Занятие № 1

Структурные компоненты нуклеиновых кислот. Уровни организации ДНК и РНК.

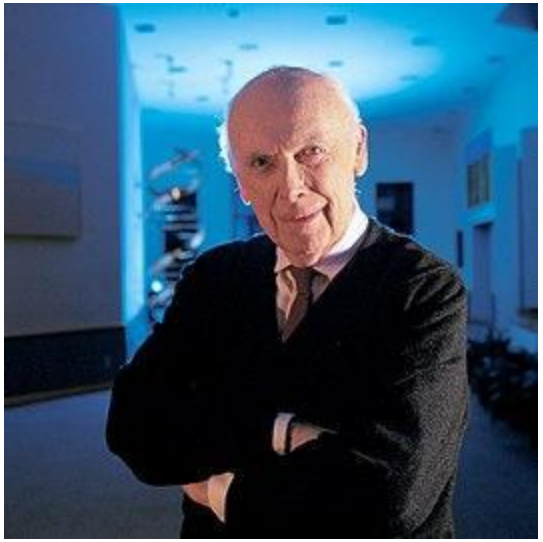
В каждом живом организме присутствуют 2 типа нуклеиновых кислот: рибонуклеиновая кислота (РНК) и дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК).

Молекулярная масса самой "маленькой" из известных нуклеиновых кислот - транспортной РНК (тРНК) составляет примерно 25 кД. ДНК - наиболее крупные полимерные молекулы; их молекулярная масса варьирует от 1 000 до 1 000 000 кД.

История открытия

- 60 – е года 19 в. – швейцарский ученый Фридрих Мишер выделил из ядер клеток гноя вещество, названное им нуклеин (от греч. nucleus - ядро).
- 1944 г. – Эвери с сотрудниками установили, что ДНК отвечает за передачу наследственной информации.
- 1953 г. – Дж. Уотсоном и Ф. Криком была предложена модель пространственной структуры ДНК (Нобелевская премия по физиологии и медицине). Модель открыта с помощью рентгеноструктурного анализа. Рентгенограммы получала Р. Франклин, работавшая в команде Дж. Уотсона и Ф. Крика.

Иоганн Фридрих Мишер



Джеймс Уотсон

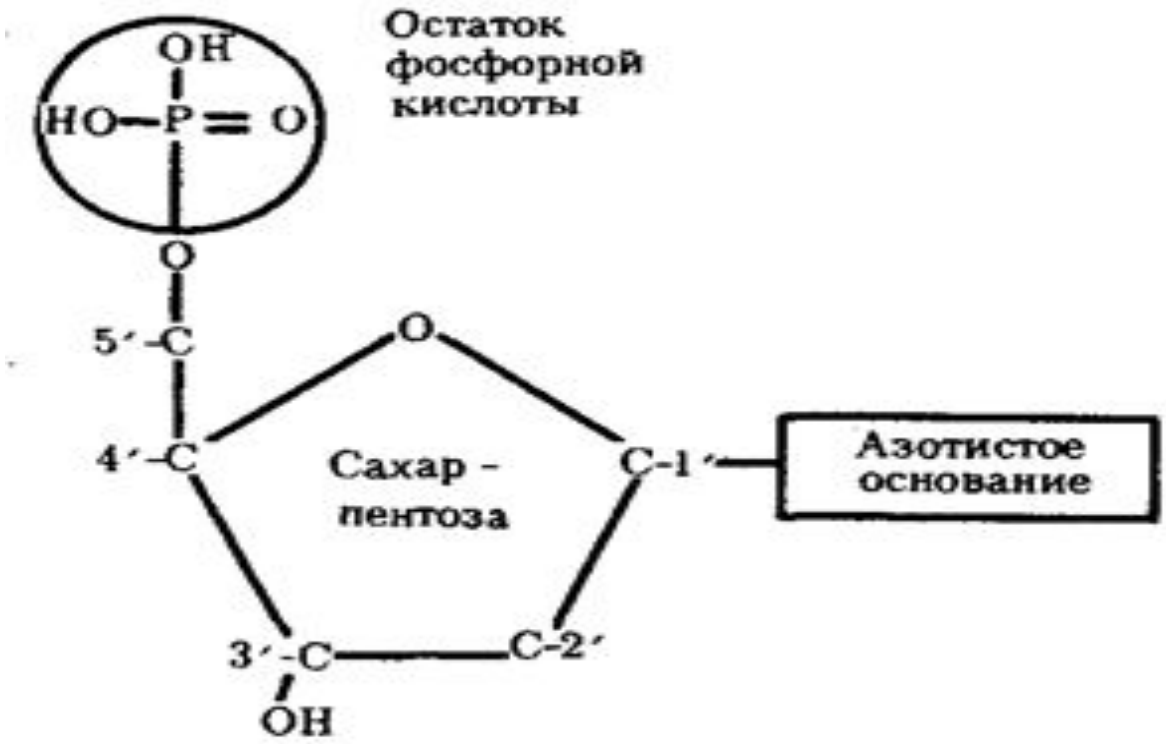
Локализация в клетке

- Основная часть ДНК находится в ядре клетки – в составе хроматина. 0, 25 % - митохондриях (мДНК), также имеется в хлоропластах у растений. РНК обнаружена во всех частях клетки.
- Нуклеиновые кислоты в клетке находятся не в свободном виде, а в комплексе с белками.

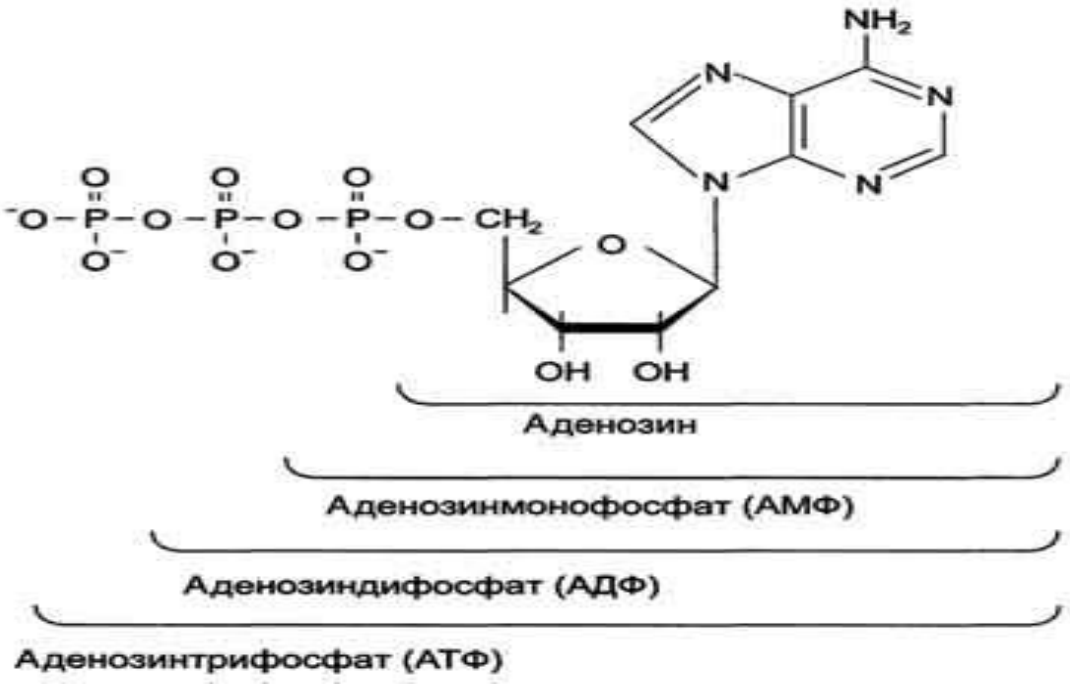
Структурная организация

- *НК – полимеры, мономерами которых являются нуклеотиды и выполняющие в клетке функции хранения, передачи и реализации генетической информации.*

