивания в ДНК какого-либо организма.

Разрезание ДНК на отрезки проводят с помощью специальных ферментов – **рестриктаз** (см. «Метилирование ДНК» в [1–4]). Из трёх типов рестриктаз используется только один – тип II, который впервые был выделен Смитом и Вилкоксом (Н.О. Smith, К.В. Wilcox, *J. Mol. Biol.*, 1970, 51, 379). В настоящее время выделен ряд ферментов подобного рода, и чаще всего используется рестриктаза ***EcoRI***, выделенная из кишечной палочки (*E. coli*). Фермент распознаёт палиндромный гексануклеотид 5'-ГААТТЦ-3' и разрывает его между Г и А, формируя таким образом острые «липкие» концы (рис. 39).

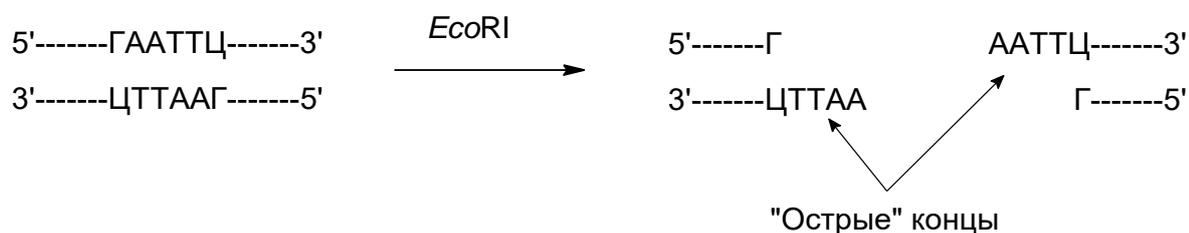


Рис. 39. Образование «липких» концов при действии рестриктазы *EcoRI*

Таблица 4

Наиболее часто используемые рестриктазы

(показана только одна цепочка 5' → 3', место разрыва указано косой чертой)

Рестриктаза	Распознаваемая последовательность	Тип концов	Организм
<i>Alu I</i>	АГ/ЦТ	тупые	<i>Arthrobacter luteus</i>
<i>BamH I</i>	Г/ГАТЦЦ	острые	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>Bgl II</i>	А/ГАТЦТ	острые	<i>Bacillus globigii</i>
<i>EcoR I</i>	Г/ААТТЦ	острые	<i>Escherichia coli</i>
<i>Hae III</i>	ГГ/ЦЦ	тупые	<i>Haemophilus aegyptius</i>
<i>Hinf I</i>	Г/АНТЦ*	острые	<i>Haemophilus influenzae</i> Rf
<i>Hind III</i>	А/АГЦТТ	острые	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd
<i>Not I</i>	ГЦ/ГГЦЦГЦ	острые	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>
<i>Pvu I</i>	Ц/ГАТЦГ	острые	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Pvu II</i>	ЦАГ/ЦТГ	тупые	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Sma I</i>	ЦЦЦ/ГГГ	тупые	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Taq I</i>	Т/ЦГА	острые	<i>Thermus aquaticus</i>

Примечание. * N – любой нуклеотид.

Некоторые рестриктазы II-го типа продуцируют не острые, а «тупые» концы в месте разрыва (табл. 4). Но место разрыва в этом случае также палиндром, как, например, для рестриктазы *AluI* (рис. 40).



Рис. 40. Образование «тупых» концов при действии рестриктазы

Рассмотрим пример применения рестриктаз. Для определения длины выделенного фрагмента ДНК проведён электрофорез этого фрагмента со смесью фрагментов (рис. 41). Эта смесь была получена действием рестриктаз *BamH I* и *Bgl I* на плазмиду pBR322 (подробнее о плазмиде и других объектах молекулярной биологии см. на сайте: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15367014?SID=srch-srp-15367014#/15367014?SID=srch-srp-15367014>).

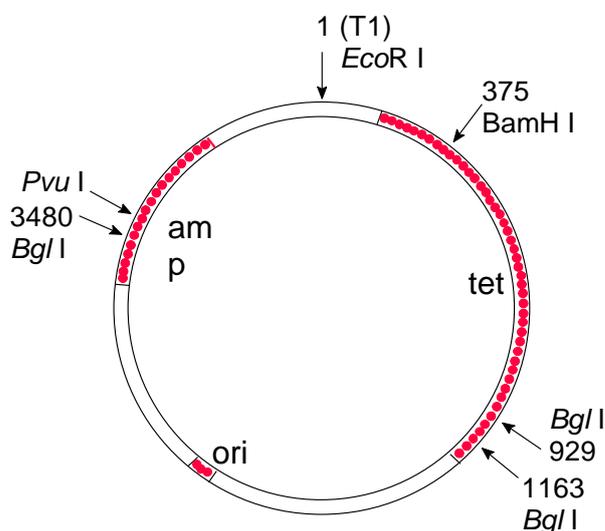


Рис. 41. Структура кольцевой ДНК плазмиды pBR322

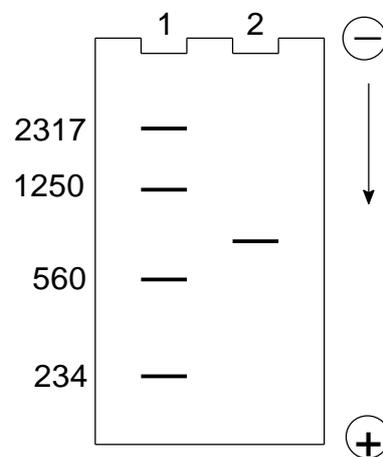


Рис. 42. Фрагменты после рестрикции ДНК плазмиды pBR322 рестриктазами *BamH I* и *Bgl I* (1-я дорожка) и неизвестная ДНК (2-я дорожка)

Плазмида имеет кольцевую ДНК, состоящую из 4361 нуклеотидных пар (НП, см. рис. 41). Нумерация нуклеотидов начинается с уникального сайта рестриктазы *EcoR* I, и первым нуклеотидом является тимидин (Т1) в этом сайте. От него ведётся нумерация нуклеотидов в кольце. Плазмида имеет также сайты распознавания рестриктаз *Bam*H I и *Bgl* I. Рестриктаза *Bgl* I распознаёт сайт 5'-ГЦЦNNNN/НГГЦ, где N – любой нуклеотид. Рестриктаза *Bam*H I наносит разрыв после 375-го нуклеотида, а *Bgl* I – после 935-го, 1163-го и 3480-го. В результате получается набор фрагментов строго определённой длины, и с ними можно сравнивать длину неизвестной ДНК (рис. 42). Препарат, содержащий плазмиду pBR322, представлен на рис. 43.



Рис. 43. Торговый препарат, содержащий 25 $\mu\text{г}$ (микрограммов) плазмиды pBR322

7.3. Гибридизация ДНК и блоттинг

После разрезания ДНК рестриктазами необходимо, во-первых, идентифицировать отрезок ДНК, содержащий требуемую нуклеотидную последовательность (или требуемый ген), и, во-вторых, выделить его в чистом виде. Проблема идентификации решается с помощью **гибридизации**. Для гибридизации необходимо знать короткую последовательность нуклеотидов, содержащуюся в искомом фрагменте, и синтезировать комплементарный олигонуклеотид. Добавление этого олиго-

нуклеотида в смесь приведёт к его связыванию с комплементарным участком искомого отрезка ДНК. Это и называется гибридизацией.

Но провести гибридизацию во время или после проведения электрофореза невозможно из-за лёгкого разрушения геля при попытке механических манипуляций с ним. Эта проблема была решена Эдвардом Саузерном (Edward Southern) в 1975 г. Технология заключается в переносе (блоттинге, blotting) ДНК из геля на механически и химически стойкую нейлоновую мембрану (рис. 44). В честь изобретателя технология называется блоттинг / перенос Саузерна. Технология в принципе проста, и её предшественником является промокание лишних чернил «промокашкой». Гель помещается на бумажный «фитиль», концы которого опущены в щелочной буфер. Сверху на гель накладывается мембрана, а на неё – стопка бумажных салфеток и груз. Буферный раствор поднимается под действием капиллярных сил вверх и впитывается бумажными салфетками, в результате чего ДНК переносится из геля на мембрану. После переноса мембрану нагревают, и ДНК фиксируется на ней, при этом цепочки двойной спирали расходятся. Таким образом, на мембране получается копия расположения ДНК в геле, и ДНК оказываются одноцепочечными.

