

Молекулярная диагностика

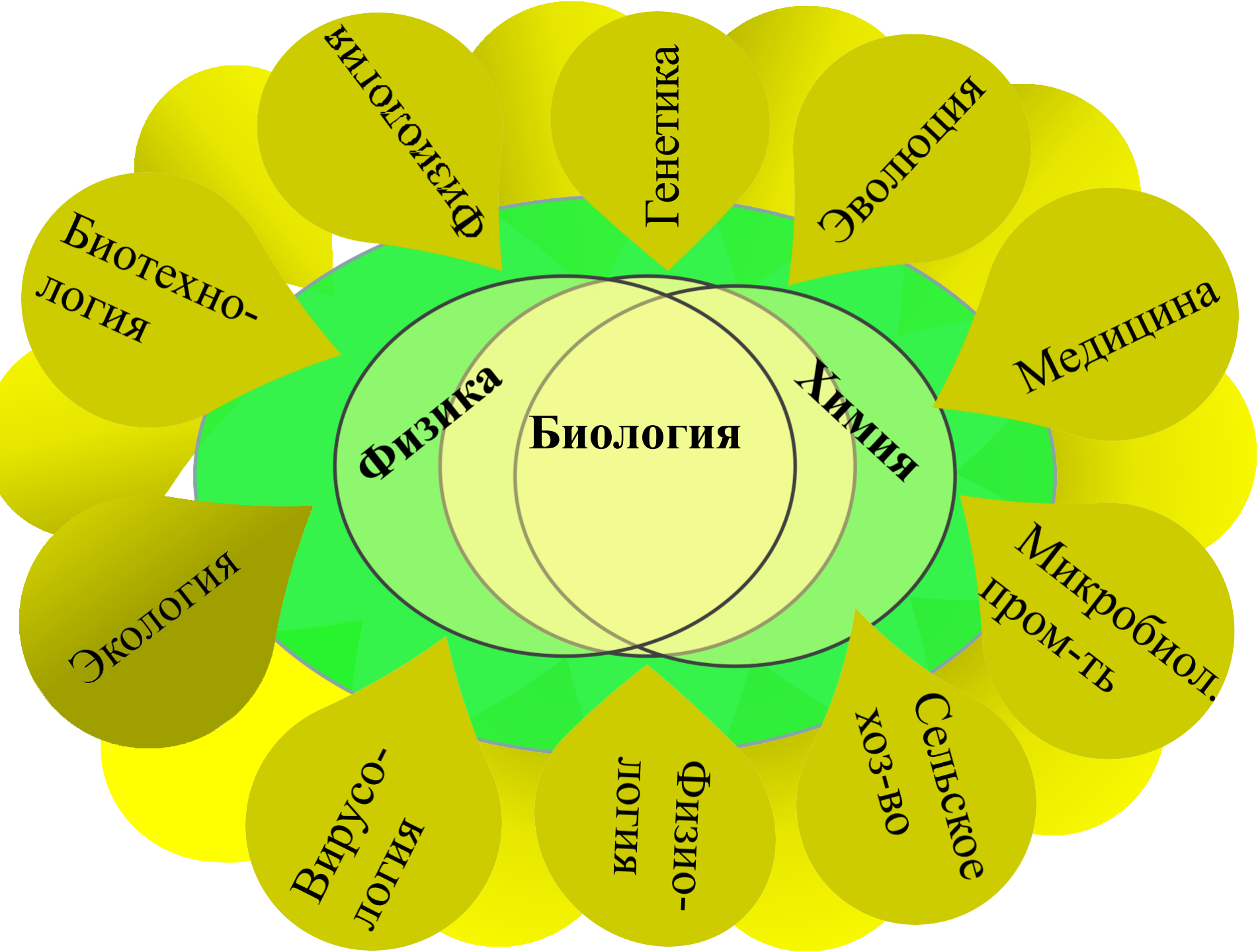
**Курс лекций для студентов IV курса
факультета биологии и биотехнологии**

- **Список рекомендуемой литературы**
- **Основная литература по курсу:**
- **1. Альбертс Б.и др., Молекулярная биология клетки. М. Мир, 1994**
- **2. Глик Б., Пастернак Дж., Молекулярная биотехнология. Принципы и применение., М., Мир, 2002**
- **3. Дымшиц Г.М. и др. Введение в молекулярную биологию Курс лекций, НГУ, Новосибирск, 2000**
- **4. Льюин Б., Гены, М. Мир, 1987; Бином, 2011**
- **5. Рис. Э., Стернберг М., Введение в молекулярную биологию (от клеток к атомам), М., Мир, 2002**
- **6. Сингер М., Берг П., Гены и геномы, М., Мир, 1998**
- **7. И.Ф. Жимулев, Общая и молекулярная генетика, НГУ, Новосибирск, 2007**

ВВЕДЕНИЕ В КУРС

**СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

лекции 1, 2



Биология

Физика

Химия

Генетика

Эволюция

Медицина

**Микробиол.
пром-ть**

**Сельское
хозяйство**

**Физио-
логия**

**Вироло-
логия**

Экология

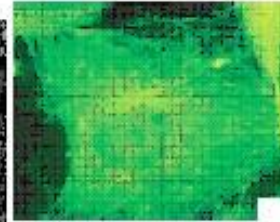
**Биотехно-
логия**

Физиологизм

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И МИРЫ

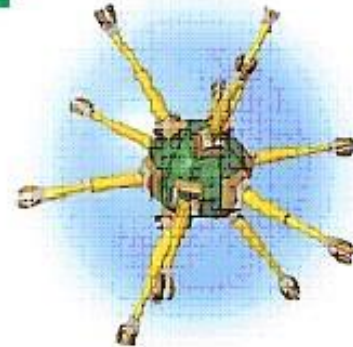
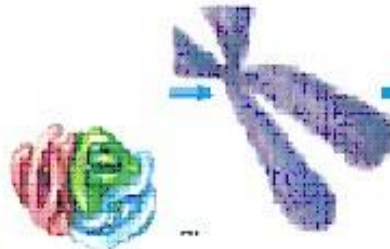
МИР ЖИВОГО

самовоспроизводящиеся
супрамолекулярные
ансамбли
бактерии клетки
организмы



МИР НАНО

супрамолекулярные
структуры
ферменты хромосомы
вирусы



МИР МОЛЕКУЛ

ковалентно-связанные
структуры
мономеры основных
биополимеров

межмолекулярные взаимодействия

ковалентные связи

нуклеотиды



аминокислоты



сахара

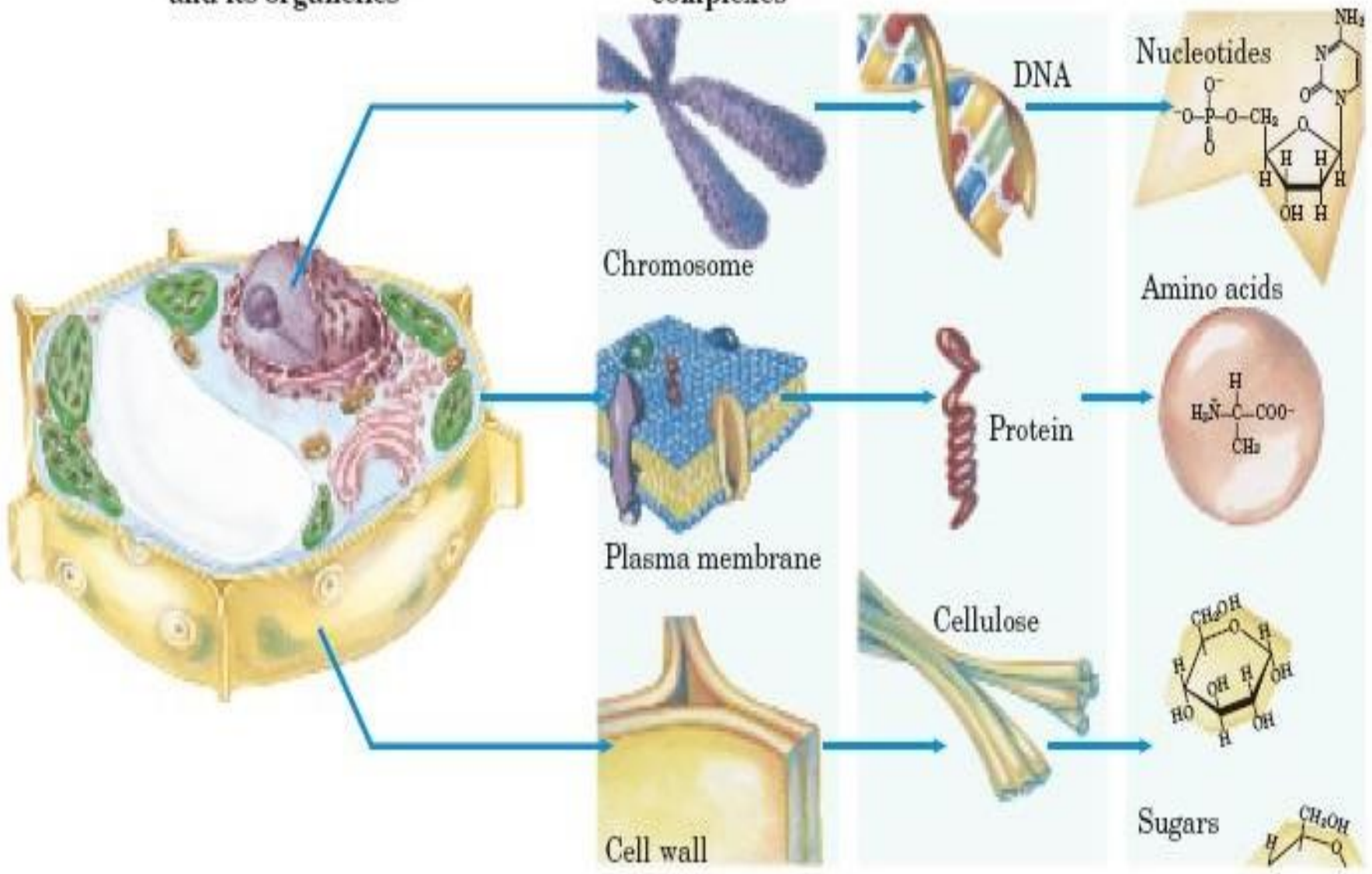


Level 4:
The cell
and its organelles

Level 3:
Supramolecular
complexes

Level 2:
Macromolecules

Level 1:
Monomeric units



- **Что такое молекулярная биология**
- ***Молекулярная биология*** - это наука, изучающая функционирование живых организмов сквозь призму химической структуры входящих в их состав молекул и атомов.
- ***Молекулярная биология*** - это наука о механизмах хранения, воспроизведения, передачи и реализации генетической информации, о структуре и функциях нерегулярных биополимеров - нуклеиновых кислот и белков.