Строение нуклеотида

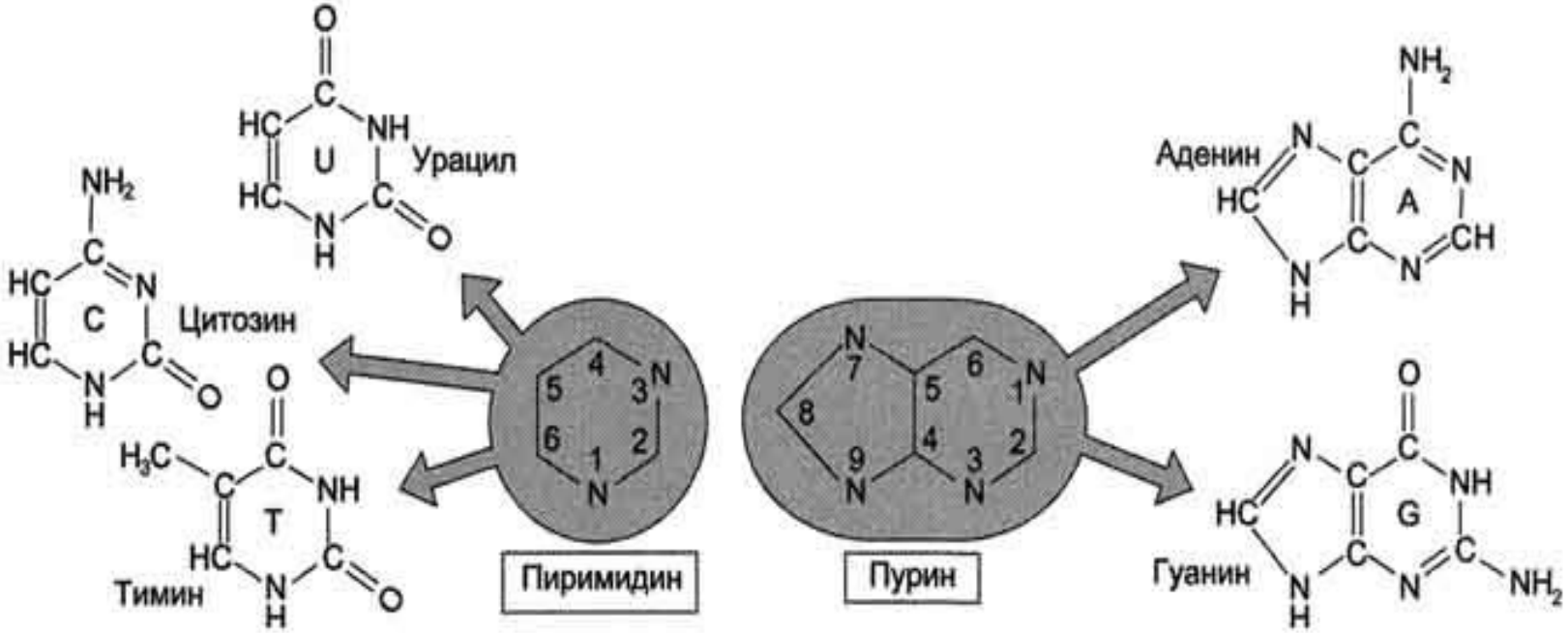


- Нуклеотиды - фосфорные эфиры нуклеозидов. Остаток фосфорной кислоты присоединён к 5'-углеродному атому пентозы (5'-фосфоэфирная связь).

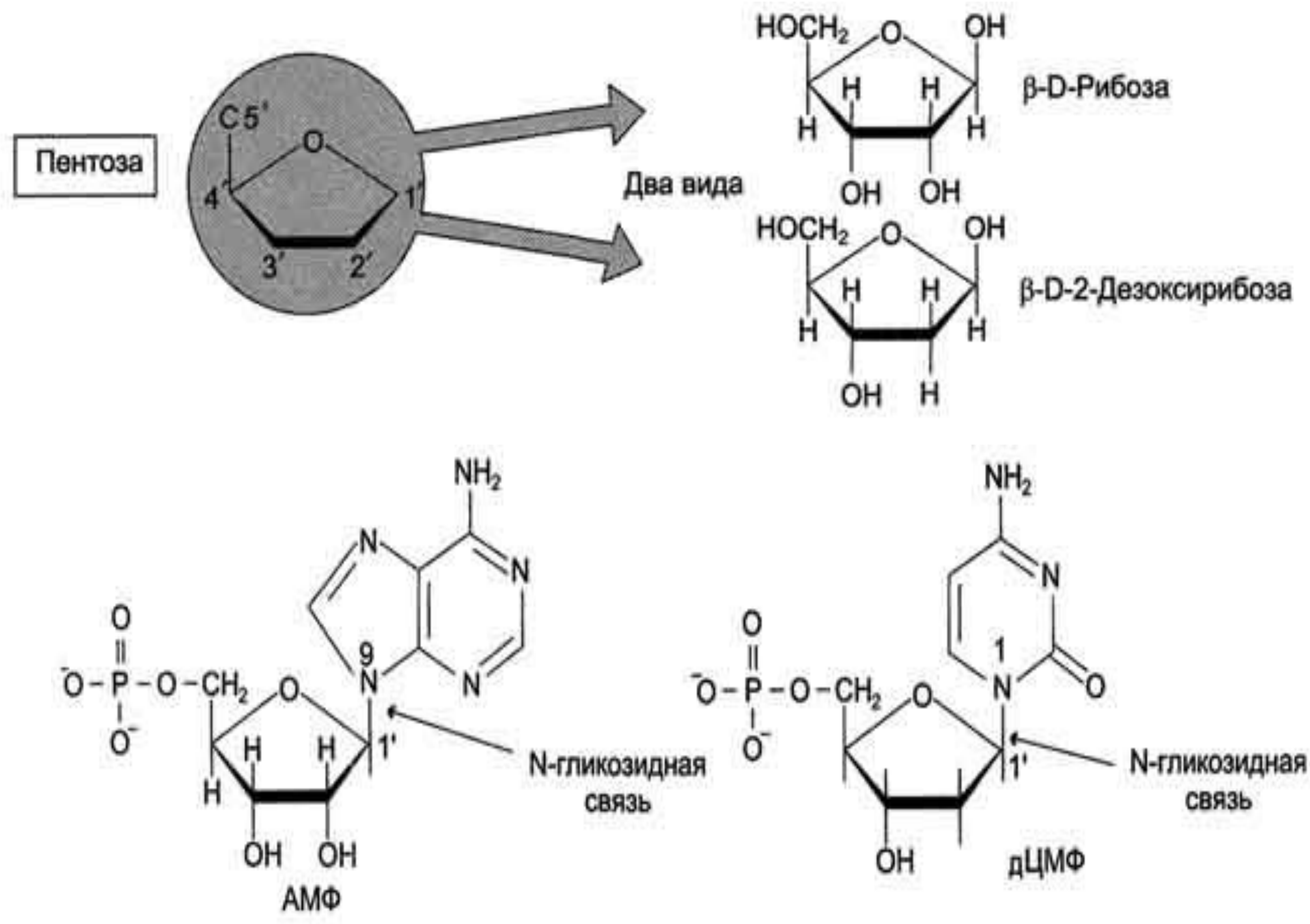


Азотистые основания

- *Ароматические гетероциклические соединения, производные пиримидина и пурина.*



Пентоза



Пентоза
C 5'
O
4'
1'
3'
2'
Два вида
HOCH2
OH
H
β-D-Рибоза
β-D-2-Дезоксирибоза
NH2
N
9
1
O
P
CH2
1'
N-гликозидная
связь
АМФ
дЦМФ

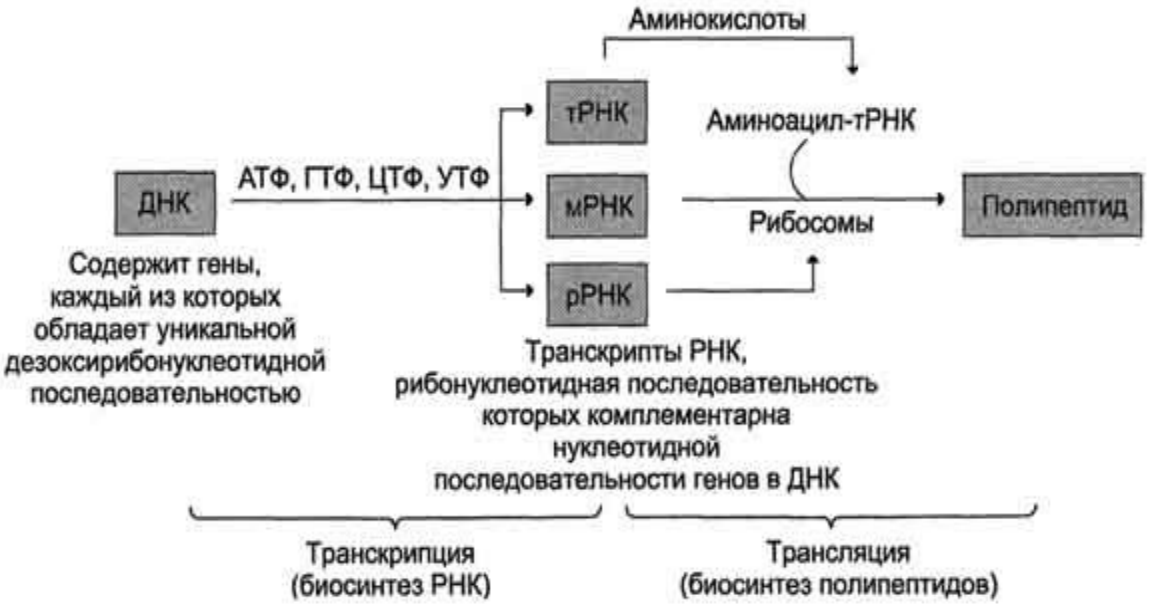
Строение – структура - функция

ДНК	РНК
Пентоза в составе нуклеотида представлена дезоксирибозой	Пентоза в составе нуклеотида представлена рибозой
Азотистые основания: аденин, гуанин, цитозин, тимин	Азотистые основания: аденин, гуанин, цитозин,урацил
Правила Чаргаффа: число пуриновых оснований (А + Г) равно числу пиримидиновых (Ц + Т)	Содержание аденина не обязательно равно содержанию урацила, содержание гуанина не обязательно равно содержанию цитозина
Двухцепочечная молекула (спираль)	Однацепочечная молекула
Хранение, воспроизведение ген. информации.	Реализация ген. информации (транскрипция, трансляция)