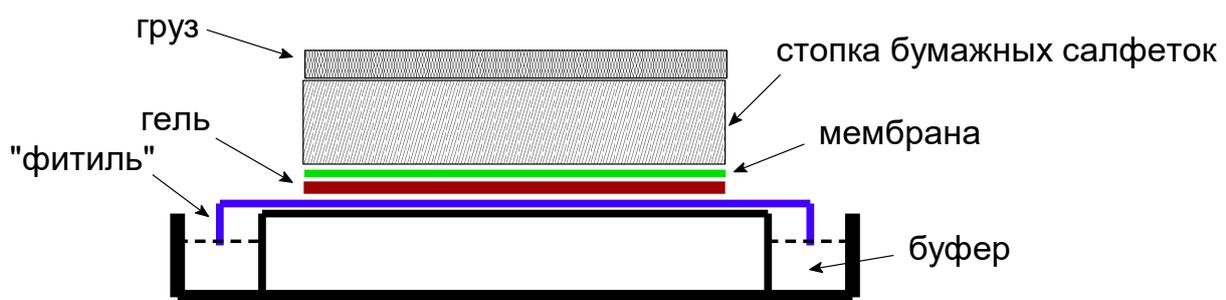


Рис. 44. Перенос ДНК на мембрану методом блоттинга («промокания»)

Теперь можно идентифицировать расположение интересующей нас ДНК на мембране (и в геле) с помощью синтезированного комплементарного олигонуклеотида. После идентификации соответствующая полоса может быть выделена (вырезана) из геля и чистая ДНК, которая нам необходима, вымывается из геля буферным раствором.

Синтез комплементарного олигонуклеотида усложняется с увеличением его длины, и поэтому необходимо определить его минимальную длину, достаточную для специфичного связывания с искомой ДНК. На практике гибридизацию проводят при температуре несколько ниже температуры плавления ($T_{пл}$) образующегося дуплекса, или гибрида ДНК с олигонуклеотидом. Олигонуклеотиды, содержащие 15–20 нуклеотидов, оказались оптимальны для гибридизации. Температуру проведения гибридизации вычисляют из следующего эмпирического уравнения, где А, Т, Г и Ц – количество соответствующих нуклеотидов в синтетическом олигонуклеотиде:

$$T_{пл} = \{4(\Gamma + Ц) + 2(A + T)\}^{\circ}C$$

Место локализации дуплекса (гибрида) на мембране определяют путём идентификации синтетического олигонуклеотида. Самый простой способ – синтезировать олигонуклеотид из радиоактивно меченых нуклеотидов. Но это не всегда удобно и небезопасно.

Более удобно использовать для этого **биотин**, который сильно и специфически связывается с белком **авидином**. Биотин присоединяют к олигонуклеотиду, комплементарному участку искомой ДНК, и после блоттинга обрабатывают мембрану этим олигонуклеотидом. Затем вымывают все негибридизованные нуклеиновые кислоты. Далее мембрану выдерживают в растворе авидина, к молекуле которого присоединена флуоресцентная метка. После этого расположение нужного фрагмента ДНК видно в УФ свете (рис. 45).

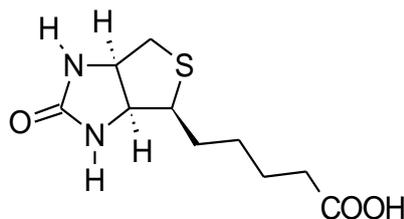


Рис. 45. Биотин

7.4. Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) была разработана в 1985 г. (R.K. Saiki, S. Skarf, F. Faloon, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, N. Arnheim. *Science*. 1985. 230. 1350.) и широко используется в молекулярной биологии для увеличения массы нуклеиновой кислоты. Для этого необходимо иметь два праймера, комплементарных 3'-концам цепей двойной спирали, и длина праймеров должна быть около 20 нуклеотидов (подумайте, почему).

Эксперимент начинают с нагрева ДНК до 95 °С, при этом цепочки двойной спирали расходятся. После этого добавляют праймеры, термостойкую ДНК-полимеразу и смесь четырёх дезоксинуклеозид-5'-фосфатов. Температуру понижают до того значения, при котором происходит гибридизация праймеров с одноцепочечными ДНК. Это температура чуть ниже температуры плавления гибрида ДНК и праймера. После этого начинает работать ДНК-полимераза, удлиняя 3'-конец праймера комплементарно нуклеотидам ДНК, т. е. идёт репликация ДНК. Затем опять нагревают смесь до 95 °С, цепи двухцепочечной ДНК расходятся, и проводят следующий цикл удвоения ДНК. Один цикл длится всего лишь 4–5 мин., и весь процесс легко автоматизируется. В процессе используется термостойкая ДНК-полимераза *Taq*, которая была выделена из термостойких бактерий *Thermus aquaticus*, и она способна вести полимеразную реакцию при 75 °С.

Метод ПЦР позволяет на порядки увеличить количество ДНК. Например, после 30 циклов количество ДНК увеличивается примерно в миллиард раз. Этот метод используется как в генной инженерии, так и для анализа ДНК, содержащейся в очень малых количествах в исследуемых образцах. Например, для обнаружения вирусных нуклеиновых кислот (в частности коронавирусов), а также малых количеств ДНК, образующихся вследствие активности теломеразы.

7.5. Секвенирование ДНК

Секвенирование ДНК – одно из важнейших достижений молекулярной биологии. Секвенирование ДНК было бы невозможным без открытия рестриктаз и совершенствования методов электрофореза, позволяющих определить длину ДНК при использовании полиакриламидного геля. Первоначально и практически одновременно было разработано два метода [6].

1. Метод, основанный на расщеплении цепочки ДНК (A.M. Maxam, W. Gilbert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. 74. 560). При этом цепочка разрывается при заданном нуклеотиде. Допустим, цепочка разрывается перед Г, и при этом разрыв происходит не везде, а только перед частью остатков гуанозина (Г). В результате получается набор отрезков ДНК, заканчивающихся нуклеотидом Г. Измерение длин этих отрезков даёт номера позиций, которые занята остатками гуанозина. Если провести ещё три подобных анализа – по А, Т и Ц, то получится последовательность нуклеотидов в ДНК. Проблема расщепления ДНК перед строго определённым нуклеотидом была решена, ДНК была секвенирована, но этот метод не получил широкого распространения из-за сложности проведения анализа.

2. Метод, основанный на копировании цепочки ДНК (F. Sanger, A. Nicklen, A.R. Coulson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. 74. 5463). Идея метода состоит в копировании цепочки ДНК в смеси нуклеозидтрифосфатов, в которой *один из трифосфатов присутствует в ограниченном количестве*. В результате этого генерируется набор отрезков ДНК, заканчивающихся позицией, на которой должен был присутствовать нуклеозид, присутствующий в ограниченном количестве в смеси.

Несмотря на преимущества данного метода по сравнению с методом расщепления, был разработан более совершенный метод, известный как **дидезокситерминационный метод** (*dideoxy chain termination method*). Он является основой всех современных методов секвенирования. В этом методе используются 2',3'-дидезоксинуклеозид-5'-три-

фосфаты. Они распознаются ДНК-полимеразой в качестве субстрата синтеза ДНК и встраиваются в цепочку синтезируемой ДНК. После этого рост цепи останавливается из-за отсутствия гидроксильной группы на 3'-конце цепочки как в 3'-, так и в 2'-положении рибозы (рис. 46).

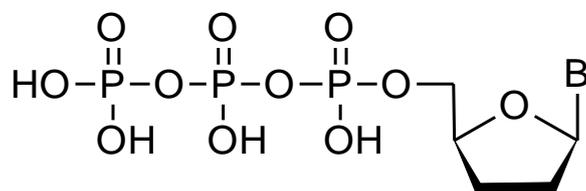


Рис. 46. 2',3'-дидезоксинуклеозид-5'-трифосфат

Для реализации метода необходимо знать короткую последовательность на 3'-конце одноцепочечной ДНК для синтеза праймера. К одноцепочечной ДНК добавляют синтезированный праймер, ДНК-полимеразу и смесь четырёх нуклеозид-5'-трифосфатов, а также небольшое количество (около 1 %) одного из четырёх дидезоксинуклеозид-5'-трифосфатов. В результате копирования одноцепочечной ДНК получается набор отрезков ДНК, заканчивающихся дидезоксинуклеотидом. Например, при добавлении дидезокситимидин-5'-трифосфата (ддТТФ) получается следующий набор фрагментов, длина которых даёт положения аденозинов в одноцепочечной исходной ДНК (рис. 47).