ЛАУРЕАТЫ НОБЕЛЕВСКОЙ ПРЕМИИ 1962 г.– «ОТЦЫ» МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Джеймс Уотсон

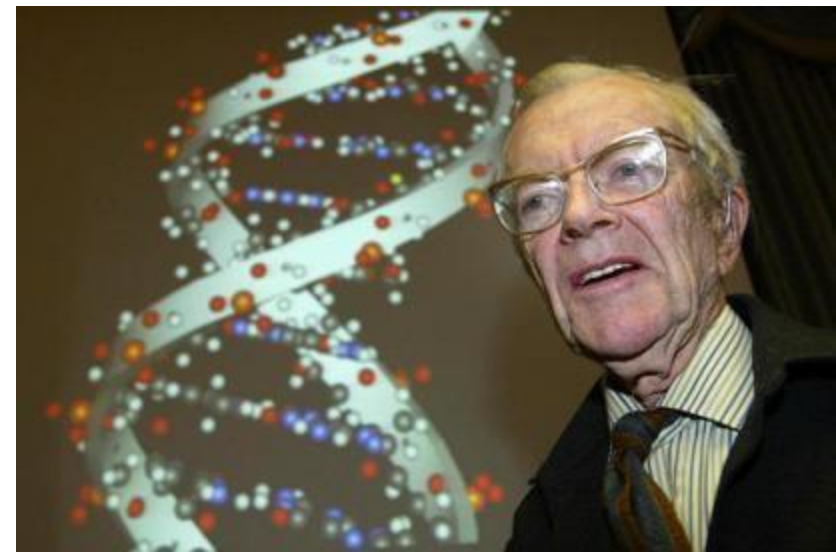
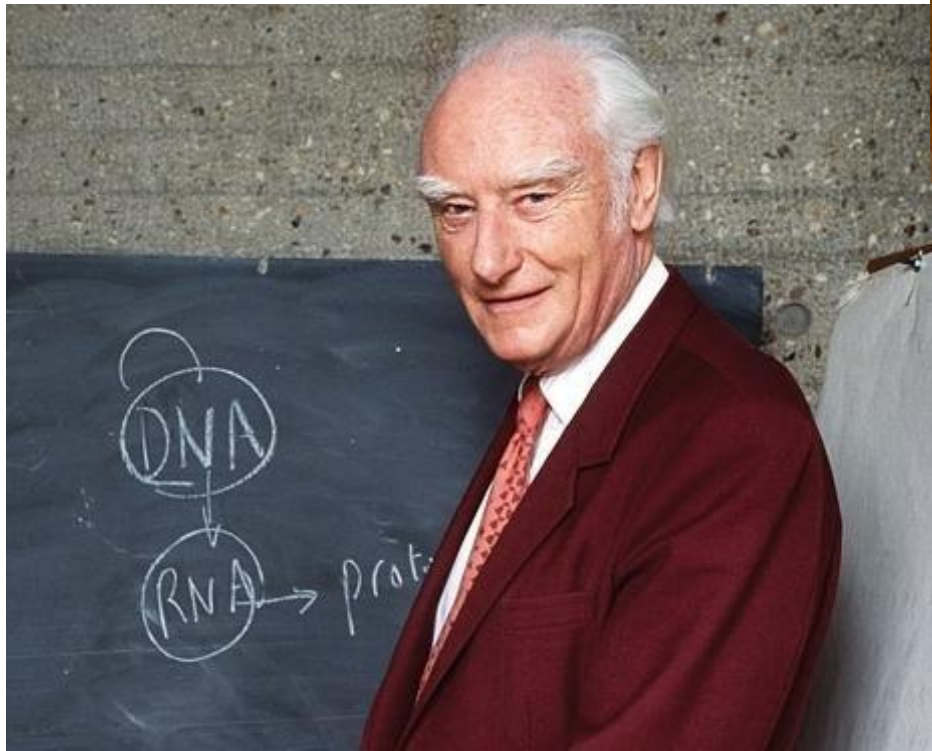
(род. 1928) США

Фрэнсис Крик

(1916 – 2004), ВЕЛИКОБРИТАНИЯ США

Морис Уилкинс

(1916 – 2004), НОВАЯ ЗЕЛАНДИЯ, США



- **Основные исторические вехи развития молекулярной биологии**

1938 г. *Название новой дисциплины* было предложено Уорреном Уивером, *Поначалу подразумевалось, что от нее ожидается объяснение физических и химических основ жизни.*

1940 г. Джордж Бидл и Эдуард Тейтем *показали факт существования связи между генами и белками, связав генетику с биохимией.*

1944 г. Освальд Эвери *показал, что гены состоят из ДНК*

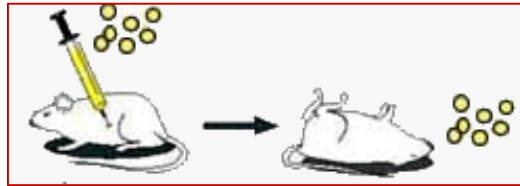
1952 г. Альфред Херши и Марта Чейз *подтвердили, что генетический материал бактериофага тоже состоит из ДНК*

- 1953г. *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 in vitro биологически активной ДНК.* Артур Корнберг (неформальный лидер молекулярной биологии)
- 1970 г. *Химический синтез гена.* Гобинд Корана
- 1970 г. *Открытие фермента обратной транскриптазы и явления обратной транскрипции.* Говард Темин, Дэвид Балтимор, Ренато Дульбеко
- 1972 г. *Открытие эндонуклеаз рестрикции.* Гамильтон Смит, Даниэль Натанс, Вернер Арбер
- 1978 г. *Открытие сплайсинга* Филипп Шарп
- 1982 г. *Открытие автосплайсинга.* Томас Чек
- ... *продолжить*

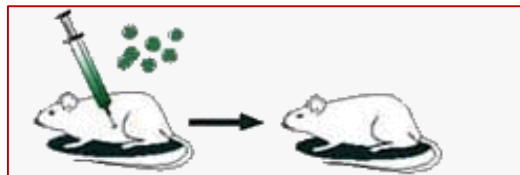
ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РОЛИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛО

1. 1928 г. Опыты Фредерика Гриффита

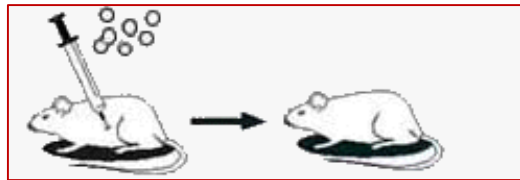
Пневмококки



Бактерии бескапсульного штамма



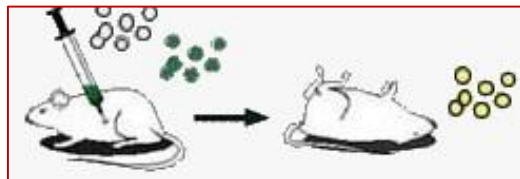
Бактерии капсульного штамма



Убитые нагреванием бактерии капсульного штамма

+

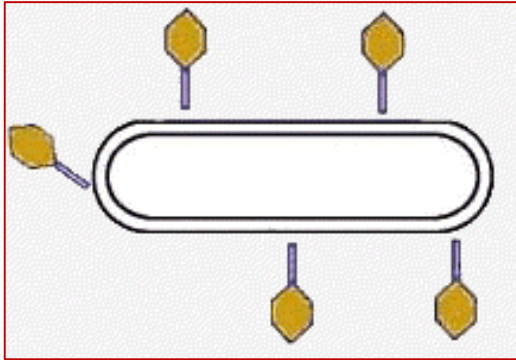
Бактерии бескапсульного штамма



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

ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РОЛИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

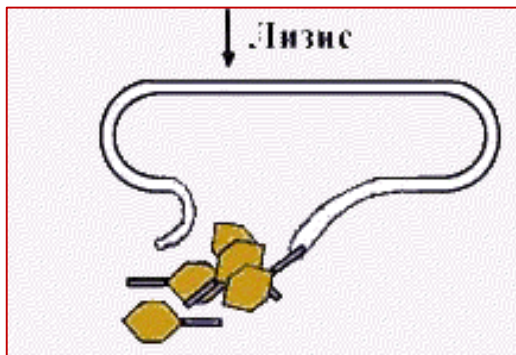
2. 1952 г. Эксперимент Альфреда Херши и Марты Чейз



Бактериофаги с мечеными белковой оболочкой (S35) и н/к (P32) инкубировали с бактериями.



Бактерии отмывали. В смывных водах не обнаруживали P32, а в бактериях - S35

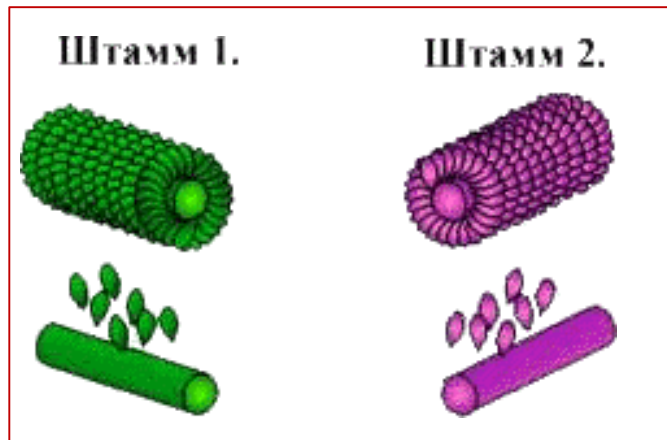


Внутри попала только ДНК

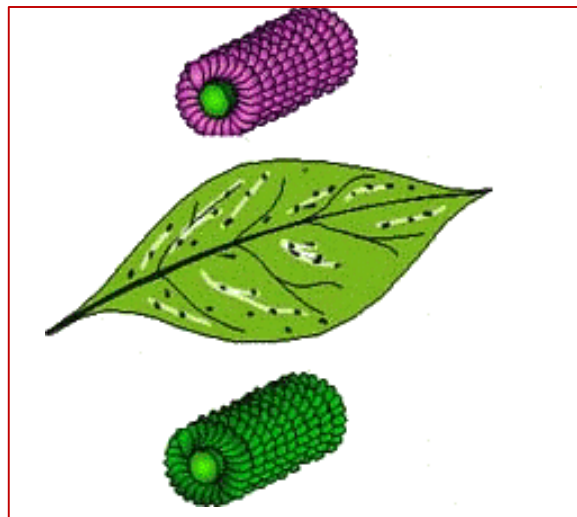
Из бактерии выходили десятки полноценных фагов.

