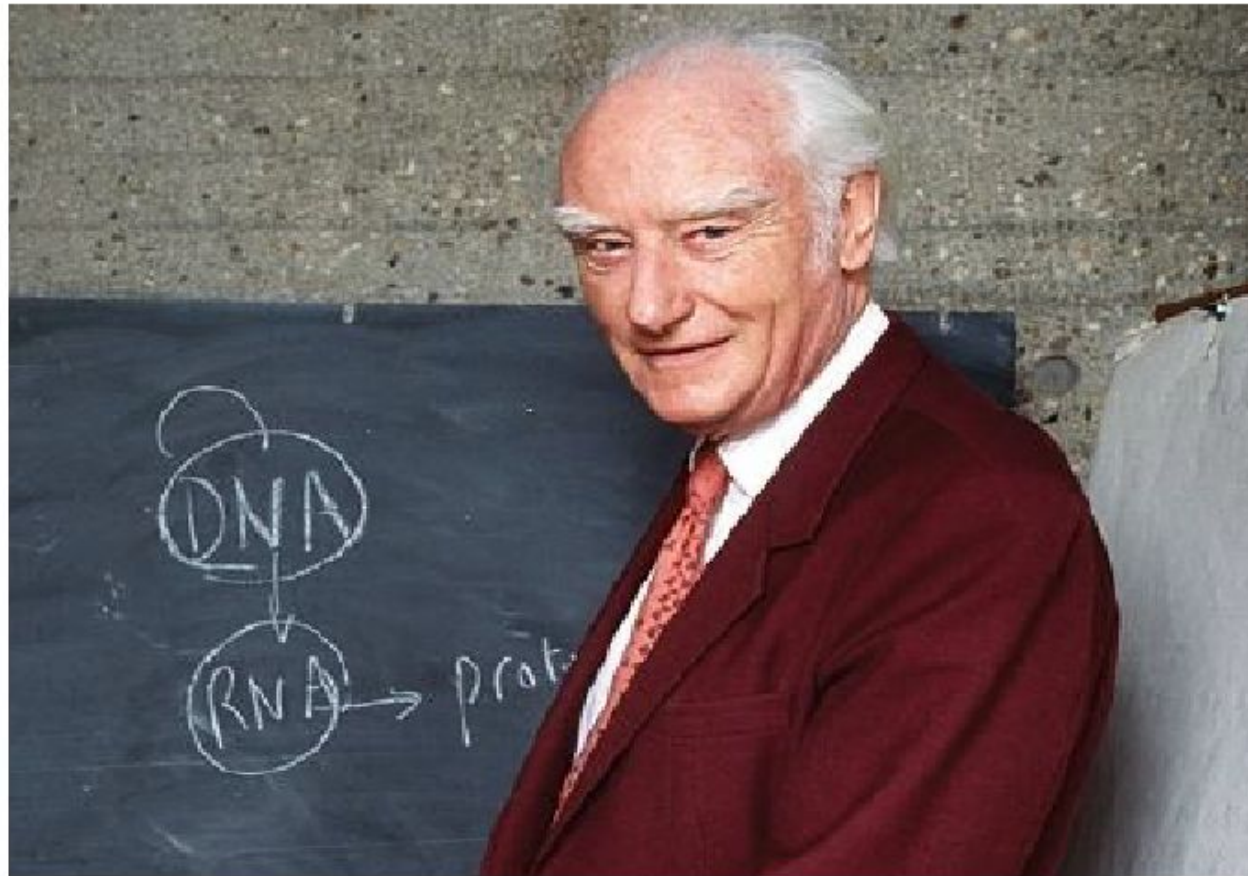


# Введение в молекулярную биологию

**Молекулярная биология** - это наука о механизмах хранения, воспроизведения, передачи и реализации генетической информации, о структуре и функциях нерегулярных биополимеров - нуклеиновых кислот и белков.



**Фрэнсис Крик**  
(1916 – 2004),  
англ., США

**1953**

**Открыта  
структура ДНК**

**Дата  
рождения  
молекулярной  
биологии**

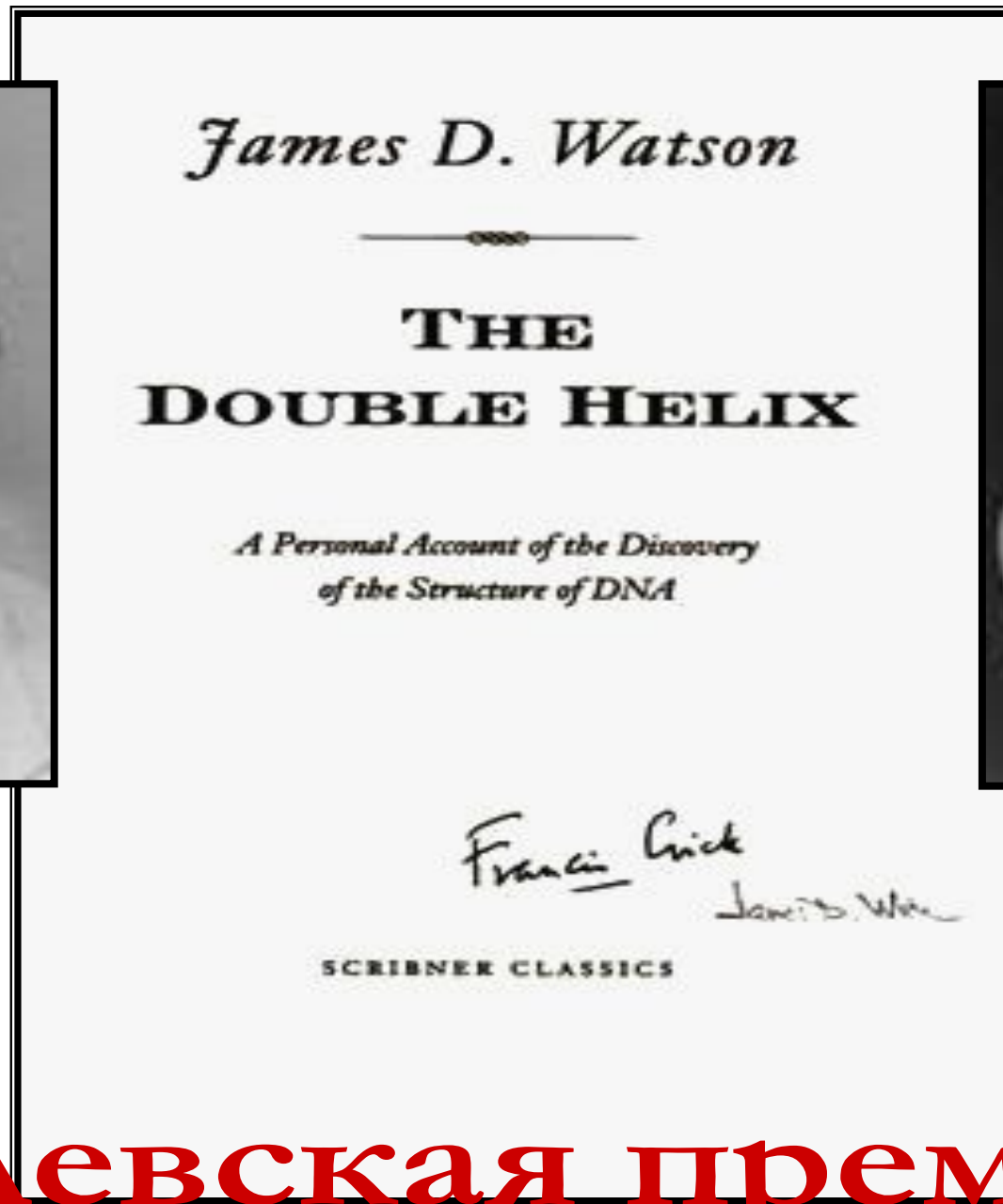


Джеймс Уотсон

Фрэнсис Крик



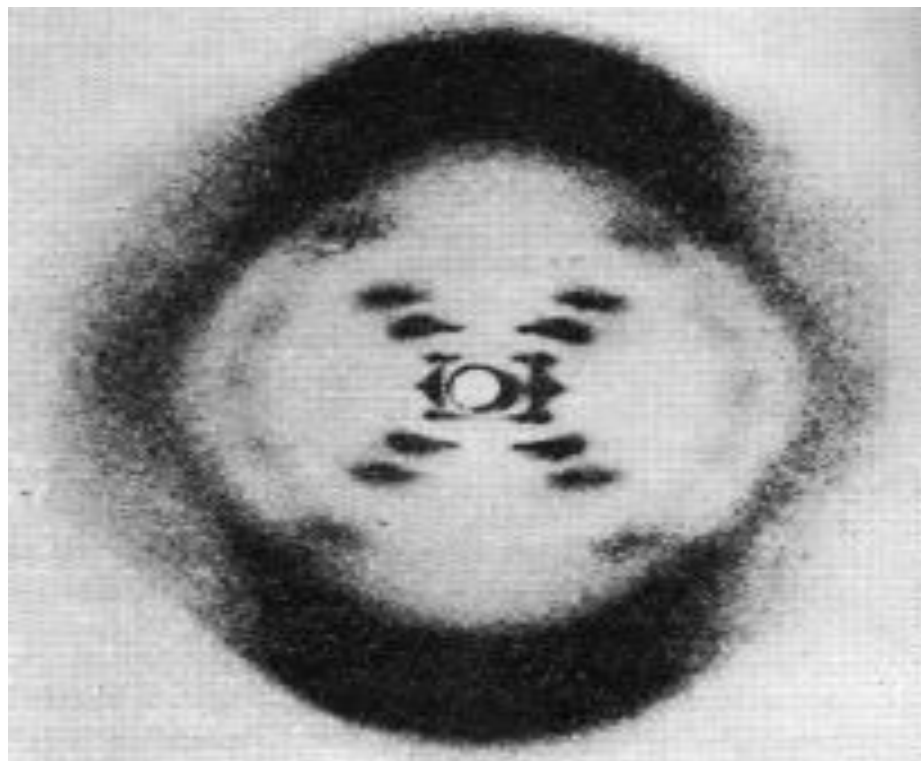
James Dewey Watson



Francis Harry Compton  
Crick

**Нобелевская премия 1962**





Рентгеноструктурный портрет  
ДНК – знаменитое фото 51



Розалинд Франклин  
**1920 – 1958**

Английский биофизик и ученый-рентгенограф. Именно благодаря сделанной ею фотографии была открыта ДНК. А ее имя незримо связано с этим открытием.