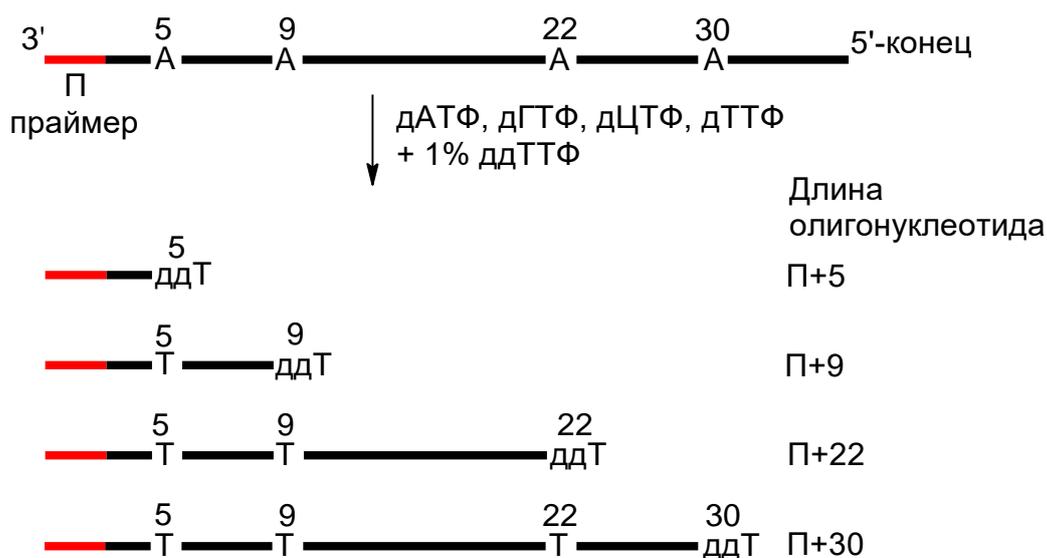


Рис. 47. Копирование ДНК в присутствии 2',3'-дидезоксинуклеотидов

Каждый фрагмент заканчивается дидезокситимидином, и длина фрагмента точно равна номеру аденозина, присутствующего в копируемой одноцепочечной ДНК. Измерив длину фрагментов с помощью электрофореза, устанавливают места расположения А в исходной ДНК. Проведя подобный эксперимент ещё три раза с добавками ддАТФ, ддГТФ и ддЦТФ, получают порядок расположения нуклеотидов в ДНК.

Для удобства чтения порядка нуклеотидов, все четыре смеси наносят на одну пластину геля. Наиболее длинный фрагмент оказывается сверху, пройдя минимальный путь в геле, а короткие – снизу. Остаётся только переписать пятна снизу вверх в порядке их следования, и получится последовательность нуклеотидов в исследуемой ДНК (рис. 48).

На одной пластине можно провести анализ ДНК длиной 400–500 нуклеотидов. Более длинные отрезки ДНК можно секвенировать на современных автоматических приборах. При этом существует ограничение по длине секвенируемого отрезка ДНК. Чем длиннее отрезки, получаемые при копировании, тем меньше между ними отличие, и тем меньше разница между соответствующими полосами на пластине геля. Поэтому, начиная с определённой длины, оказывается невозможным различить два отрезка ДНК, отличающиеся по длине на один нуклеотид.

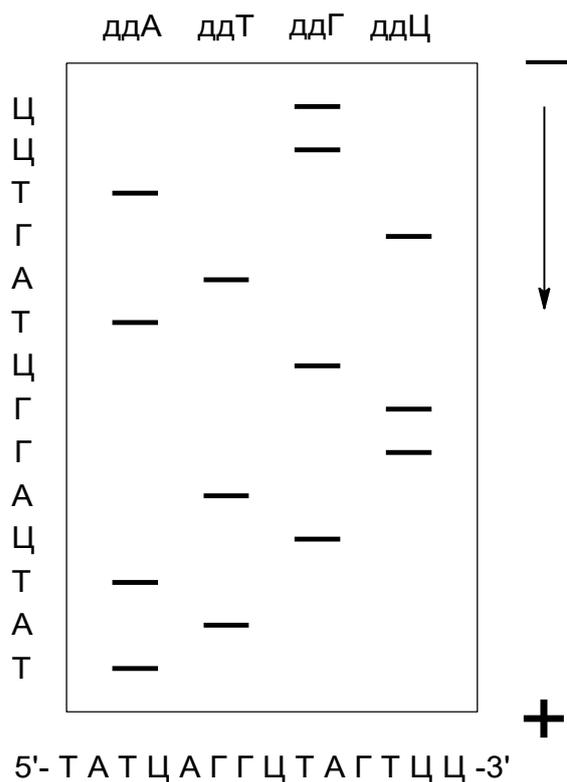


Рис. 48. Фрагмент пластины геля после копирования ДНК в присутствии дидезоксинуклеотидов

Таким образом, одной проблемой метода является ограничение по длине секвенируемой ДНК. Ещё одна проблема – использование однонитевой ДНК, в то время как природная ДНК существует в виде двойной спирали. Обе проблемы были успешно решены.

Для получения однонитевой ДНК используется бактериофаг M13, геном которого состоит из однонитевой циклической ДНК. Этот фаг инфицирует кишечную палочку (*E. coli*), и однонитевая ДНК выступает в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепочки. Получающаяся двуспиральная ДНК реплицируется в клетке бактерии обычным способом. При образовании вирусных частиц двухцепочечная ДНК превращается в одноцепочечную и упаковывается вирусными белками. Это свойство фага M13 и используется в процессе секвенирования. Для секвенирования надо вставить в двухспиральную фаговую ДНК отрезок ДНК, которую нужно секвенировать. После образования гибридных частиц фага, содержащих однонитевую ДНК, эти частицы можно непосредственно использовать для секвенирования.

Особенность фага M13 – наличие *полилинкера*, содержащего сайты распознавания различных рестриктаз (рис. 49).

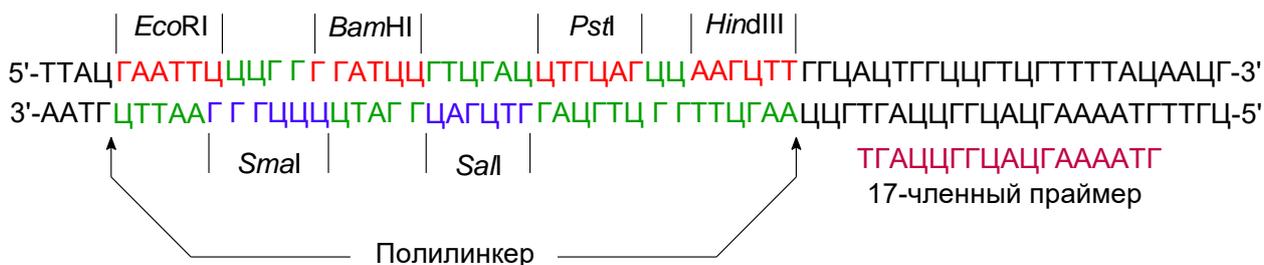


Рис. 49. Полилинкер и праймерный отдел ДНК фага M13

Отрезки секвенируемой двухспиральной ДНК, полученные с помощью одной из рестриктаз, вставляются в полилинкер. Полученную **рекомбинантную** ДНК вносят в клетки *E. coli*, и в результате функционирования фага получают вирусные частицы с одноцепочечной ДНК, содержащей секвенируемую цепочку. После выделения кольце-

вые вирусные (фаговые) одноцепочечные ДНК непосредственно подвергаются секвенированию с применением дидезоксинуклеотидов. Так как анализируются рекомбинантные вирусные ДНК в целом, то участок из 17 нуклеотидов фрагмента вирусной ДНК используется в качестве универсального праймера (см. рис. 49). Таким образом, применение фага M13 в качестве вектора решает сразу две проблемы:

- 1) получение одноцепочечной ДНК;
- 2) использование универсального праймера для любой секвенируемой ДНК.

Проблема секвенирования очень длинных ДНК решается путём разрезания её различными рестриктазами на более короткие отрезки, определение нуклеотидной последовательности этих отрезков и сложения этих отрезков в единую цепочку путём сравнения общих участков. Было разработано два варианта секвенирования очень длинных ДНК: метод движения вдоль ДНК (*walking along the sequence*) и метод множественных разрывов (*shotgun sequencing*). В первом случае ДНК последовательно разрывается на куски по несколько сотен нуклеотидов, последовательность нуклеотидов которых определяется с использованием одной пластины геля. Конец каждого куска используется в качестве праймера следующего. Недостаток метода заключается в необходимости каждый раз синтезировать новый праймер (рис. 50).