Именно ДНК выполняет генетическую функцию

3. 1957 г. Опыты Френкеля - Конрата



Разные штаммы вируса вызывают разную картину поражения листьев табака.

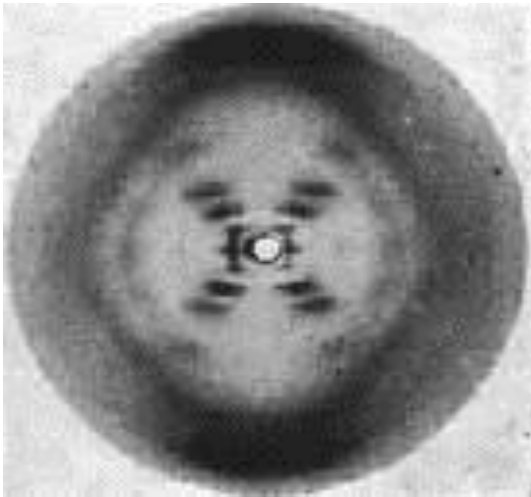


«Переодетые» вирусы вызывали картину поражения, характерную для того штамма, чья РНК была покрыта чужим белком.

Не только ДНК, но и РНК может служить носителем генетической информации.

СТРОЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

- Хронология открытий, подготовивших создание Уотсоном и Криком модели двойной спирали ДНК
- 1868г. **Обнаружен нуклеин**. Современное название - **хроматин**. Фридрих Мишер
- 1889г. **Нуклеин разделен на нуклеиновую кислоту и белок**. Появился **термин "нуклеиновая кислота"**. Рихард Альтман
- 1900г. **Все азотистые основания были описаны** химиками.
- 1909г. **В нуклеиновых кислотах обнаружены фосфорная кислота и рибоза**. Левин
- 1930г. **Найдена дезоксирибоза**. Левин
- 1938г. **Рентгеноструктурный анализ показал, что расстояние между нуклеотидами в ДНК 3,4 Å. При этом азотистые основания уложены стопками**. Уильям Астбюри, Флорин Белл



Рентгенограмма натриевой соли ДНК в В-форме, полученная Розалинд Франклин

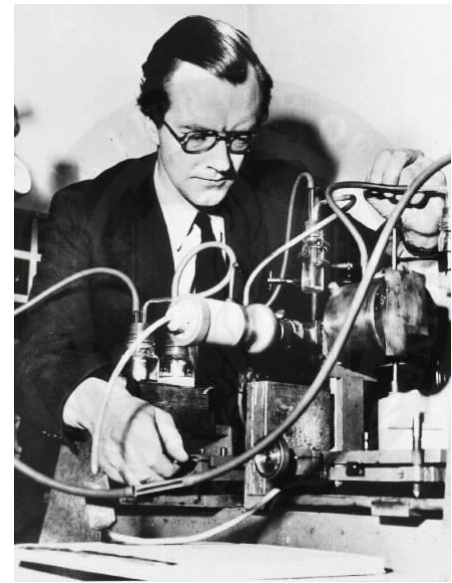
1947г. С помощью прямого и обратного титрования установлено, что в ДНК есть **водородные связи между группами N-H и C=O**. Гулланд

1953г. С помощью кислотного гидролиза ДНК с последующей хроматографией и количественным анализом установлены закономерности: **$A/T=1$; $G/C=1$; $(G+C)/(A+T)=K$ - коэффициент специфичности, постоянен для каждого вида**. Эрвин Чаргафф

- **Правило Чаргаффа.** В любой молекуле ДНК количество аденина равно количеству тимина, а количество гуанина – количеству цитозина.

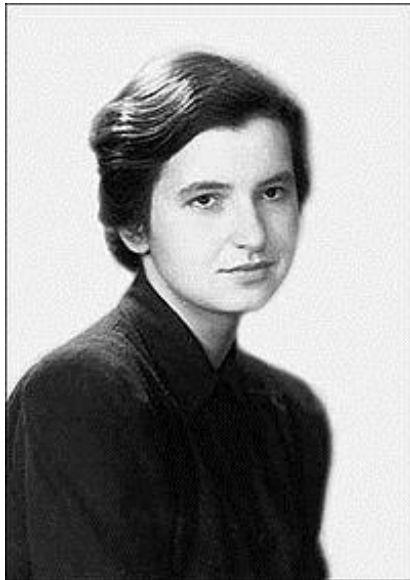


Френсис Крик и Джеймс Уотсон



Морис Уилкинс

(1916 — 2004), Нов. Зел, Англ.

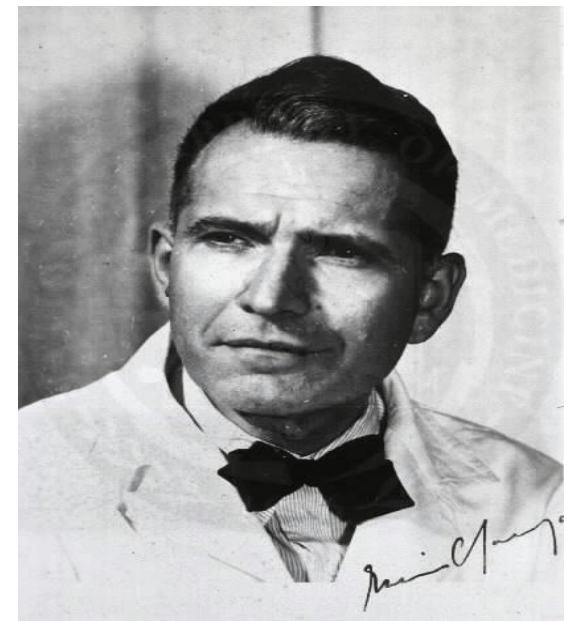


Эрвин Чаргафф

(1905 – 2002)

Розалинд Франклин

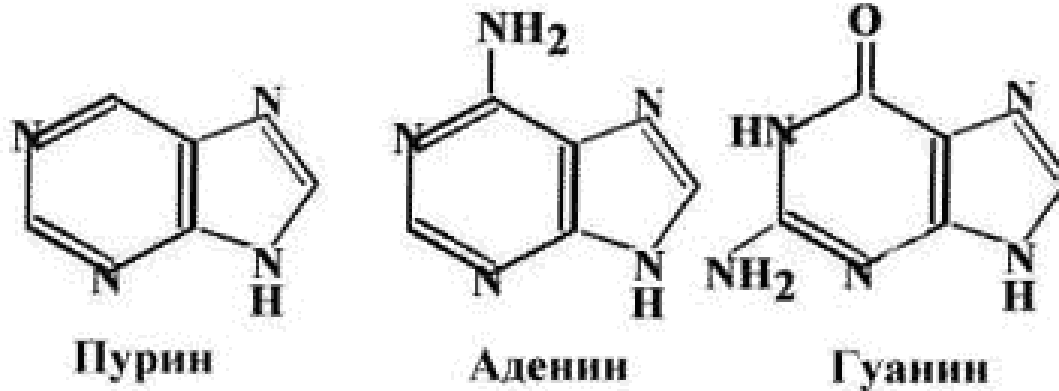
(1920 — 1958)



- **Нуклеиновые кислоты являются нерегулярными полимерами, мономеры которых - нуклеотиды.**
- **Нуклеотид = нуклеозид + фосфорная кислота = азотистое основание + пентоза + фосфорная кислота.**
- **В РНК пентоза - рибоза. В ДНК - дезоксирибоза.**



- Существует два класса азотистых оснований.
- **Пурины**: аденин (А) и гуанин (Г) - содержат два гетероцикла.



- **Пиримидины**: тимин (Т), цитозин (Ц) и урацил (У) - содержат один гетероцикл.