## **ROSALIND FRANKLIN: DNA'S DARK LADY**

Sunday 15 January 2006 10pm-10.50pm

Today, nearly all scientists agree that the hard evidence used to support Francis Crick, James Watson and Maurice Wilkins' revolutionary theory about DNA was based on the work of Rosalind Franklin, a brilliant molecular biologist and crystallographer.

Yet in 1962, when the three men were awarded a Nobel Prize for the discovery, Franklin wasn't even mentioned. Tragically, she had died four years earlier at the age of 37. Her cancer was probably the result of over-exposure to the radiation she used in making her remarkable x-ray photographs - including Photograph 51 - the image that was the key to revealing the double-helix structure of DNA.

Dark Lady of DNA finds out why Franklin never received credit for her contribution, how the three men gained access to her crucial data and asks who this pioneering woman who worked in the male-dominated world of scientific research was.

Молекулы ДНК и РНК можно увидеть в электронный микроскоп

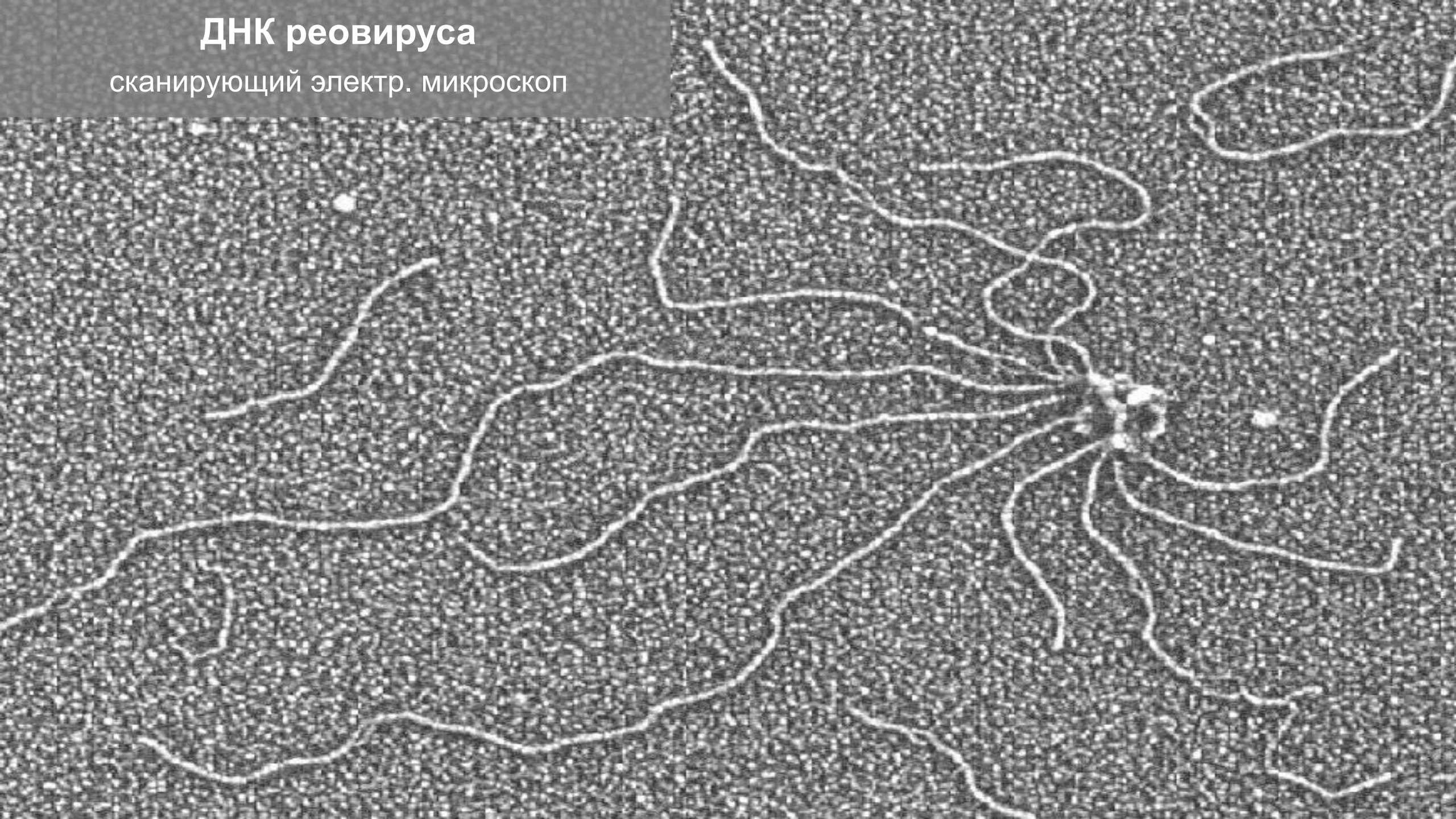


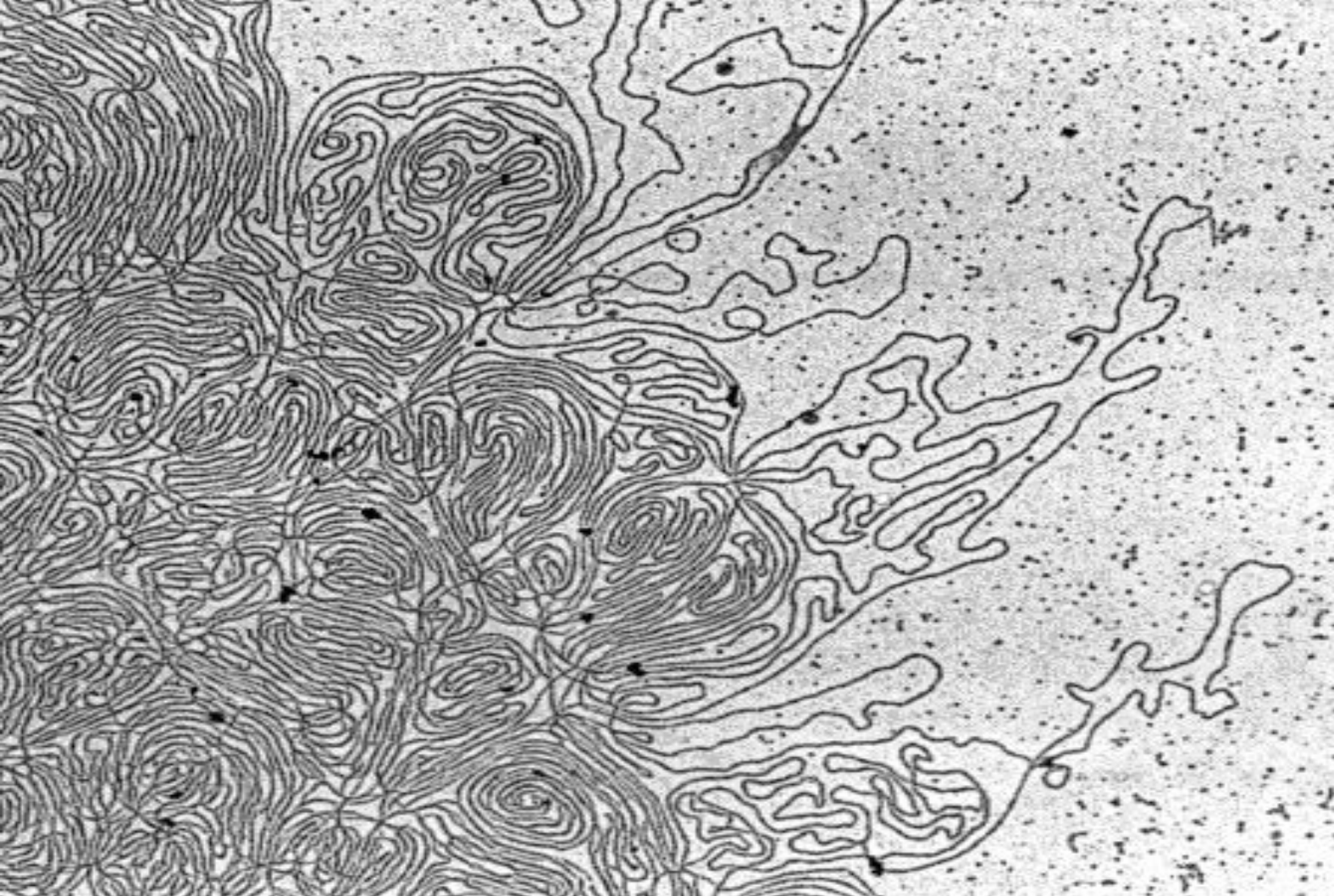
**ДНК бактериальных плазмид**



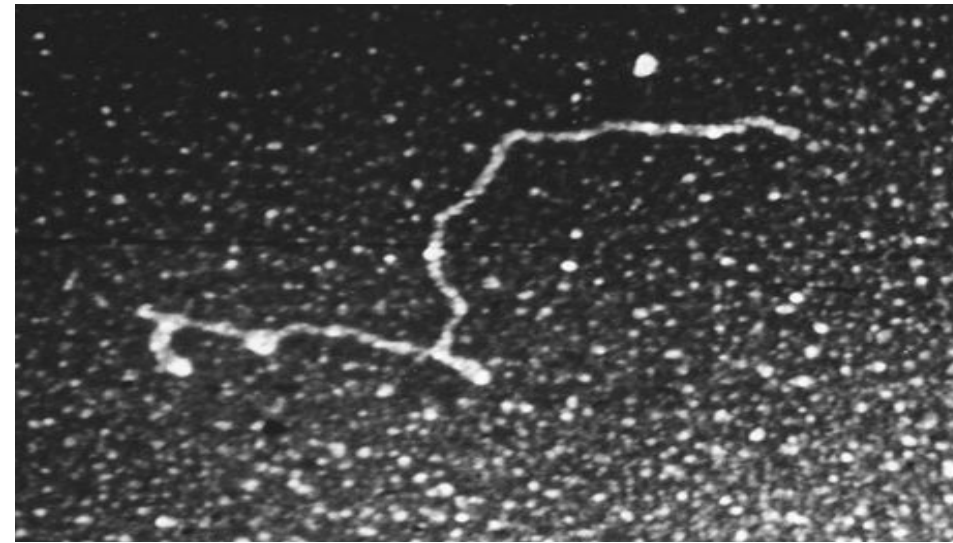
# ДНК реовируса

сканирующий электр. микроскоп

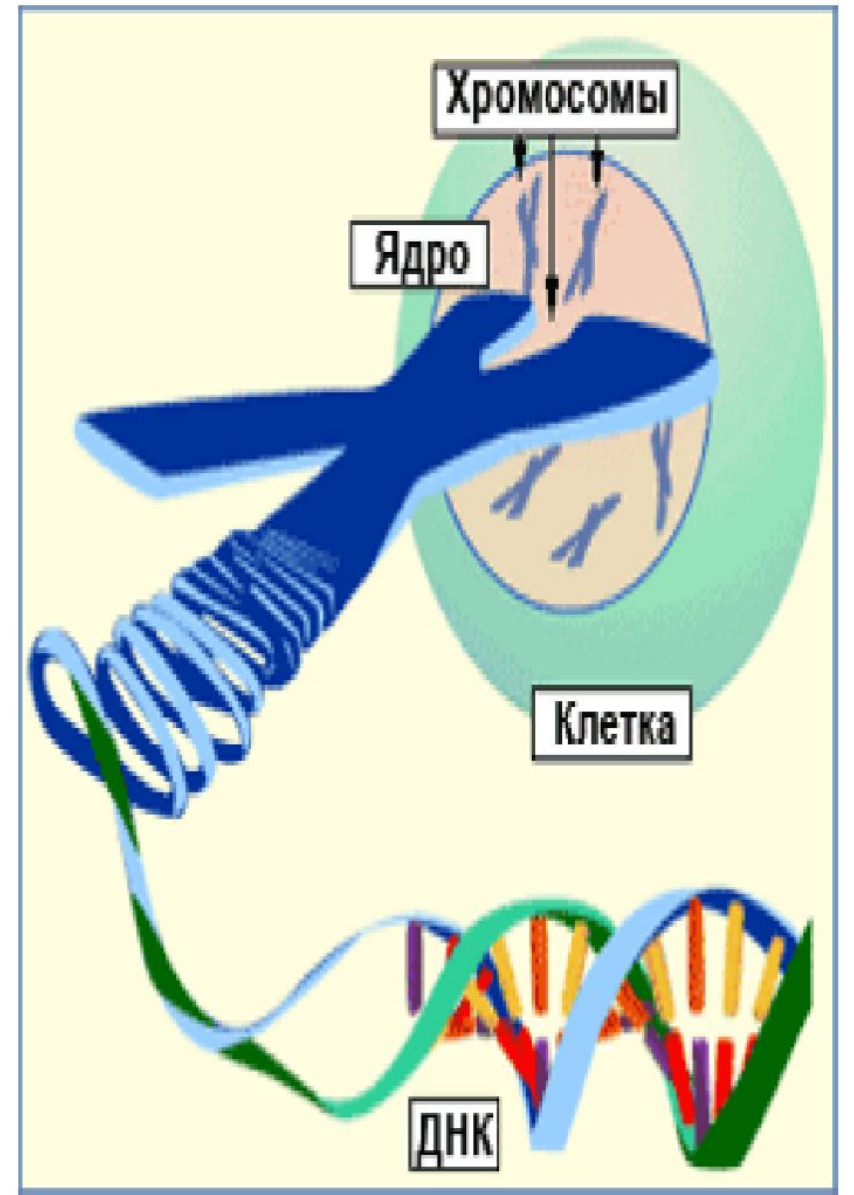
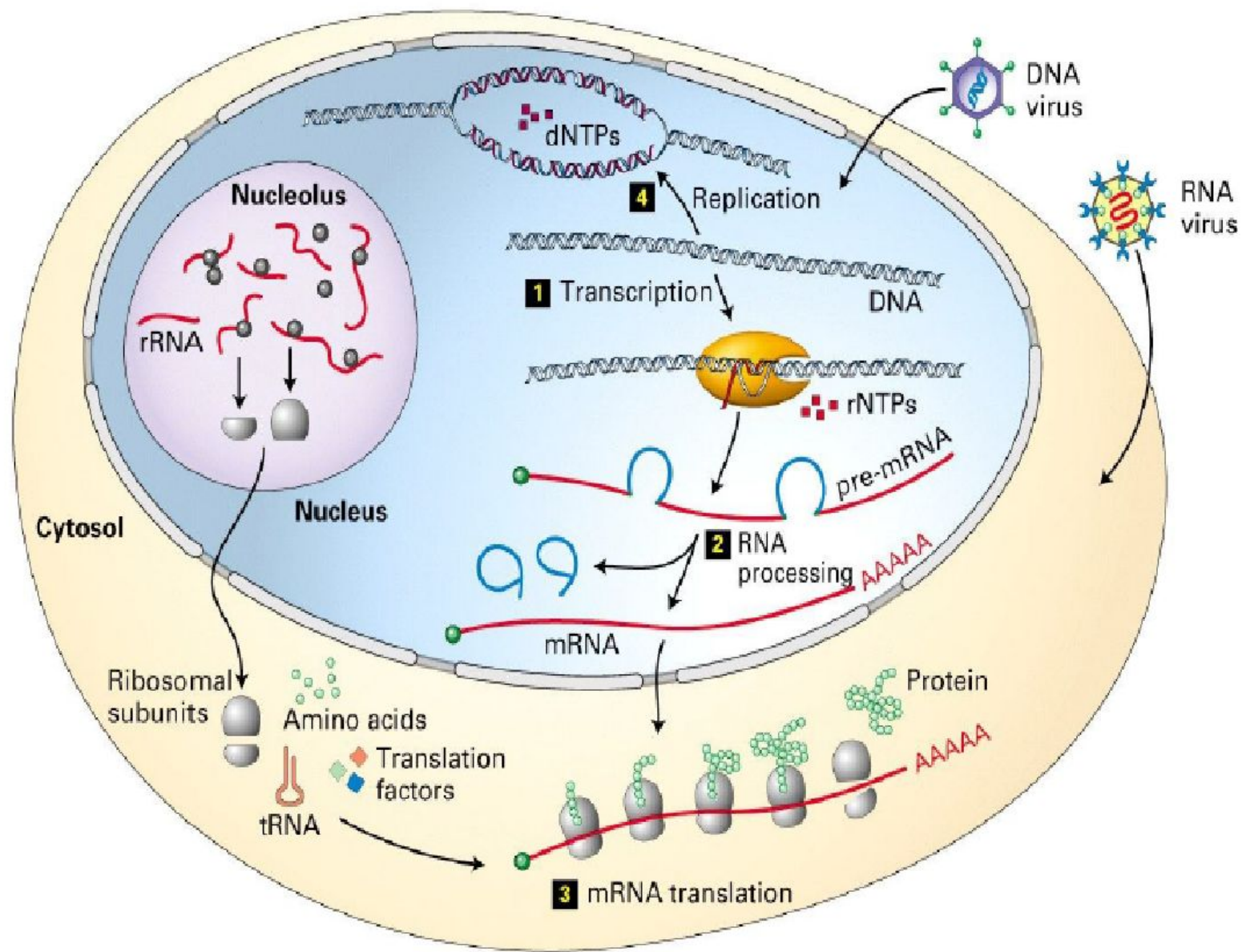




**ДНК**, выделенная  
из одной хромосомы человека

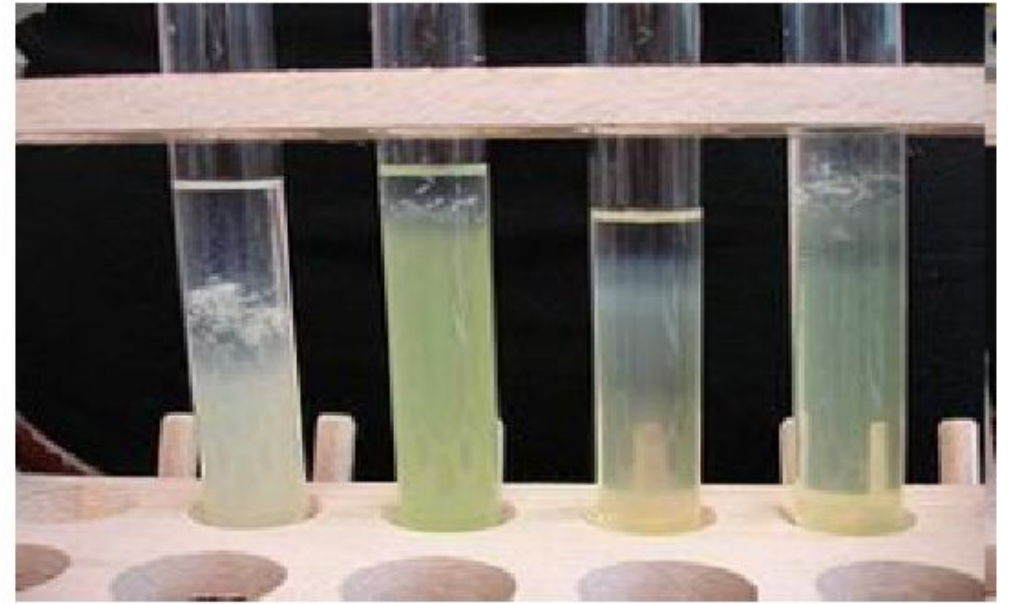


**РНК**





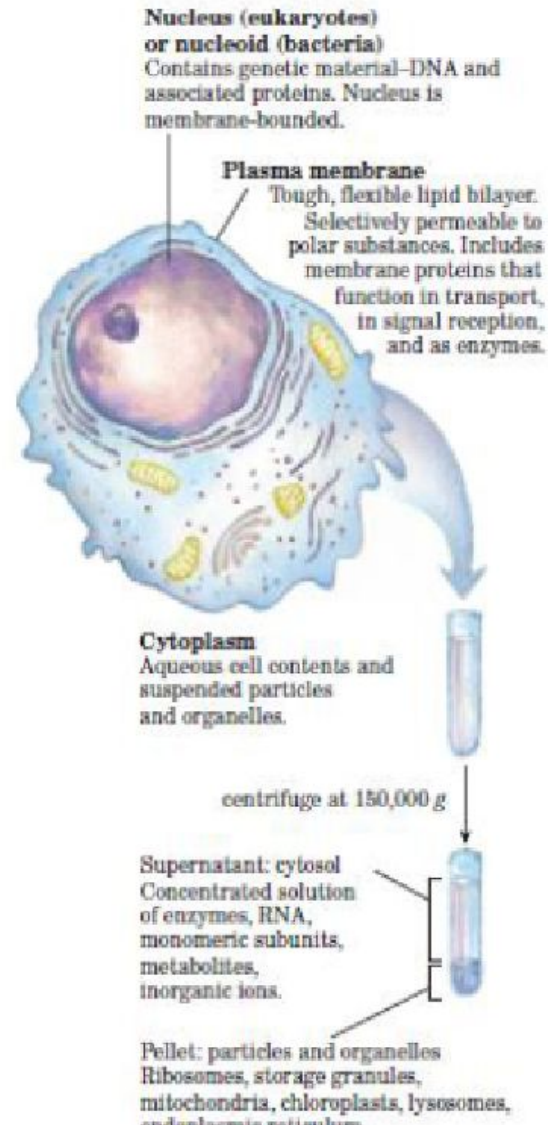
ДНК генома бактериофага:  
фотография под  
трансмиссионным  
электронным микроскопом.



