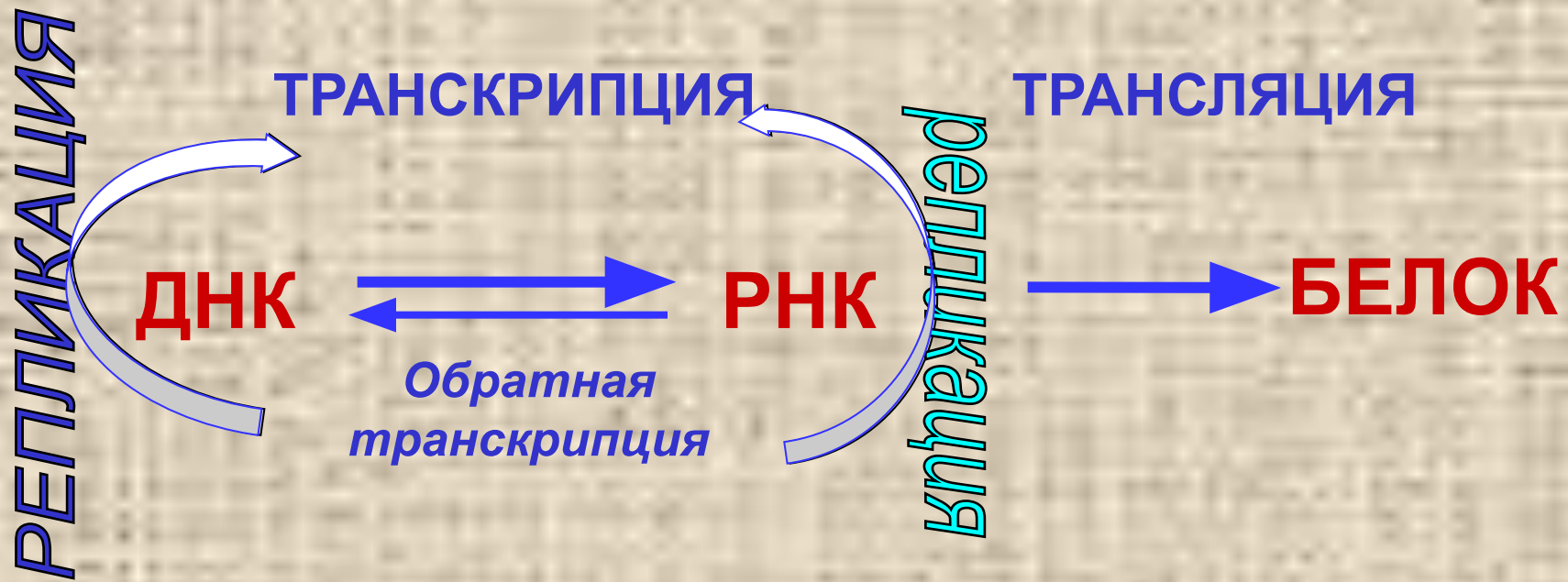
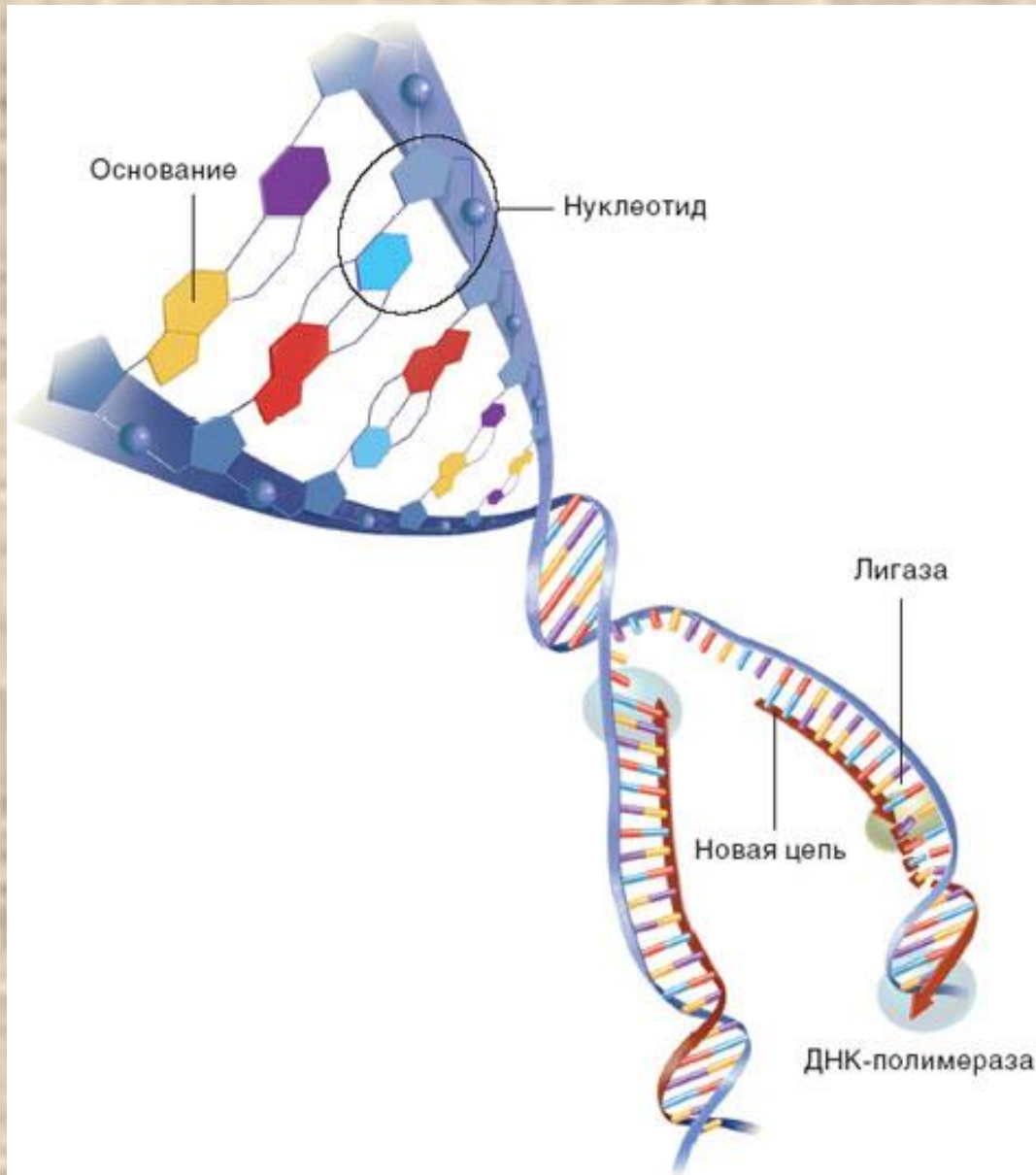


# **Матричные синтезы**

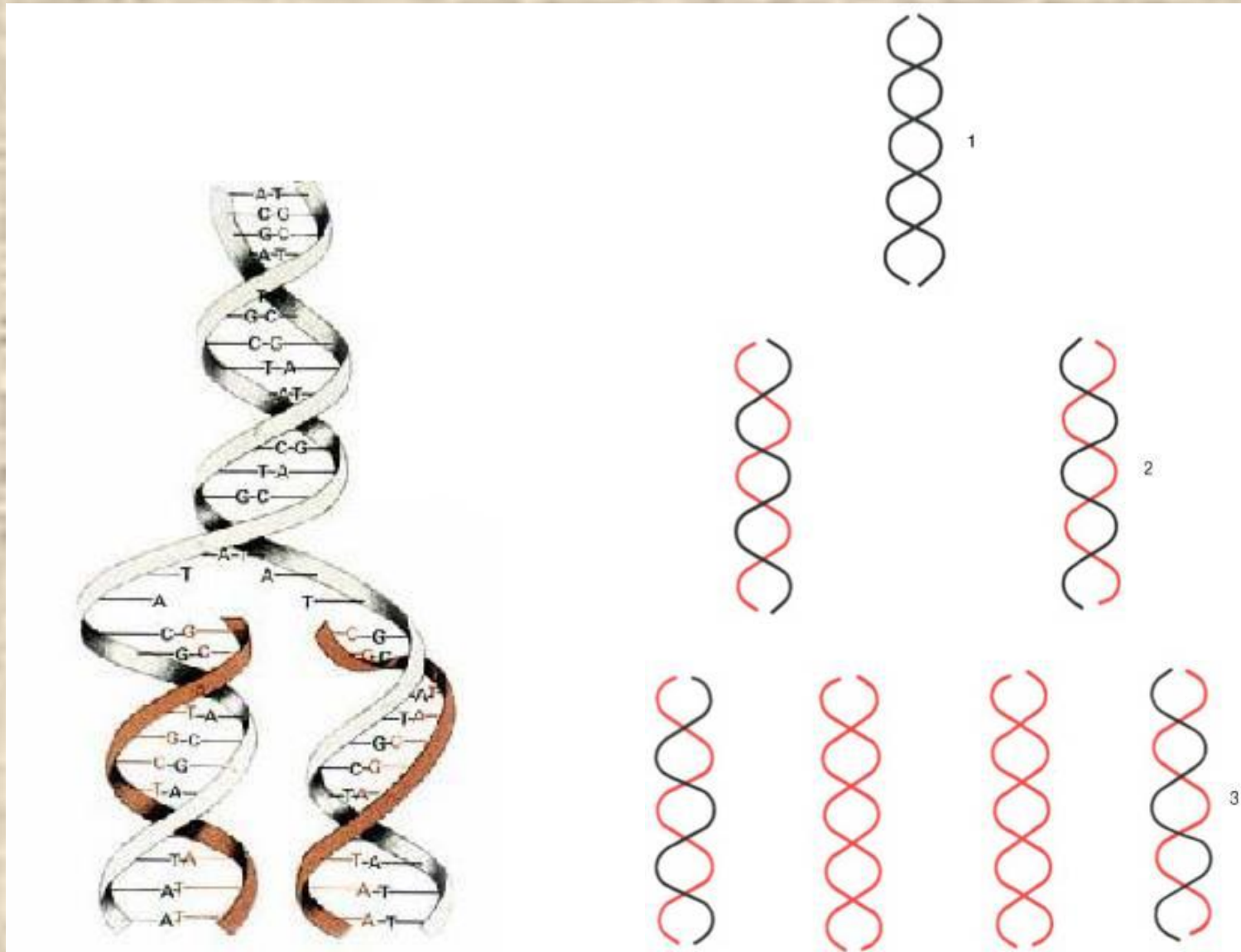
# Основной постулат молекулярной биологии



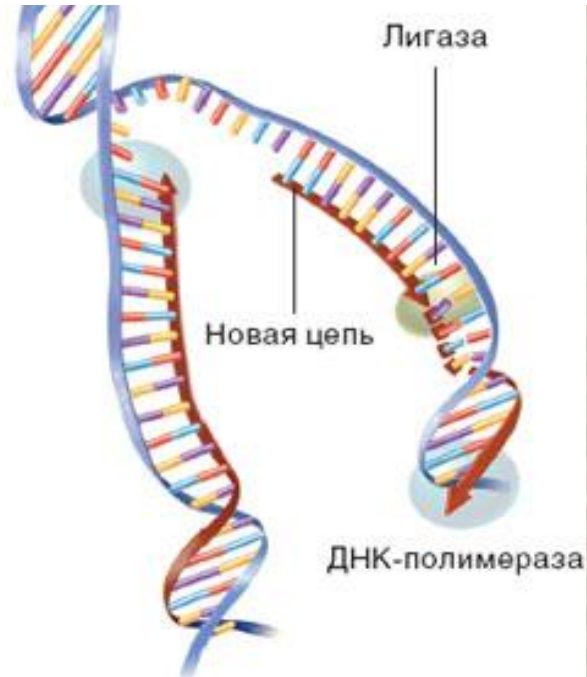
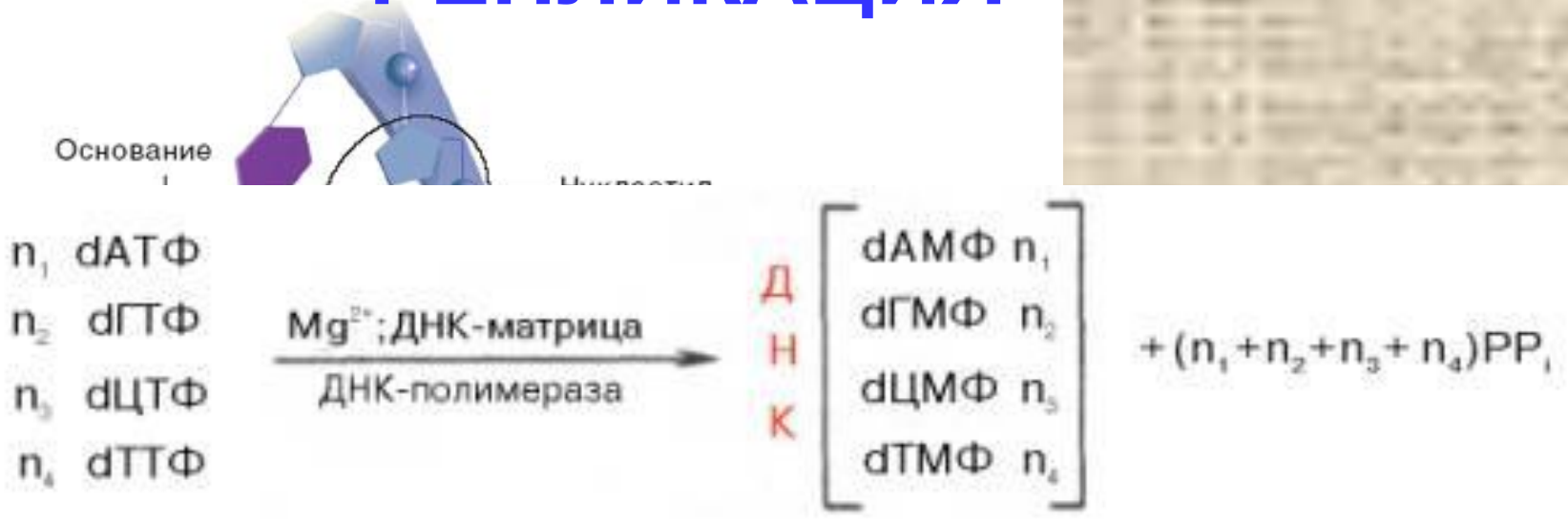
# РЕПЛИКАЦИЯ