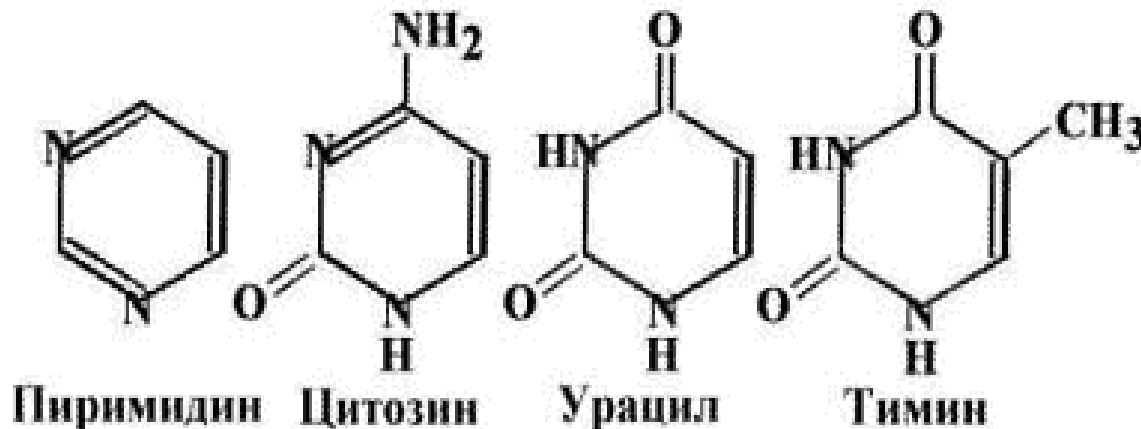


Таблица 1.2. Нуклеотидный состав различных ДНК

Источник	A ¹⁾	G	C	T	$\frac{A+T}{G+C}$	$\frac{A+G}{T+C}$	G+C, мол. %
Бактериофаг λ	26,0	23,8	24,3	25,8	1,08	0,99	48
Бактериофаг T2	32,5	18,2	16,7 ²⁾	32,6	1,86 ²⁾	1,03 ²⁾	35 ²⁾
<i>Escherichia coli</i>	23,8	26,0	26,4	23,8	0,91	0,99	52
<i>Bacillus subtilis</i>	29,0	20,7	21,3	29,0	1,38	0,99	42
Вирус папилломы Шоупа	26,6	24,5	24,2	24,7	1,05	1,04	49
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31,3	18,7	17,1	32,9	1,79	1,00	36
<i>Chlamydomonas</i>	19,6	30,2	30,0 ³⁾	19,7	0,65 ³⁾	0,99 ³⁾	60 ³⁾
Цыпленок	27,9	21,2	21,5 ³⁾	29,4	1,34 ³⁾	0,96 ³⁾	43 ³⁾
Мышь	28,9	21,1	20,3 ³⁾	30,0	1,44 ³⁾	1,00 ³⁾	41 ³⁾
Корова	27,3	22,5	22,5 ³⁾	27,7	1,22 ³⁾	0,99 ³⁾	44 ³⁾
Пшеница	27,2	22,6	22,8 ³⁾	27,4	1,20 ³⁾	0,99 ³⁾	45 ³⁾

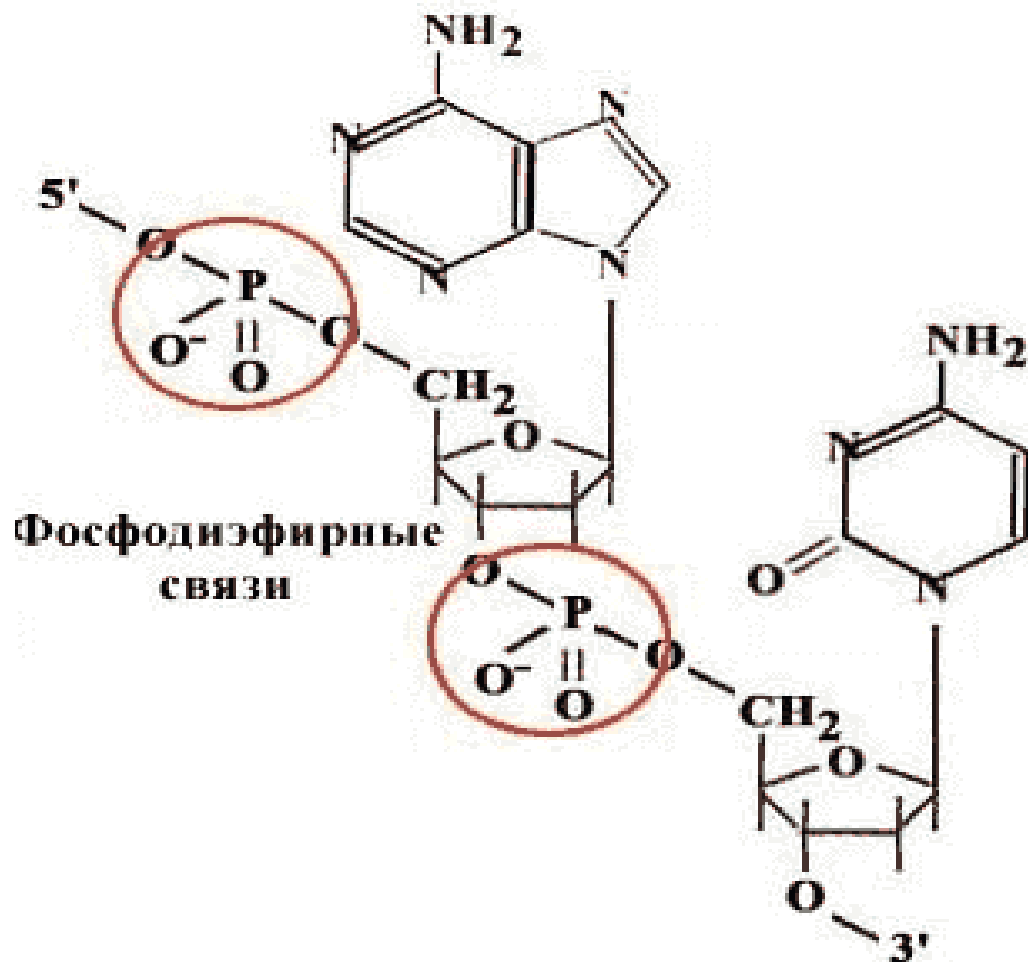
¹⁾ Используются общепринятые сокращенные обозначения пуринов и пиримидинов.

²⁾ 5-гидроксиметилцитозин.

³⁾ Включая 5-метилцитозин.

(Сингер, Берг, 1996)

- Нуклеотиды соединяются друг с другом в полимерную цепочку с помощью **фосфодиэфирных связей**. Азотистые основания не принимают участия в соединении нуклеотидов одной цепи.



Номенклатура азотистых оснований и нуклеотидов

Основание	Рибонуклеотид	Рибонуклеозид
Аденин (A)	Аденилат (AMP)	Аденозин
Цитозин (C)	Цитидилат (CMP)	Цитидин
Гуанин (G)	Гунилат (GMP)	Гуанозин
Урацил (U)	Урацилат (UMP)	Уридин

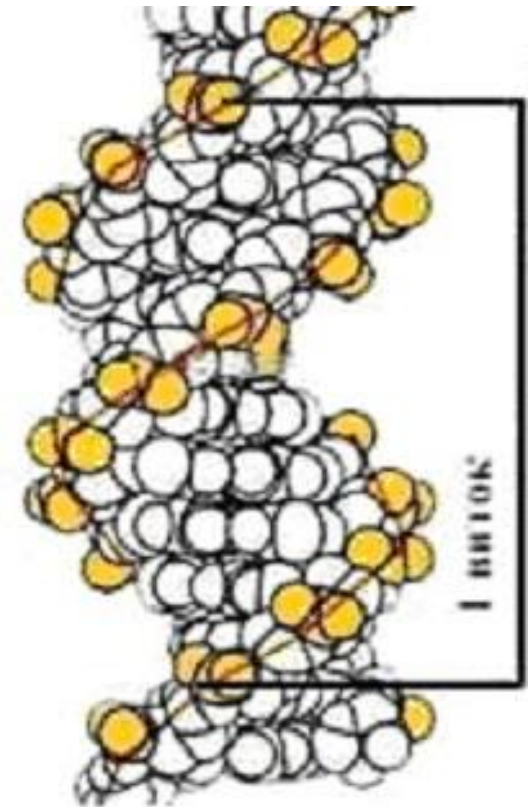
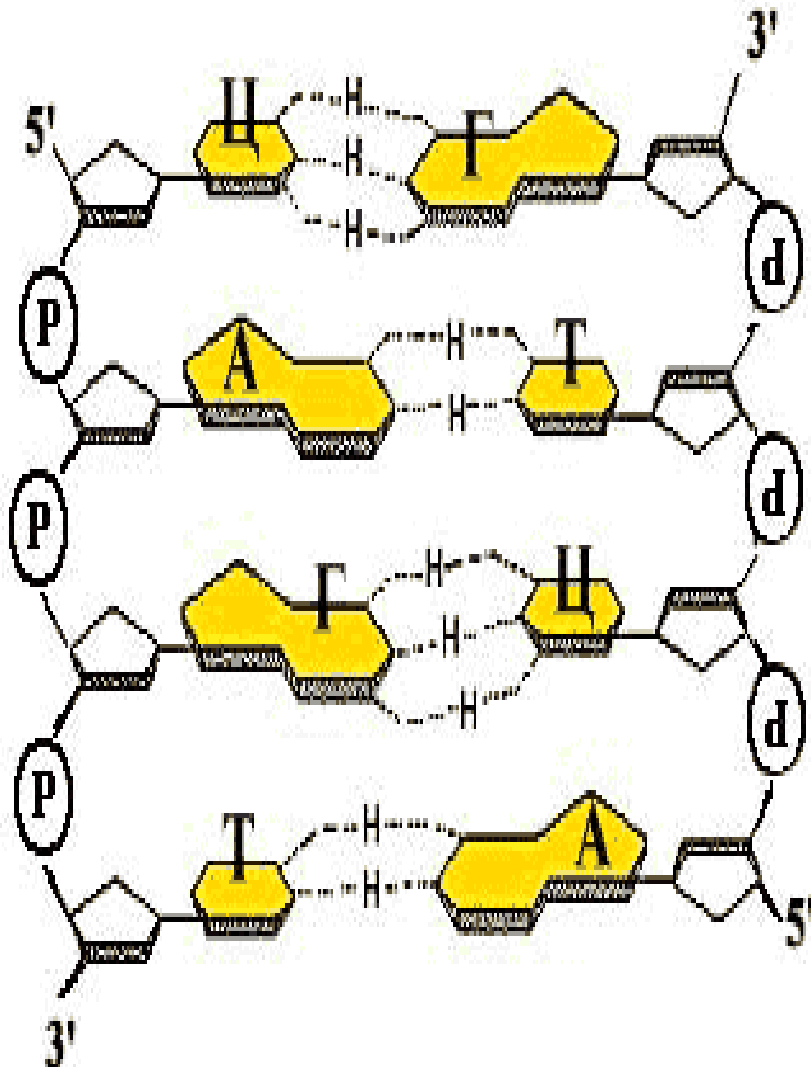
Основание	Рибонуклеотид	Рибонуклеозид
Аденин (A)	Дезоксиаденилат (dAMP)	Дезоксиаденозин
Цитозин (C)	Дезоксицитидилат (dCMP)	Дезоксицитидин
Гуанин (G)	Дезоксигунилат (dGMP)	Дезоксигуанозин
Тимин (T)	Дезокситимидилат (dTMP)	Дезокситимидин

• Принципы строения ДНК

- 1. ***Нерегулярность.***
Существует регулярный сахарофосфатный остов, к которому присоединены азотистые основания. Их чередование нерегулярно.
- 2. ***Антипараллельность.***
ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, ориентированных антипараллельно. 3`-конец одной расположен напротив 5`-конца другой.
- 3. ***Комплементарность (дополнительность).***
Каждому азотистому основанию одной цепи соответствует строго определенное азотистое основание другой цепи. Соответствие задается химией. Пурин и пиримидин в паре образуют водородные связи. В паре А-Т две водородные связи, в паре Г-Ц - три.
- 4. ***Наличие регулярной вторичной структуры.***
Две комплементарные, антипараллельно расположенные полинуклеотидные цепи образуют правые спирали с общей осью.