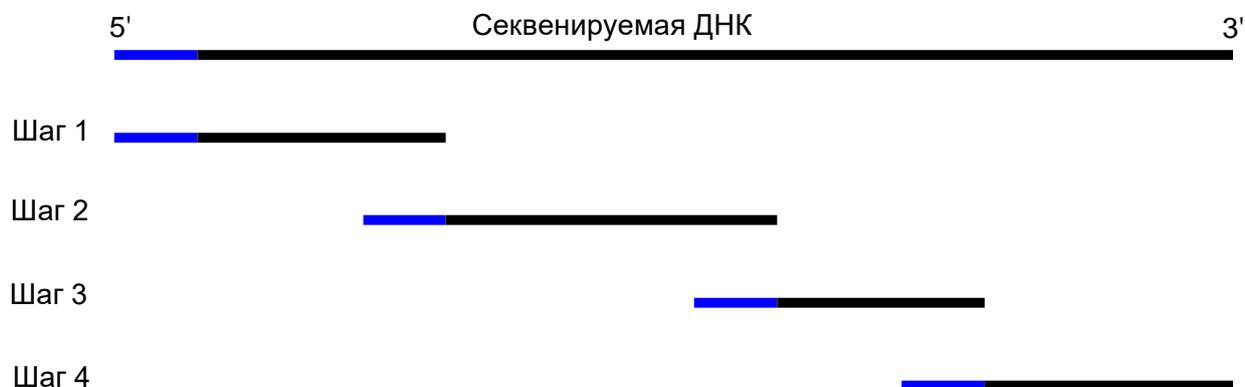


Рис. 50. Пошаговое секвенирование ДНК

Во втором случае (рис. 51) исследуемую ДНК расщепляют на короткие отрезки произвольным способом, используя набор рестриктаз. На каждом шаге используют одну-единственную рестриктазу, отрезки ДНК встраивают в вектор M13. Выделяют индивидуальные клоны вектора и определяют последовательность их ДНК. В результате на каждом шаге для индивидуальной рестриктазы получают набор нуклеотидных последовательностей. Они перекрываются для разных шагов (рестриктаз), что позволяет воссоздать последовательность всей исходной ДНК.



Рис. 51. Секвенирование ДНК методом случайных разрывов

Последний метод наиболее эффективен и используется в современных автоматических секвенаторах ДНК. Кроме этого, в отличие от ручного секвенирования, в приборах применяются дидезоксинуклеотиды, меченые флуоресцентными метками, и капиллярный электрофорез вместо электрофореза на пластинах (рис. 52).

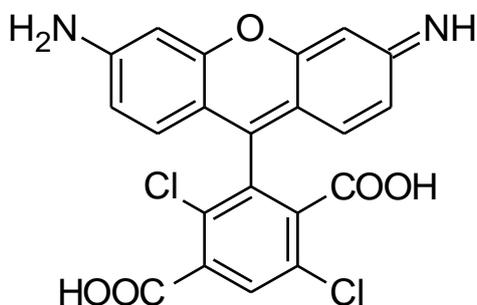


Рис. 52. Дихлорродамин

В качестве флуоресцентной метки используют производные дихлорродамина с максимумами флуоресценции при 540, 565, 595 и 620 нм.

Производные дихлорродамина соединяются с дидезокси-нуклеотидами специальными линкерами, а модифицированные ДНК полимеразы распознают подобные модифицированные нуклеотиды в качестве субстратов синтеза ДНК. В результате этого все четыре смеси, полученные с ддАТФ, ддГТФ, ддЦТФ и ддТТФ, можно анализировать на одной дорожке при электрофорезе. И вместо «дорожки» на пластине полиакриламидного геля используют капиллярный электрофорез. В отличие от пластины, разрешающая способность капиллярного электрофореза выше – он позволяет разделять отрезки ДНК, содержащие до 1000 нуклеотидов. После проведения электрофореза датчик движется вдоль капилляра и детектирует участки с флуоресценцией. Номер участка даёт номер нуклеотида в ДНК, а цвет флуоресценции – тип нуклеотида. Данные автоматически вводятся в компьютер, и спектральная картинка легко трансформируется в последовательность четырёх букв – А, Т, Г и Ц (рис. 53–55).



Рис. 53. Секвенатор ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer:
общий вид и блок из 16 капилляров

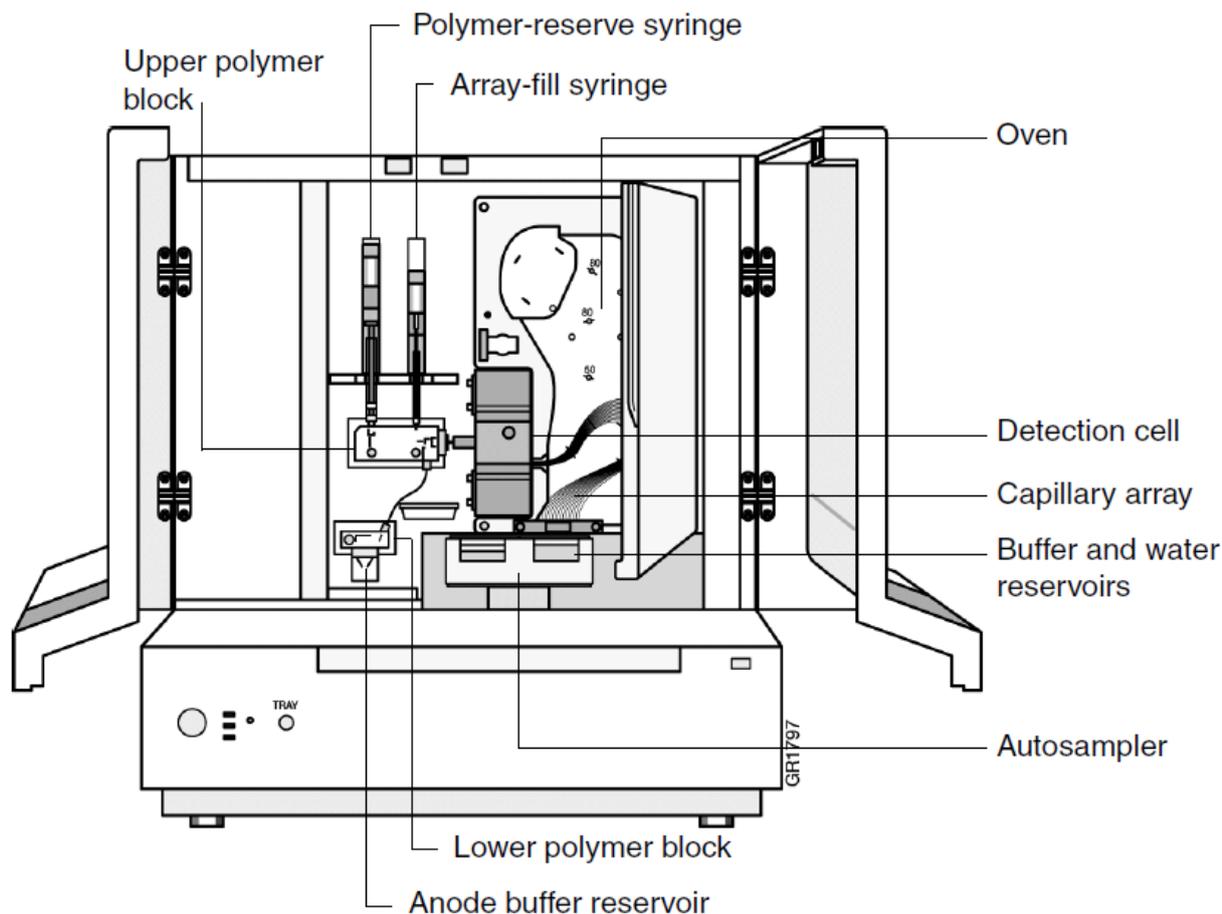


Рис. 54. Схема секвенатора ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer

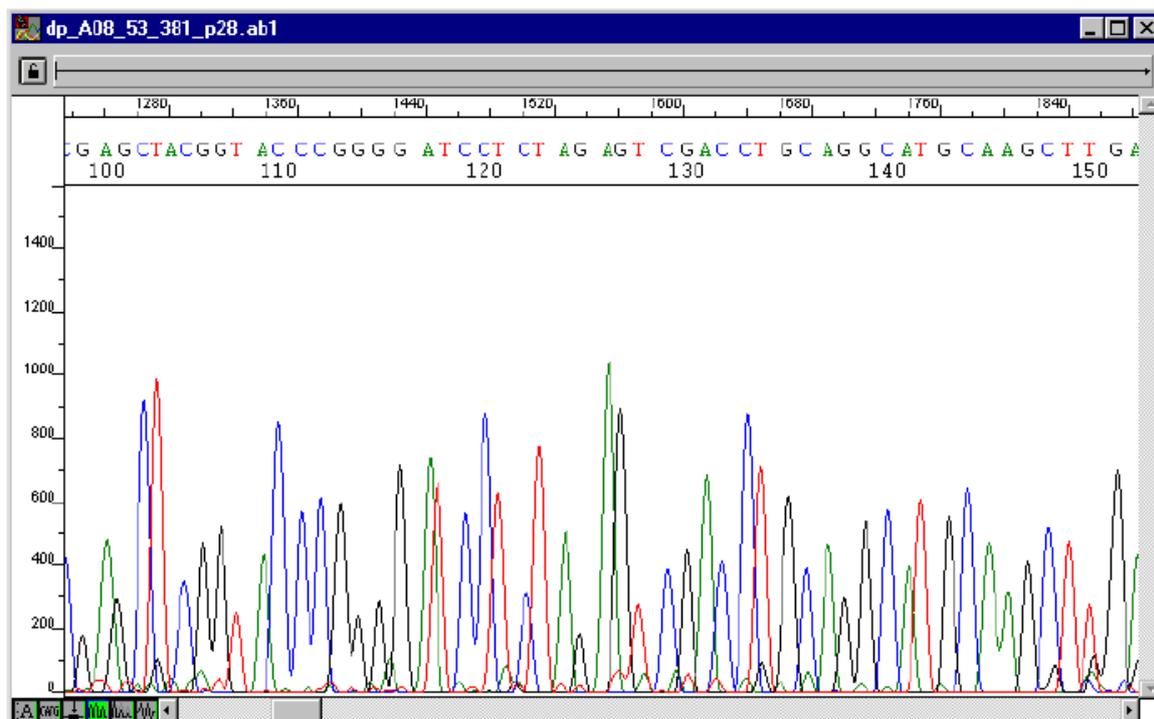


Рис. 55. Компьютерное представление результатов анализа ДНК секвенатором ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer: каждому типу нуклеотида соответствует пик одного из четырёх цветов

При ручном способе можно нанести на одну гелевую пластину до 20 образцов, или 5 наборов по 4 дорожки, что даёт общую длину расшифрованной ДНК около 2000 нуклеотидов. При этом расшифровка ДНК длиной 1 000 000 нуклеотидов потребует около 500 подобных анализов, что займёт более года работы. Современные секвенаторы позволяют одновременно анализировать несколько сотен образцов, и ДНК длиной 1 000 000 нуклеотидов может быть расшифрована за один день.

7.6. Генная инженерия

Генная инженерия – это наука о методах изменения генома живого организма (существует также понятие генетической инженерии). При изменении генома изменяется функционирование клетки и всего организма или получается организм другого вида. В последнем случае нужно добавить и / или убрать несколько генов. «Генетическая модификация человека» – эта фраза звучит пугающе, но изменение генома человека – единственный способ лечения генетических заболеваний. Термин «редактирование генома» меньше пугает обывателя, хотя и в этом случае используются те же методы генной инженерии.

Цель генной инженерии – создание новых организмов с полезными свойствами, например, новых сельскохозяйственных культур, новых штаммов микроорганизмов. Так, человеческий инсулин производится с 1982 года генно-модифицированными бактериями, в геном которых вставлен ген человеческого инсулина. Этот метод позволяет производить инсулин в необходимом количестве, и лечение диабета производимым препаратом не вызывает побочных эффектов.

Впервые геном был изменён в случае бактерий, и на примере бактерий рассмотрим подобную технологию. Идея проста. Например, в случае производства инсулина, необходимо, во-первых, выделить отрезок ДНК, содержащий данный ген, и, во-вторых, вставить этот отрезок в ДНК бактериальной клетки. Для этих операций используются рестриктазы, электрофорез, гибридизация, олигонуклеотидный синтез, полимеразная цепная реакция, блоттинг и другие методы [5, 6].

Для выделения нужного отрезка ДНК исходную ДНК подвергают действию рестриктаз, в результате чего образуется набор отрезков, которые разделяют с помощью электрофореза. Далее необходимо выяснить, где находится нужная нам ДНК. Для этого синтезируют 20–25-членный олигонуклеотид, комплементарный известному участку искомого фрагмента. С помощью блоттинга и гибридизации определяют местоположение нужного фрагмента на пластине геля. Смывают этот отрезок ДНК с геля и размножают его с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). В результате получают миллиграммовые количества материала, который необходимо вставить в геном бактерии.

Для «вставки» используют специальную конструкцию – **вектор**. Это обычно бактериальная плазмида, имеющая кольцевую ДНК, и наиболее популярным вектором является плазмида pBR322. Эту плазмиду мы уже рассматривали при обсуждении рестриктаз, и теперь необходимо пояснить, что означают фрагменты ДНК, выделенные красным цветом (затемнённые участки) (рис. 56).

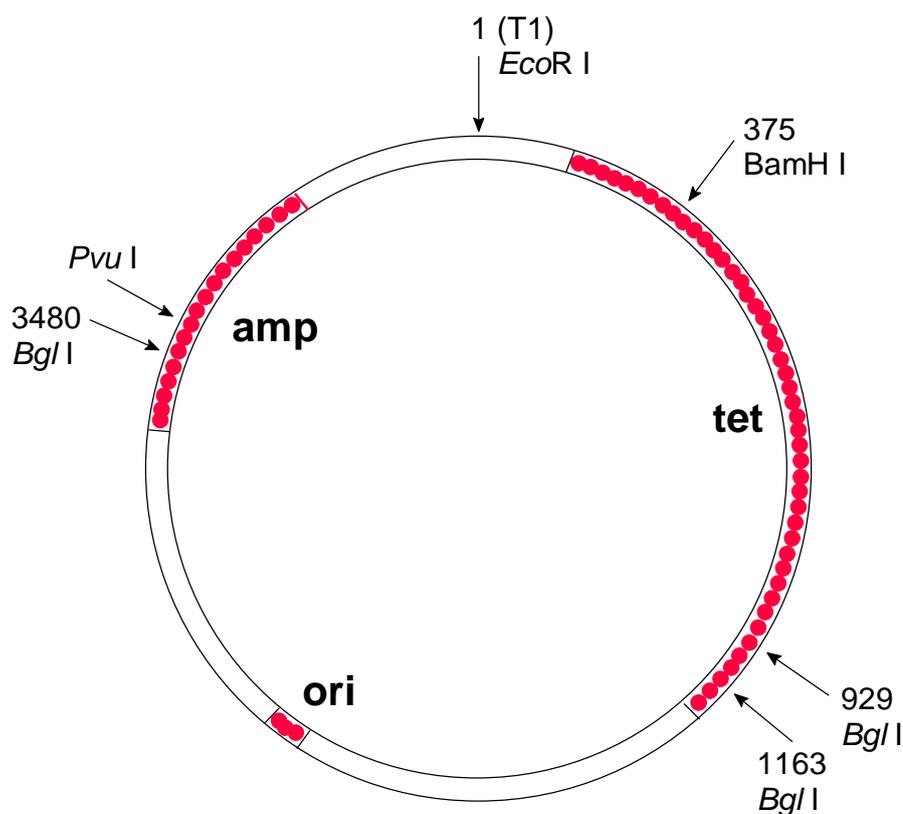


Рис. 56. Структура кольцевой ДНК плазмиды pBR322: **amp** и **tet** – гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину; **ori** – место начала репликации

Вектор используется не только в генной инженерии, но и для очистки и преумножения ДНК после электрофореза, что заменяет метод ПЦР. ДНК плазмиды содержит сайты распознавания нескольких рестриктаз. Допустим, мы получили отрезок ДНК с искомым геном с помощью рестриктазы *Bam*HI. Подействовав на плазмиду этой же рестриктазой, получим разрыв, содержащий «острые» / «липкие» концы, комплементарные «острым» концам нашего отрезка ДНК. Добавляем эту ДНК, и она встраивается в разрыв плазмидной ДНК благодаря этим комплементарным «липким» концам. После добавления лигазы концы сшиваются и образуются **рекомбинантные плазмиды**. Для переноса плазмид в клетку *E. coli* смешивают клетки и плазмиды в холодном растворе CaCl_2 и кратковременно нагревают его до 42 °С. При этом плазмиды проникают внутрь клетки. До сих пор механизм этого процесса не ясен, но метод работает.

При получении рекомбинантных плазмид плазмиды берут в избытке по отношению к вставляемой в них ДНК. Поэтому после действия лигазы получается смесь обычных и рекомбинантных плазмид, и не во все бактериальные клетки плазмиды попадают. Таким образом, нужно решить две задачи:

- 1) выделить клетки с плазмидами (трансформированные);
- 2) отобрать среди этих клеток клетки с рекомбинантными плазмидами.

Для этого используются селективные **маркеры**, имеющиеся в геноме плазмиды. Это и есть участки генома, выделенные красным. Один участок – ген, продуцирующий белок, благодаря которому бактерия становится устойчивой к действию ампициллина, другой – ген устойчивости к тетрациклину.

После обработки бактерий вектором в растворе CaCl_2 переносят отдельные бактерии в чашку Петри с питательным раствором, и бактерии начинают размножаться. Каждая бактерия образует свою колонию, в которой все бактерии одинаковы. После обработки всех колоний ампициллином нетрансформированные бактерии погибают, а остаются только те, в которых присутствуют плазмиды с геном устойчивости к этому антибиотику. Первая задача решена.