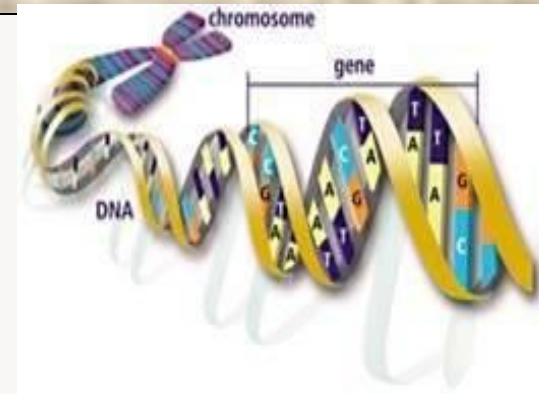
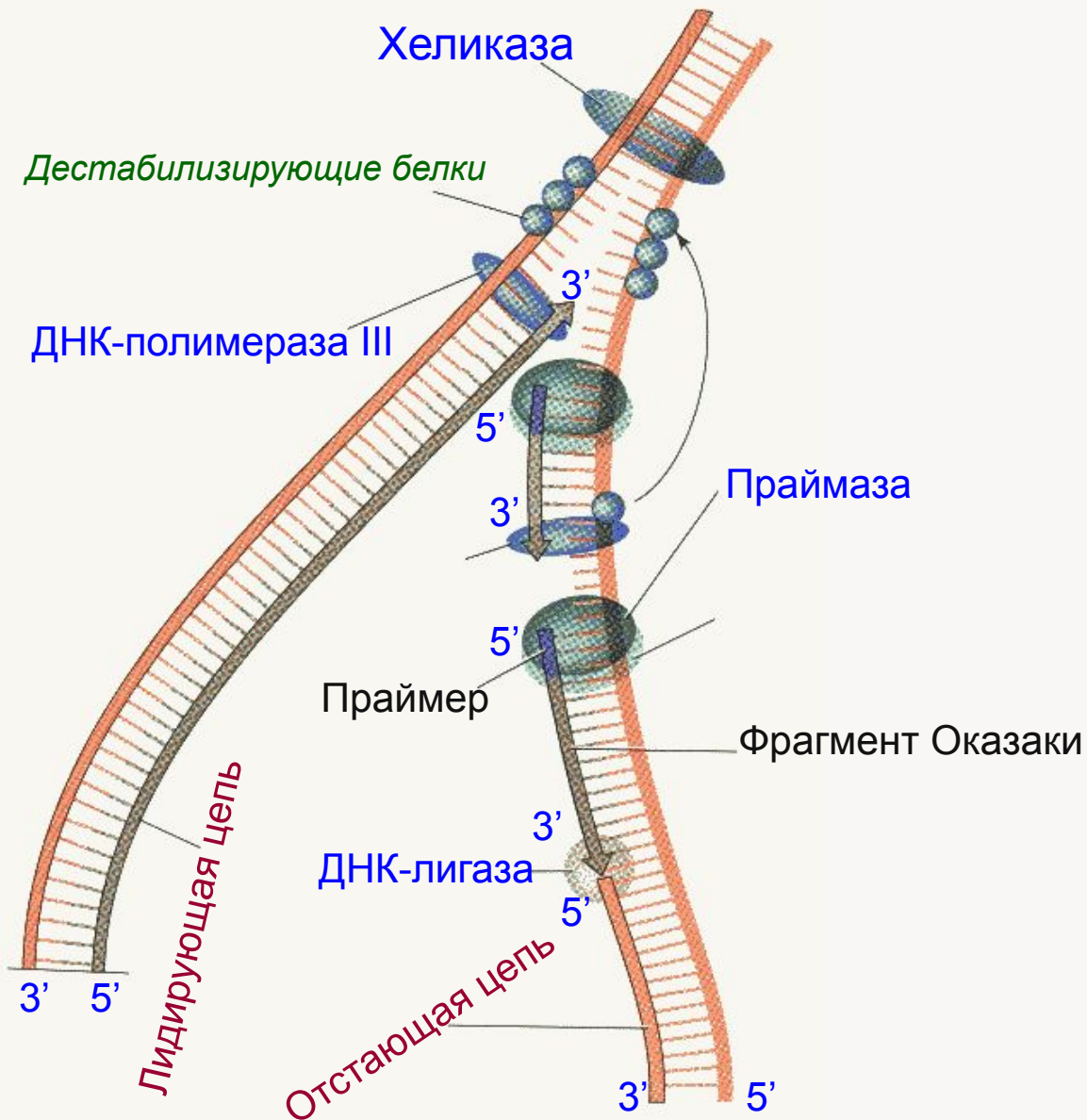
# РЕПЛИКАЦИЯ полуконсервативный способ



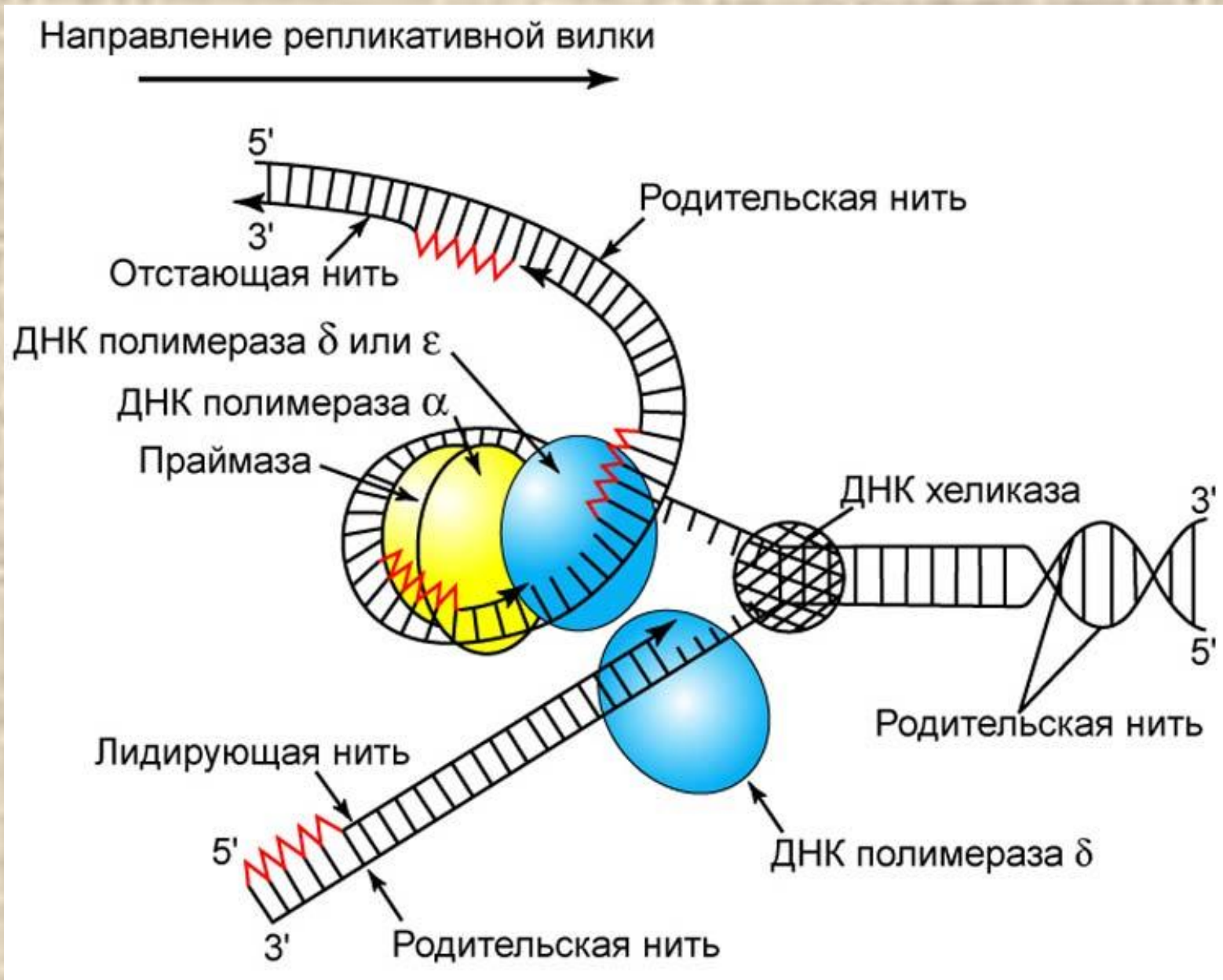
# РЕПЛИКАЦИЯ



# РЕПЛИКАЦИЯ (прокариоты)



# РЕПЛИКАЦИЯ (эукариоты)



# РНК

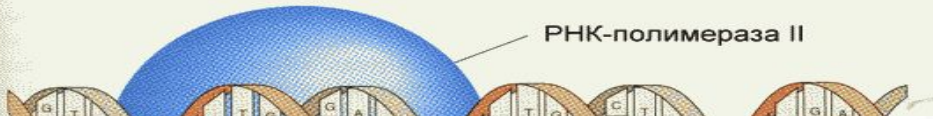
Свойства РНК у *E.coli* (по А. Ленинджеру)

Тип РНК	Скорость седиментации, ед. Сведберга (S)	Молекулярная масса	Число нуклеотидных остатков	% от общей РНК
мРНК	6–25	250000–1000000	75–3000	2
тРНК	4	23000–30000	75–90	16
рРНК	5	~ 35000	~ 120	82
рРНК	16	~ 550000	~ 1500	
рРНК	23	~ 1100000	~ 3100	





# ТРАНСКРИПЦИЯ



$n_1$  АТФ

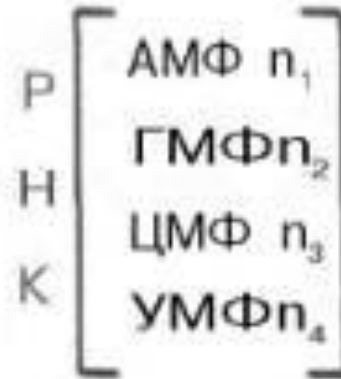
$n_2$  ГТФ

$n_3$  ЦТФ

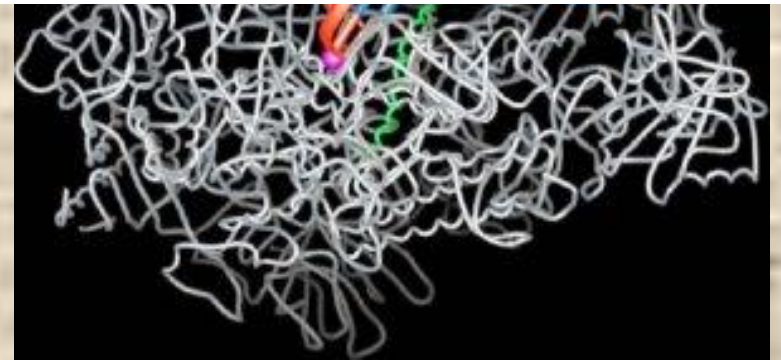
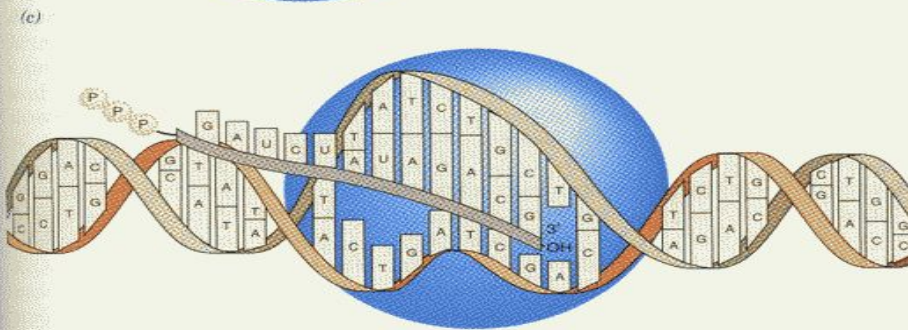
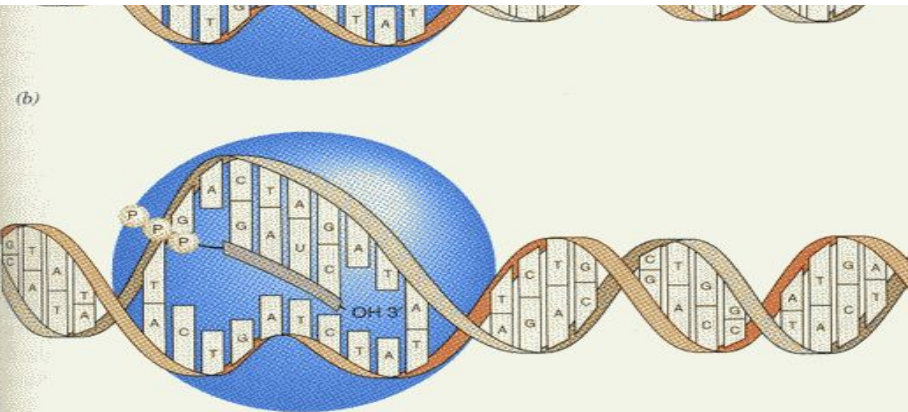
$n_4$  УТФ