Принципы строения ДНК

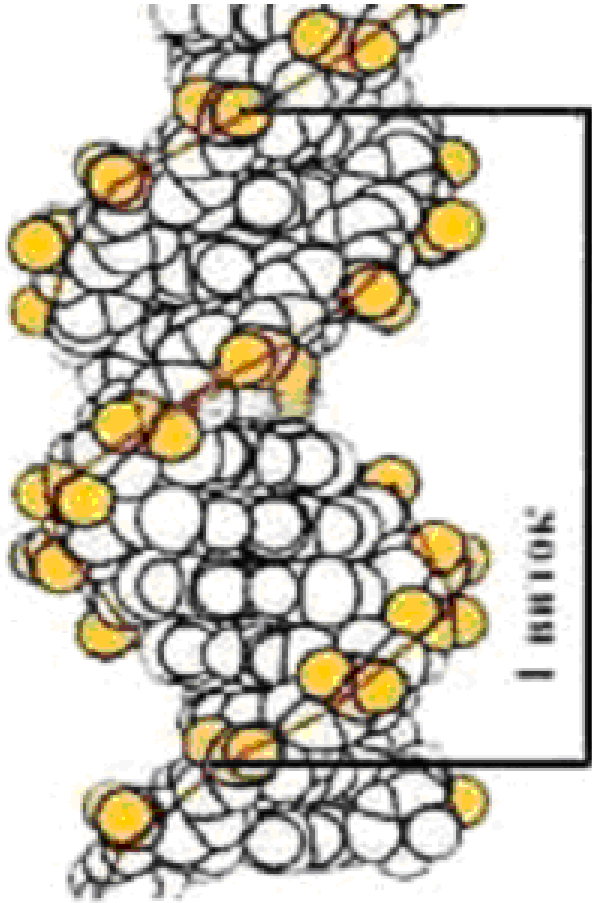
- Нерегулярность, антипараллельность, комплементарность, наличие регулярной вторичной структуры



В - форма
двойной спирали
ДНК

ФОРМЫ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК

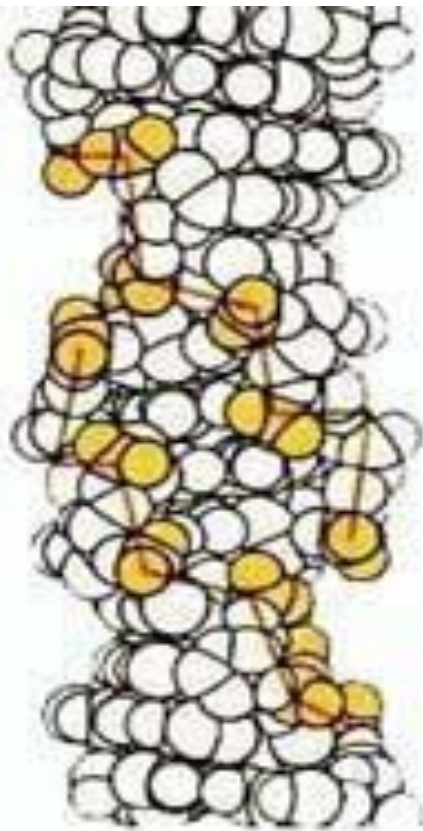
В-форма: 1 виток 10 п.о. Плоскости азотистых оснований перпендикулярны оси спирали. Соседние комплементарные пары повернуты друг относительно друга на 36 градусов. Диаметр спирали 20Å, причем пуриновый нуклеотид занимает 12Å, а пиримидиновый - 8Å.



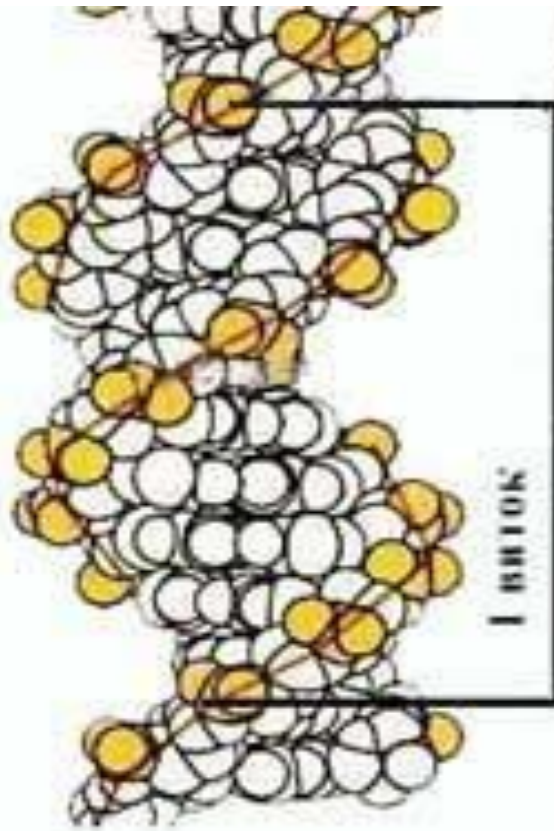
**В - форма
двойной спирали
ДНК**

**A, B - ПРАВОЗАКРУЧЕННЫЕ ФОРМЫ ДВОЙНОЙ СПИРАЛИ ДНК
Z - ЛЕВОЗАКРУЧЕННАЯ**

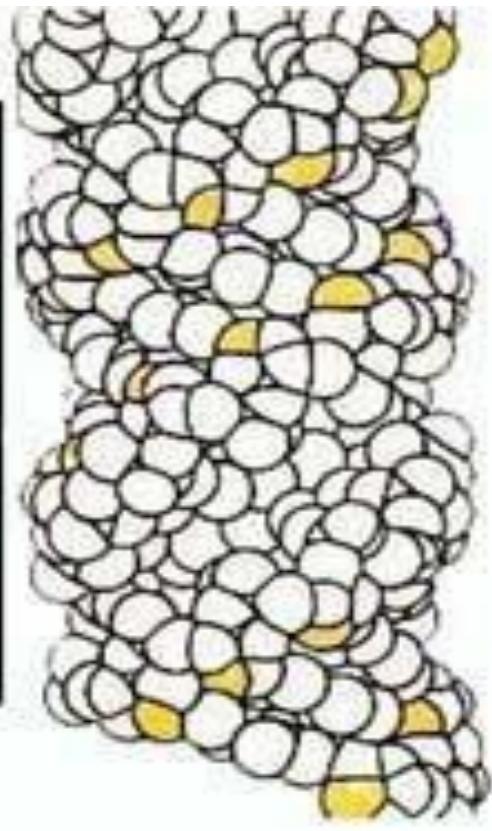
Ни A-, ни Z- формы не могут существовать в водном растворе без дополнительных воздействий (белки или суперспирализация)



Z - форма

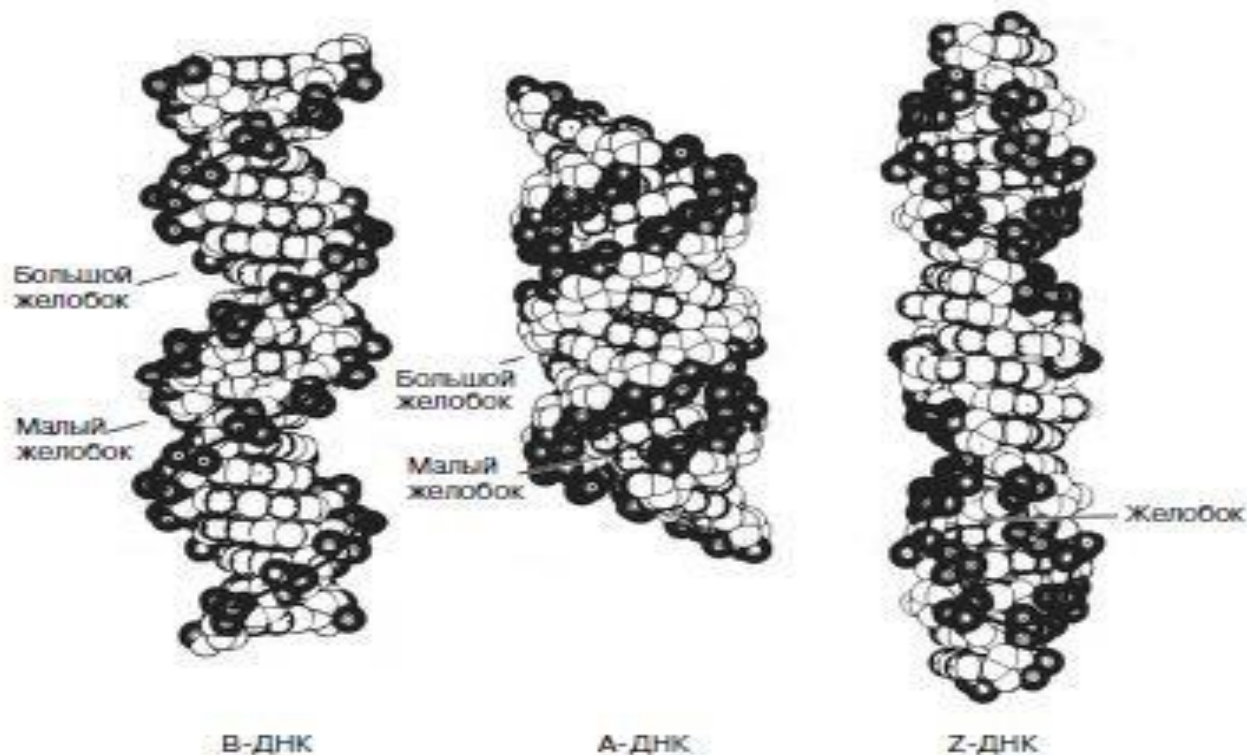


B - форма



A - форма

Изомерные формы двойной спирали



Тип	В-ДНК	А-ДНК	Z-ДНК
Форма	правозакрученная	правозакрученная	левозакрученная
Шаг	3,4 нм	2,9 нм	7,7 нм
Виток	10 п. н.	11-12	12
Диаметр	1,8 нм		

Структура **Z-ДНК** сложна для изучения, потому что она не существует в стабильной форме двойной спирали. Напротив, она является временной структурой, появляющейся в результате биологической активности и быстро исчезающей.