Рекомбинантные плазмиды отличаются от исходных тем, что вставка под действием рестриктазы *Bam*HI произошла в участке гена устойчивости к тетрациклину. В результате этот ген перестаёт «работать», и бактерия с рекомбинантной плазмидой теряет устойчивость к тетрациклину. Но нам нужны живые бактерии с рекомбинантными плазмидами, а их тетрациклин убивает. Следовательно, колонии бактерий «промокают» мембраной, на которую переносится часть бактерий каждой колонии. Затем обрабатывают мембрану тетрациклином, после чего выясняется, какие колонии не устойчивы к этому антибиотику. В результате выделяют из чашки Петри эти колонии и получают бактерии, содержащие рекомбинантные плазмиды. Далее бактерии с генно-модифицированными плазмидами можно использовать для продуцирования белка, который кодирует ДНК-«вставка». Или после размножения бактерий, можно выделить плазмиды и вырезать вставленный участок с помощью рестриктазы *Bam*HI, тем самым получить большее количество и идеально чистой интересующей нас ДНК.

В описанном выше случае нужный нам белок продуцируется гибридной плазмидой, вставленной в бактериальную клетку, но существуют и другие способы вставки чужеродного гена в ДНК-клетки хозяина. Например, в качестве векторов используют фаги, вирусы и транспозоны. Кроме того, для генной модификации растений была модифицирована бактерия-паразит *Agrobacterium tumefaciens*. Её ДНК распознаётся многими растениями как своя собственная, реплицируется и встраивается в ДНК клетки растения. Таким образом, эта бактерия выполняет функцию природного вектора. Модификация агробактерии заключается в удалении «вредных» генов и встраивании «полезных». После этого бактерия переносит заданный генетический материал в растительную клетку.

Наиболее простым методом генной модификации является обстрел клеток растений микрочастицами вольфрама или золота размером 1–2 мкм с нанесёнными на них отрезками ДНК. Частицы металла пробивают мембрану насквозь, а ДНК остаётся в клетке, и достаточно лишь несколько случаев подобных событий. Отверстия в мембране

затягиваются, и остаётся только отобрать нужные колонии клеток. Работа напоминает обычную селекцию.

С помощью агробактерии была проведена генетическая модификация кукурузы, сои, томатов, картофеля, хлопчатника, злаковых и других сельскохозяйственных культур (компания *Monsanto*). Например, был выведен сорт картофеля, устойчивый к колорадскому жуку. Для этого в ДНК картофеля был введён ген *CryIIIА*, который кодирует природный гербицид пептидной природы. В отличие от природных генов (*CryI*, *Cry4* и др.), встроенный синтетический ген продуцирует в листьях картофеля белковый природный гербицид в количествах, на порядок превышающих летальную дозу для колорадского жука. В России два сорта картофеля (*NewLeaf*), устойчивого к колорадскому жуку, получили сертификат безопасности в 2002 году. Выращивание этого картофеля позволило не только эффективно бороться с колорадским жуком, но и существенно снизить применение гербицидов и инсектицидов. Снижение «химической» нагрузки на поля – это ещё одна проблема, решаемая с помощью генной инженерии.

Таким образом, исследования в области молекулярной биологии и генно-инженерные технологии не только открыли «тайну» наследования свойств, изменчивости и эволюции живых организмов, но и позволили управлять этими процессами. В результате человечество получило новые сельскохозяйственные культуры, биотехнологические продукты медицинского назначения (инсулин и др.), а также способ лечения наследственных заболеваний.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Назовите два класса нуклеиновых кислот, в чем их различия?
2. Назовите основные исторические этапы развития молекулярной биологии.
3. Как была открыта ДНК?
4. Как происходило открытие генов, кодирования белков ДНК?
5. Что такое трансляция?
6. Что такое генетический код?
7. Как происходит синтез белка?
8. Перечислите основные этапы трансляции.

9. Что такое транскрипция?
10. Перечислите основные этапы транскрипции и транскрипционные факторы.
11. Перечислите типы структур белков, связывающихся с ДНК.
12. Перечислите общие факторы транскрипции.
13. Что такое опероны? Какие они бывают?
14. Что такое репликация ДНК?
15. Какова структурная организация ДНК в хромосомах?
16. Что такое клеточный цикл?
17. Перечислите основные характеристики репликации ДНК.
18. Что такое репликация теломерных концов ДНК?
19. Что такое теломеры? Каким образом длина теломер может быть восстановлена?
20. Изобразите структуру теломеразы.
21. Перечислите методы анализа ДНК и секвенирования генома.
22. Дайте определение терминам: электрофорез; «ножницы» для ДНК; гибридизация ДНК; блоттинг.
23. Что такое полимеразная цепная реакция? Назовите область её применения. Перечислите основные этапы ПЦР.
24. Что такое секвенирование ДНК?
25. Перечислите основные методы и инструменты генной инженерии.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

Опыт 1. ИЗВЛЕЧЕНИЕ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВ ДРОЖЖЕЙ

Ход работы. В фарфоровую ступку помещают 1 г дрожжей, добавляют 5 капель этилацетата, 10 капель дистиллированной воды, около 0.1 г стеклянного песка. Дрожжевую массу растирают пестиком 1–2 мин, затем в ступку добавляют 4 мл 0.5 %-ного раствора NaOH и растирание продолжают в течение 5 мин. Содержимое ступки пипеткой переносят в центрифужную пробирку, уравнивают с другой пробиркой с водой и центрифугируют в течение 10 мин. Надосадочную жидкость переносят в стакан с 30–40 мл воды, подкислённой уксусной кислотой до $pH = 4.5$. Выпавший осадок РНК-протеина отделяют центрифугированием.

Опыт 2. ВЫДЕЛЕНИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОПРОТЕИНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

Ход работы. 1–2 г селезенки (или других тканей) тщательно растирают в ступке с равным количеством стеклянного порошка, приливая постепенно небольшими порциями 15–20 мл 5 %-ного раствора хлорида натрия, содержащего 0.04 % трёхзамещённого цитрата натрия (ингибитор ДНК-азы). Полученный вязкий раствор центрифугируют (15 мин. при 3000 об/мин). Объём надосадочной жидкости измеряют цилиндром, затем помещают её в стакан. К полученному раствору медленно приливают шестикратный объём дистиллированной воды. Образовавшиеся нити дезоксирибонуклеопротеидов осторожно наматывают на деревянную палочку.

Опыт 3. ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВ ДРОЖЖЕЙ

Ход работы. 500 мг дрожжей помещают в круглодонную колбу и добавляют 12 мл 10 %-ного раствора серной кислоты и 12 мл дистиллированной воды. Перемешивают и закрывают обратным холодильником. Колбу помещают в кипящую водяную баню и кипятят 1 ч. Затем колбу охлаждают, фильтруют содержимое и с фильтратом (гидролизатом нуклеопротеинов) проводят реакции на составные части нуклеотидов.

1. Биуретовая реакция на белок

К 5–6 каплям фильтрата (гидролизата нуклеопротеинов) прибавляют 10 капель 10 %-ного раствора NaOH и 1 каплю 1 %-ного раствора медного купороса. При наличии белка жидкость окрашивается в розово-фиолетовый цвет.

2. Серебряная проба на пуриновые основания

К 0.5 мл фильтрата (гидролизата нуклеопротеинов) добавляют аммиак до щелочной реакции на лакмус и 0.5 мл аммиачного раствора оксида серебра. Через 5 мин. при стоянии выпадает небольшой хлопьевидный осадок серебряных соединений пуриновых оснований. Нитрат серебра можно заменить на нитрат ртути!

3. Реакция на пентозы

К 0.5 мл гидролизата добавляют 0.5 мл 10 %-ного раствора NaOH и по каплям раствор сульфата меди до образования гидрата окиси меди (аморфный голубоватый осадок), при этом необходимо избегать избытка сульфата меди. Нагревают до кипения. В случае присутствия моносахаридов (пентоз) образуется красный осадок закиси меди.

4. Молибденовая проба на фосфорную кислоту

К 0.5 мл гидролизата прибавляют равный объём молибденового реактива и кипятят несколько минут, жидкость окрашивается в лимонно-жёлтый цвет. При охлаждении образуется жёлтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

Опыт 4. ВЫДЕЛЕНИЕ И РАЗДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ШМИДТА И ТАНГАУЗЕРА

Данный метод позволяет выделить из одной навески биологического материала ДНК и РНК, проводят работу в два этапа. На первом этапе удаляют низкомолекулярные растворимые в кислой среде соединения путем экстракции гомогената раствором 0.5 Н HClO_4 или 5 %-ным раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ). На втором этапе разделяют ДНК и РНК, используя различную устойчивость ДНК и РНК к щелочному гидролизу.