$Mg^{2+}$ ; ДНК-матрица

РНК-полимераза



$+(n_1+n_2+n_3+n_4)PP_i$

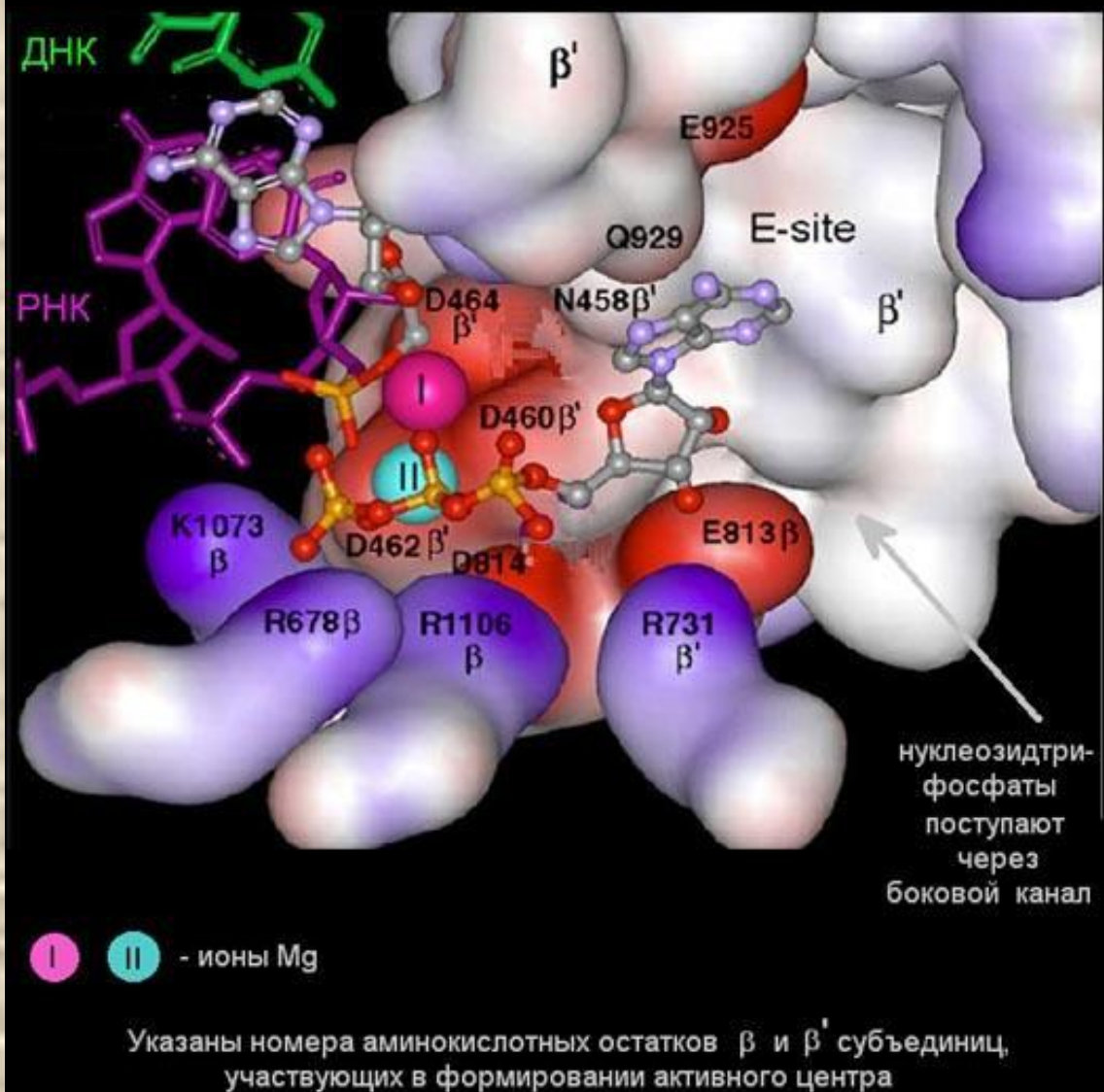


транскрипция

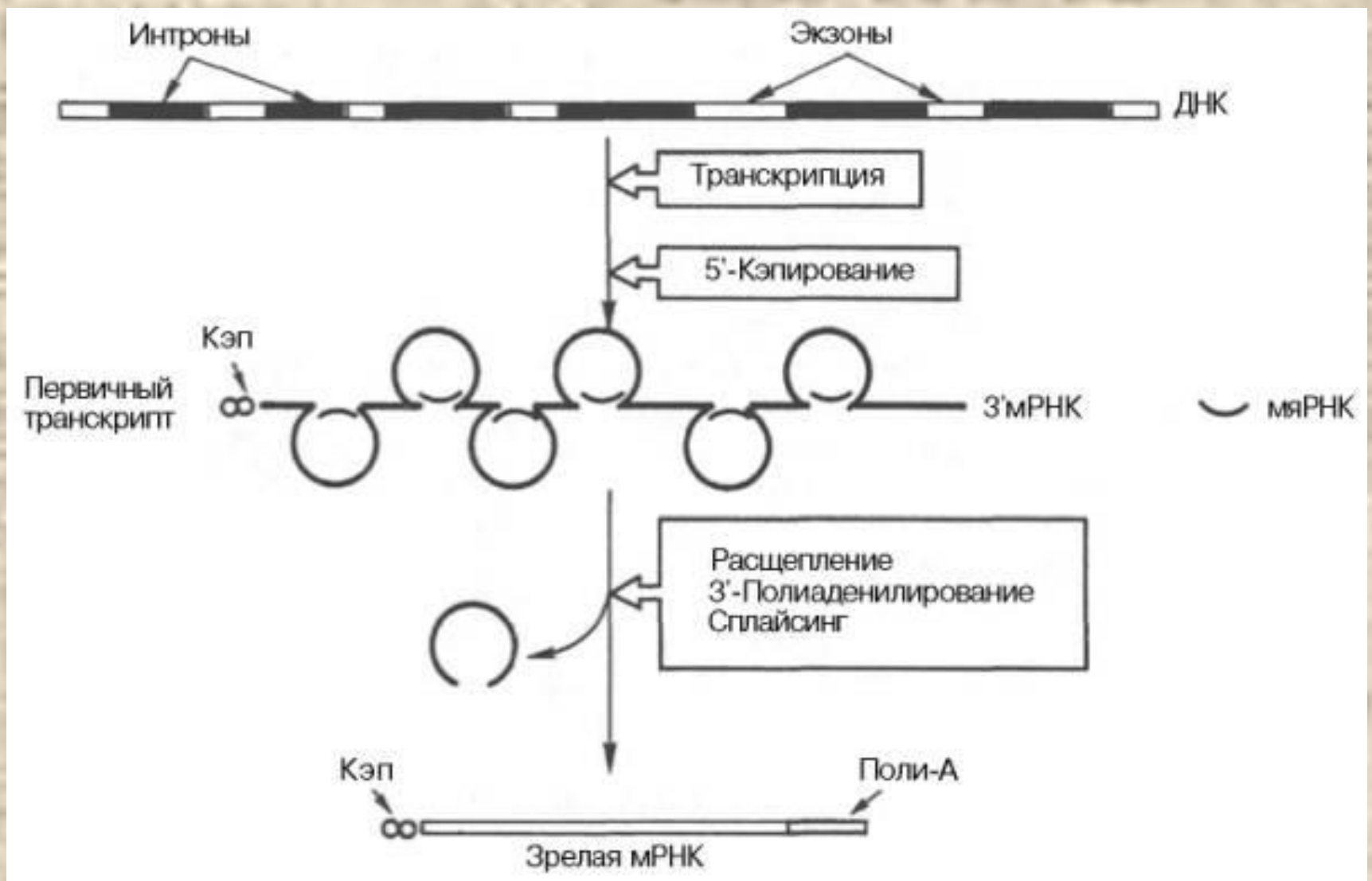


# ТРАНСКРИПЦИЯ

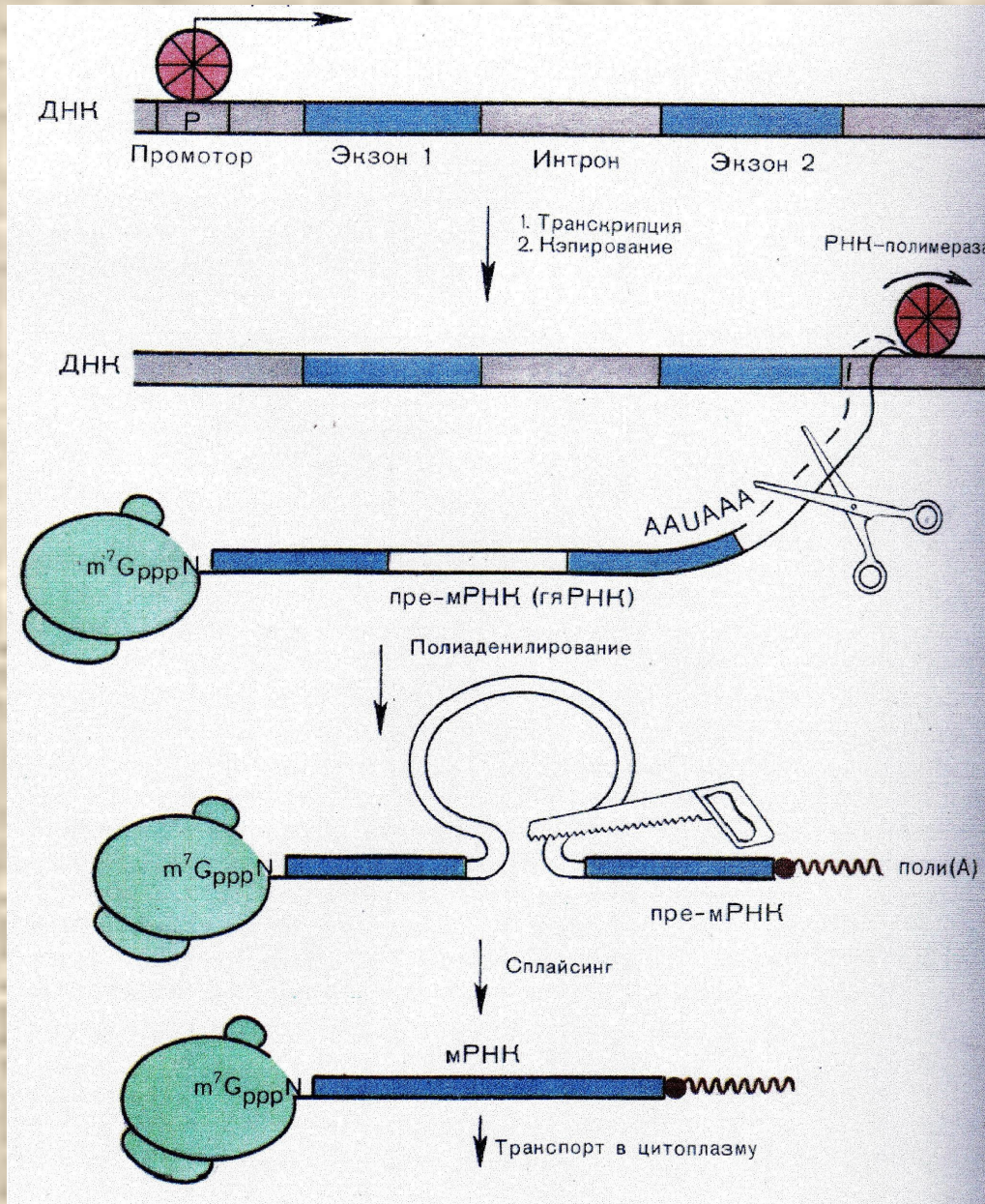
## СТРУКТУРА АКТИВНОГО ЦЕНТРА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ



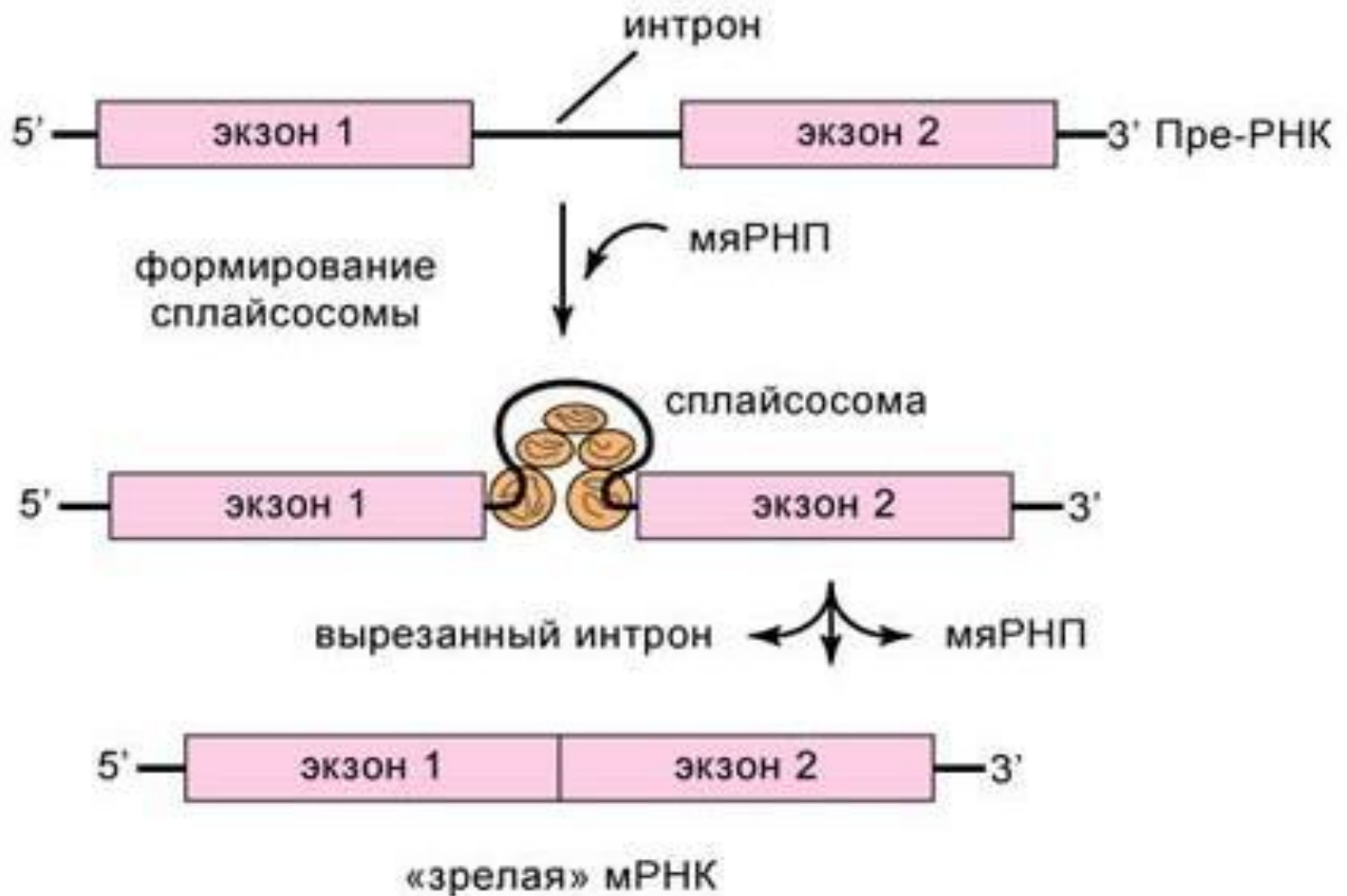
# ПРОЦЕССИНГ мРНК



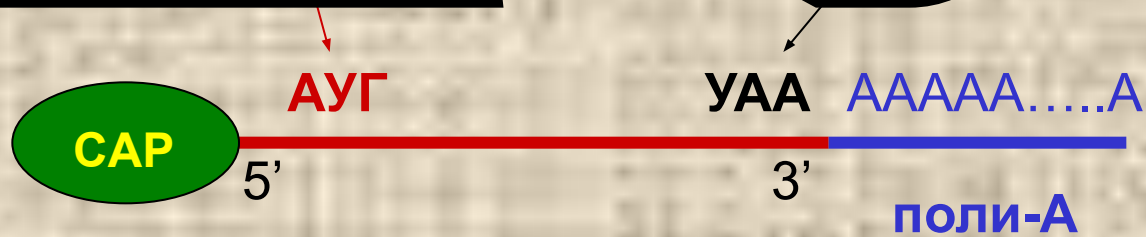
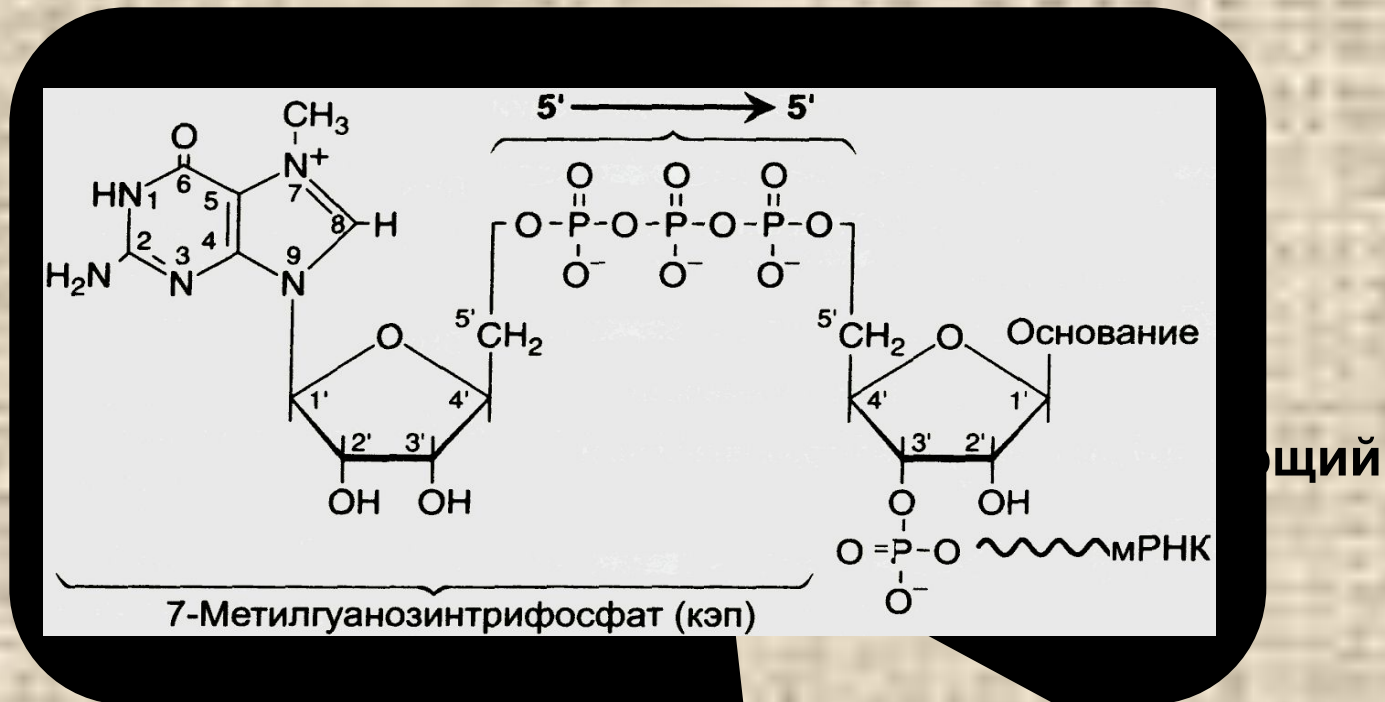
# ПРОЦЕССИНГ мРНК