Выделение ДНК  
методом спиртового  
осаждения. ДНК  
выглядит как клубок  
белых нитей.

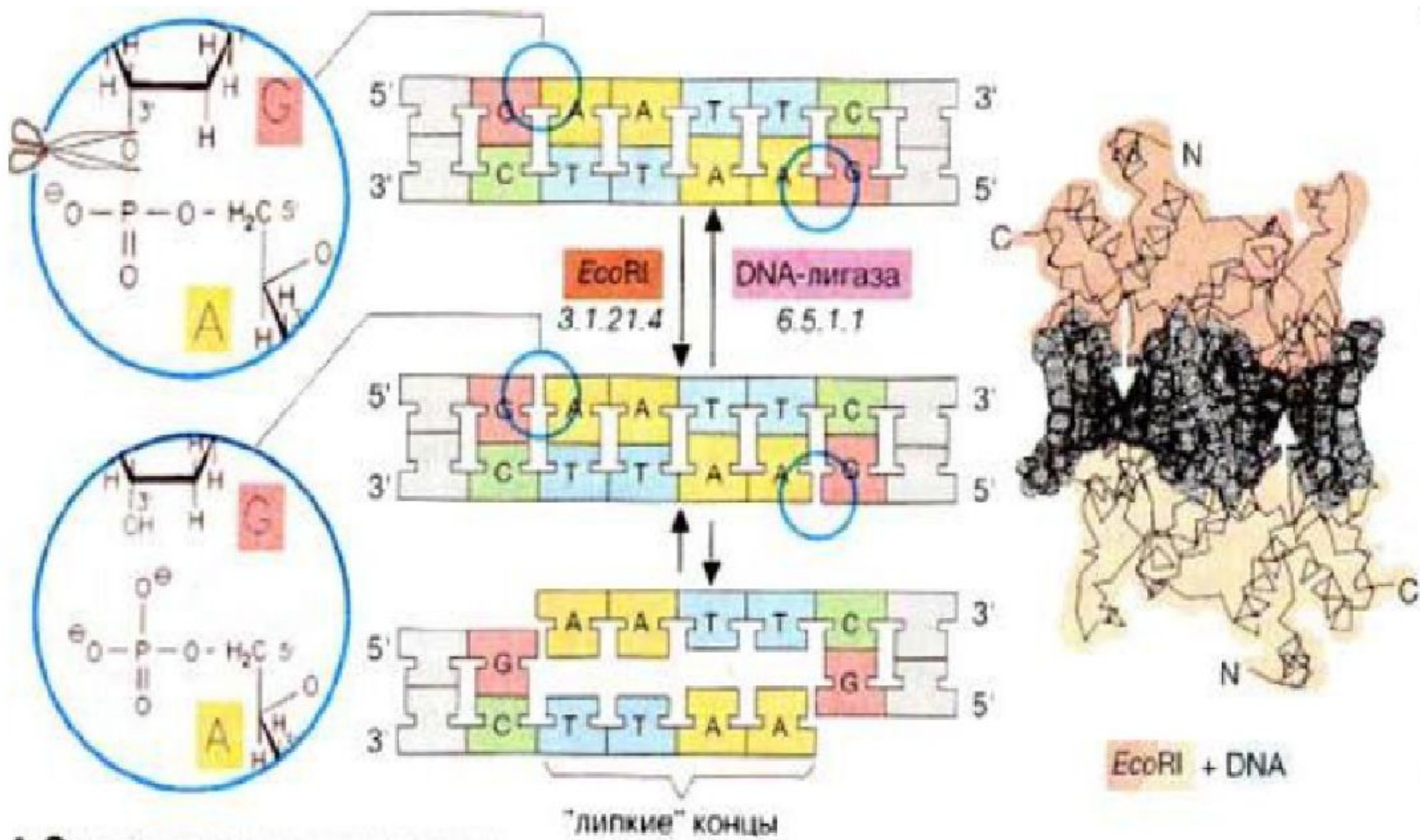
# МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

## Выделение белков и нуклеиновых кислот



*(Lehninger, 2004)*

# Рестрикция ДНК



**Рестрикционный анализ** - наиболее простой метод прямой детекции мутаций. Его суть состоит в том, что рестрикционные эндонуклеазы (бактериальные ферменты) разрезают двойную нить ДНК в определенных последовательностях из 4-8 нуклеотидов. Разрезанные участки мутантной ДНК, отличающиеся по длине от нормальных участков, выявляются на электрофореграмме. Если в состав сайта рестрикции входит полиморфный нуклеотид, эту мутацию можно выявить абсолютно достоверно. Если полиморфные нуклеотиды лежат в неузнаваемых рестриктазой участках, то метод рестрикционного анализа неприменим.

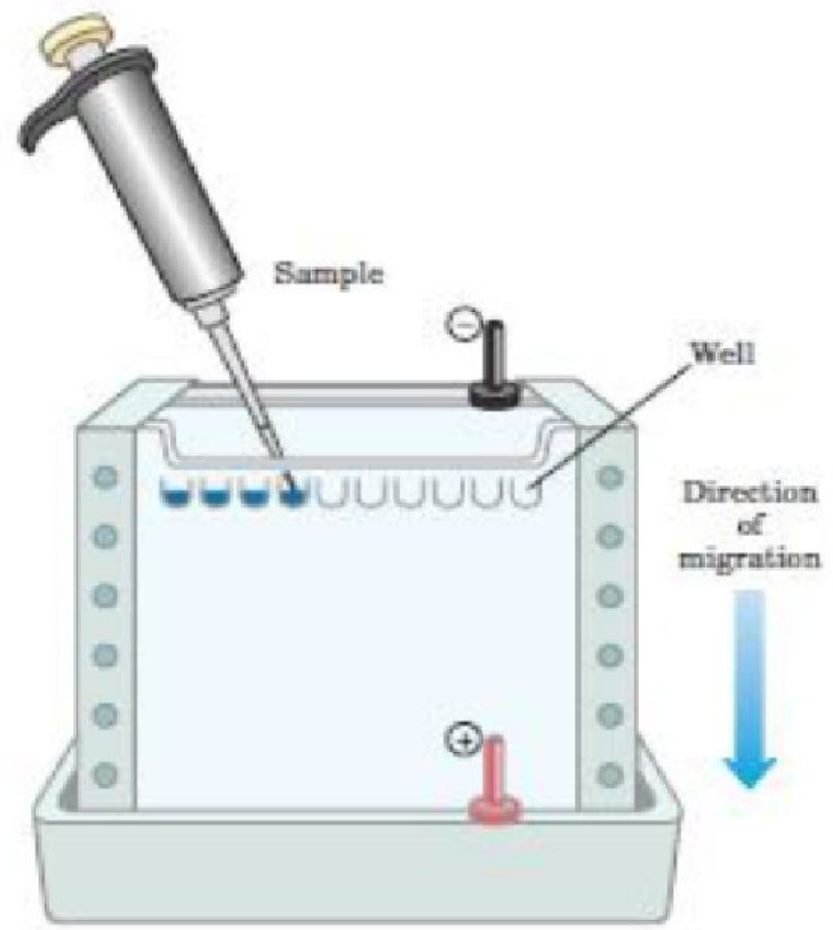
# Гель-электрофорез



Камера для  
горизонтального  
электрофореза



Камера для  
вертикального  
электрофореза





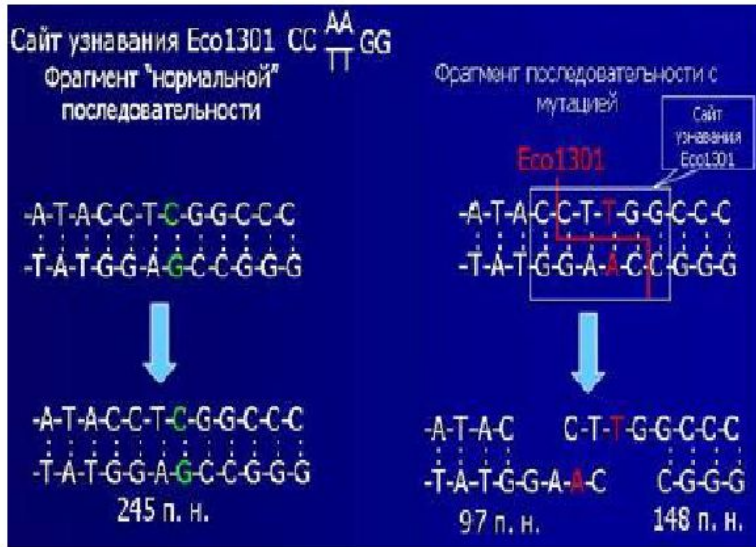
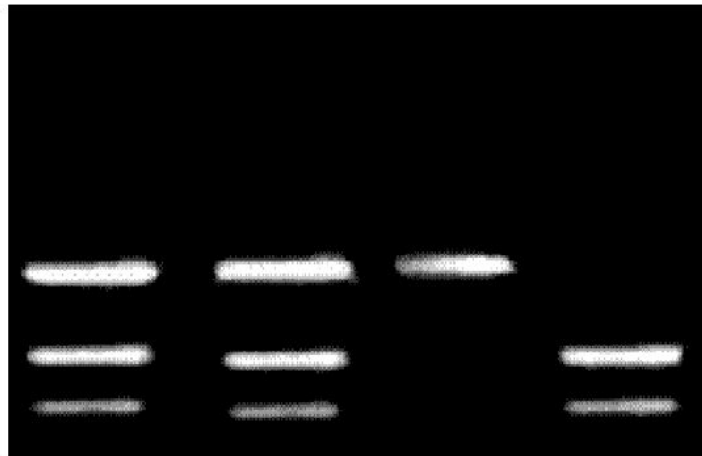


Схема рестриционного анализа для детекции мутаций R408WR408W (мутация гена фенилаланингидроксилазы, ассоциированная с фенилкетонурией)



мать      отец      пробанд      проба без мутации

1,8 %-ный  
агарозный гель

- Ключом к рестриционному картированию служат свойства одного класса ферментов, обнаруженных у бактерий. рестриктирующие ферменты режут двухцепочечную ДНК в специфических участках. Каждый рестриктирующий фермент имеет свою особую мишень. Обычно это специфическая последовательность нуклеотидов длиной от 4 до 6 пар оснований. Фермент режет ДНК в каждой точке, где встречается такая последовательность. Разные рестриктирующие ферменты имеют различные последовательности-мишени. Сейчас в распоряжении исследователей находится большой набор рестриктаз.