Объединения B- и Z-ДНК.



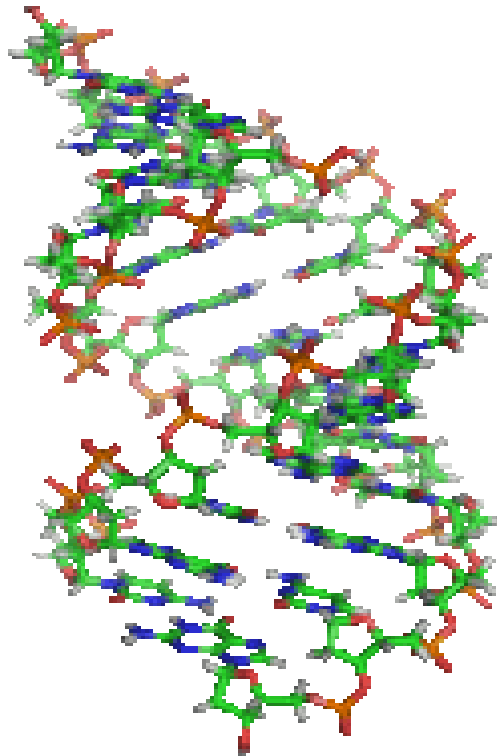
Пока никаких чётких биологических функций у Z-ДНК не определено, но предполагается, что она обеспечивает свёрхспирализацию ДНК во время транскрипции. Потенциал к образованию Z-форм также обнаруживается на участках, задействованных в активной транскрипции.

В 2003 году биофизик Александр Рич из Массачусетского технологического института заметил, что фактор вирулентности поксвируса (вирус оспы у человека), называемый E3L, имеет Z-альфа-родственный участок, схожий с белком млекопитающих, связывающим Z-ДНК.

В 2005 году Рич и коллеги выяснили, что E3L делает для поксвируса. Во время экспрессии генов в хозяйской клетке E3L вызывает повышение транскрипции от 5 до 10 раз в нескольких генах, блокирующих способность клеток к саморазрушению (апоптозу) как к защитной реакции против инфекции.

с высокой ионной силой либо в сухой ДНК.

Биологическая роль - А-форма ДНК необходима в тех процессах, где образуются ДНК-РНК комплексы, так как РНК может принимать только А-форму спирали из-за ОН-группы. Также А-форма устойчивее к УФ-излучению, и поэтому споры грибов содержат именно такую форму.



Размеры и форма молекул ДНК

Таблица 1.3. Молекулярная масса, длина и тип структуры ДНК различного происхождения

Источник	Мол. масса	Длина	Число пар оснований	Тип структуры
Бактериофаг φX174	$1,6 \cdot 10^6$	1,6 мкм	$5 \cdot 10^3$ ¹⁾	Кольцевая одноцепочечная
SV40	$3,5 \cdot 10^6$	1,1 мкм	$5,2 \cdot 10^3$	Кольцевая двухцепочечная
Бактериофаг T2	$1,2 \cdot 10^7$	50 мкм	$2 \cdot 10^5$	Линейная двухцепочечная
Хромосома <i>Haemophilus influenzae</i>	$7,9 \cdot 10^7$	300 мкм	$1,2 \cdot 10^6$	Неизвестен
Хромосома <i>Escherichia coli</i>	$2,6 \cdot 10^9$	1 мм	$4 \cdot 10^6$	Кольцевая двухцепочечная
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
Хромосома 1	$1,4 \cdot 10^7$	50 мкм	$2,1 \cdot 10^5$	Линейная двухцепочечная
Хромосома 12	$1,5 \cdot 10^7$	500 мкм	$2,2 \cdot 10^6$	То же
<i>Drosophila melanogaster</i>				
Хромосома 2	$4 \cdot 10^8$	15 мм	$6,0 \cdot 10^7$	* *
Хромосома 3	$4,2 \cdot 10^8$	16 мм	$6,3 \cdot 10^7$	* *
Хромосома 4	$4 \cdot 10^9$	1,5 мм	$6 \cdot 10^8$	* *

¹⁾ В данном случае указано число оснований, а не пар оснований.

Дальтон – Da. Атомная единица массы (обозначение а. е. м.), она же дальтон (обозначение Da), она же углеродная единица. выражается через массу нуклида углерода ^{12}C и равна 1/12 массы этого нуклида _
1 а. е. м. = $1,660\,540\,2(10) \cdot 10^{-27}$ кг = $1,660\,540\,2(10) \cdot 10^{-24}$ г (Сингер, Берг, 1996)

Формы молекул ДНК

- **В клетках прокариот и эукариот молекула ДНК всегда состоит из двух цепей (дуплекс) и может иметь кольцевую или линейную форму. Геномы ДНК-содержащих вирусов могут быть представлены одноцепочечной или двухцепочечной молекулой ДНК (кольцевой или линейной).**
- **^ Кольцевая суперспирализованная двухцепочечная молекула ДНК - хромосомы бактерий, плазмиды, геномы митохондрий, пластид и некоторых вирусов.**
- **^ Линейная двухцепочечная ДНК находится в хромосомах эукариот и некоторых вирусов.**

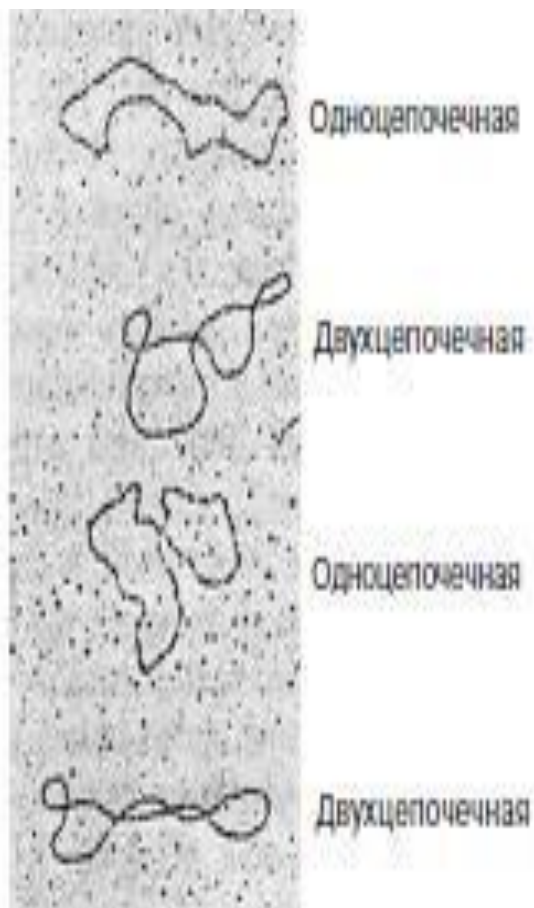
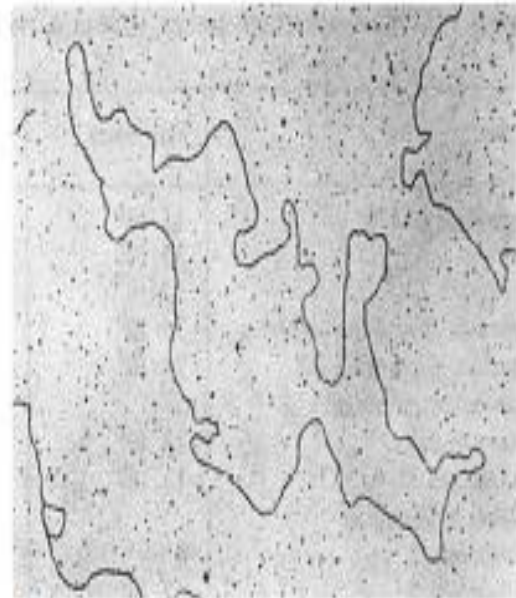


РИС. 1.11.

Электронные микрофотографии одно- и двухцепочечных кольцевых ДНК фага M13. Двухцепочечная ДНК выглядит более гладкой и вытянутой и ее легче визуализировать, чем одноцепочечную. (С любезного разрешения L. Chow.)