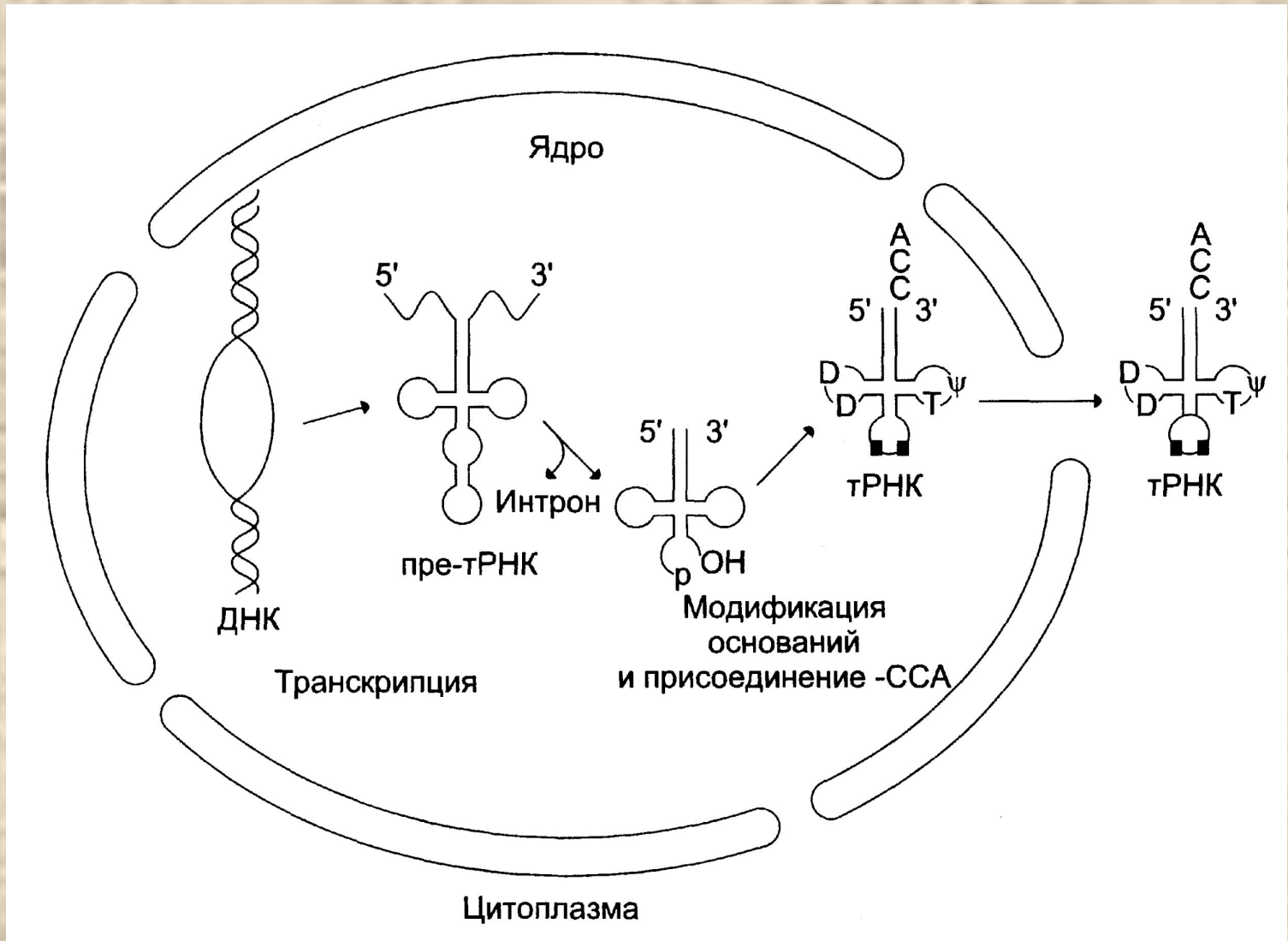
# СПЛАЙСИНГ



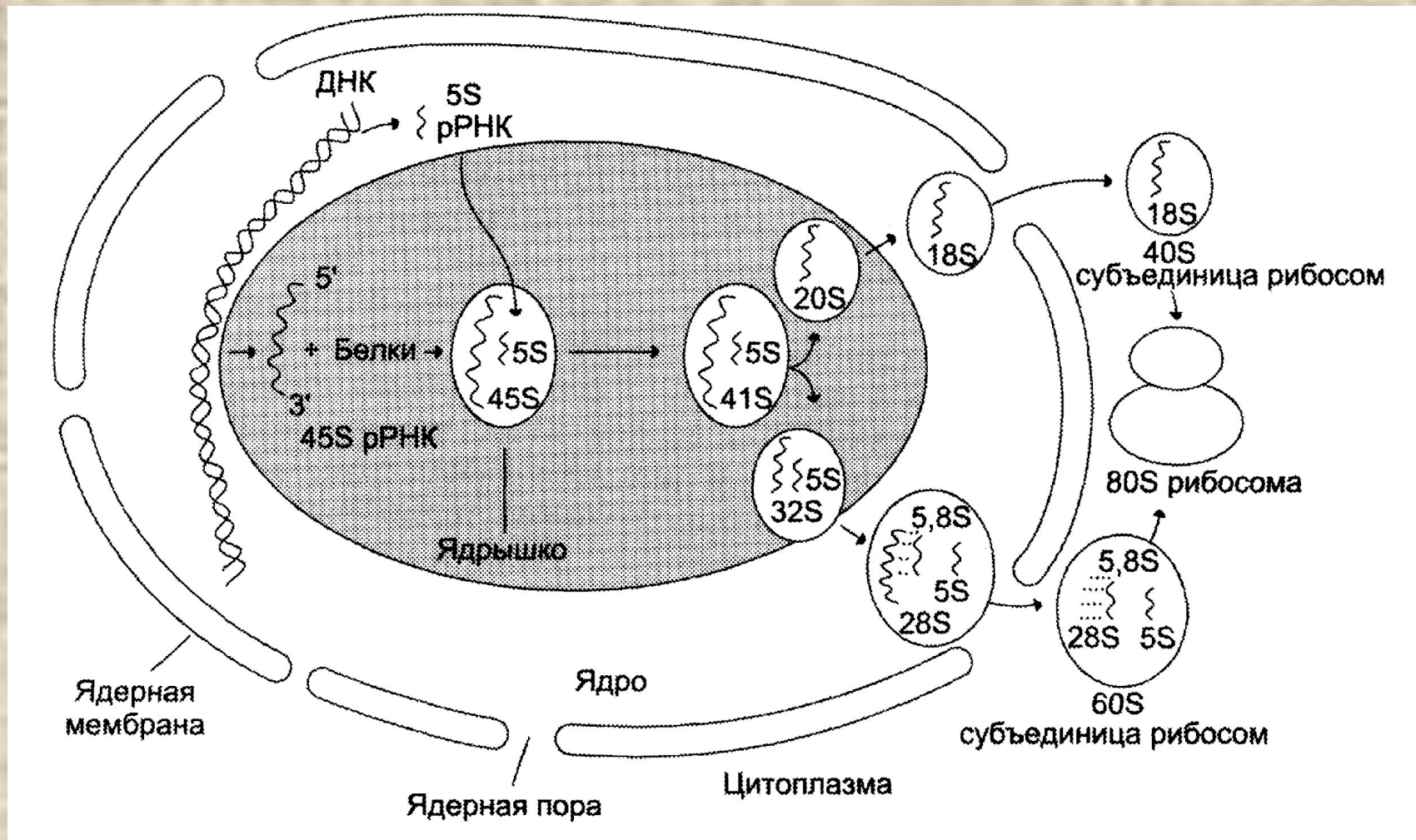
# м-РНК



# ПРОЦЕССИНГ тРНК



# ПРОЦЕССИНГ рРНК и образование рибосом





# Генетический код

Способ шифровки информации об аминокислотной последовательности белка с помощью последовательности нуклеотидов.

Первое основание	Второе основание			
	У	Ц	А	Г
У	УУУ – Фен УУЦ – Фен УУА – Лей УУГ – Лей	УЦУ – Сер УЦЦ – Сер УЦА – Сер УЦГ – Сер	УАУ – Тир УАЦ – Тир УАА * УАГ *	УГУ – Цис УГЦ – Цис УГА * УГГ – Три
Ц	ЦУУ – Лей ЦУЦ – Лей ЦУА – Лей ЦУГ – Лей	ЦЦУ – Про ЦЦЦ – Про ЦЦА – Про ЦЦГ – Про	ЦАУ – Гис ЦАЦ – Гис ЦАА – Глн ЦАГ – Глн	ГГУ – Арг ГГЦ – Арг ГГА – Арг ГГГ – Арг
А	АУУ – Иле АУЦ – Иле АУА – Мет АУГ – Мет	АЦУ – Тре АЦЦ – Тре АЦА – Тре АЦГ – Тре	ААУ – Асн ААЦ – Асн ААА – Лиз ААГ – Лиз	АГУ – Сер АГЦ – Сер АГА – Арг АГГ – Арг
Г	ГУУ – Вал ГУЦ – Вал ГУА – Вал ГУГ – Вал	ГЦУ – Ала ГЦЦ – Ала ГЦА – Ала ГЦГ – Ала	ГАУ – Асп ГАЦ – Асп ГАА – Глу ГАГ – Глу	ГГУ – Гли ГГЦ – Гли ГГА – Гли ГГГ – Гли

\* - терминирующий кодон

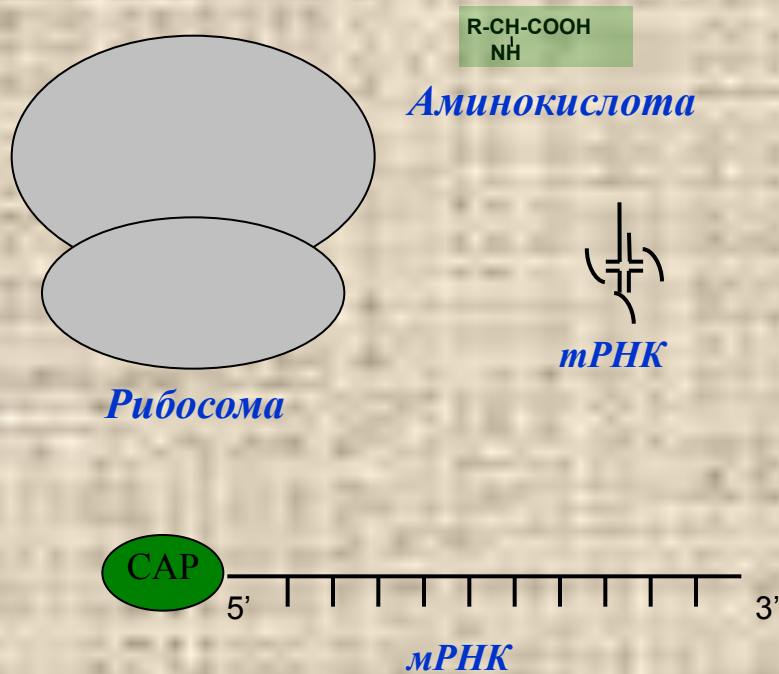


# Свойства генетического кода

- **Триплетность**
- **Специфичность**
- **Вырожденность**
- **Непрерывность**
- **Универсальность**



# Необходимые компоненты для синтеза белка



- мРНК
- тРНК
- Рибосомы
- Аминокислоты
- Ферменты
- Белковые факторы
- АТФ и ГТФ
- $Mg^{2+}$



# Основные этапы биосинтеза белка (трансляции)

- Активация аминокислот – предварительный этап:  
активация аминокислот – присоединение их к специфическим тРНК.

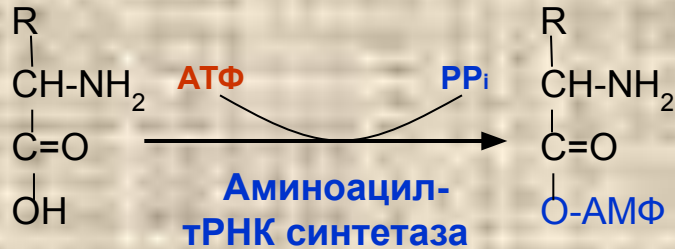
## Основные этапы:

- Инициация;
  - Элонгация;
  - Терминация.
- 
- Процессинг белка – посттрансляционная модификация:  
формирование специфической конформации (фолдинг);  
модификация аминокислот; частичный протеолиз.