- ***Репликация –*** синтез дочерней молекулы двухцепочечной ДНК, идентичной родительской двухцепочечной ДНК (матрица – нити родительской ДНК).
- ***Транскрипция –*** ферментативный процесс, при котором генетическая информация, содержащаяся в одной цепи ДНК, используется для синтеза комплементарной нуклеотидной последовательности в цепи мРНК (матрица – одна из цепей ДНК).
- ***Трансляция –*** процесс, при котором генетическая информация, содержащаяся в молекуле мРНК, направляет синтез соответствующей аминокислотной последовательности в белке (матрица – мРНК).
- ***Репарация –*** исправление ошибок в структуре ДНК, возникающих под воздействием факторов внешней и внутренней среды (матрица – участок неповрежденной нити ДНК)

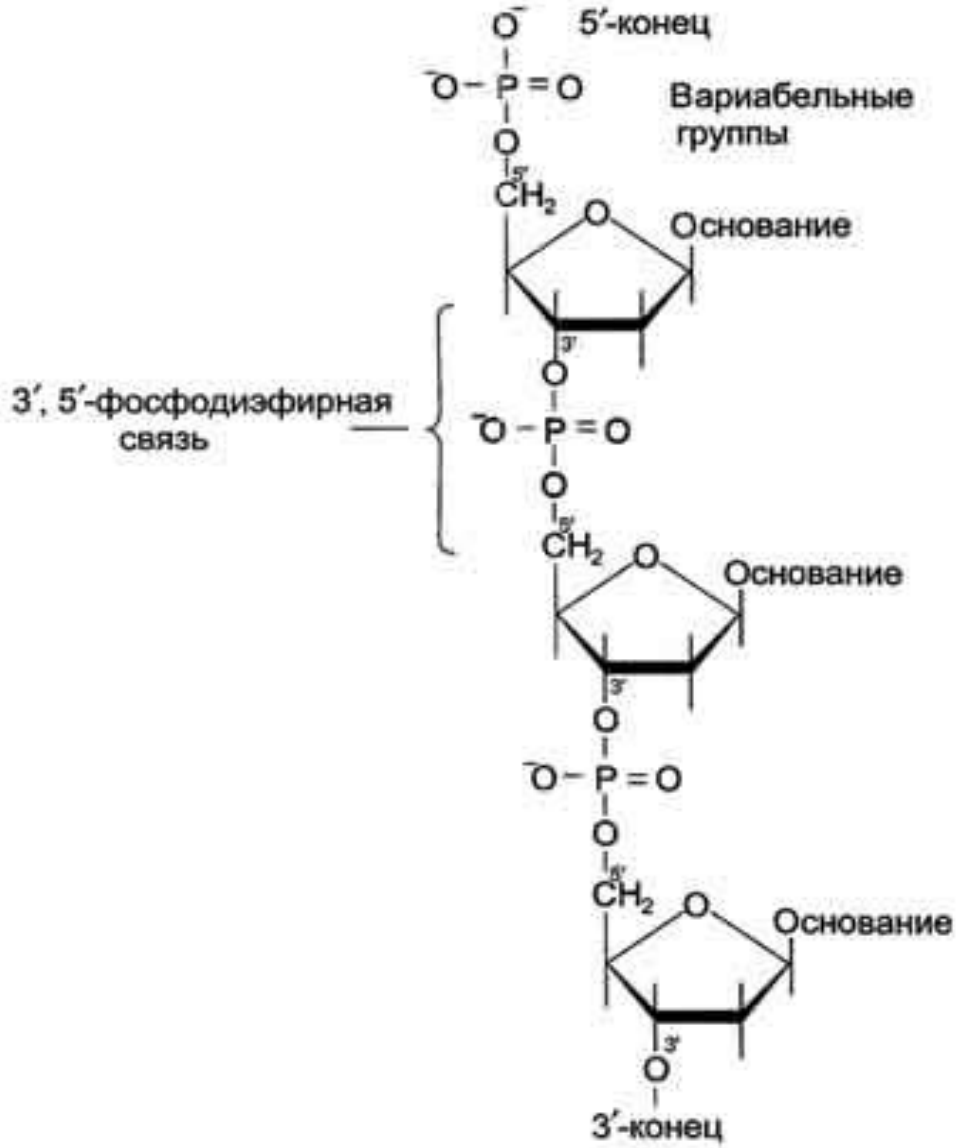
Схема реализации генетической информации в фенотипические признаки.

- Реализацию потока информации в клетке можно представить схемой ДНК-"РНК-"белок. ДНК-"РНК обозначает биосинтез молекул РНК (транскрипцию); РНК-"белок означает биосинтез полипептидных цепей (трансляцию).



Структура ДНК

- *Первичная структура ДНК* – порядок чередования дезоксирибонуклеозидмонофосфатов (дНМФ) в полинуклеотидной цепи.
- Связь между нуклеотидами – 3’, 5’ – фосфодиэфирная связь (между фосфатной группой и 3’ и 5’ - углеродными атомами двух соседних дезоксирибоз.



Фрагмент цепи ДНК

Макромолекулярная структура ДНК

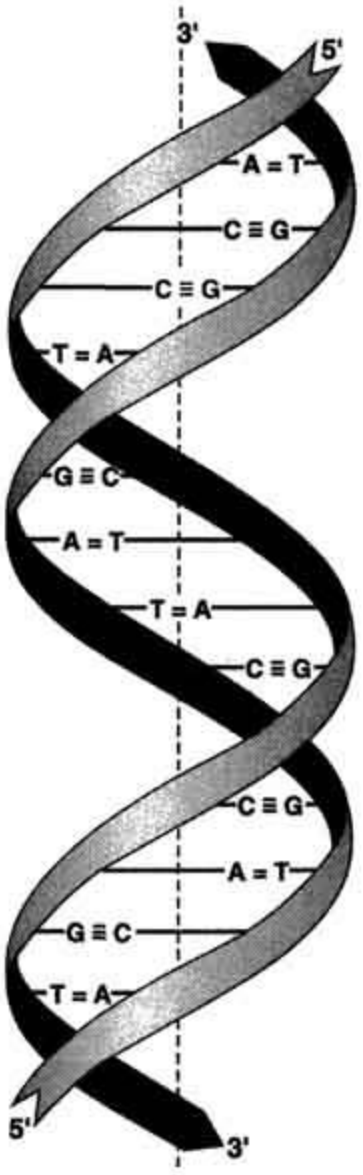
В 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик предложили модель структуры ДНК. При построении модели ученые основывались на четырех группах данных:

- 1. ДНК представляет собой полимер, состоящий из нуклеотидов, соединенных 3'-5'-фосфодиэфирными связями.
- 2. Состав нуклеотидов ДНК подчиняется правилам Чаргаффа: в любой ДНК содержание пуриновых нуклеотидов (A+G) всегда Равно содержанию пиримидиновых нуклеотидов (T+C); число остатков А всегда равно числу остатков Т, число остатков G — Числу остатков С.
- 3. Рентгенограммы волокон ДНК, впервые полученные М. Уилкинсом и Р. Франклин, указывают на то, что молекула обладает спиральной структурой и содержит более одной ноли нуклеотидной цепи.
- 4. Кислотно-щелочное титрование ДНК показывает, что ее структура стабилизируется водородными связями. Титрование и нагревание нативной ДНК вызывает заметные изменения ее физических свойств, в частности вязкости, переводя ее в «денатурированную» форму, причем ковалентные связи при этом не разрушаются.

Модель пространственной структуры ДНК.

Согласно этой модели, молекула ДНК имеет форму спирали, образованную двумя полинуклеотидными цепями, закрученными относительно друг друга и вокруг общей оси. Двойная спираль **правозакрученная,** полинуклеотидные цепи в ней **антипараллельны**, т.е. если одна из них ориентирована в направлении 3'→5', то вторая - в направлении 5'→3'. Поэтому на каждом из концов молекулы ДНК расположены 5'-конец одной цепи и 3'-конец другой цепи.