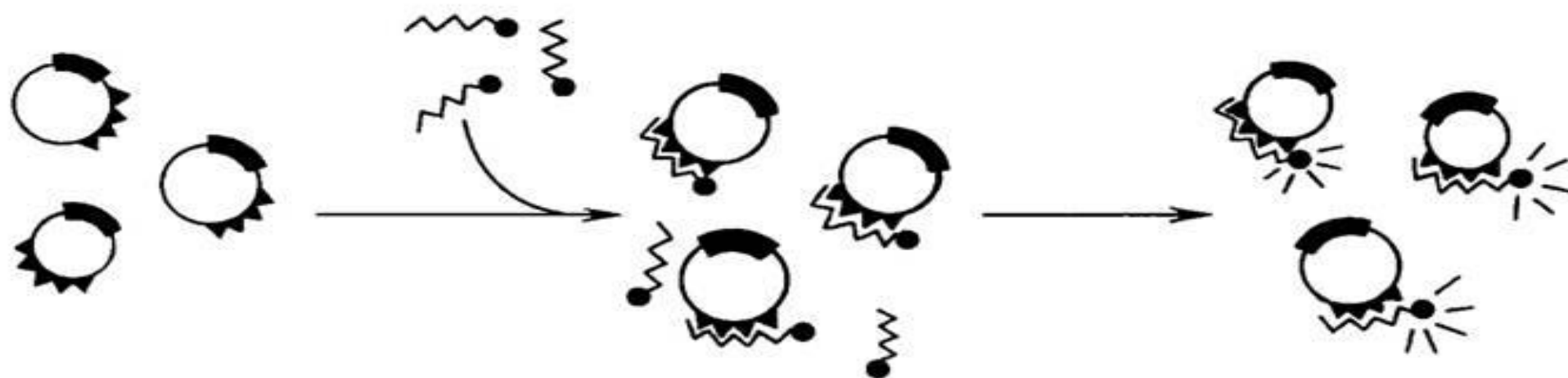


# Молекулярная диагностика

- **Гибридизация ДНК:** для определения порядка расположения нуклеотидов в исследуемом генетическом материале изучаемую ДНК инкубируют с ДНК-зондом – меченной радиоактивным изотопом однонитевой ДНК с известной последовательностью нуклеотидов. В случае комплементарности происходит сшивка.
- **Блот-гибридизация:** для определения положения аномального фрагмента ДНК исследуемую ДНК после рестрикции разделяют по молекулярной массе, денатурируют, фиксируют на мембране и гибридизируют с меченым радиоактивным изотопом ДНК- или РНК-зондом.
- **Клонирование ДНК:** с помощью рестриктаз нить выделяют отдельные группы генов или единичные гены, затем создают необходимое количество копий данного гена.

## Метод молекулярной гибридизации

- Основан на способности ДНК и РНК специфически соединяться (**гибридизироваться**) с комплементарными олигонуклеотидными фрагментами, искусственно синтезированными и мечеными ферментом, флюорохромом или изотопом (**зондами**).