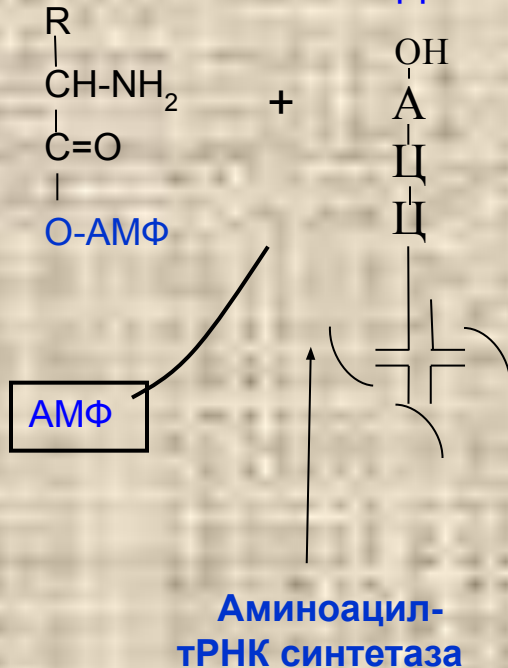
# Активация аминокислот

## I стадия



Этот процесс протекает в две стадии, катализируемые одним и тем же ферментом – аминоксил-тРНК синтетаза:

## II стадия

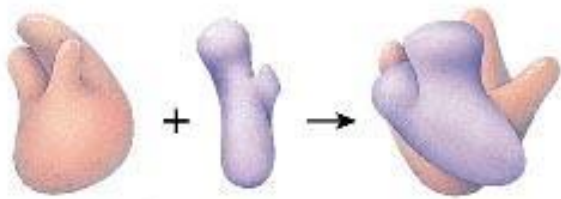


**I стадия** – аминокислота вступает в реакцию с АТФ, при этом освобождается пиррофосфат и образуется промежуточный продукт – аминоксиладенилат

**II стадия** – аминоксиладенилат взаимодействует с тРНК, при этом образуется соединение – аминоксил-тРНК.



# р-РНК в составе рибосомы

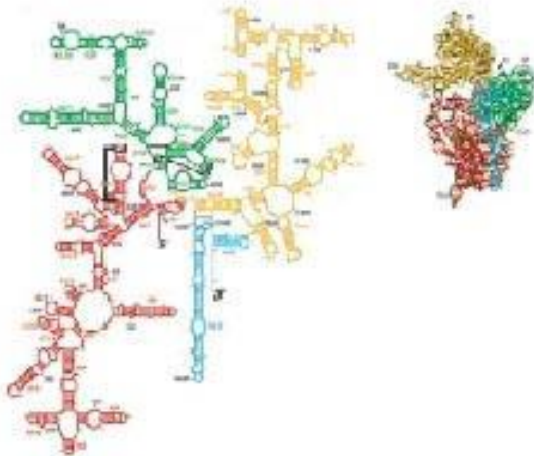


**Большая  
субъединица**      **Малая  
субъединица**

Рибосома состоит из большой и малой субъединицы.

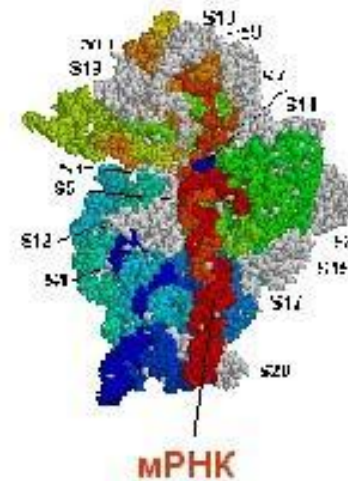
Основу структуры каждой субъединицы составляет сложным образом свернутая рРНК.

К каркасу из рРНК присоединяются рибосомные белки.



**Вторичная и третичная структура  
рРНК малой субъединицы**

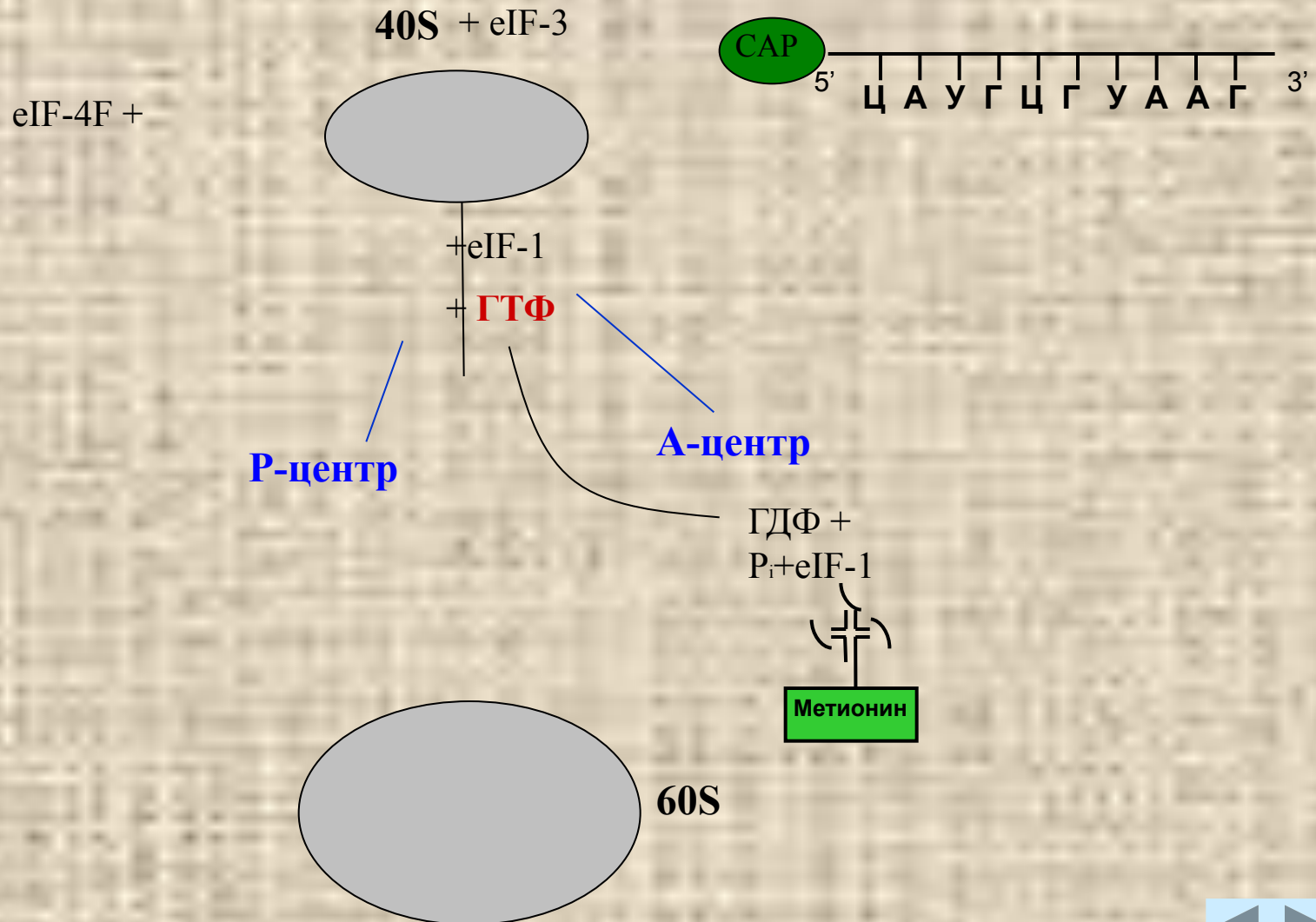
(по Wimberly et al., Nature 2000, 407: 327-339)



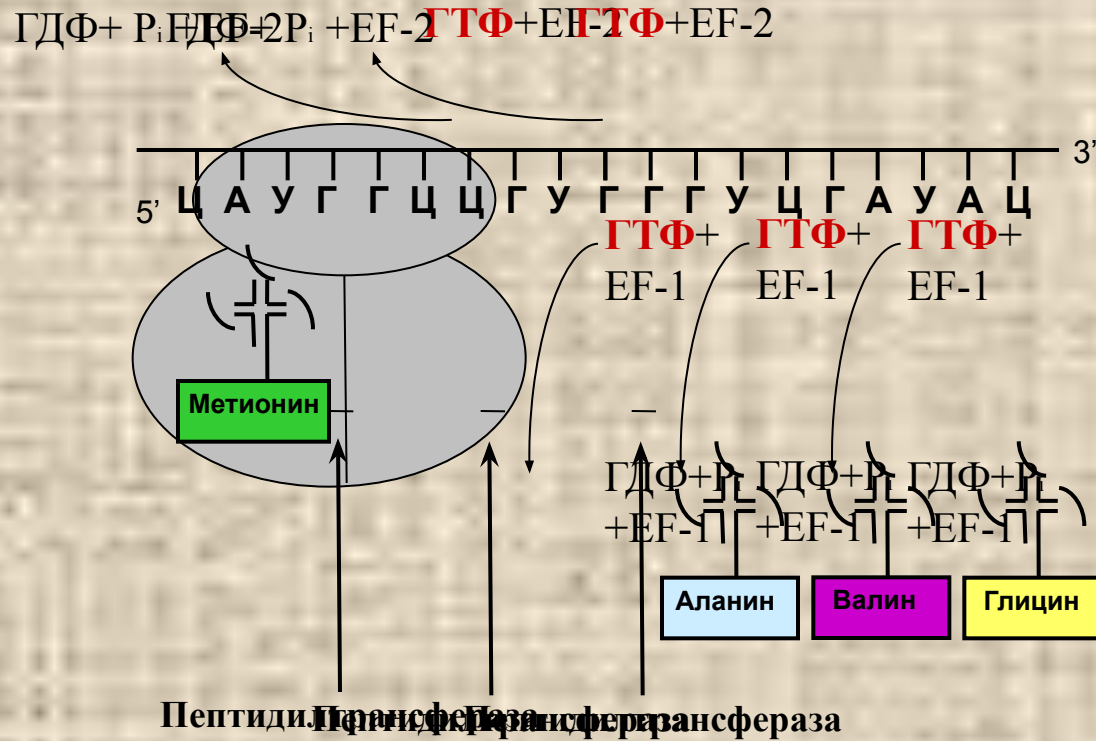
**Структура малой  
субъединицы**



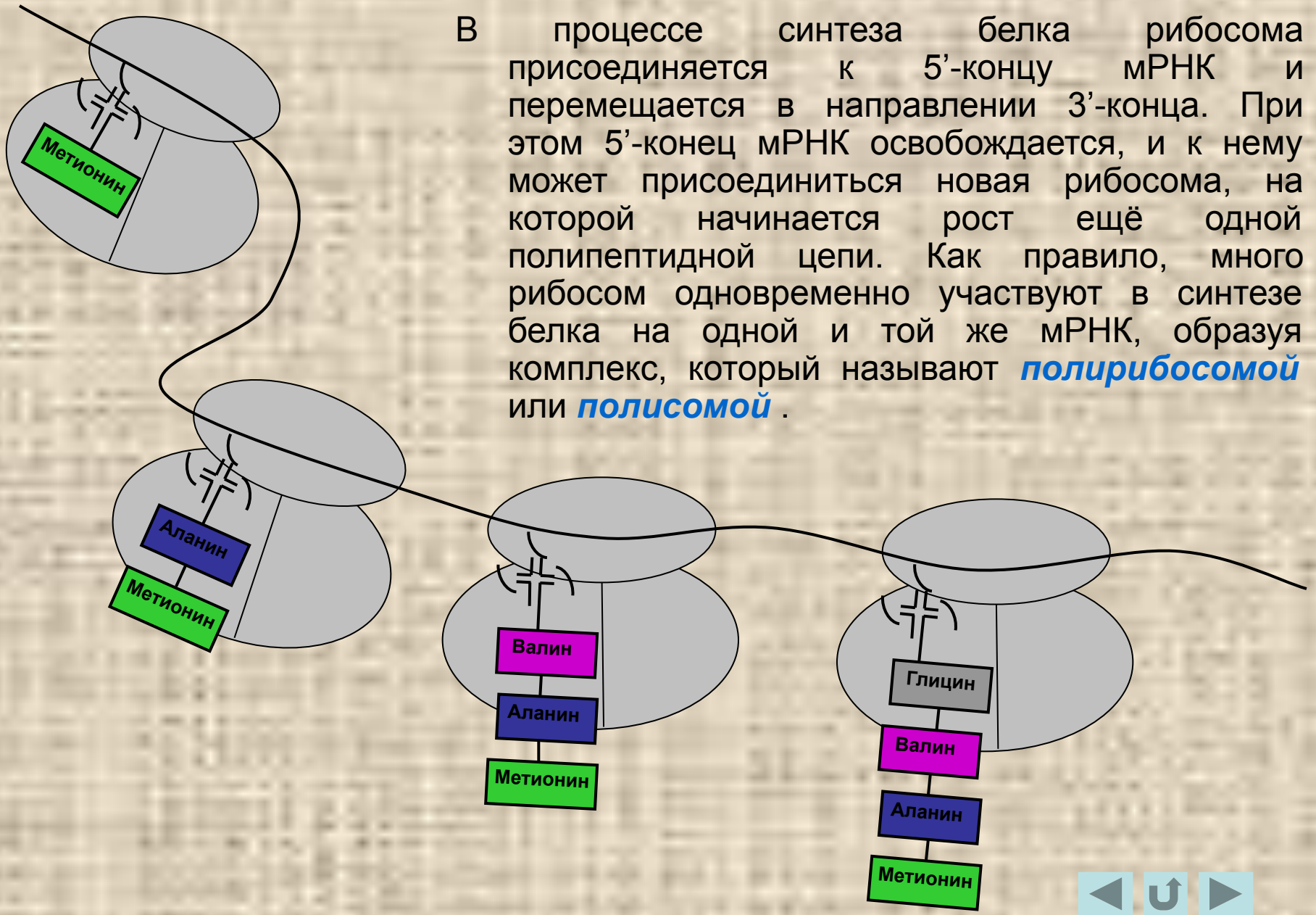
# Инициация



# Элонгация







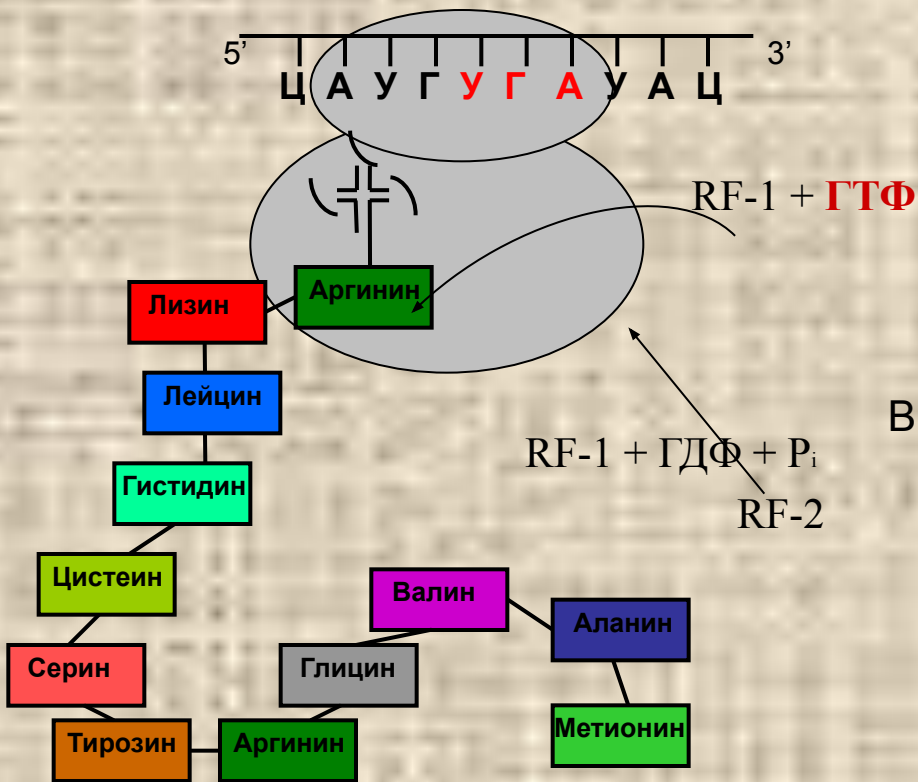
В процессе синтеза белка рибосома присоединяется к 5'-концу мРНК и перемещается в направлении 3'-конца. При этом 5'-конец мРНК освобождается, и к нему может присоединиться новая рибосома, на которой начинается рост ещё одной полипептидной цепи. Как правило, много рибосом одновременно участвуют в синтезе белка на одной и той же мРНК, образуя комплекс, который называют **полирибосомой** или **полисомой**.