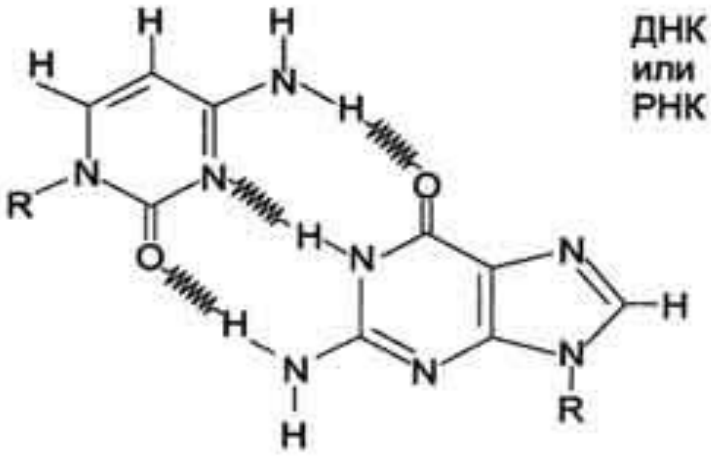
- Таким образом, ***молекула ДНК состоит из двух антипараллельных цепей с комплементарной последовательностью нуклеотидов. Цепи закручены относительно друг друга в правозакрученную спираль так, что на один виток приходится примерно 10 пар нуклеотидов.***



Связи, участвующие в образовании вторичной структуры ДНК

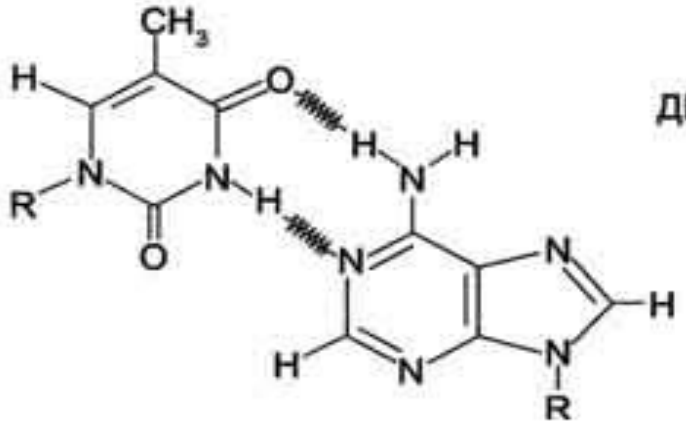
- ***Водородные связи*** между комплементарными азотистыми основаниями;
- Комплементарые основания уложены в стопку в сердцевине спирали. Между основаниями двухцепочечной молекулы в стопке возникают ***гидрофобные взаимодействия***, стабилизирующие двойную спираль.

Цитозин ::: Гуанин
(три водородные связи)



ДНК
или
РНК

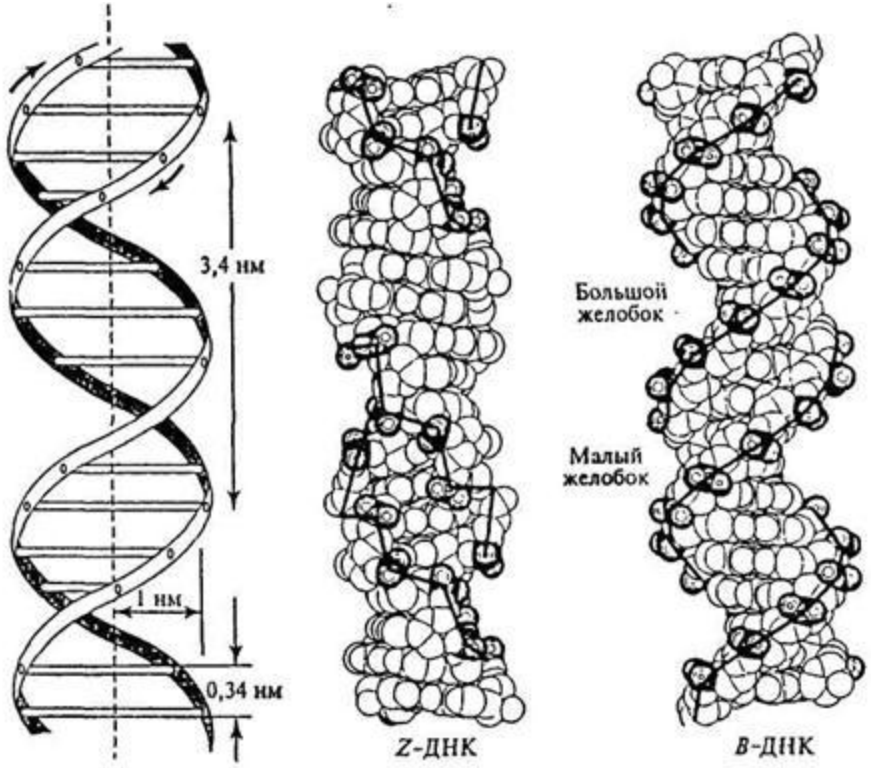
Тимин ::: Аденин
(две водородные связи)



ДНК

Правило Чаргаффа:
число пуриновых оснований (A + G) равно числу пиримидиновых оснований (T + C).

Формы ДНК и их характеристики



Тип	Закрученность спирали	Число пар оснований на виток	Расстояние между плоскостями оснований	Диаметр спирали
A	Правая	11	0,256 нм	2,3 нм
B	Правая	10	0,338 нм	1,9 нм
Z	Левая	12	0,371 нм	1,8 нм

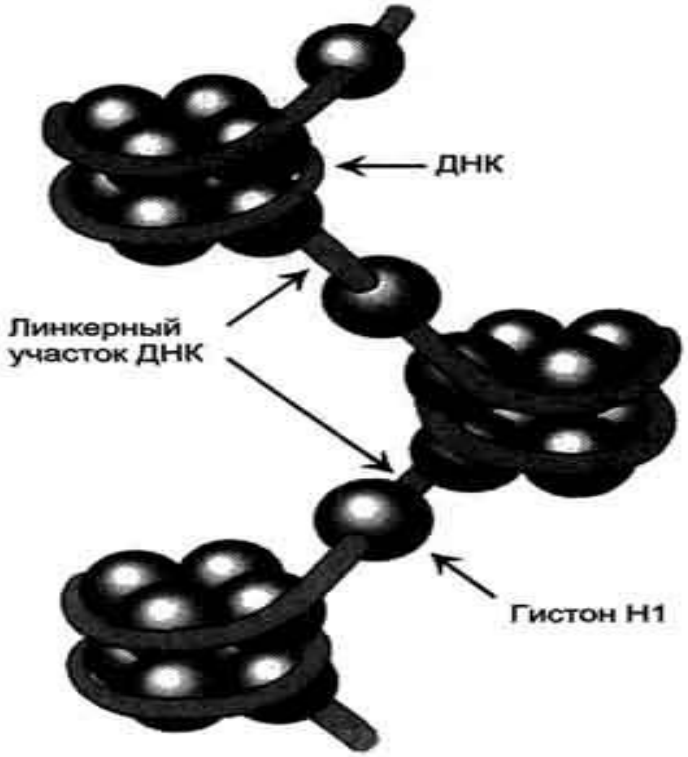
- ***Для человека характерна B - форма спирали.*** Именно она и была описана Дж. Уотсоном и Ф. Криком.

- *Третичная структура ДНК (суперспирализация ДНК).* Компактизация и суперспирализация ДНК осуществляются с помощью разнообразных белков, взаимодействующих с определёнными последовательностями в структуре ДНК.
- Комплекс белков с ядерной ДНК клеток называют *хроматином.*

- Все связывающиеся с ДНК эукариотов белки можно разделить на 2 группы: **гисгоновые и негистоновые белки.**
- **Гистоны** - белки с молекулярной массой 11-21 кД, содержащие много остатков аргинина и лизина. Благодаря положительному заряду гистоны образуют ионные связи с отрицательно заряженными фосфатными группами, расположенными на внешней стороне двойной спирали ДНК.

Структура нуклеосом.

- Восемь молекул гистонов (H2A, H2B, H3, H4)2 составляют ядро нуклеосомы, вокруг которого ДНК образует примерно 1,75 витка.



РНК

- ***Первичная структура РНК -*** *порядок чередования рибонуклеозидмонофосфатов (НМФ) в полинуклеотидной.*

- ***Вторичная структура РНК***

  Молекула рибонуклеиновой кислоты построена из одной полинуклеотидной цепи. Отдельные участки цепи РНК образуют спирализованные петли - "шпильки", за счёт водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями A-U и G-C.

- ***Третичная структура РНК***

  Одноцепочечные РНК характеризуются компактной и упорядоченной третичной структурой, возникающей путём взаимодействия спирализованных элементов вторичной структуры.