Во время щелочного гидролиза в молекуле РНК происходит образование фосфоэфирной связи между соседними фосфатными группами и свободными 2-гидроксилами рибозы. В результате образуется неустойчивый фосфотриэфир, который распадается с образованием нуклеозид-2-фосфата. Последний также быстро гидролизует, после чего получается смесь нуклеозид-2-фосфатов и нуклеозид-3-фосфатов. Таким образом, РНК распадается, образуя смесь 2- и 3-мононуклеотидов.

В молекуле ДНК в положении 2 дезоксирибозы гидроксильная группа отсутствует, поэтому образование циклических фосфатов невозможно, и ДНК оказывается устойчивой в условиях щелочного гидролиза.

Реактивы

1. 0.5 Н HClO_4 или 5 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).
2. 0.5 г пекарских дрожжей.
3. Смесь этанол-хлороформ (3:1).
4. Смесь этанол-этилацетат (1:1).
5. 0.5 Н Раствор КОН.
6. Конц. HClO_4 (5,7 н).
7. 1 н Раствор HClO_4 .

Приборы и принадлежности: ступки для растирания дрожжей, центрифуга и пробирки к ней, термостат на 37 и 80 °С, пипетки, пробирки, стеклянные палочки.

Ход работы. Дрожжи растирают в ступке с 10 мл 0.5 н HClO_4 или 5 % ТХУ в течение 10 мин. Полученный гомогенат центрифугируют в течение 15 мин. с максимальной скоростью. Раствор, содержащий различные низкомолекулярные соединения, отбрасывают. Осадок содержит белки, нуклеиновые кислоты, липиды.

Осадок промывают смесью этанол-хлороформ (3:1), приливая к осадку 10 мл смеси и хорошо помешивая стеклянной палочкой. Центрифугируют в течение 10 мин. с максимальной скоростью и надосадочный раствор, содержащий липидные вещества, отбрасывают (раствор переливают в колбу «Слив этанол-хлороформ»). К осадку приливают 10 мл смеси этанол-этилацетат (1:1) и перемешивают, чтобы удалить оставшиеся липидные соединения. Центрифугируют в тех же условиях, надосадочный раствор отбрасывают (раствор переливают в колбу «Слив этанол-этилацетат») и оставляют осадок, содержащий белки и нуклеиновые кислоты.

К полученному осадку добавляют 5 мл 0.5 Н раствора КОН и проводят щелочной гидролиз в течение 1 ч. при 37 °С, для этого пробирки помещают в термостат. В результате этой обработки происходит гидролиз полимерной РНК до растворимых в кислой среде продуктов. После гидролиза раствор охлаждают и добавляют раствор конц. HClO_4 (5.7 Н) до $\text{pH} = 1$ по универсальному индикатору, при этом необходимо учесть, что часть кислоты расходуется на нейтрализацию КОН. В этих условиях в осадок выпадают ДНК, белки и плохо растворимая соль KClO_4 , а продукты гидролиза РНК остаются в растворе. Пробу центрифугируют в указанных выше условиях и собирают надосадочный раствор (гидролизат РНК).

Осадок, содержащий ДНК, заливают 7 мл 1 Н раствором HClO_4 , перемешивают и нагревают в термостате при 80 °С в течение 30 мин.

Пробы охлаждают и затем центрифугируют для отделения осадка, содержащего продукты, не подвергшиеся гидролизу (15 мин, макс. обороты). Надосадочный раствор, содержащий гидролизат ДНК, оставляют для определения в нем компонентов ДНК.

Качественная реакция на определение D-рибозы в гидролизате РНК

К 1 мл гидролизата РНК приливают 2 мл свежеприготовленного орцинового реактива и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. – в присутствии D-рибозы развивается ярко-зелёное окрашивание.

Качественная реакция для определения D-дезоксирибозы в гидролизате ДНК

К 1 мл гидролизата ДНК добавляют 2 мл свежеприготовленного дифениламинового реактива и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин. – в присутствии D-дезоксирибозы появляется синее окрашивание.

Чтобы выявить наличие примесей D-рибозы в гидролизате ДНК и наличие D-дезоксирибозы в гидролизате РНК, проводят орциновую пробу с гидролизатом ДНК и дифениламиновою пробу с гидролизатом РНК, при этом окраска должна практически отсутствовать, если получены чистые гидролизаты ДНК и РНК.

Количественные методы анализа гидролизатов РНК и ДНК

Для проведения количественного анализа состава гидролизаты РНК и ДНК следует предварительно развести в соотношении 1:50 (1 мл гидролизата и 50 мл воды). Полученные растворы хорошо перемешивают и исследуют на количественный состав компонентов.

Опыт 5. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК И ДНК

При гидролизе РНК и ДНК отщепляется неорганический фосфор в виде фосфатов, количество которого можно рассчитать по разнице поглощения при 270 и 290 нм. Полученные разбавленные растворы гидролизатов РНК и ДНК помещают в кварцевые кюветы для фотометрии и измеряют поглощение при заданных длинах волн. Результаты измерения заносят в табл. 5.1.

Таблица 5.1

Результаты измерений

РНК		ДНК	
Длина волны, нм	Поглощение, А	Длина волны, нм	Поглощение, А
270		270	
290		290	

Различия в нуклеотидном составе РНК и ДНК при этих длинах волн сглаживаются, поэтому можно пользоваться формулой для расчёта количества «Нуклеинового фосфата»:

$$(\text{Фосфаты РНК или ДНК}) = (A_{270} - A_{290}) \cdot 0.19, \text{ мг фосфора.}$$

Для того чтобы перейти от количества фосфора к количеству РНК, умножают полученное значение для фосфора на 10.5, а для расчёта количества ДНК умножают значение фосфора на 10.1 (содержание фосфора в РНК, в среднем, равно 9.5%, а в ДНК – 9.9%).

Опыт 6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОРА В ГИДРОЛИЗАТАХ РНК И ДНК

При обработке растворов, содержащих фосфор, молибденовокислым аммонием в кислой среде образуется фосфорномолибденовая кислота $H_7[P(Mo_2O_7)_6]$. При взаимодействии с восстановителем образуется смесь комплексных соединений, содержащих молибден с различной валентностью. Смесь этих комплексов растворима в воде

и называется общим термином – «молибденовая синь». Интенсивность синей окраски пропорциональна количеству фосфора, которое определяют по калибровочному графику, построенному со стандартным раствором фосфора.

Данный метод позволяет определить от 5 до 50 мкг фосфора в мл, поэтому предварительно необходимо развести гидролизаты РНК и ДНК в зависимости от того содержания фосфора, которое определено спектрофотометрическим методом (см выше).

Реактивы

1. 0.42 %-ный раствор молибденовокислого аммония $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, приготовленного на 1 н серной кислоте – **раствор 1**.

2. 1 %-ный раствор аскорбиновой кислоты, приготовленный на 0.001 М растворе $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (восстановитель) – **раствор 2**.

3. Смесь из шести объёмов **раствора 1** и одного объёма **раствора 2** готовят непосредственно перед определением и при необходимости хранят в холоде 2–3 ч. – **раствор 3**.

4. Стандартный раствор, содержащий 0.050 мг фосфора в 1 мл. Для его приготовления обычно используют перекристаллизованный KH_2PO_4 .

Приборы и принадлежности: термостат на 45 °С, УФ-спектрофотометр с кюветами, бюретки для растворов, пипетки, пробирки.

Ход работы. Для построения калибровочного графика в 5 пробирок вносят 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 и 1.0 мл стандартного раствора фосфора, а в контрольную пробу вносят 1.0 мл воды. В опытные пробы добавляют от 0.1 до 1 мл воды. В опытные пробы добавляют от 0.1 до 1.0 мл гидролизатов РНК и ДНК, предварительно разбавленных, в зависимости от содержания фосфора, определённого спектрофотометрически. Объём всех проб доводят водой до 1 мл и прибавляют по 2 мл смеси **раствора 3**. Пробирки помещают в термостат при 45 °С на 20 мин. и затем определяют поглощение с помощью УФ-спектрофотометра при длине волны 625 нм. Результаты измерений заносят в табл. 6.1.

Результаты измерений

	Вода	Стандартный раствор KH_2PO_4					РНК	ДНК
Объём, мл	1.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1		
Поглощение								

Калибровочный график строят в координатах «оптическая плотность – концентрация дигидрофосфата». Концентрацию фосфора в гидролизатах РНК и ДНК определяют по калибровочному графику с учётом разведения растворов.