# Терминация



**Терминация** - заключительный этап синтеза белка, наступает в том случае если в А-центр рибосомы попадает один из стоп кодонов: **УАГ**, **УАА**, **УГА**. Стоп кодоны не кодируют никаких аминокислот и для них нет соответствующих тРНК. Вместо этого к рибосоме присоединяются 2 белковых фактора терминации (RF).

В результате происходит отщепление синтезированной полипептидной цепи, отсоединение транспортной и матричной РНК и диссоциация субъединиц рибосомы. Эти процессы требуют затраты энергии ГТФ.



# Процессинг белка

- Фолдинг - формирование уникальной третичной или четвертичной структуры белка
- Присоединение простетической группы (у сложных белков)
- Частичный протеолиз
- Ковалентные модификации аминокислот



# Процессинг белка

1) **Частичный протеолиз** – удаление части полипептидной цепи специфическими эндопротеазами.

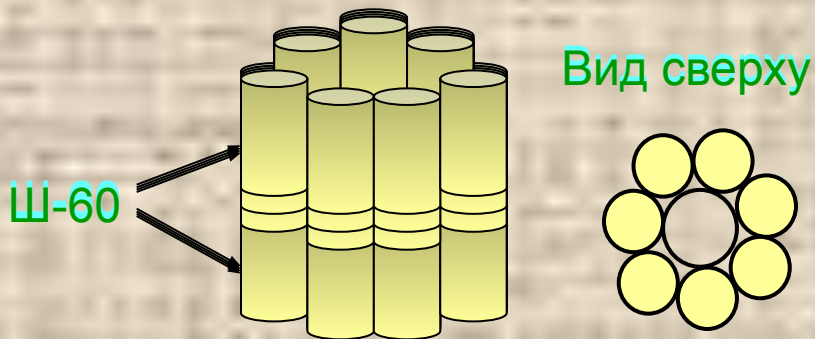
2) **Ковалентные модификации аминокислот-** присоединение различных химических групп: фосфатных, ацильных, метильных, олигосахаридных и др.

3) **Формирование дисульфидных связей** необходимых для поддержания нативной конформации белка

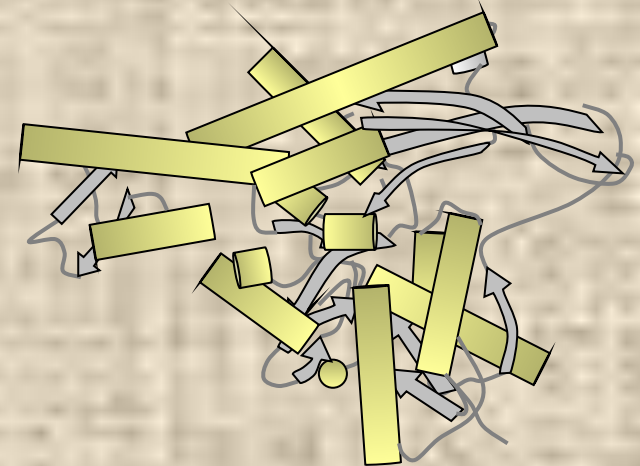
# ШАПЕРОНЫ

Шапероны — специфические белки, способные стабилизировать конформацию белков, находящихся в неустойчивом состоянии.

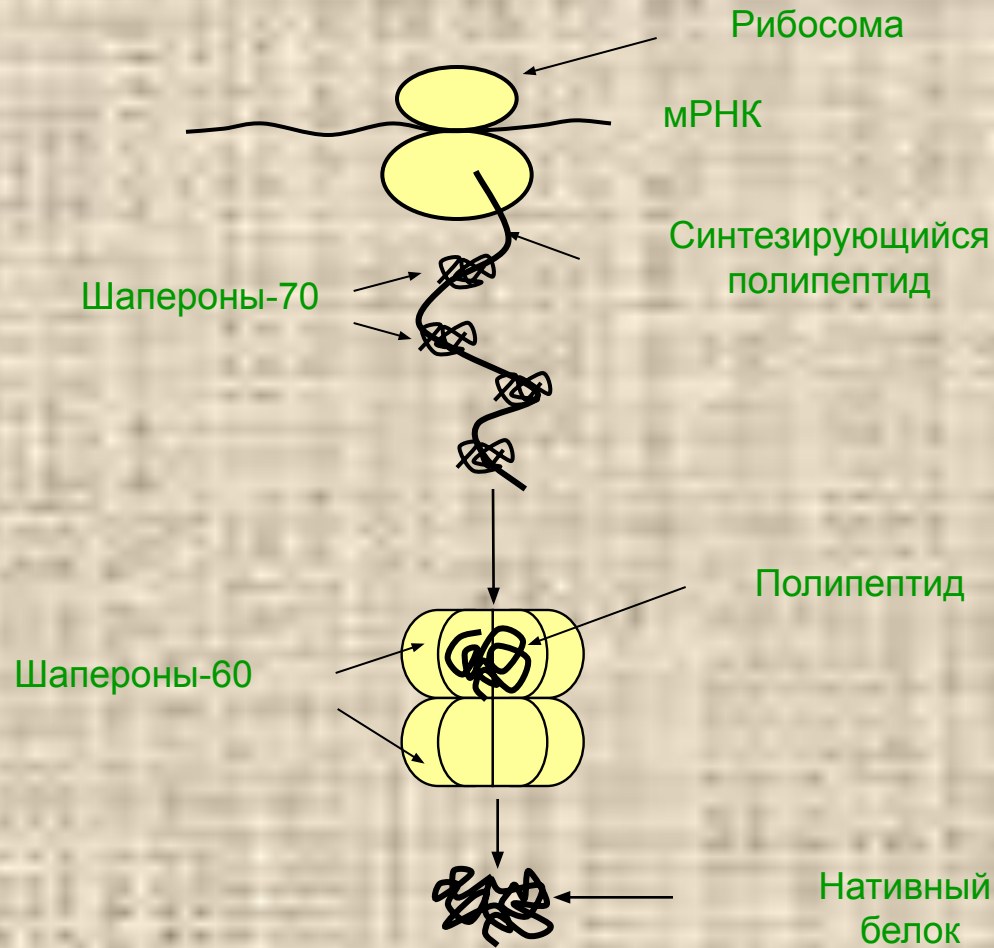
## СТРОЕНИЕ ШАПЕРОНОВОГО КОМПЛЕКСА



## ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА ШАПЕРОНА-70



# УЧАСТИЕ ШАПЕРОНОВ В ФОЛДИНГЕ БЕЛКОВ



# Различия биосинтеза белка в про- и эукариотических клетках



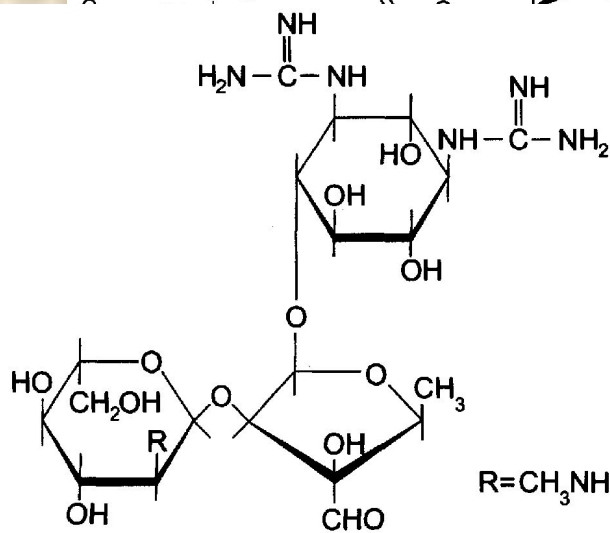
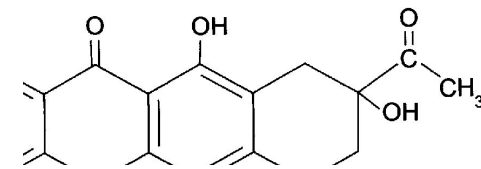
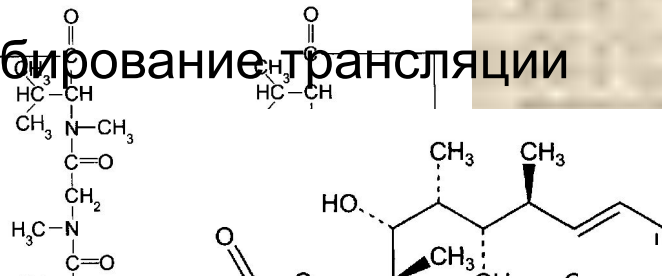
- У *прокариотов* процессы репликации, транскрипции и трансляции сопряжены в пространстве и во времени
- У *эукариотов* трансляция осуществляется в цитоплазме, куда поступает из ядра мРНК после завершения транскрипции процессинга;
- Про- и эукариоты имеют различные рибосомы (80S у прокариот и 70S у эукариот);
- Факторы инициации, элонгации и терминации различны



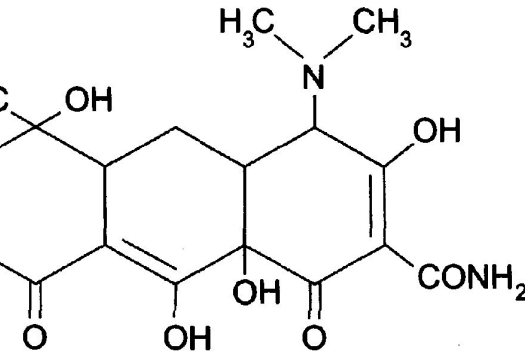
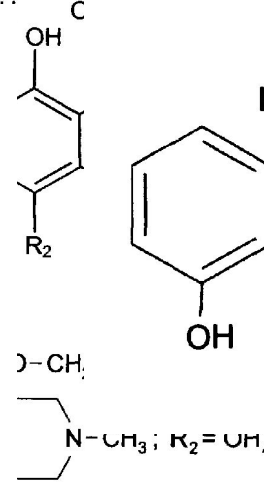


# Ингибиторы матричных биосинтезов

- Взаимодействие с ДНК, нарушение репликации и транскрипции
- Ингибирование ферментов транскрипции
- Ингибирование трансляции



Стрептомицин



Тетрациклин







# Ингибиторы биосинтеза белка

**Левомецетин (хлорамфеникол)** – соединяется с большой субъединицей рибосом. Оказывает ингибирующее влияние на пептидилтрансферазную реакцию (на стадии элонгации), ингибирует транслокацию.

**Рубомицин** - соединяется с большой субъединицей рибосом. Ингибирует пептидилтрансферазную активность.

**Стрептомицин и неомицин** – соединяется с большой субъединицей рибосом, вызывая ошибки в трансляции мРНК, приводящие к нарушению соответствия между кодонами и включаемыми аминокислотами, что приводит к синтезу аномальных белков и гибели бактерий.

**Тетрациклины** – ингибируют элонгацию: тормозят связывание аминоацил-тРНК с аминоацильным центром в малой субъединице рибосом.

**Эритромицин** – соединяется с малой субъединицей рибосом, нарушая ее функцию.





# Активаторы биосинтеза белка

АТФ, некоторые гормоны и витамины

АТФ служит одним из источников энергии.

Гормоны взаимодействуют с гормончувствительным участком ДНК и запускают транскрипцию и трансляцию, либо изменяют активность белков и ферментов, участвующих в данных процессах (соматотропный гормон, инсулин, половые гормоны, гормоны щитовидной железы (тироксин, трийодтиронин))

Витамины: А (ретинол), D (холекальциферол). Активные формы этих витаминов (ретиноевая кислота и кальцитриол) действуют подобно гормонам.

Витамины К, С, В<sub>9</sub>, В<sub>12</sub> влияют на посттранслционную модификацию белков.



# Процессинг белка

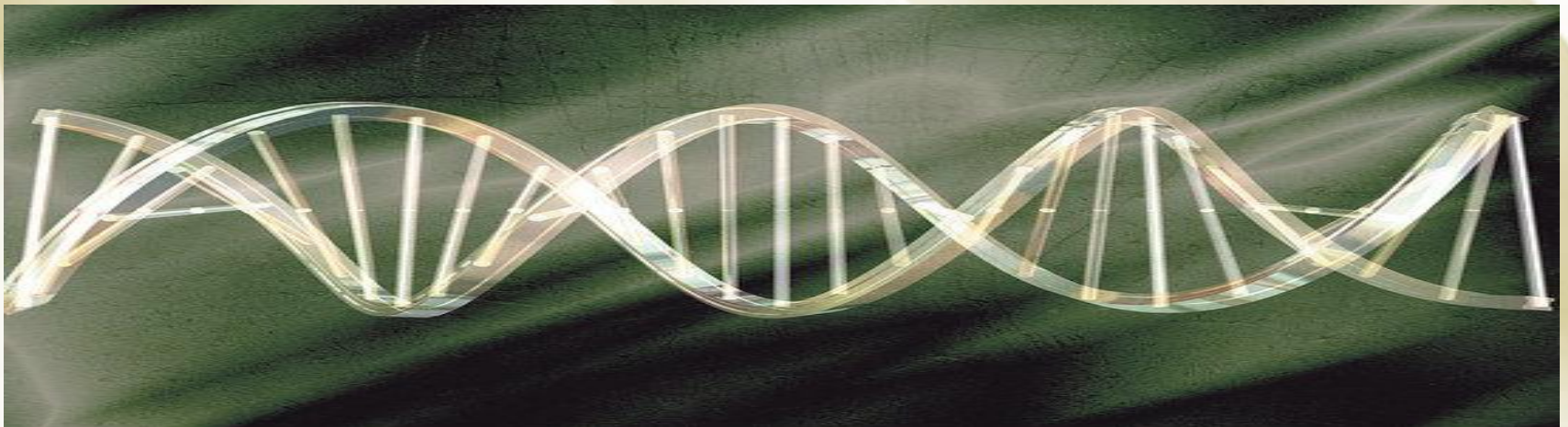
Синтезируемые полипептидные цепи могут подвергаться структурным модификациям, либо будучи еще связанными с рибосомами, либо после завершения синтеза. Эти конформационные изменения получили название **посттрансляционные изменения**, включающие удаление части полипептидной цепи, ковалентное присоединение одного или нескольких низкомолекулярных лигандов, приобретение белком нативной конформации.