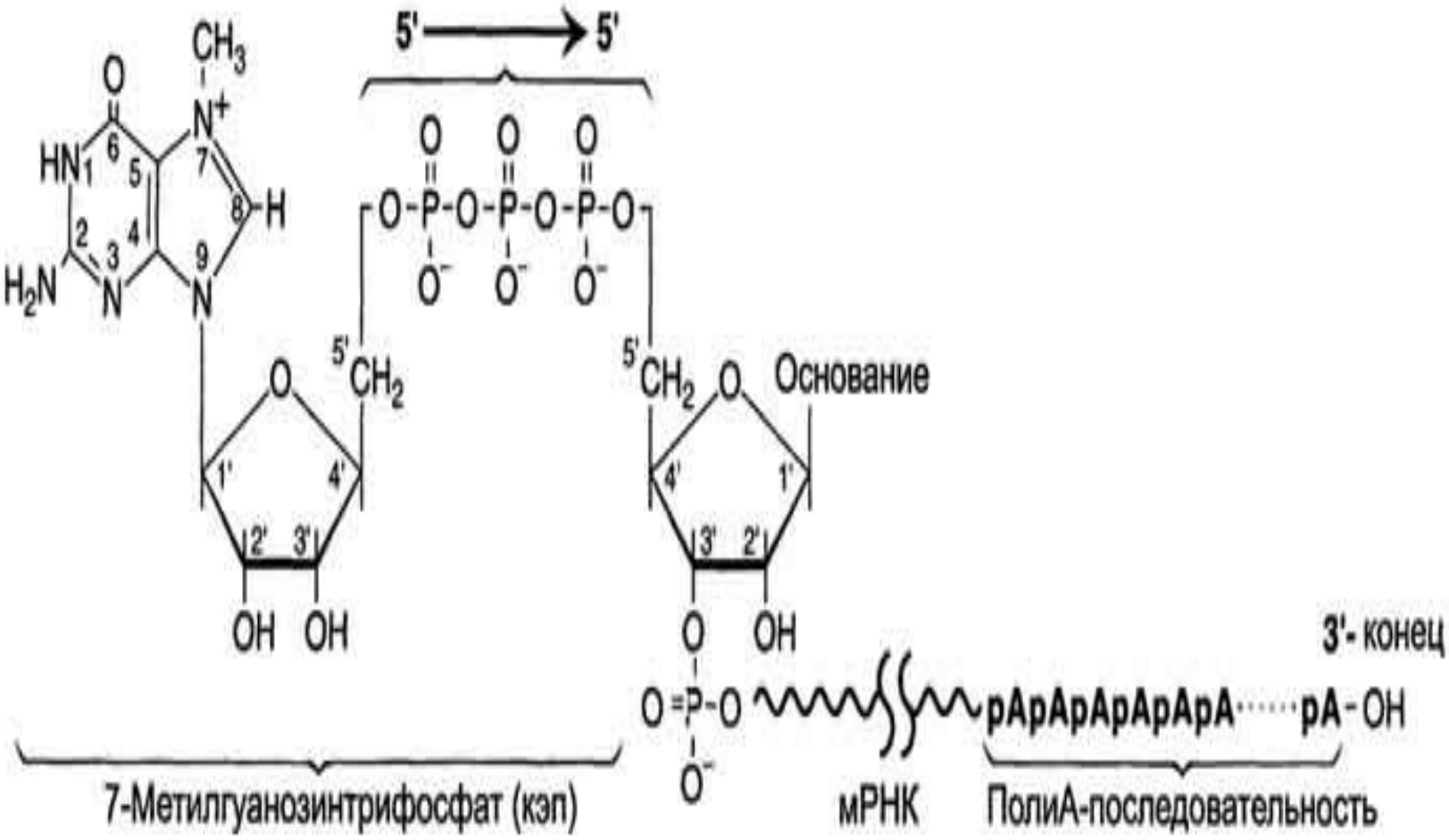
Основные типы РНК

- *Матричная (информационная) РНК (мРНК)*
- *Рибосомальная РНК (рРНК)*
- *Транспортная РНК*
- *Малые ядерные РНК (мяРНК)*

Процессинг мРНК

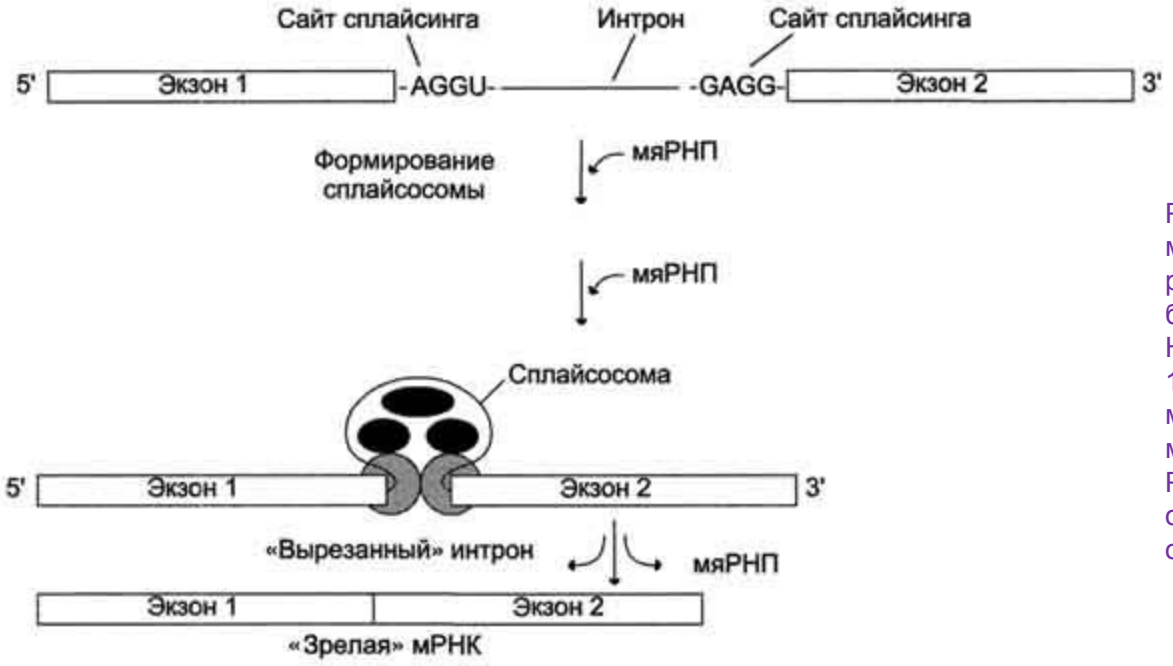
- Процессинг РНК – совокупность процессов в клетке, которые способствуют превращению первичных транскриптов (пре – мРНК) в зрелую РНК. Включает следующие процессы:
- **Кепирование –** присоединение к 5’ концу пре – мРНК 7 – метилгуанозин – 5’ – трифосфата (кеп).
- **Полиаденилирование –** присоединение к 3’ концу пре – мРНК 100 – 200 остатков аденина.
- **Сплайсинг -** удаление интронов (участков, не кодирующих белок) и объединение экзонов (кодирующих участков).

Ковалентная модификация концевых нуклеотидных остатков первичного транскрипта мРНК.



Сплайсинг

- В процессе сплайсинга принимают участие различные малые ядерные рибонуклеопротеины (мяРНП), которые формируют **сплайсосому.** мяРНП, взаимодействуя с РНК и друг с другом, фиксируют и ориентируют реакционные группы первичного транскрипта. Каталитическая функция сплайсосом обусловлена РНК-составляющими; такие РНК называют рибозимами.

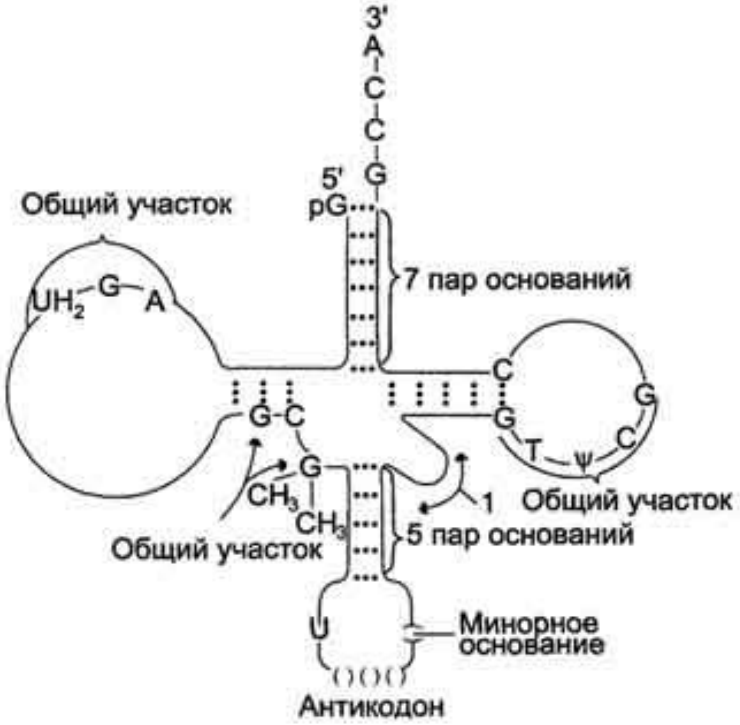


Разные варианты сплайсинга могут приводить к образованию разных изоформ одного и того же белка.
Например, ген тропонина состоит из 18 экзонов и кодирует многочисленные изоформы этого мышечного белка.
Разные изоформы тропонина образуются в разных тканях на определённых стадиях их развития.