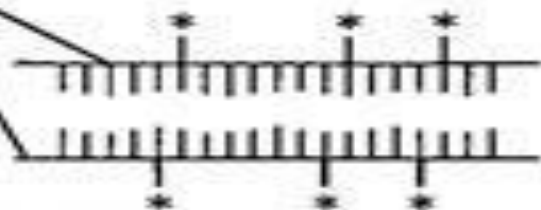
Исследуемая ДНК



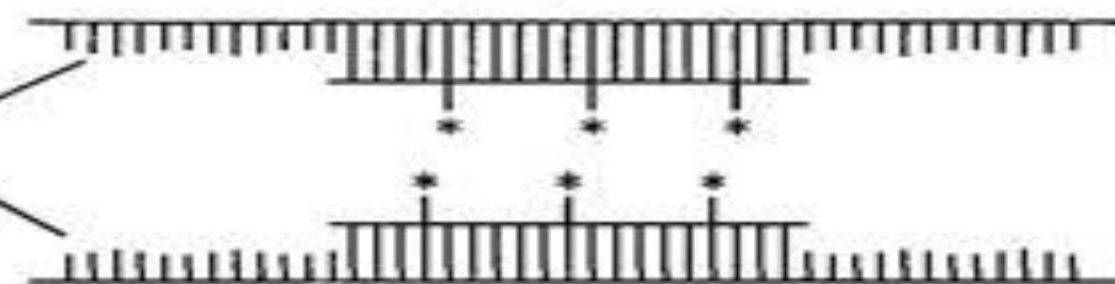
Денатурация  
и фиксация  
на фильтре



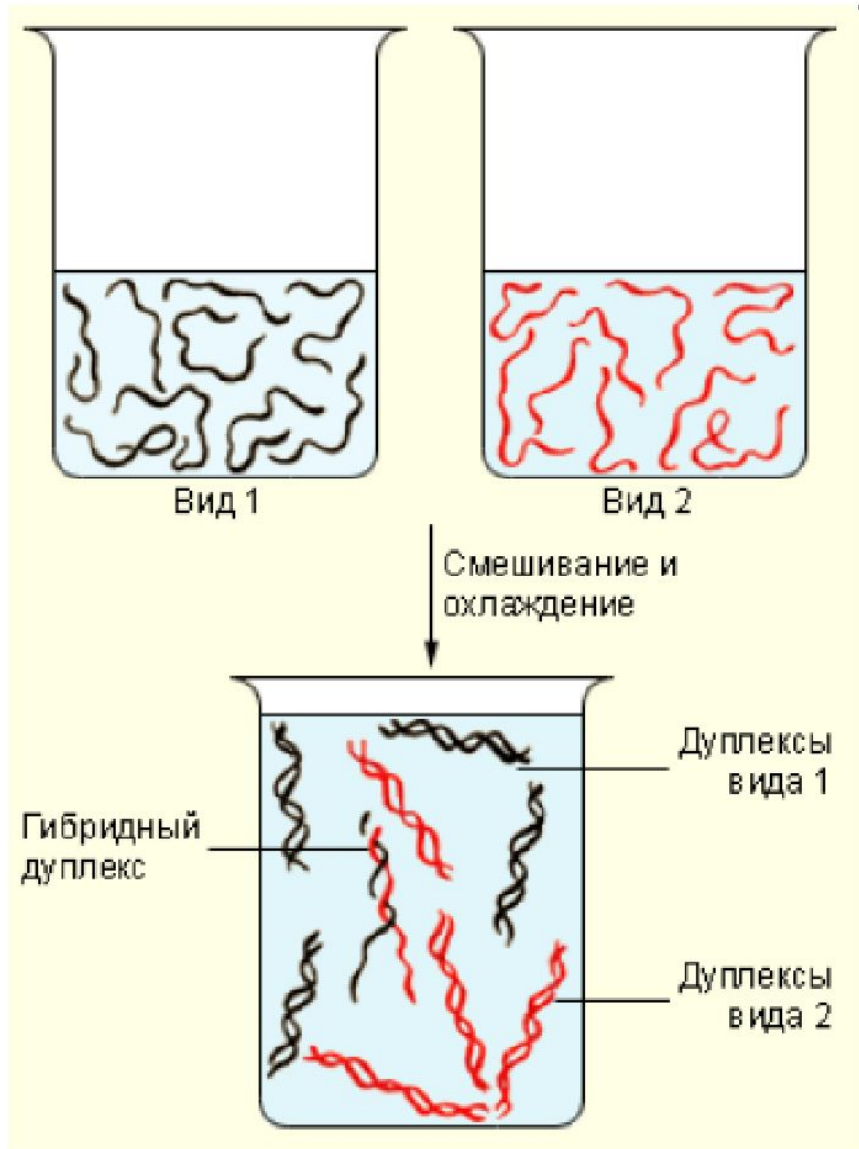
Меченый  
зонд



Гибридизация



Гибридовавшаяся  
ДНК



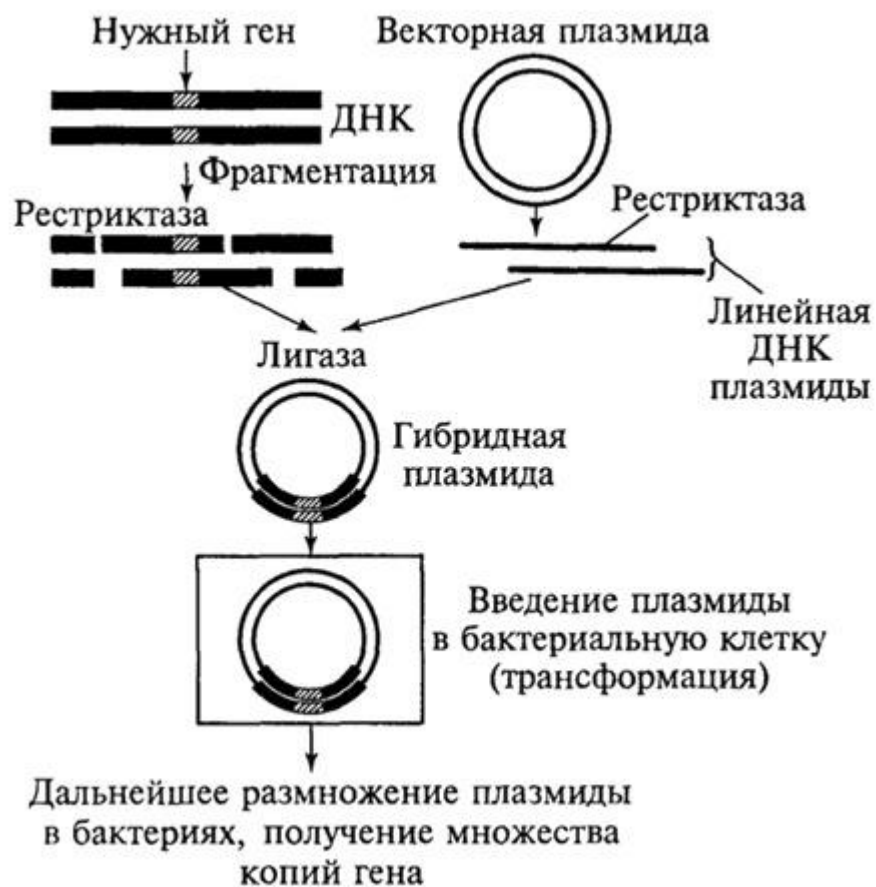
## Данные молекулярной биологии

Чем ближе родство, тем меньше отличий в строении ДНК и белков. В настоящее время проведена гибридизация цепей нуклеотидов ДНК человека и шимпанзе. Между комплементарными нуклеотидами восстановились химические связи, и оказалось, что ДНК человека и шимпанзе сходны на 91 — 97,5%.

Универсальность генетического кода свидетельствует о едином происхождении всех живых организмов Земли.



# Клонирование генов



## Технология рекомбинантных ДНК (молекулярное клонирование)

- 1. Из организма донора извлекают нужную ДНК, подвергают ее ферментативному гидролизу и извлекают нужный ген.
- 2. У бактерий или других клеточных структур извлекают вектор (плазмиду) и его разрезают.
- 3. Вставляют в вектор фрагмент ДНК.
- 4. Полученную конструкцию вводят в клетку хозяина, где она передается потомкам.
- 5. Получают специфический белковый продукт, синтезируемый клетками хозяина.



# Получение генно-инженерного инсулина



В 1983 году Кэри Мюллис с сотрудниками разработал метод клонирования последовательностей ДНК *in vitro*, который получил название полимеразной цепной реакции (ПЦР).

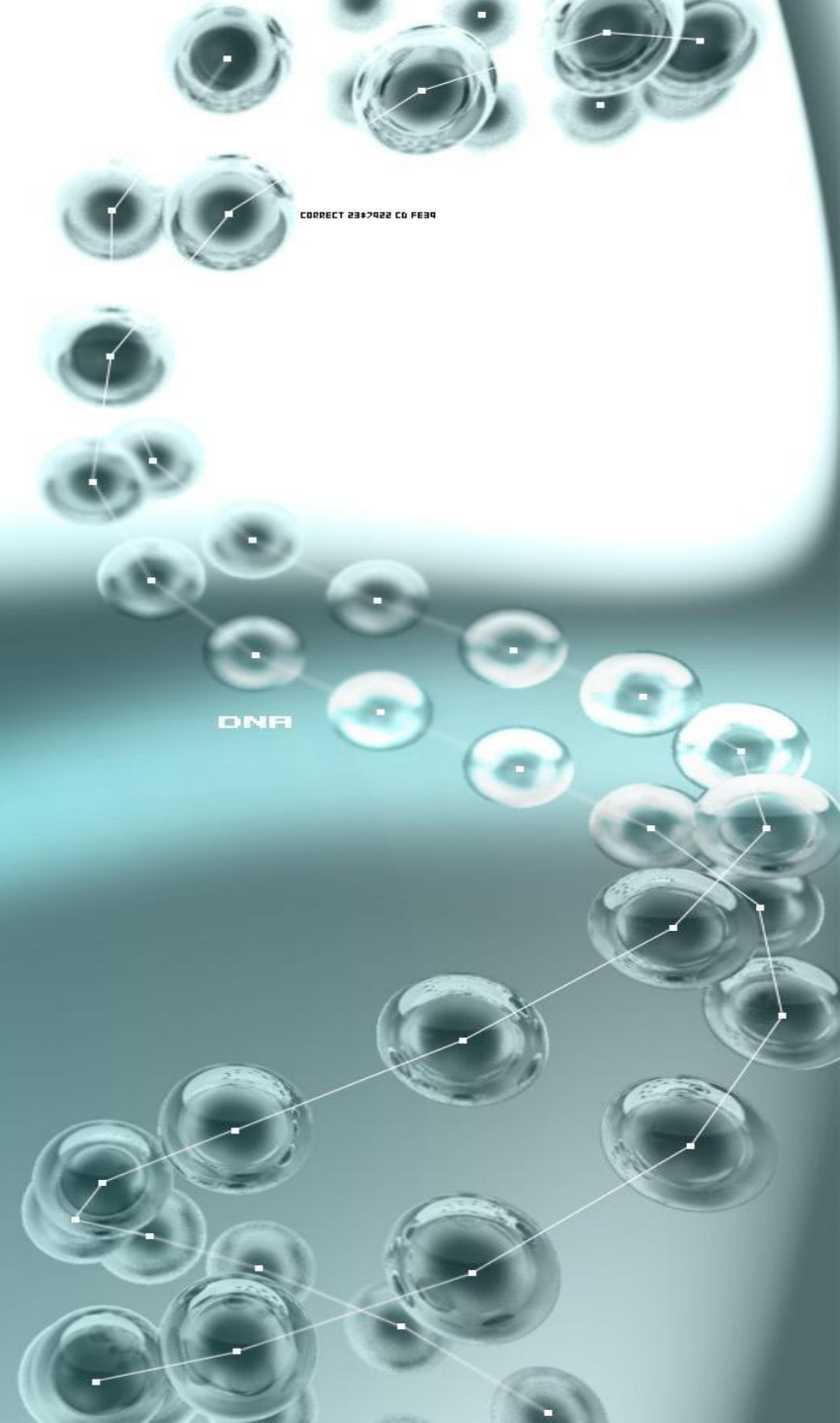
ПЦР – метод амплификации, т.е. получения большого числа копий нужного гена или его фрагмента в условиях *in vitro*.



Праймеры – это искусственно синтезированные короткие однонитевые ДНК (20 – 30 нуклеотидов), выполняющие функцию «затравок» при ферментативном синтезе ДНК. В ПЦР обычно используют 2 праймера, которые комплементарны 3'-концевым последовательностям амплифицируемого участка на обеих нитях ДНК-матрицы соответственно. Расстояние между праймерами определяет длину синтезируемых фрагментов ДНК.



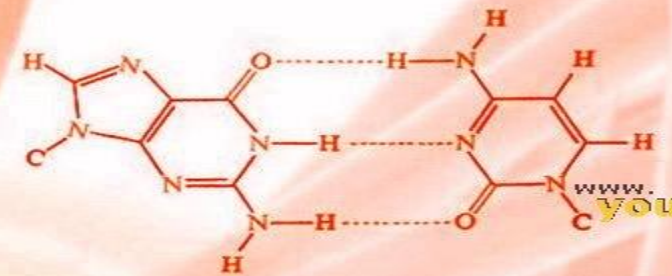
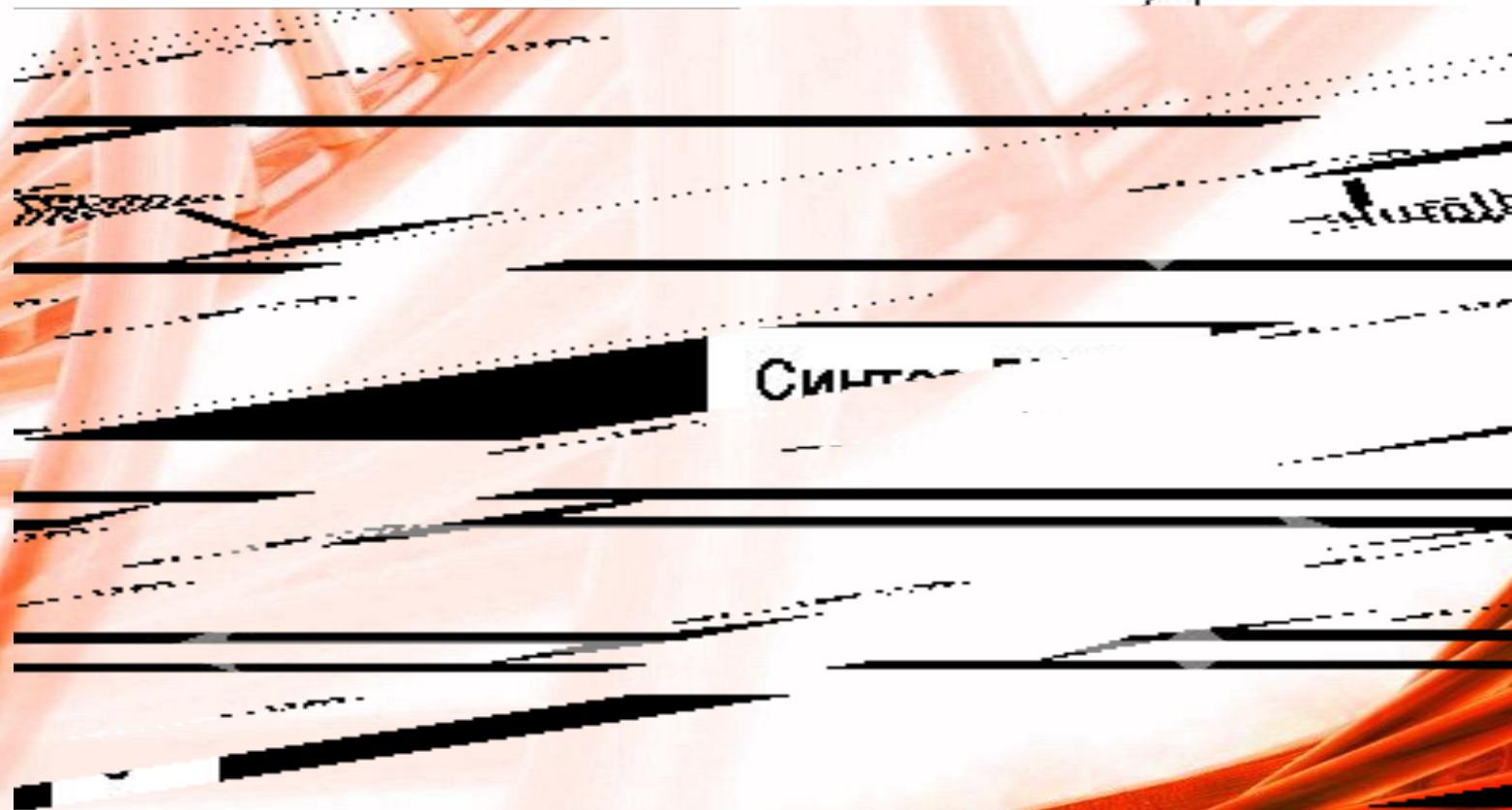
Термостабильные бактерии *Thermus Aquaticus*