Многие модификации осуществляются в эндоплазматическом ретикулуме. Здесь происходит **фолдинг полипептидных цепей - формирование уникальной третичной или четвертичной структуры белка.**



# ПЦР

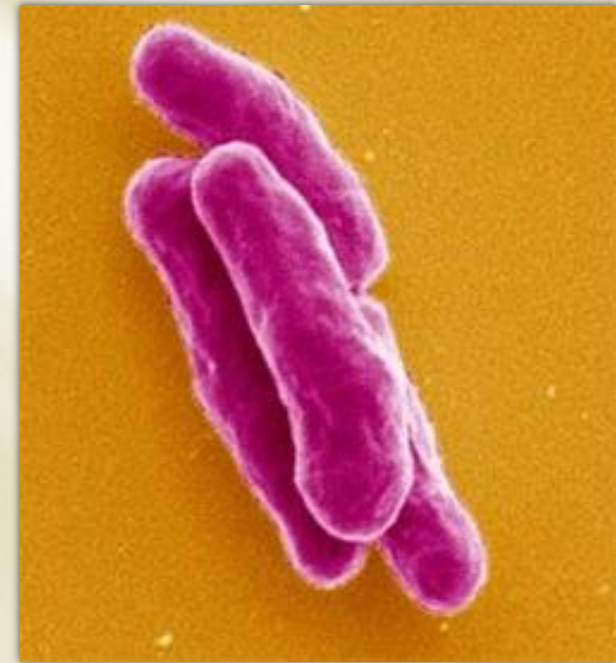
- ПЦР - полимеразная цепная реакция — это метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).
- ПЦР диагностика — это метод лабораторной диагностики инфекционных заболеваний, в частности, этот метод широко применяется и для диагностики ЗППП



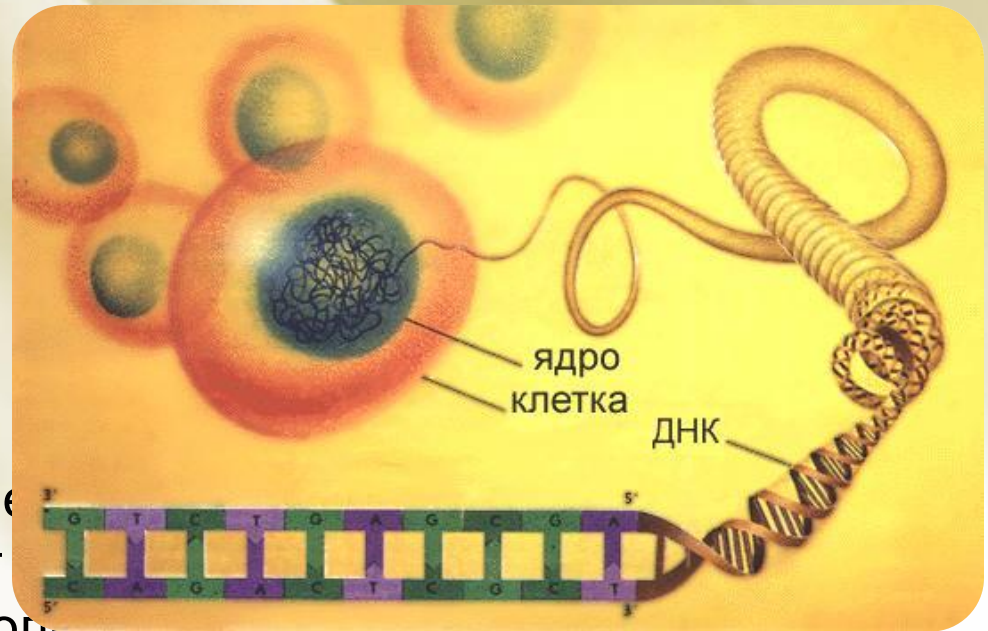
Анализ методом ПЦР основан на обнаружении в материале исследования небольшого фрагмента ДНК возбудителя той инфекции, которую подозревает врач.

Сама полимеразная цепная реакция используется для того, чтобы найденный фрагмент размножить, клонировать.

Необходимое условие для проведения ПЦР – знание нуклеотидной последовательности амплифицируемой области.



Метод ПЦР основан на принципе естественной репликации ДНК, включающим расплетение двойной спирали ДНК, расхождение нитей ДНК и комплементарное дополнение обеих. Репликация ДНК может начаться не в любой точке, а только в определенных стартовых блоках - коротких двунитевых участках. Суть метода заключается в том, что маркировав такими блоками специфический только для данного вида (но не для других видов) участок ДНК, можно многократно воспроизвести (амплифицировать) именно этот участок.



# Механизмы реакции

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах, (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК.



# Компоненты реакции

- I. **ДНК-матрица**, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- II. **Два праймера**, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.
- III. Термостабильная **ДНК-полимераза** — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.
- IV. **Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты** (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- V. **Ионы  $Mg^{2+}$** , необходимые для работы полимеразы.
- VI. **Буферный раствор**, обеспечивающий необходимые условия реакции



# *Праймеры*

- Праймеры - это короткие, длиной 20-30 оснований, одноцепочечные ДНК комплиментарные 3-концам цепей копируемой ДНК-матрицы.
- Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка.

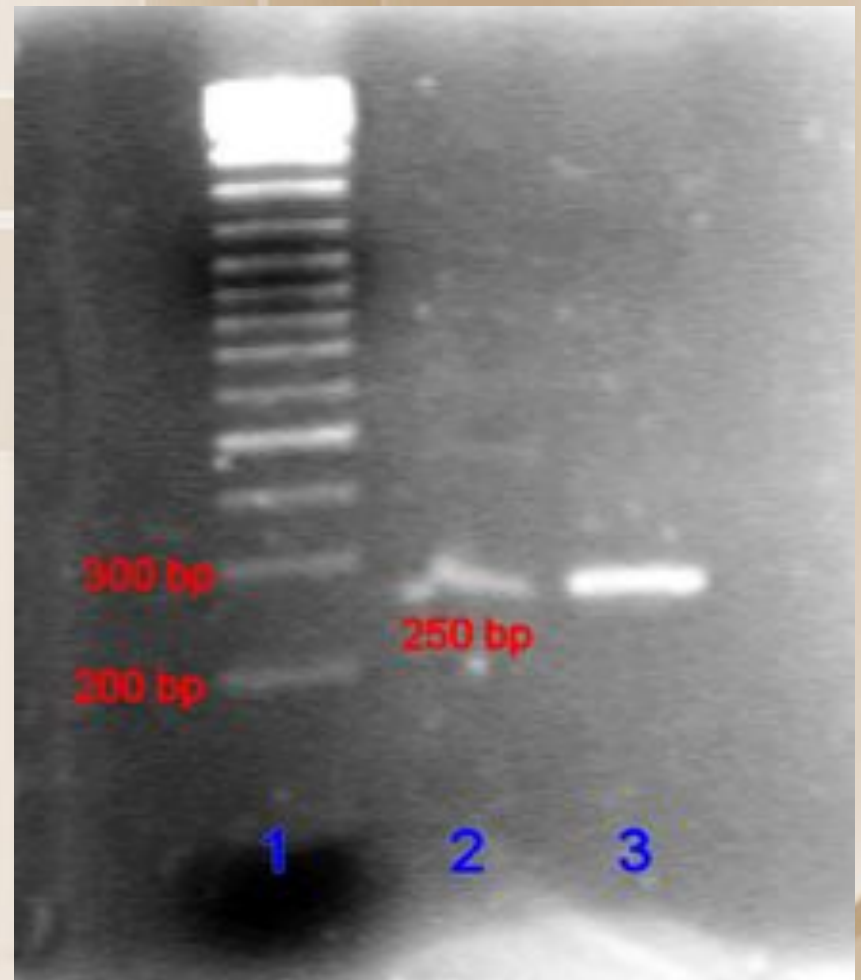
ПЦР проводят в амплификаторе - приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1 °С. Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта»



Touchdown ПЦР и последующего хранения амплифицированных молекул при 4 °С. Для ПЦР в реальном времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором. Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшет, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

# Ход реакции

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20—35 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий. Фотография геля, содержащего маркерную ДНК (1) и продукты ПЦР-реакции (2,3). Цифрами показана длина фрагментов ДНК в парах нуклеотидов.

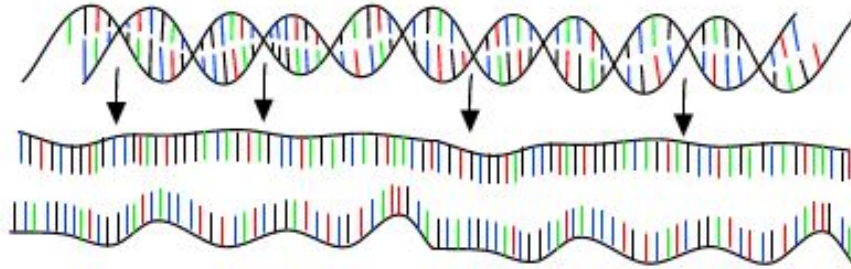


# Проведение ПЦР

- **Денатурация**
- Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96 °С (или до 98 °С, если используется особенно термостабильная полимераза) на 0,5—2 мин, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется плавлением (*денатурацией*), так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Обычно, перед первым циклом проводят длительный прогрев реакционной смеси в течение 2—5 мин для полной денатурации матрицы и праймеров.

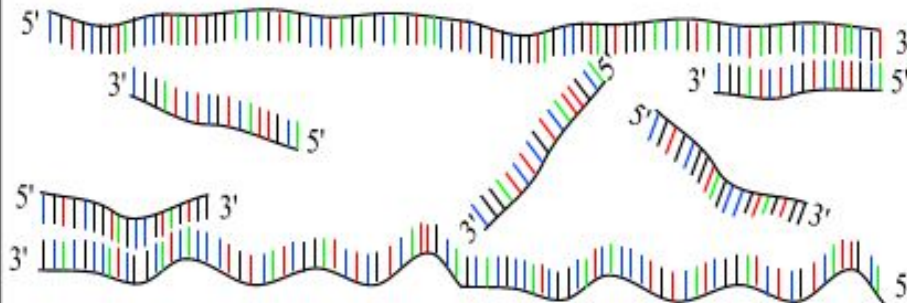
# PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



**Step 1 : denaturation**

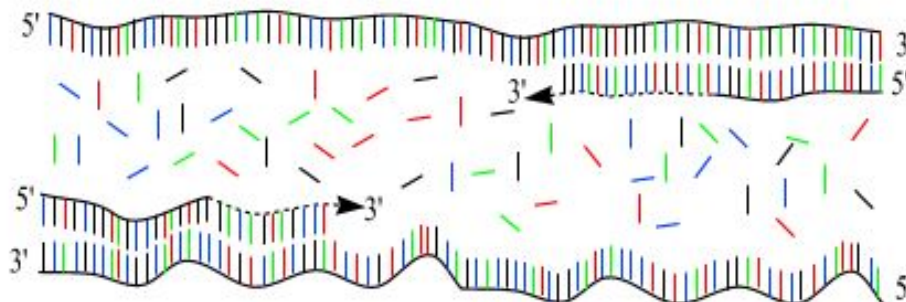
1 minut 94 °C



**Step 2 : annealing**

45 seconds 54 °C

**forward and reverse primers !!!**



**Step 3 : extension**

2 minutes 72 °C

**only dNTP's**

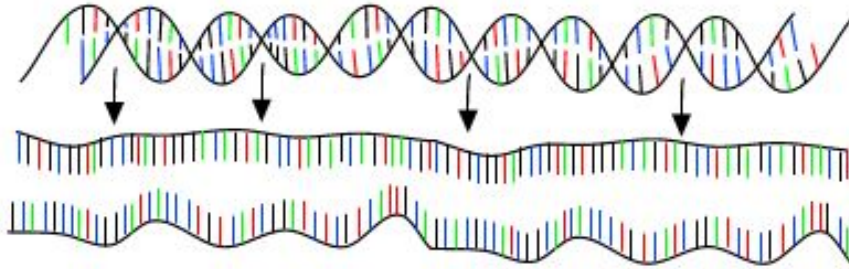
# Проведение ПЦР

## Отжиг

Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется *отжигом*. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается равной температуре плавления праймеров. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре). Время стадии отжига — 30 сек, одновременно, за это время полимераза уже успевает синтезировать несколько сотен нуклеотидов. Поэтому рекомендуется подбирать праймеры с температурой плавления выше 60 °С и проводить отжиг и элонгацию одновременно, при 60-72 °С.

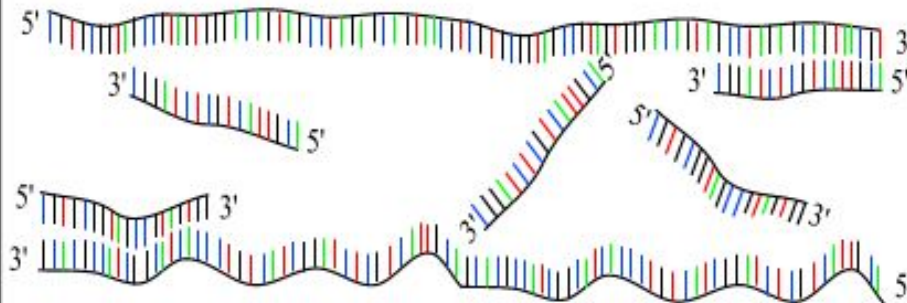
# PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



**Step 1 : denaturation**

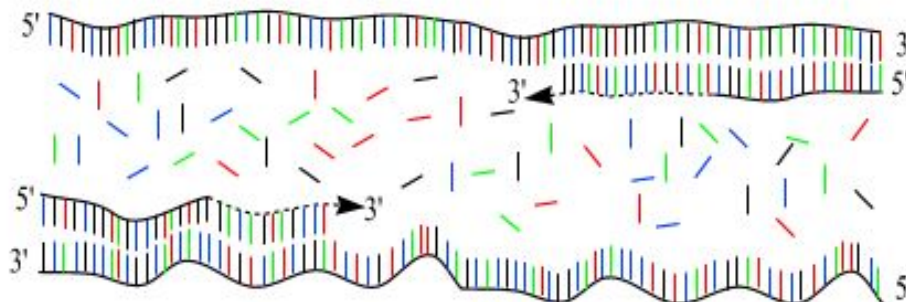
1 minut 94 °C



**Step 2 : annealing**

45 seconds 54 °C

**forward and reverse primers !!!**



**Step 3 : extension**

2 minutes 72 °C

**only dNTP's**

# Проведение ПЦР

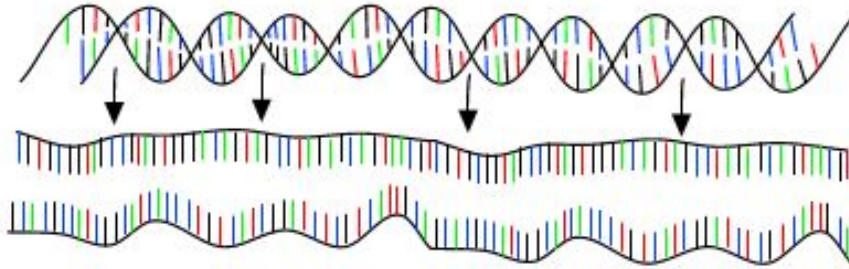
## Элонгация

ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы, синтезируя новую цепь в направлении от 5' к 3' концу. Температура элонгации зависит от полимеразы. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию *финальной элонгации*, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7—10 мин.