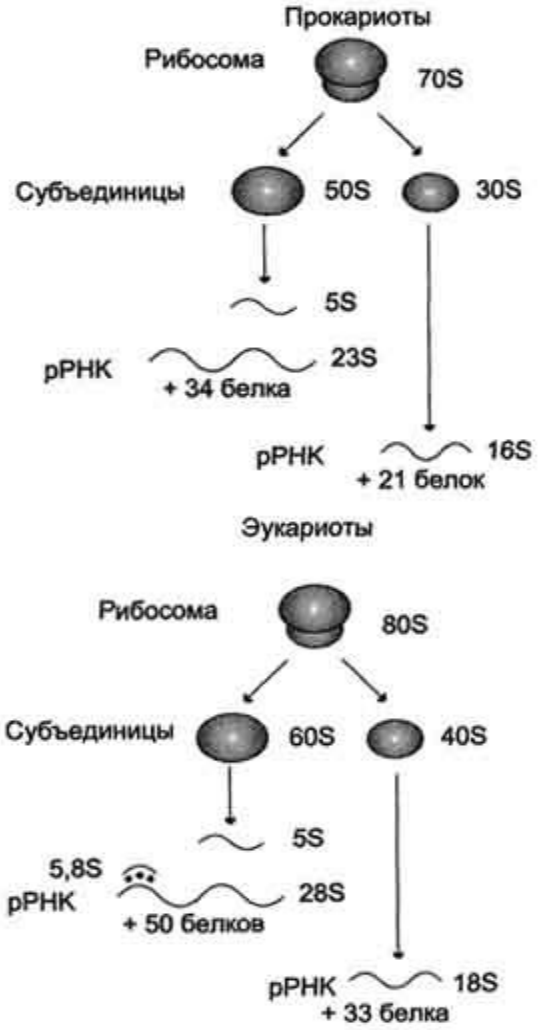
- Предшественники рРНК и тРНК – таже как и мРНК подвергаются в ядре химической модификации (процессингу).

Процессинг первичного транскрипта мРНК

- Процессинг тРНК включает формирование последовательности -CCA на 3'-конце (акцепторный конец), к которому присоединяется соответсующая аминокислота, а также формирование структуры, называемой "антикодон", - триплета нуклеотидов, обеспечивающего взаимодействие тРНК с комплементарным кодоном мРНК в ходе синтеза белков.



Процессинг первичного транскрипта рРНК – формирование рибосом.



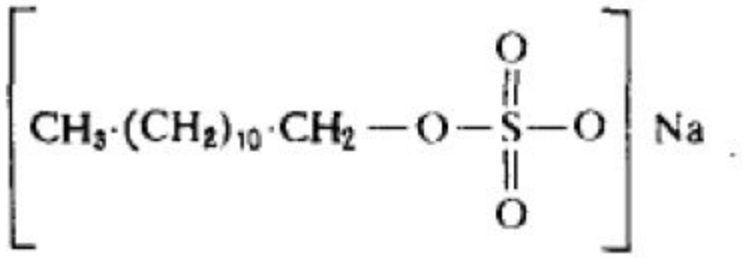
- Рибосомы – место синтеза белка. Представляют собой комплекс белков и рРНК. Локализованны в цитоплазме. Состоят из большой и малой субъединиц.
- Рибосомы эукариотов и прокариотов различаются по молекулярной массе субъединиц, количеству молекул рРНК, массе рРНК, количеству и разнообразию белков, способных связывать специфические лиганды.
- Величина S характеризует скорость оседания частиц при ультрацентрифугировании и пропорциональна их молекулярной массе. Рибосома прокариотов (70S) состоит из 50S и 30S субъединиц, эукариотов (80S) - состоит из субъединиц 60S и 40S.

Занятие № 2

Методы молекулярной биологии

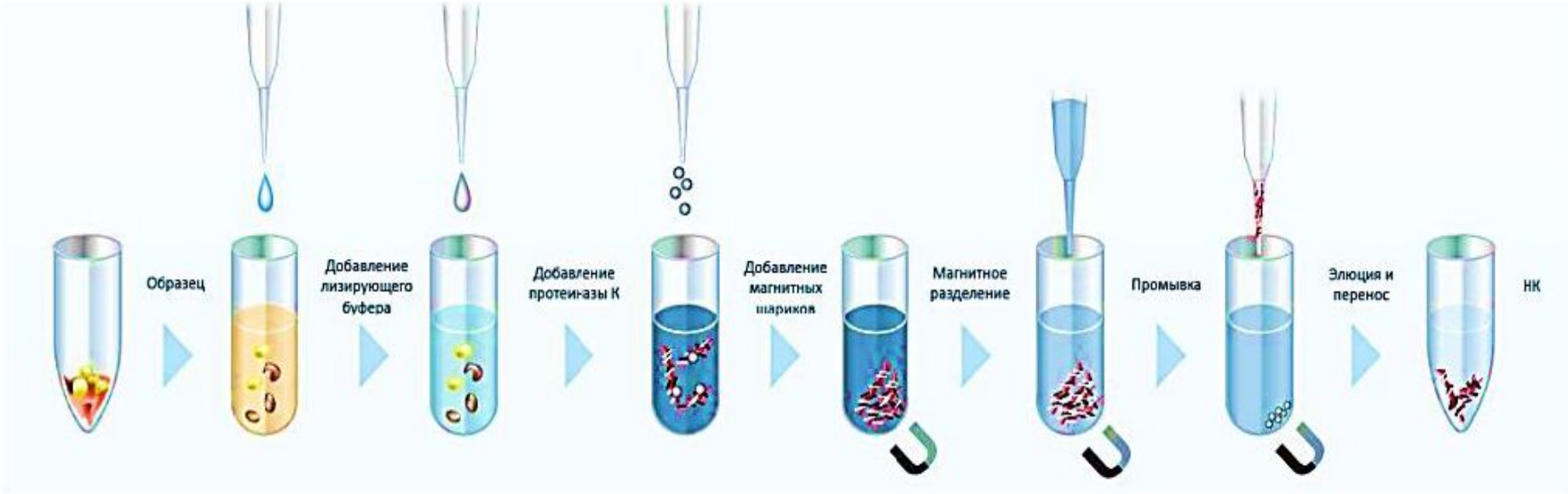
Выделение НК

- Основными требованиями, предъявляемыми к методу выделения, являются эффективное отделение нуклеиновых кислот от белков, а также минимальная степень фрагментации полученных препаратов.
- **Клеточные стенки исследуемого биологического материала разрушаются одним из стандартных методов**, а затем **обрабатываются анионным детергентом**. При этом белки выпадают в осадок, а нуклеиновые кислоты остаются в водном растворе.
- ДНК может быть осаждена в виде геля осторожным **добавлением этанола** к её солевому раствору. Концентрацию полученной нуклеиновой кислоты, а также наличие примесей (белки, фенол) обычно **определяют спектрофотометрически по поглощению на А260 нм.**
- Нуклеиновые кислоты легко деградируют под действием особого класса ферментов — нуклеаз. В связи с этим при их выделении **важно обработать лабораторное оборудование и материалы соответствующими ингибиторами.**



M 288,4

Выделение нуклеиновых кислот основано на методе разделения веществ при помощи магнитных шариков



Определение концентрации и качества препаратов нуклеиновых кислот методом спектрофотомерии

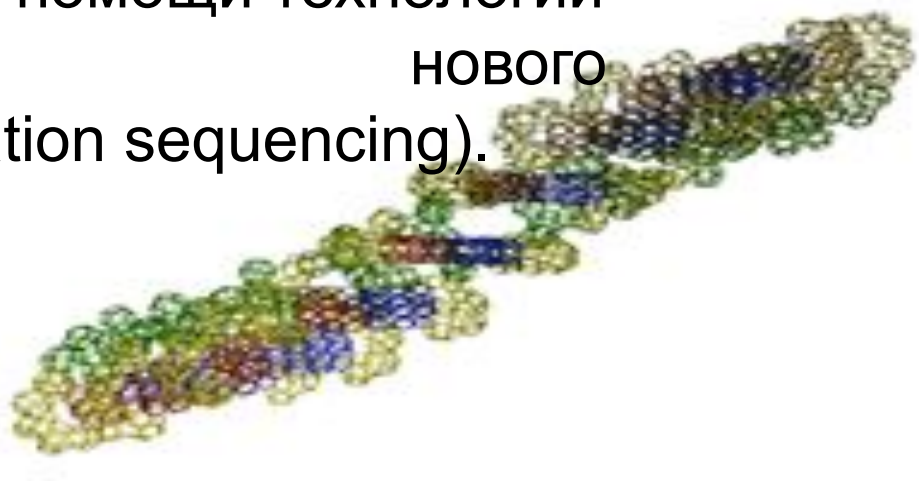
- Спектрофотометрия (абсорбционная) – физико-химический метод исследования растворов и твердых веществ, основанный на изучении спектров поглощения в ультрафиолетовой (200–400 нм), видимой (400–760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях спектра. В соответствии с законом Бугера–Ламберта–Бера оптическая плотность раствора прямо пропорциональна концентрации поглощающего вещества. Нуклеиновые кислоты (НК) поглощают УФ излучение в области 240–290 нм с максимумом при 260 нм. Хромофорами служат азотистые основания НК (пиримидиновые).