А



Б

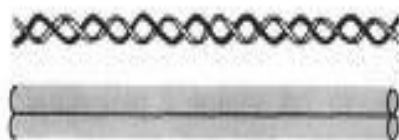
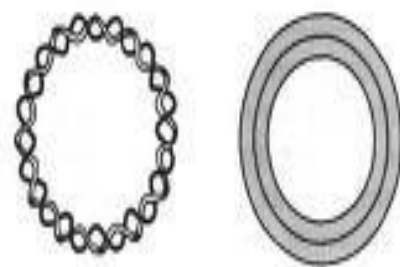
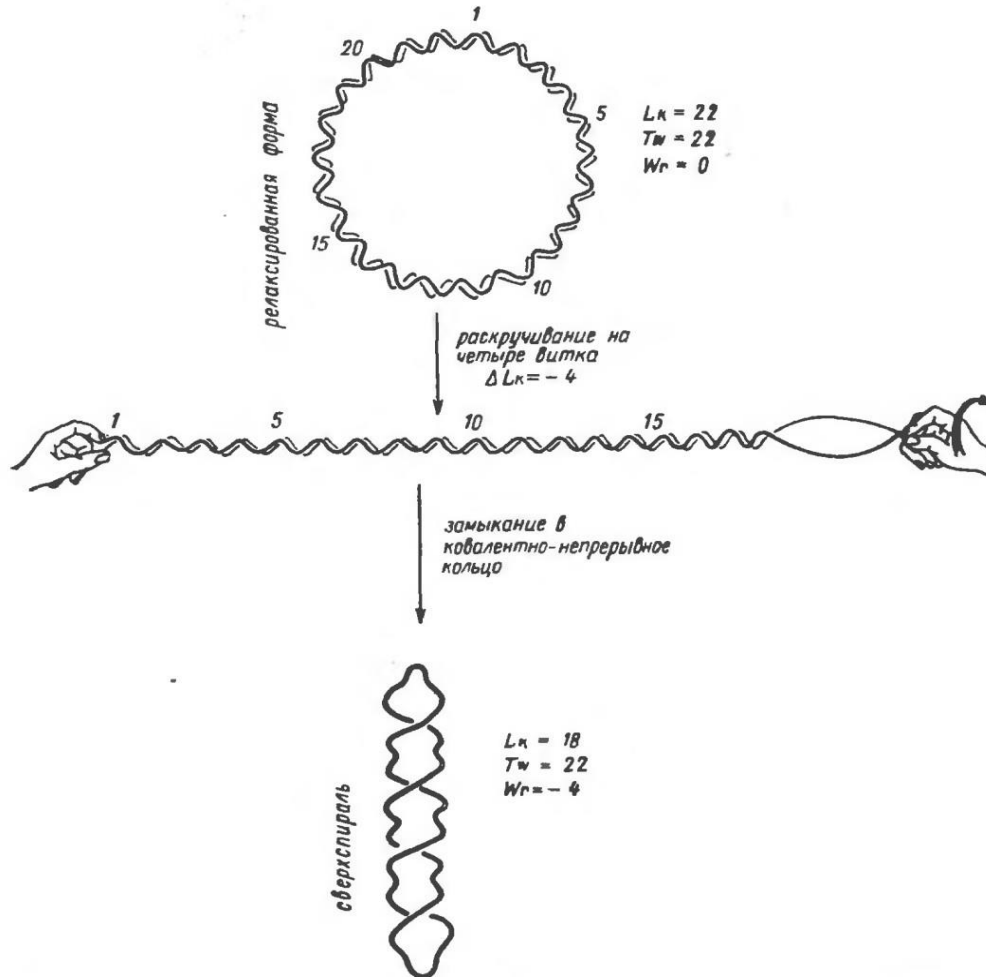


РИС. 1.9.

Схематическое представление и электронные микрофотографии линейной (А) и кольцевой (Б) двухцепочечной ДНК фага λ . (Электронные микрофотографии любезно предоставлены L. Chow.) ДНК изображена в виде двойной спирали; такое же изображение для двухцепочечной ДНК будет использоваться повсюду в этой книге.

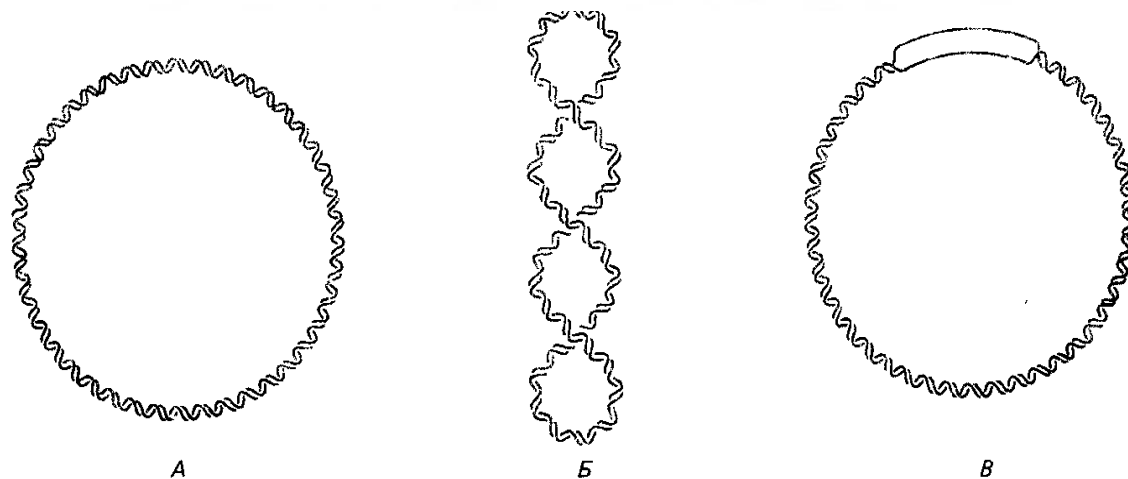
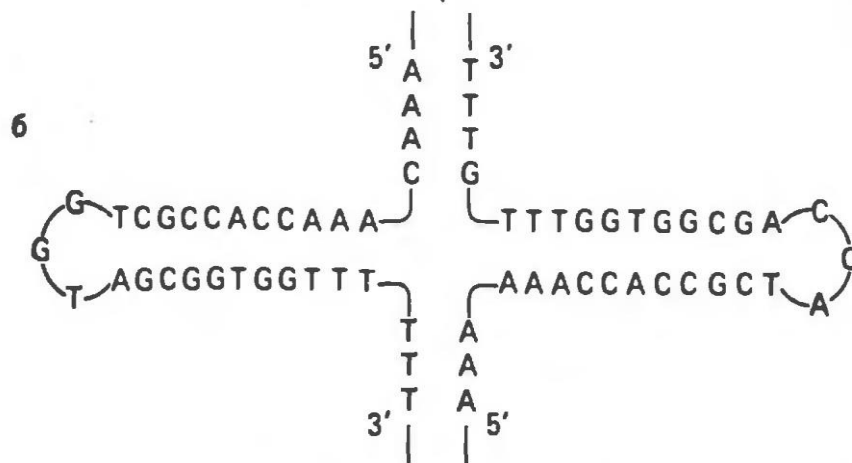
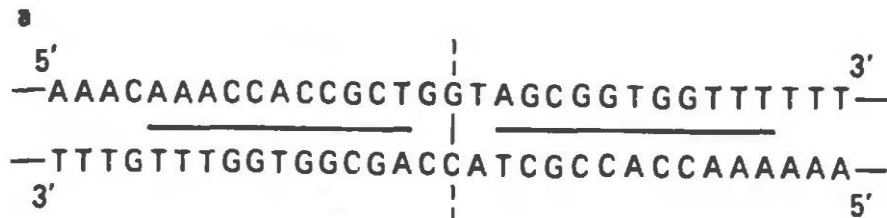


Сверхспирализация ДНК



(Спирин, 1990)

Схема, иллюстрирующая образование отрицательно сверхспирализованной кольцевой ковалентно замкнутой ДНК



Образование крестообразных структур в палиндромных участках

(Спирин, 1990)

Рис. 2.12. При суперспирализации двуспиральная молекула ДНК закручивается сама на себя. Разделение оснований снимает отрицательную суперспирализацию (сверхскручивание).

А. Кольцевая ДНК без суперспирализации. Б. Отрицательно суперспирализованная ДНК. В. Отрицательная суперспирализация может привести к разделению цепей.

(Льюин, 1997)

• **ФУНКЦИИ ДНК**

- **1. ДНК является носителем генетической информации.**
Функция обеспечивается фактом существования **генетического кода.**
- **2. Воспроизведение и передача генетической информации в поколениях клеток и организмов.**
Функция обеспечивается процессом **репликации.**
- **3. Реализация генетической информации в виде белков, а также любых других соединений, образующихся с помощью белков-ферментов.**
Функция обеспечивается процессами **транскрипции и трансляции.**

ОТЛИЧИЯ МЕЖДУ ДНК И РНК

	ДНК	РНК
Сахар	Дезоксирибоза	Рибоза
Азотистые основания	A T G C	A U G C
Количество цепей в молекуле	99.99% двойная спираль 0.01% одноцепочечная	99.99% одноцепочечная 0.01% двухцепочечная
форма молекулы	Все одноцепочечные-кольцевые. Большинство двухцепочечных - линейные, часть- кольцевые	Линейные молекулы

ВИДЫ РНК

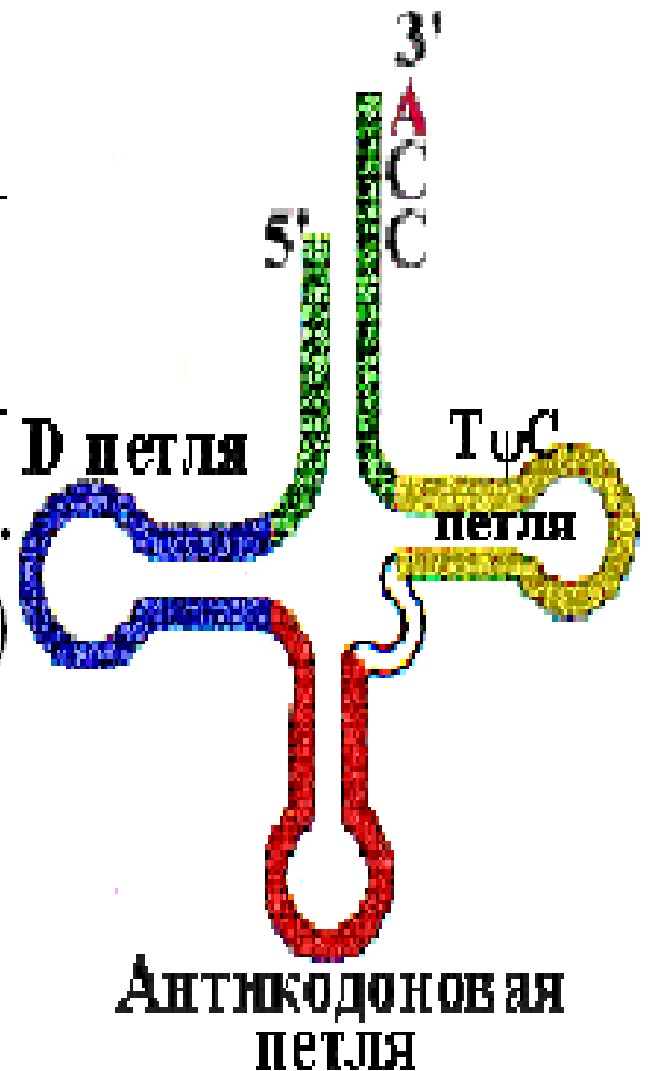
Виды РНК	Размер в нуклеотидах
гРНК - геномные РНК	10000-100000
мРНК - информационные (матричные) РНК	100-100000
тРНК - транспортные РНК	70-90
рРНК - рибосомные РНК	несколько дискретных классов от 100 до 500000
sРНК - малые РНК	100-300