В один цикл ПЦР включается 3 этапа:

- Денатурация – исходная смесь нагревается до  $94^{\circ}\text{C}$ , при этом нити ДНК расходятся;
- Отжиг – на этом этапе  $T$  реакционной смеси снижается до  $52 - 60^{\circ}\text{C}$  и происходит комплементарное связывание праймеров с нитями матричной ДНК;
- Полимеризация, в ходе которой Taq-полимераза катализирует удлинение праймеров (с 3'-конца) и синтез новых цепей ДНК.  $T$  смеси для проявления оптимальной активности Taq-полимеразы соответствует  $72^{\circ}\text{C}$ .

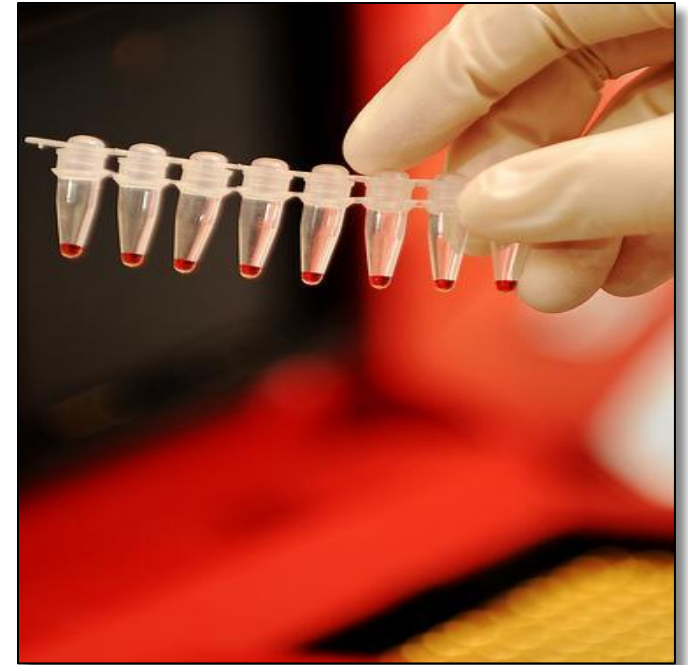
# Разделившиеся комплементарные цепи ДНК



Эти этапы повторяются многократно в приборе – амплификаторе (термоциклере), что позволяет получить огромное количество копий нужного фрагмента ДНК. Так, в результате проведения 20 циклов ПЦР анализируемый участок ДНК амплифицируется более чем в миллион раз.

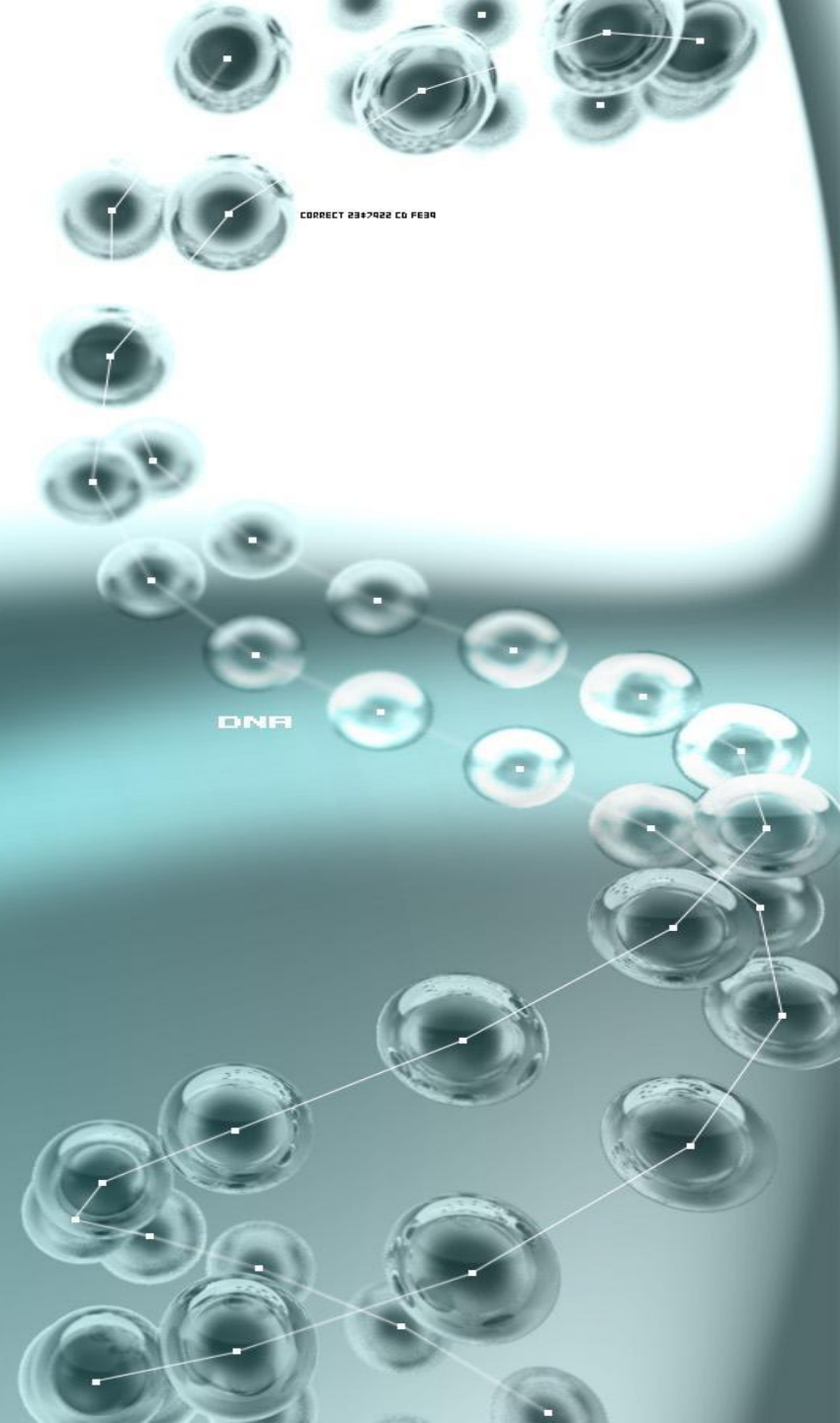
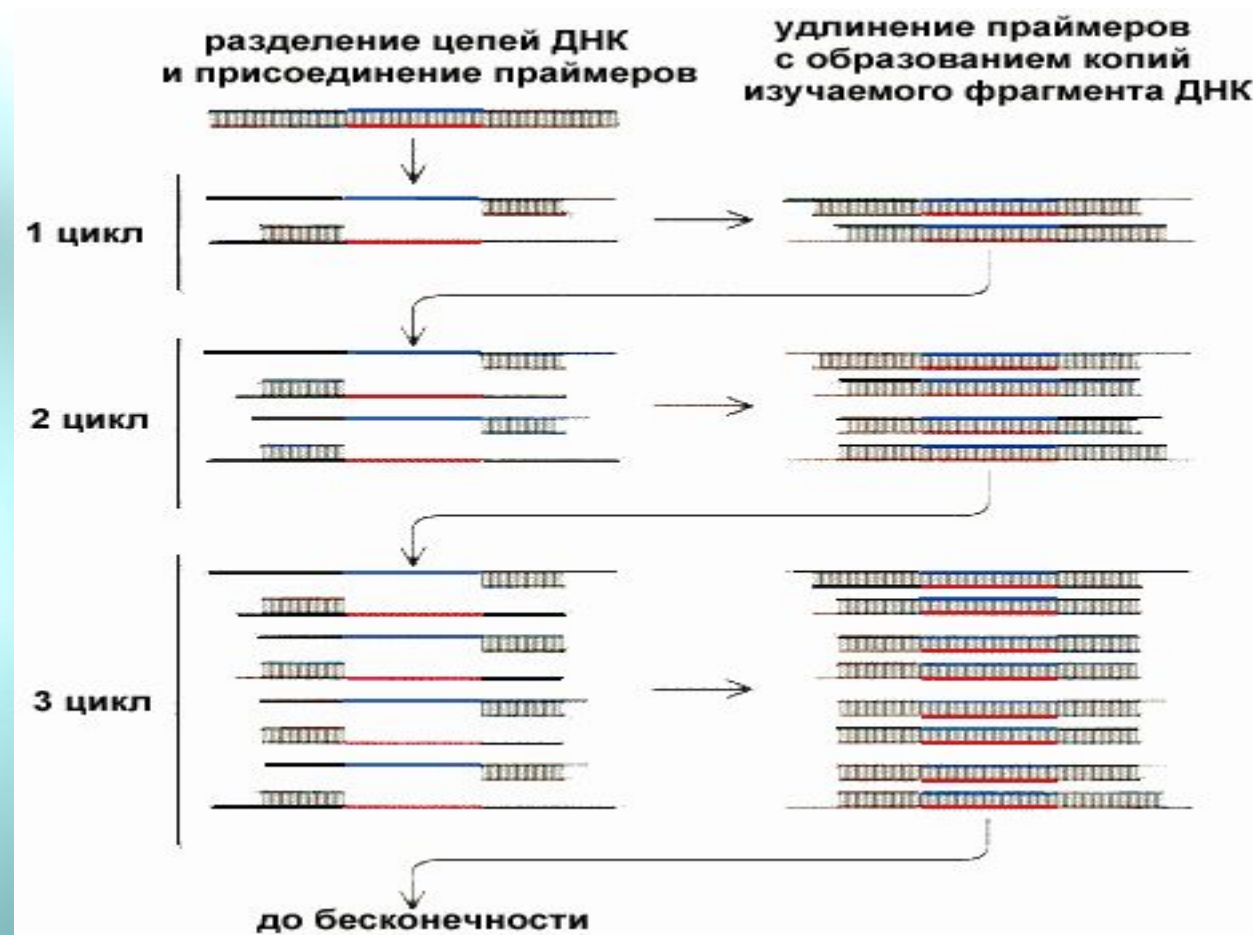


**Современный амплификатор Corbett (вид 1)**



**Современный амплификатор Corbett (вид 2)**

# Общая схема амплификации изучаемого фрагмента ДНК



Широкое распространение метод ПЦР в настоящее время получил как метод диагностики различных инфекционных заболеваний. ПЦР позволяет выявлять этиологию инфекции, даже если в пробе содержится всего несколько молекул ДНК возбудителя. ПЦР широко используется для ранней диагностики ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов, клещевого энцефалита, туберкулеза, венерических заболеваний и т.д.