Секвенирование

- **Секвенирование** (sequencing) – это общее название методов, которые позволяют установить последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК. В настоящее время нет ни одного метода секвенирования, который бы работал для молекулы ДНК целиком; все они устроены так: сначала готовится большое число небольших участков ДНК (клонируется молекула ДНК многократно и «разрезается» её в случайных местах), а потом читается каждый участок по отдельности.

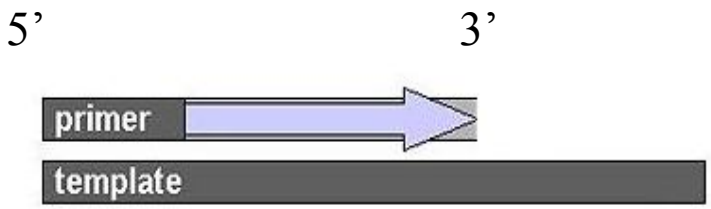
В настоящее время для секвенирования генов обычно применяют метод Сенгера с дидезоксинуклеозидтрифосфатами (ddNTP).

Обычно до начала секвенирования производят амплификацию участка ДНК, последовательность которого требуется определить, при помощи ПЦР. Секвенирование полного генома обычно осуществляют при помощи технологий секвенирования нового поколения (next-generation sequencing).



Секвенирование ДНК по Сенгеру

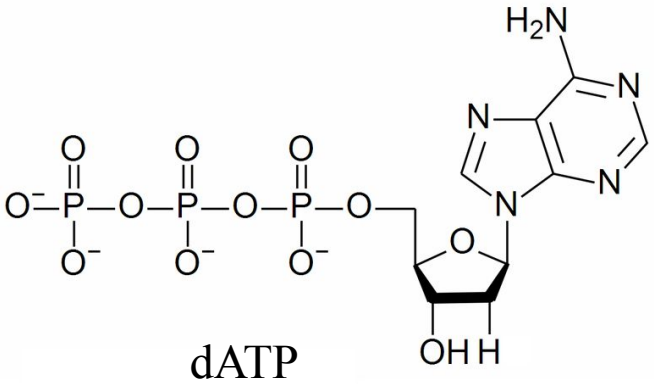
- Пусть есть образец ДНК, надо узнать его последовательность.
- Возьмем раствор, содержащий наш образец (одноцепочечную ДНК в достаточном количестве), дезоксинуклеотиды dNTP (кирпичи, из которых строится ДНК), ДНК-полимеразу (белок-строитель), и праймер к образцу (праймер – это комплементарная «затравка» - кусочек ДНК, комплементарный началу нашего фрагмента, достаточной длины, чтобы с него начался синтез комплементарной цепи):

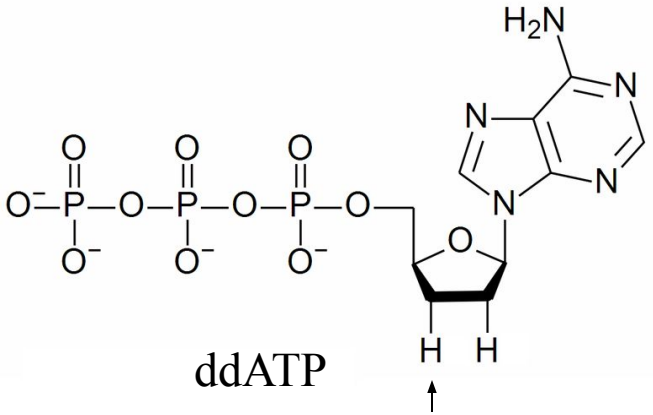


- Если позволить полимеразе работать (то есть, держать температуру, в которой ей удобно вести синтез), то в результате мы получим полностью достроенные комплементарные цепи.

Секвенирование ДНК по Сенгеру

- А теперь разобьем всю смесь на 4 пробирки, в которых содержатся в небольшом количестве радиоактивно меченные ddATP, ddGTP, ddCTP или ddTTP (в каждой пробирке – что-то одно).

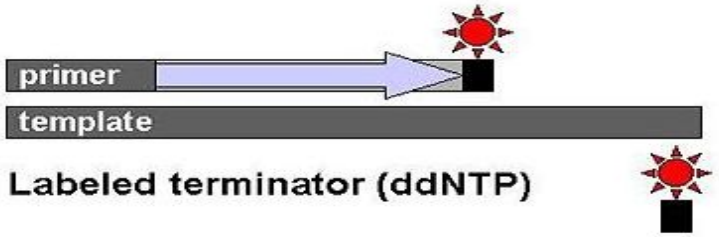


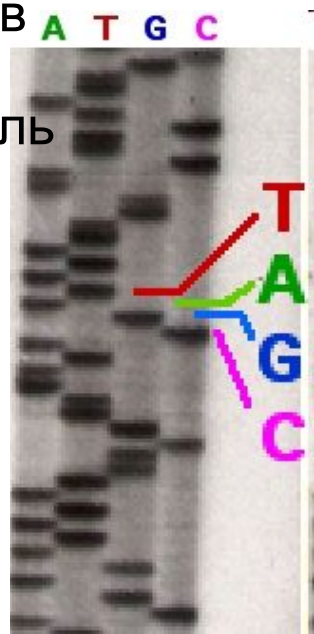


- У ddNTP нет кислорода на 3’-конце, поэтому, если его встроили в молекулу ДНК, такая молекула удлиняться не будет, поскольку к ddNTP ничего присоединиться уже не может – на 3’ кислорода нет.

Секвенирование ДНК по Сенгеру

- Позволим полимеразе работать в каждой из смесей. Для каждой молекулы образца она будет достраивать комплементарную цепь, пока не встроит ddNTP. Притом в пробирке с ddATP это может случиться только в тех местах, где в образце содержался тимин (комплементарный аденину ddATP). Тогда, если в образце были тимины в положениях 5, 7, 14, 15, то в пробирке с ddATP мы получим фрагменты ДНК комплементарной цепи с такими длинами.
- Сделаем форез, чтобы различить фрагменты разной длины в каждой пробирке, каждая дорожка фореза – одна пробирка.
- Поскольку ddNTP был радиоактивно помечен, то, проявив гель на фотопленке, мы увидим только комплементарные цепи с ddNTP.





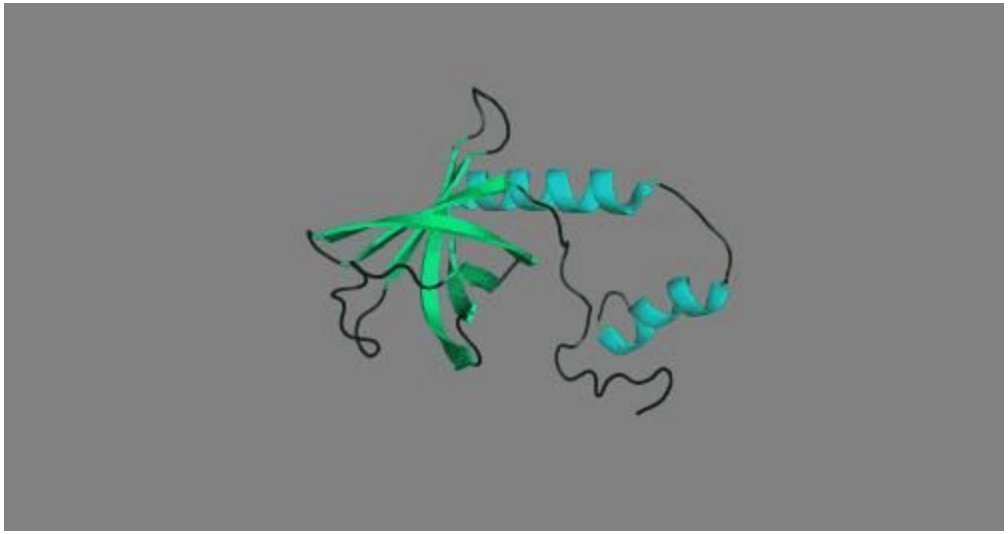
Применение в медицине:

- Микробиология:

1) Выявление патогенов: холера – на Гавайях, токсичная E.coli в Германии.
2) Анализ симбиотических организмов: микробиом.