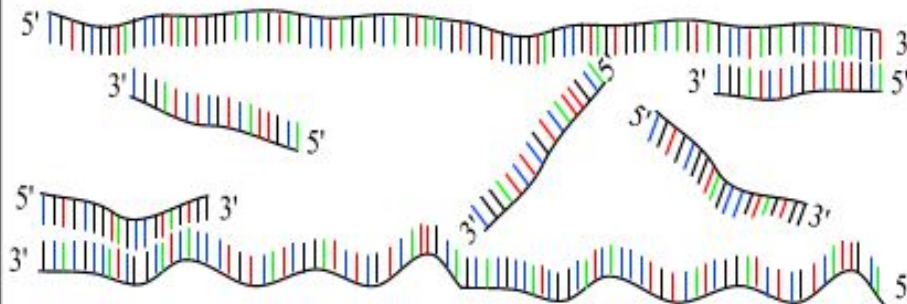
# PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



**Step 1 : denaturation**

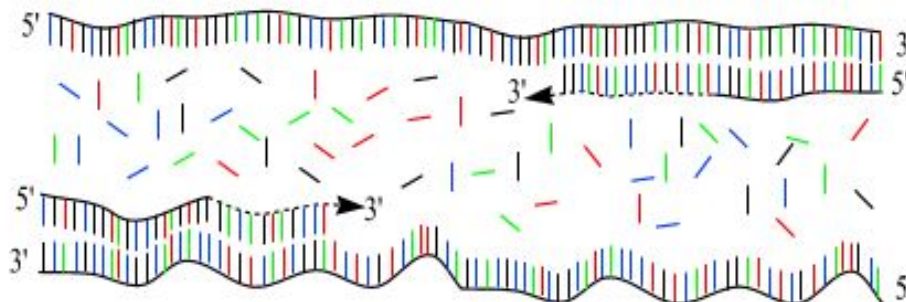
1 minut 94 °C



**Step 2 : annealing**

45 seconds 54 °C

**forward and reverse primers !!!**

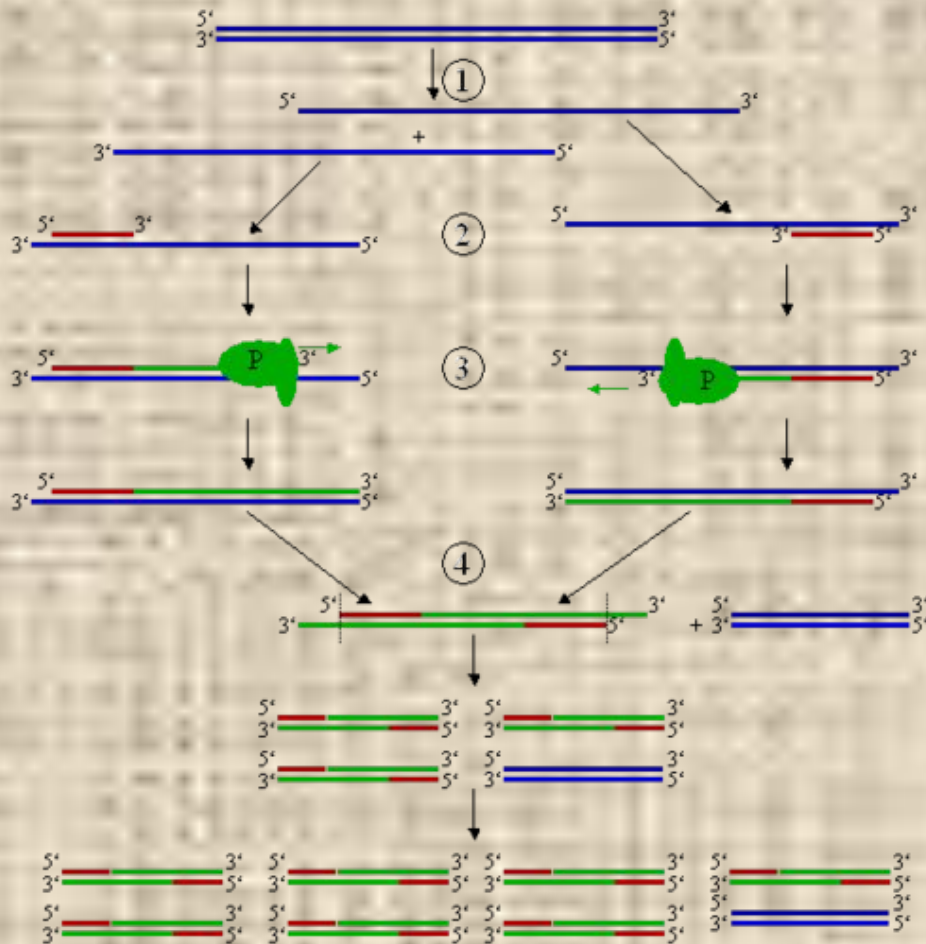


**Step 3 : extension**

2 minutes 72 °C

**only dNTP's**

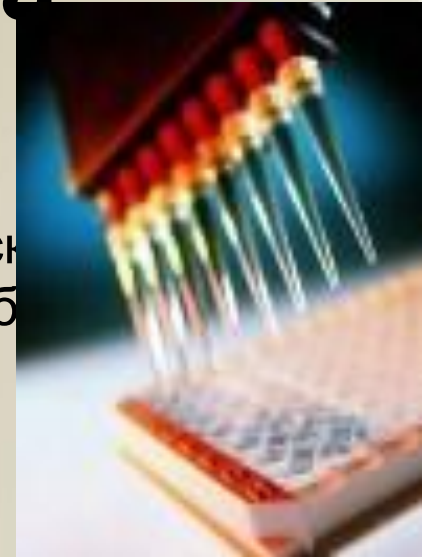
# Проведение ПЦР



Схематическое изображение первого цикла ПЦР. (1) Денатурация при 94—96 °С. (2) Отжиг при 68 °С (например). (3) Элонгация при 72 °С (P=полимераза). (4) Закончен первый цикл. Две получившиеся ДНК-цепи служат матрицей для следующего цикла, поэтому количество матричной ДНК в ходе каждого цикла удваивается

# Преимущества метода

- Полимеразная цепная реакция является диагностическим методом, позволяющим выявлять единичные клетки возбудителей многих инфекционных заболеваний за счет многократного увеличения количества копий тестируемых специфических последовательностей ДНК.
- Тест-системы, основаны на принципе амплификации ДНК, позволяет обнаруживать патогенные для человека бактерии и вирусы даже в тех случаях, когда другими способами (иммунологическим, бактериологическим, микроскопическим) их выявление невозможно.
- Это преимущество достигается за счет высокой чувствительности ПЦР - системы, которая составляет около  $10^1$  бактериальных клеток, в то время как чувствительность и монологических и микроскопических тестов колеблется в пределах  $10^3$ - $10^6$  клеток.





Тест-системы на основе ПЦР эффективны при диагностике трудно культивируемых, не культивируемых и персистирующих форм патогенных бактерий.

Определение можно проводить непосредственно в клиническом материале (кровь, сыворотка, лаважные массы, мокрота, слюна, желудочный сок, биопсийный материал, мазки, смывы) и в материале, получаемом из объектов внешней среды (вода, почва).

# Перечень достоинств ПЦР - генодиагностики инфекций

1. Метод прямой и позволяет достичь предельно возможной чувствительности: от нескольких копий до одного возбудителя в пробе.
2. Специфичность метода равна 100%.
3. Для ПЦР - анализа пригоден любой материал, в том числе и гистологические препараты.
4. Количество исследуемого материала, как правило, составляет несколько десятков микролитров но при низкой концентрации возбудителя может быть увеличена в сотни и тысячи раз за счет экстракции ДНК и РНК.
5. Метод позволяет определять число копий возбудителя в пробе и тем самым контролировать вирусемию или бактеремию в процессе лечения.

6. Исследуемый материал может быть дезинфицирован химической или термической обработкой в момент его забора, и, следовательно, исключается возможность инфицирования персонала в процессе проведения ПЦР.

7. Простота исполнения и возможность полной автоматизации.

8. Результаты получают через несколько часов, то есть в течение одного рабочего дня.



## Возможность получения ложноположительного результата.

ПЦР-анализ может показать положительный результат даже в том случае, если инфекция уже мертва, «убита» антибиотиками, но ее мертвые клетки все еще содержатся в тканях пациента.

Неспособность

ПЦР «отличить» ДНК мертвой клетки от живой налагает определенные требования при использовании ПЦР и для контроля эффективности лечения.

Основное правило, выдерживать необходимый период после лечения до проведения контрольного ПЦР исследования.



# Предупреждение ложно - положительных результатов ПЦР

1. Перекрестная контаминация от пробы к пробе (в процессе обработки клинических образцов или при раскапывании реакционной смеси), приводящей к появлению спорадических ложно - положительных результатов;
2. Контаминация рекомбинантными плазмидами, содержащими клонированные последовательности детектируемого гена;
3. Контаминация продуктами амплификации (амплификонами) являются наиболее частой причиной ложно - положительных результатов, поскольку в процессе ПЦР - диагностики амплификоны накапливаются в больших количествах и очень легко переносятся с аэрозолями и через приборы. Поэтому детекция продуктов ПЦР должна проводиться в изолированной комнате сотрудником, не производящим обработку клинических образцов и не готовящим реактивы для ПЦР. Приготовление основных растворов также должно производиться в отдельной чистой комнате. Все растворы должны храниться и использоваться в небольших порциях.



# Ошибки при проведении ПЦР исследований

1. Ложноположительный результат анализа может получиться вследствие неправильного забора материала - не попадания в материал эпителиальных клеток, а содержания большого количества совершенно неинформативной слизи.
2. На получение ложных результатов ДНК-анализа оказывает влияние неправильная транспортировка и хранение полученных проб. ДНК инфекции в этом случае может разрушаться и как следствие — ложноотрицательный результат.
3. Нарушение стерильности при заборе материала для ПЦР - диагностики — еще одна причина ложноположительной ПЦР. В результате обнаружится «несуществующая» инфекция.
4. Непригодность реагентов. Неоснащенная и несовременная лаборатория, где на непригодность реагентов врачи «закрывают глаза» - это еще одна и серьезных причин недостоверной диагностики. Конечно, это сильно удешевляет лабораторную диагностику, но не может не сказаться на ее результатах.

# Применение ПЦР

- *Криминалистика*

ПЦР используют для сравнения так называемых «генетических отпечатков пальцев». Необходим образец генетического материала с места преступления — кровь, слюна, сперма, волосы и т. п.

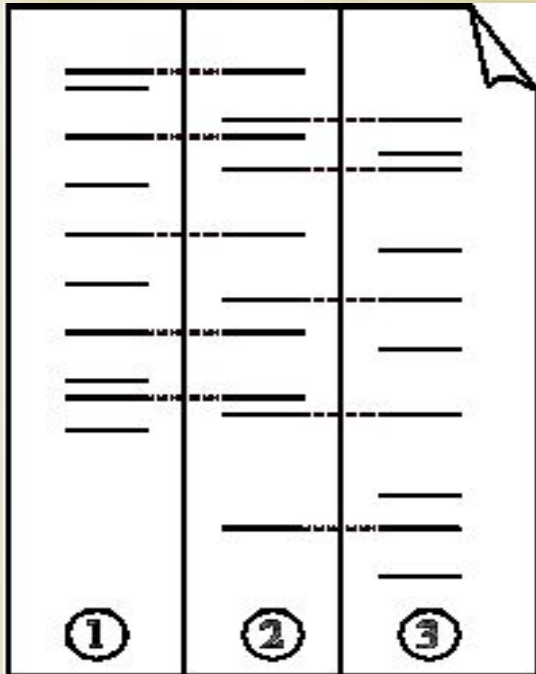
Его сравнивают с генетическим материалом подозреваемого.

Достаточно совсем малого количества ДНК, теоретически — одной копии. ДНК расщепляют на фрагменты, затем амплифицируют с помощью ПЦР. Фрагменты разделяют с помощью электрофореза

ДНК. Полученную картину расположения полос ДНК и называют генетическим отпечатком пальцев (англ. genetic fingerprint).



# Установление отцовства



Результаты электрофореза ДНК-фрагментов, амплифицированных с помощью ПЦР. (1) Отец. (2) Ребенок. (3) Мать. Ребенок унаследовал некоторые особенности генетического отпечатка обоих родителей, что дало новый, уникальный отпечаток.

## *Медицинская диагностика*

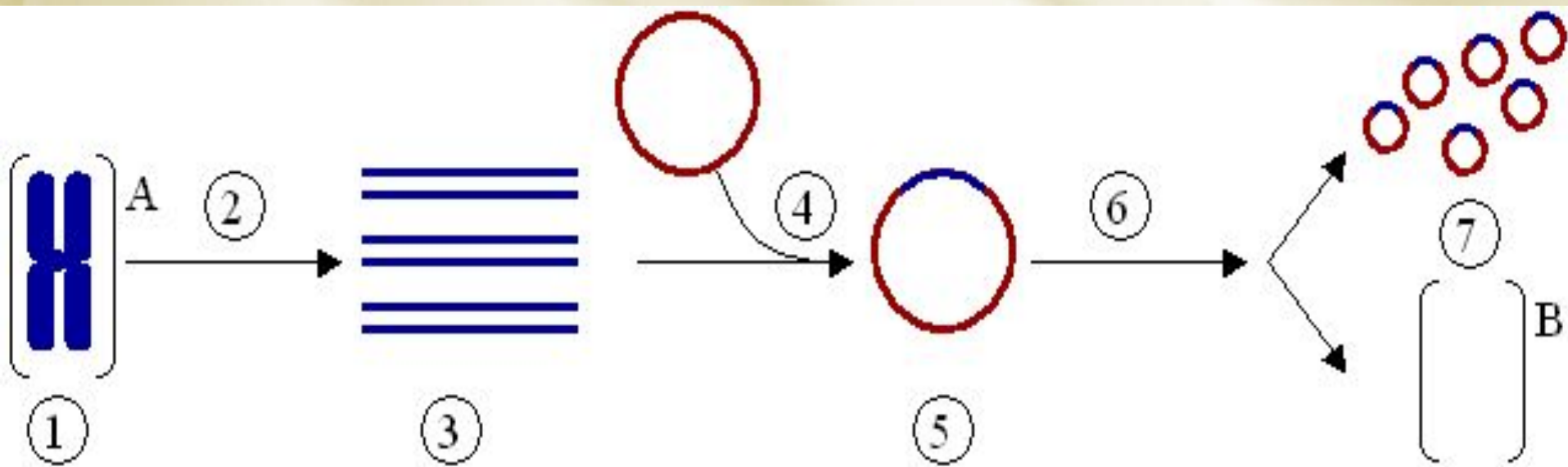
ПЦР дает возможность существенно ускорить и облегчить диагностику наследственных и вирусных заболеваний. Нужный ген амплифицируют с помощью ПЦР с использованием соответствующих праймеров, а затем секвенируют для определения мутаций. Вирусные инфекции можно обнаруживать сразу после заражения, за недели или месяцы до того, как проявятся симптомы заболевания.

# Персонализированная медицина

Иногда лекарства оказываются токсичными или аллергенными для некоторых пациентов. Причины этого — отчасти в индивидуальных различиях в восприимчивости и метаболизме лекарств и их производных. Эти различия детерминируются на генетическом уровне. Например, у одного пациента определенный цитохром (белок печени, отвечающий за метаболизм чужеродных веществ) может быть более активен, у другого — менее. Для того чтобы определить, какой разновидностью цитохрома обладает данный пациент, предложено проводить ПЦР-анализ перед применением лекарства. Такой анализ называют предварительным



Клонирование генов — это процесс выделения генов и, в результате генноинженерных манипуляций, получения большого количества продукта данного гена.



Клонирование гена с использованием плазмиды.

(1) Хромосомная ДНК организма А. (2) ПЦР. (3) Множество копий гена организма А. (4) Вставка гена в плазмиду. (5) Плазмиды с геном организма А. (6) Введение плазмиды в организм В. (7) Умножение количества копий гена организма А в организме В.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