Опыт 7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ D-РИБОЗЫ В ГИДРОЛИЗАТЕ РНК

Данный метод основан на том, что D-рибоза при нагревании с концентрированными минеральными кислотами превращается в фурфурол и конденсируется с орцином, образуя комплекс, окрашенный в зелёный цвет. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию рибозы, что используют для количественного определения РНК по её углеводному компоненту.

Реактивы

1. Орциновый реактив (свежеприготовленный).
2. Стандартный раствор рибозы $0.2 \cdot 10^{-3}$ М (32 мкг/мл).

Приборы и принадлежности: УФ-спектрофотометр с кюветами, бюретки для растворов, пипетки, пробирки.

Ход работы. Для построения калибровочного графика в 5 пробирок вносят 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 и 1.0 мл стандартного раствора D-рибозы, в контрольную пробу вносят 1 мл воды. В опытные пробы вносят от 0.1 до 1.0 мл разбавленного гидролизата РНК, объём всех проб доводят до 1.0 мл и добавляют по 2 мл орцинового реактива, перемешивают и помещают в кипящую водяную баню на 15–20 мин. После нагревания развивается зеленое окрашивание, интенсивность которого измеряют на УФ-спектрофотометре при длине волны 670 нм. Результаты измерений заносят в табл. 7.1.

Результаты измерений

	Вода	Стандартный раствор рибозы					РНК
Объём, мл	1.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1	0.1–1
Поглощение							

Калибровочный график строят в координатах «оптическая плотность – концентрация D-рибозы». Концентрацию D-рибозы в гидролизате РНК определяют по калибровочному графику с учётом разведения раствора.

Опыт 8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ D-2-ДЕЗОКСИРИБОЗЫ В ГИДРОЛИЗАТЕ ДНК

Данный метод основан на том, что 2-дезоксирибоза в присутствии концентрированных минеральных кислот превращается в фурфуроловый спирт, который конденсируется с дифениламином, образуя комплекс синего цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию 2-дезоксирибозы, что используют для количественного определения ДНК по её углеводному компоненту.

Количество 2-дезоксирибозы определяют с помощью калибровочного графика, который строят со стандартным раствором.

Реактивы

1. Дифениламиновый реактив (реактив Дише).
2. Стандартный раствор 2-дезоксирибозы $0.4 \cdot 10^{-3}$ М (64 мкг/мл).

Приборы и принадлежности: УФ-спектрофотометр с кюветами, бюретки для растворов, пипетки, пробирки.

Ход работы. Для построения калибровочного графика в 5 пробирок вносят 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 и 1.0 мл стандартного раствора 2-дезоксирибозы, в контрольную пробу вносят 1 мл воды. В опытные пробы вносят от 0.1 до 1.0 мл разбавленного гидролизата ДНК, объём всех проб доводят до 1.0 мл и добавляют по 2 мл дифениламинового реактива, перемешивают и помещают в кипящую водяную баню на 10 мин.

После нагревания развивается синее окрашивание, интенсивность которого измеряют на фотоэлектроколориметре при длине волны 605 нм. Концентрацию 2-рибозы в гидролизатах ДНК определяют по калибровочному графику с учётом разведения растворов.

Опыт 9. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТИСТЫХ ОСНОВАНИЙ

Для количественного определения азотистых оснований измеряют поглощение раствора (например, гидролизата ДНК или РНК) и рассчитывают концентрацию данного основания, используя закон Бугера – Ламберта – Бера и поглощение раствора при длине волны, характерной для данного основания. В табл. 9.1 приведены молярные коэффициенты поглощения основных пуриновых и пиримидиновых оснований, входящих в состав РНК и ДНК – величины этих коэффициентов используют для расчёта концентраций азотистых оснований. Например, гидролизат имеет поглощение при 260 нм, равное 0.670. В этом случае концентрация аденина равна:

$$K_{\text{аденин}} = 0.670 : (13.4 \cdot 10^3) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ М.}$$

Результаты количественного определения продуктов гидролиза нуклеиновых кислот даны в табл. 9.2.

Таблица 9.1

Молярные коэффициенты азотистых оснований РНК и ДНК

Основание	Молярный коэффициент, 10^3	Длина волны, нм
Аденин	13.3	260
Гуанин	7.2	250
Цитозин	5.55	268
Тимин	7.4	270
Урацил	8.2	258

**Результаты количественного определения продуктов гидролиза
нуклеиновых кислот**

Гидролизат РНК		Гиролизат ДНК	
Компонент	Концентрация, моль/л	Компонент	Концентрация, моль/л
РНК, г		ДНК, г	
Фосфат, г		Фосфат, г	
D-Рибоза		2-Дезоксирибоза	
Азотистые основания		Азотистые основания	
Аденин		Аденин	
Гуанин		Гуанин	
Цитозин		Цитозин	
Урацил		Тимин	

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. М.: Мед. информ. агентство, 2016.
2. Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. М.: Мед. информ. агентство, 2007. <http://mushkambarov.narod.ru/>
3. Рис Э., Стернберг М. Введение в молекулярную биологию: Пер. с англ. М.: Мир, 2002. <http://www.chem.msu.su/rus/elibrary/pic-sternberg/all.pdf>
4. Коничев А.С., Севастьянова Г.А. Молекулярная биология. М.: Академия, 2005.
5. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология: Пер. с англ. М.: Наука, 2002.
6. Doonan S. Nucleic Acids. RSC, 2004.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ	4
1. ДВА КЛАССА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ	4
2. ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ	5
2.1. Открытие ДНК.....	5
2.2. Открытие генов	8
2.3. Молекулярная биология в СССР	10
2.4. Открытие кодирования белков ДНК.....	11
2.5. Основные открытия	12
3. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ И БЕЛКИ	13
4. ТРАНСЛЯЦИЯ: ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД И СИНТЕЗ БЕЛКА	19
4.1. Генетический код	19
4.2. Синтез белка на рибосоме	21
4.3. Этапы трансляции	25
5. ТРАНСКРИПЦИЯ: СИНТЕЗ мРНК.....	30
5.1. Локализация генов в хромосомах.....	30
5.2. Спейсерные отделы ДНК	32
5.3. Транскрипционные факторы.....	34
5.3.1. Типы структур белков, связывающихся с ДНК.....	35
5.3.2. Общие факторы транскрипции.....	37
5.4. Опероны	38
5.4.1. Индуцибельный лактозный оперон.....	39
5.4.2. Репрессибельный триптофановый оперон	41
6. РЕПЛИКАЦИЯ ДНК.....	43
6.1. Структурная организация ДНК в хромосомах.....	43
6.2. Клеточный цикл	44
6.3. Основные характеристики репликации ДНК.....	46
6.3.1. Ферментный комплекс	48
6.3.2. Репликация теломерных концов ДНК	54
6.3.3. Теломеры.....	55
6.3.4. Восстановление длины теломер с помощью теломеразы.....	56
6.3.5. Альтернативный механизм восстановления длины теломер	57
6.3.6. Структура теломеразы.....	58

7. АНАЛИЗ ДНК И СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМА.....	60
7.1. Электрофорез.....	61
7.2. «Ножницы» для ДНК.....	62
7.3. Гибридизация ДНК и блоттинг.....	65
7.4. Полимеразная цепная реакция.....	68
7.5. Секвенирование ДНК	69
7.6. Генная инженерия	77
ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ	81
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ	83
Опыт 1. Извлечение рибонуклеопротеинов дрожжей.....	83
Опыт 2. Выделение дезоксирибонуклеопротеина из биологических тканей ..	83
Опыт 3. Изучение химического состава рибонуклеопротеинов дрожжей.....	84
Опыт 4. Выделение и разделение нуклеиновых кислот методом Шмидта и Тангаузера.....	85
Опыт 5. Спектрофотометрический метод определения РНК и ДНК	88
Опыт 6. Определение фосфора в гидролизатах РНК и ДНК.....	88
Опыт 7. Определение D-рибозы в гидролизате РНК	90
Опыт 8. Определение D-2-деоксирибозы в гидролизате ДНК	91
Опыт 9. Спектрофотометрическое определение азотистых оснований.....	92
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	94

Учебное издание

ШИРЯЕВ Андрей Константинович
ШАДРИКОВА Вера Андреевна

Нуклеиновые кислоты

Редактор *Н.В. Беганова*
Компьютерная верстка *И.О. Миняева*
Выпускающий редактор *Ю.А. Петропольская*

Подп. в печать 14.07.20
Формат 60×84 ¹/₁₆. Бумага офсетная
Усл. п. л. 5,63. Уч.-изд. л. 5,59
Тираж 50 экз. Рег. № 111/20

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Самарский государственный технический университет»
443100, г. Самара, Молодогвардейская, 244. Главный корпус

Отпечатано в типографии
Самарского государственного технического университета
443100, г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244. Корпус № 8