- Болезнь ⟶ профиль экспрессии:

1) Классификация опухолей, тонкий и/или ранний диагноз.
2) Спектр мутагенеза – причина опухолеобразования.



Секвенирование ДНК по Максаму и Гилберту: метод химической деградации

- В 1976 г. А. Максамом и У. Гилбертом был разработан метод секвенирования, основанный на специфической химической деградации фрагмента ДНК, радиоактивно меченного с одного конца. Препарат меченной ДНК разделяли на четыре аликвоты и каждую обрабатывали реагентом, модифицирующим одно или два из четырех оснований. А. Максам и У. Гилберт предложили модифицировать пуриновые основания диметилсульфатом. При этом происходит метилирование адениновых остатков по азоту в положении 3, а гуаниновых - по азоту в положении 7. Обработка образца ДНК соляной кислотой при 0°С приводит к выщеплению метиладенина. Последующая инкубация при температуре 90°С в щелочной среде вызывает разрыв сахарно-фосфатной цепи ДНК в местах выщепления оснований. Обработка пиперидином приводит к гидролизу образца по остаткам метилгуанина. Пиримидиновые основания модифицируют гидразином. Если реакцию вести в бессолевой среде, то модифицируются как цитозин, так и тимидин; если обработку вести в присутствии 2М NaCl, то модифицируется лишь цитозин. Расщепление цепи ДНК на фрагменты и в этом случае осуществляется пиперидином. Условия реакций авторы подбирали таким образом, чтобы в итоге получить полный набор субфрагментов разной длины. Последующий электрофорез в полиакриламидном геле позволяет восстановить полную структуру исследуемого фрагмента.

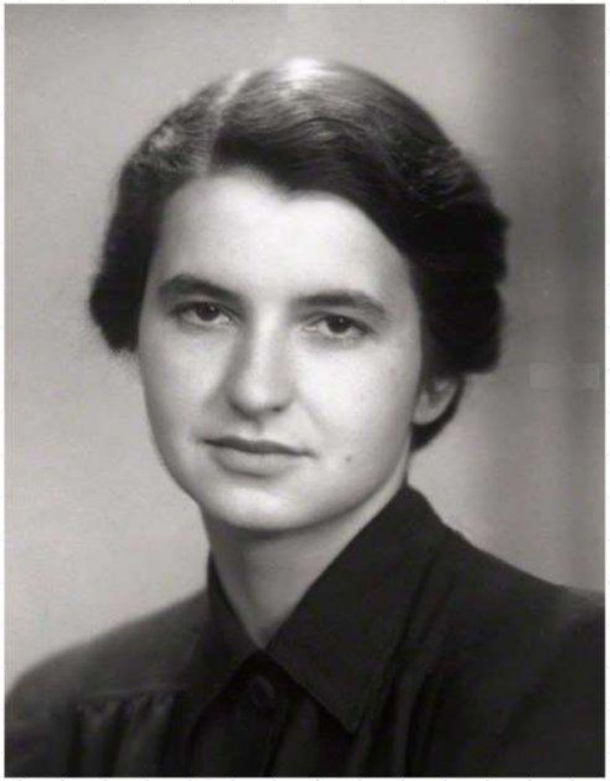
Пиросеквенирование

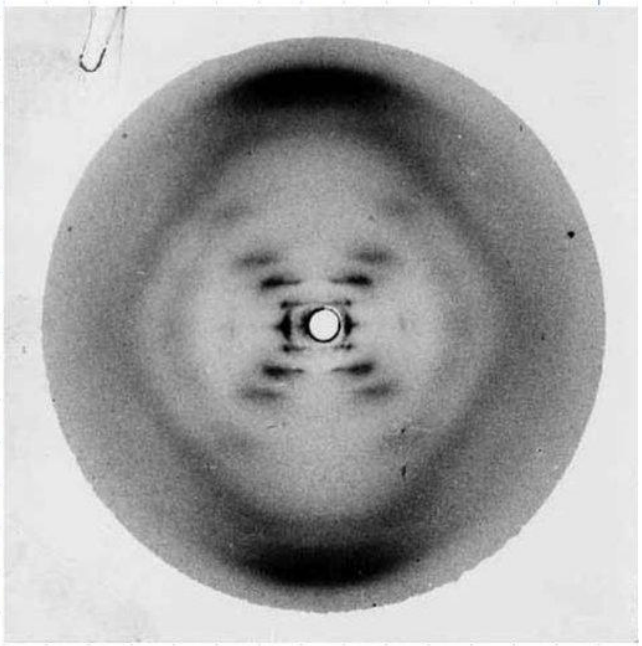
Это метод секвенирования ДНК (определение последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК), основанный на принципе «секвенирование путём синтеза». При включении нуклеотида происходит детекция высвобождающихся пирофосфатов. Технология была разработана Полом Ниреном в 1996 году.

MS - анализ

Метод масс-спектрометрии основан на пространственной или временной сепарации различающихся по массе и предварительно ионизированных молекул.

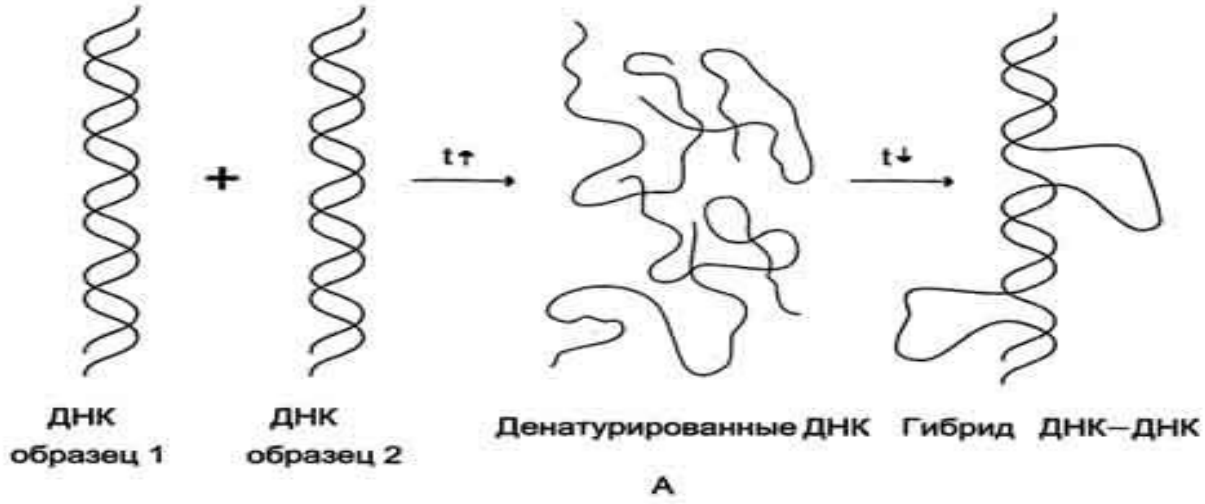
Рентгеноструктурный анализ



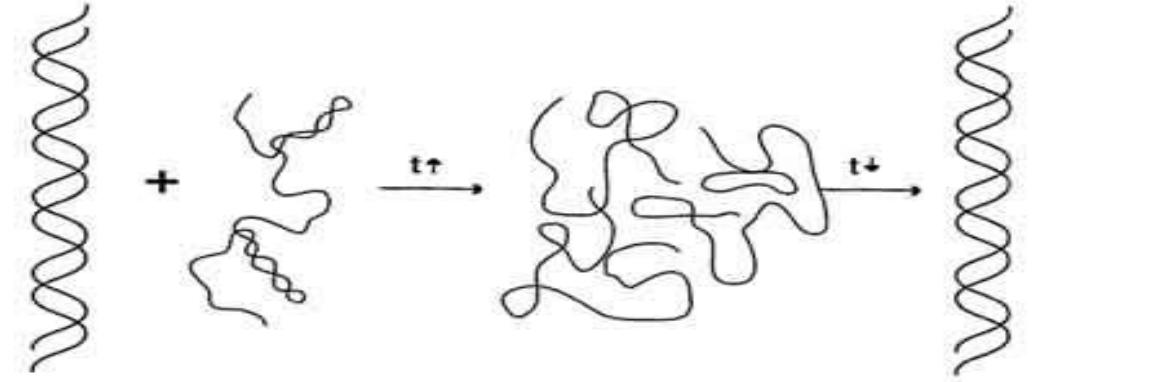


Розалинда Фрэнклин (1920 - 1958) и рентгенограмма В-формы ДНК

Гибридизация



А



Б