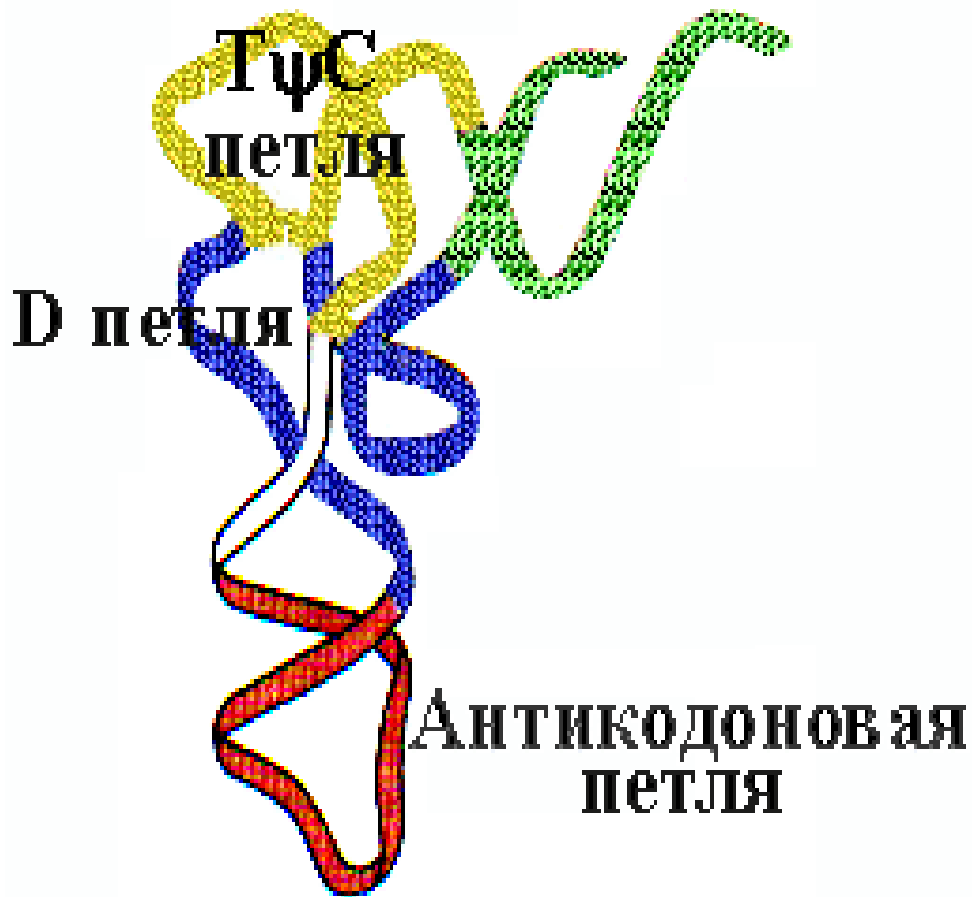
Вторичная структура

"клеверный лист".

Последовательность ССА на 3'-конце одинакова для всех тРНК.

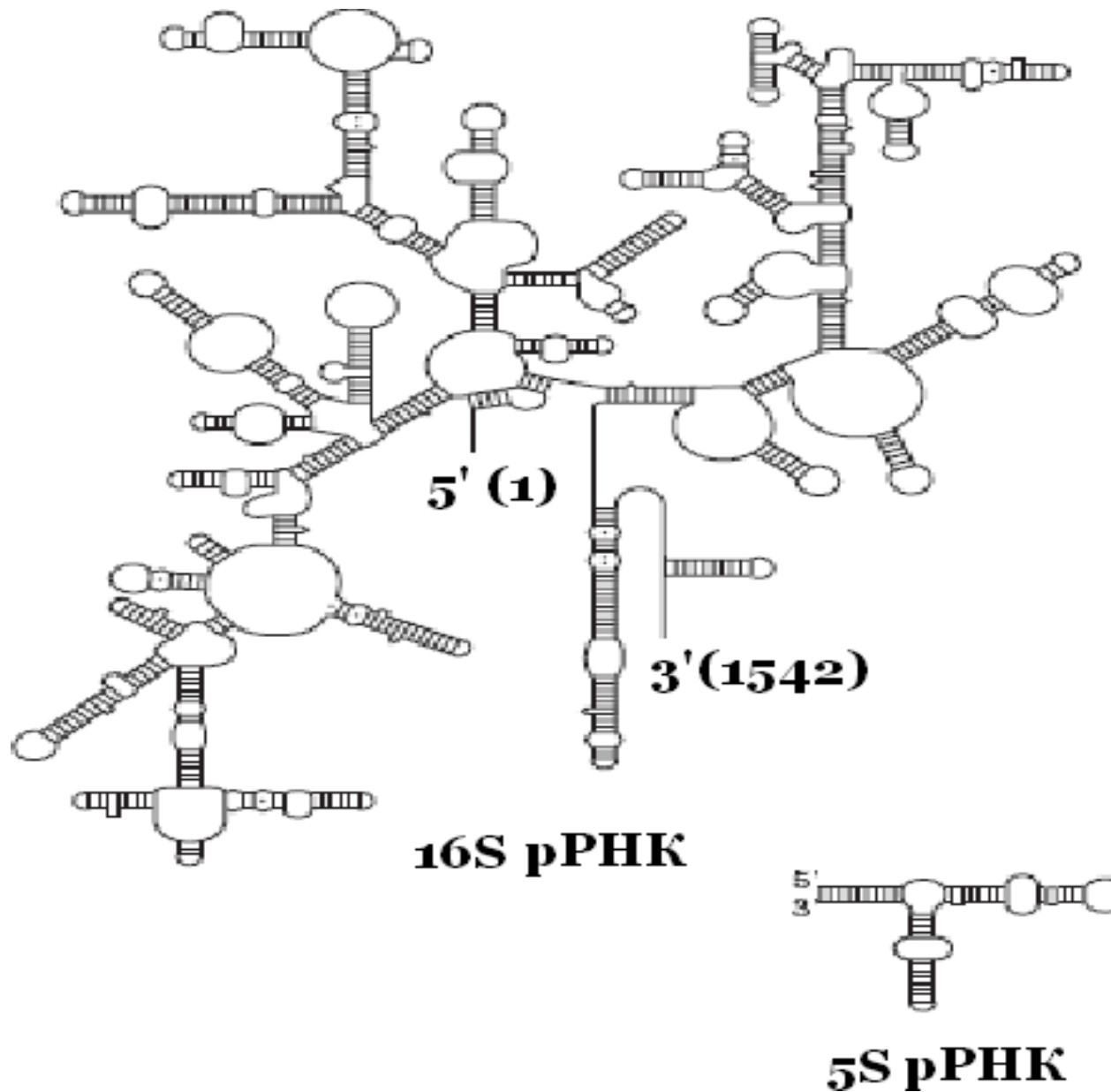
К концевому аденозину (А) присоединяется аминокислота.



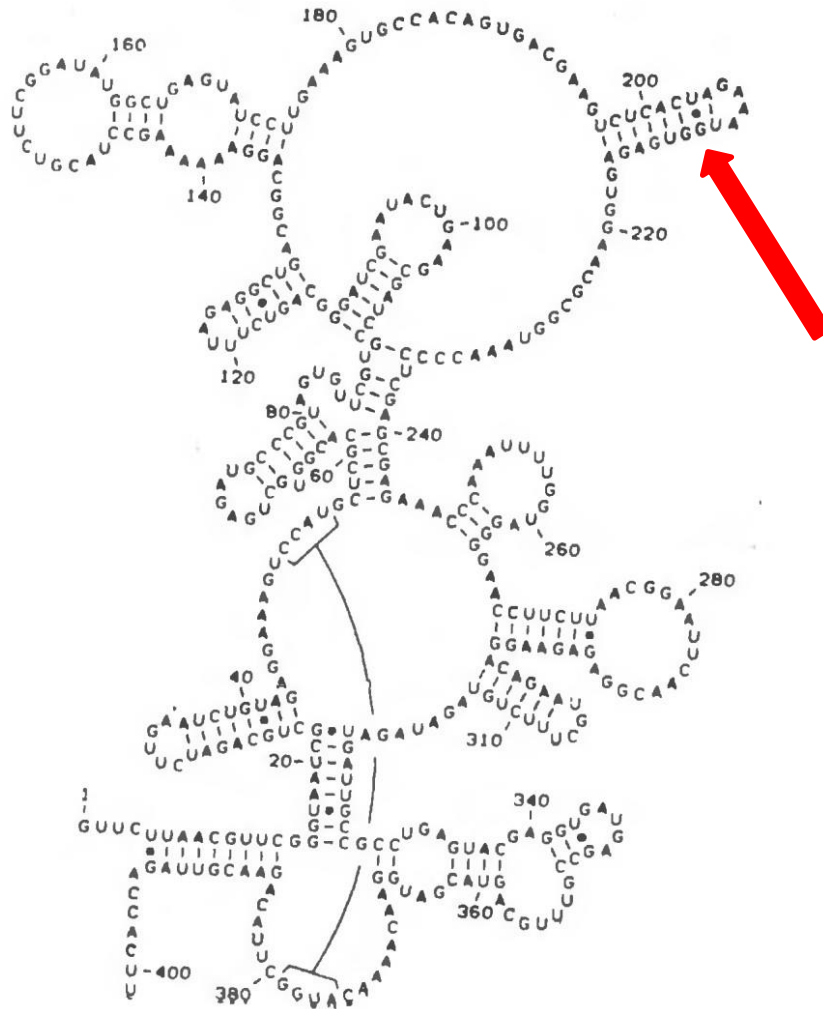


Третичная структура
тРНК в проекции на
плоскость имеет
форму бумеранга

Диаграмма вторичной структуры бактериальных рибосомных (16S и 5S) рРНК



Вторичная структура РНК



**Вторичная структура РНК-
компонента рибонуклеазы
из кишечной палочки**