Этот метод имеет большое значение для мониторинга и оценки эффективности терапии, особенно при вирусных заболеваниях. Определение «вирусной нагрузки» позволяет осуществить индивидуальный подбор дозы противовирусных препаратов. При помощи ПЦР удастся выявить отдельные субтипы и штаммы вирусов и бактерий, обладающих повышенной устойчивостью к тем или иным лекарственным препаратам.



Успехи генетики, молекулярной биологии и биохимии привели к формированию трех новых фундаментальных дисциплин — геномики, протеомики и метаболомики.





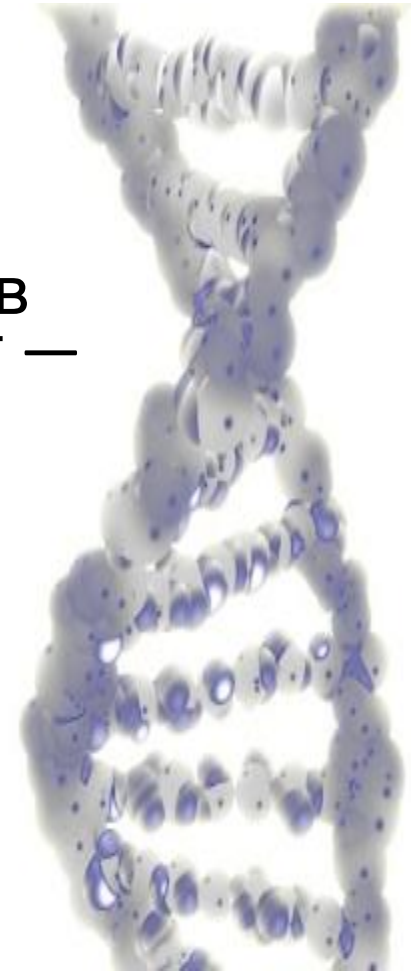
# Геномика

**Геномика** — раздел молекулярной генетики, посвящённый изучению генома и генов живых

**организмов.**

- Секвенирование геномов
- Поиск и сопоставление генов
- Функциональный анализ генома
- Сопоставление геномов

Секвенирование биополимеров (белков и нуклеиновых кислот — ДНК и РНК) — определение их первичной аминокислотной или нуклеотидной последовательности.



• разработка правовых и этических требований по созданию и внедрению в медицину молекулярного (геномного и протеомного) паспорта индивида.

Таким образом, современная молекулярная медицина — это 3 науки: геномика, протеомика и биоинформатика.

1. **Геном** – весь наследственный аппарат клетки, её ДНК
2. **Секвенирование ДНК** – выяснение нуклеотидной последовательности цепочки ДНК
3. **Картирование** - определение положения гена по отношению к другим генам - **генетическое**  
к другим ДНК последовательностям - **молекулярное (позиционное)**  
к рисунку дифференциальной окраске - **хромосомное**
4. **Идентификация гена** – установление наличия гена в библиотеке кДНК, его картирование, выделение в чистом виде, клонирование вне организма

# Секвенирование генома

## Перспективы

- «Геном человека» — это наиболее известный из многих международных геномных проектов, нацеленных на секвенирование ДНК конкретного организма. В настоящее время знание последовательности человеческой ДНК приносит наиболее ощутимую пользу.
- Кроме того, важные достижения в биологии и медицине ожидаются в результате секвенирования **модельных организмов**, в число которых входят **мыши**, **дрозофилы**, *Danio rerio*, **дрожжи**, **нематоды**, некоторые растения и множество **микробов** и **паразитов**.



Метаболомика -научное направление в молекулярной биологии и генетике, занимающееся изучением всех метаболических реакций, присущих данному виду организмов (напр., изображение его метаболических путей, измерение метаболитов в разных типах клеток и т. д.) и происходящих в нормальном состоянии, под контролем окружающей среды или генетических модификаций, а также при различного рода патологиях.

- Метаболом представляет собой совокупность всех метаболитов, являющихся конечным продуктом обмена веществ в клетке, ткани, органе или организме. В то время как данные об экспрессии мРНК генов и данные протеомного анализа не раскрывают полностью всего того, что может происходить в клетке, метаболические профили могут дать мгновенный снимок физиологических процессов в клетке.

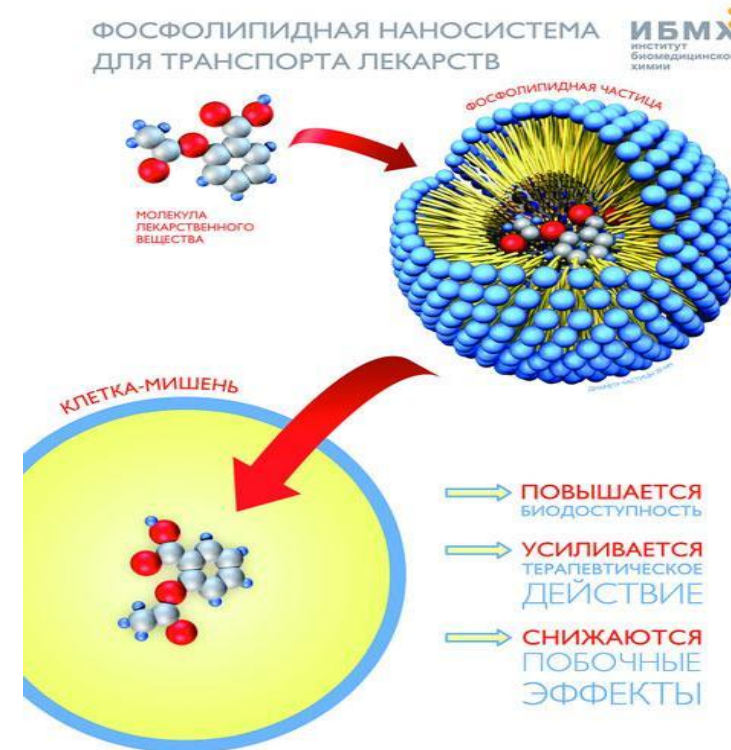
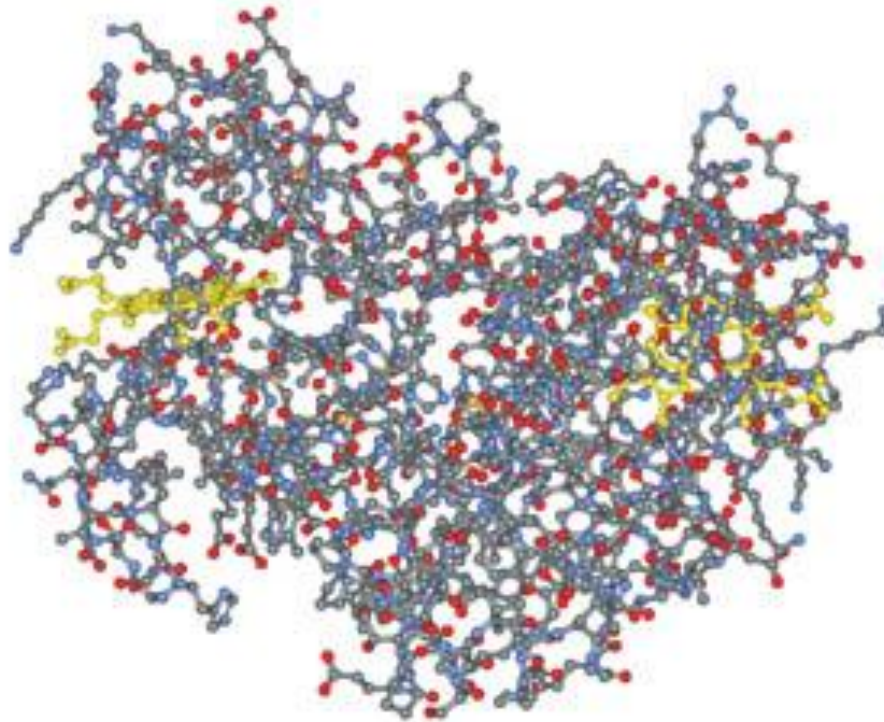


# Цель и задачи протеомики.

- **Конечная цель протеомики** – установление и характеристика полного набора белков данного организма.
- **Основные задачи протеомики:**
  - - идентификация белков клеток, тканей, биологических жидкостей организма;
  - - определение структуры белков;
  - - установление функциональных свойств белков;
  - - исследование взаимосвязи структуры и функции белков;
  - - выяснение механизмов регуляции активности белков;
  - - изучение межбелковых взаимодействий;
  - - выяснение специфики изменений протеома при заболеваниях;
  - - выявление белков – мишеней, на которые направлено действие лекарственного средства.

# Протеомика

Протеомика занимается инвентаризацией белков, т.е., реально работающих молекулярных машин в клетке.



# Диагностическая протеомика

- Выявление характерных пептидных и белковых паттернов в плазме крови, характерных для определенного заболевания
- На 2007 год определено 289 протеинов в плазме крови человека
- Развитие диагностической протеомики плазмы крови и других биологических жидкостей организма человека, способствует уточнению классификации болезней человека, интенсивному развитию профилактической медицины и предиктивной фармакологии



## СХЕМА ПРОТЕОМНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

