

Нуклеиновые кислоты

(В помощь учителю биологии и химии)

А. А. Чиркин, профессор Витебского государственного университета имени П. М. Машерова,
доктор биологических наук, профессор

(Окончание. Начало в № 1 за 2018 год.)

6. Функции, строение и виды РНК

По функциональной значимости выделяют два класса молекул РНК. К первому классу относят молекулы РНК, обеспечивающие процесс трансляции — матричный синтез полипептидной цепи, а ко второму классу — молекулы РНК, участвующие в регуляции экспрессии генов на этапе трансляции.

По классическим представлениям, РНК является одиночной полинуклеотидной цепью, построенной из четырёх основных типов рибонуклеотидов — АМФ, ГМФ, ЦМФ и УМФ. Для РНК характерны минорные нуклеотиды с необычными азотистыми основаниями — дигидроурацил, 3-метилурацил, 1-метилгуанин и др. (до 50 типов).

Особенно много минорных нуклеотидов в аминоксил-тРНК (до 10 % от всех нуклеотидов). В РНК содержание аденина и гуанина не соответствует содержанию урацила и цитозина. При наличии в цепи РНК участков с комплементарной последовательностью единичная цепь РНК способна сворачиваться с образованием так называемых шпилек, структур, имеющих двуспиральные характеристики.

К основным типам РНК, необходимых для трансляции, относят следующие три типа молекул:

1. *Матричные, или информационные, РНК* (м- или иРНК), м.м. 25000–100000. Да, состоят из 75–300 нуклеотидов, синтезируются в ядре из пре-мРНК; составляют 5–7 % от всей клеточной РНК. Период полужизни — несколько минут. На 5'-конце всех эукариотических мРНК имеется особая структура, называемая *кэп*. Кэп представляет собой 7-метилгуанозинтрифосфат. Образование кэпа происходит ферментативным путём в ядре ещё до завершения транскрипции. Считается, что

кэп, с одной стороны, предохраняет 5'-конец мРНК от её расщепления 5'-экзонуклеазами, с другой стороны, используется для специфического узнавания в системе трансляции. За кэпом следует *нетранслируемый участок* (от 3–15 нуклеотидов до иницирующего кодона), в котором располагается последовательность нуклеотидов, комплементарная последовательности рРНК. Её роль — обеспечение правильного взаимодействия 5'-конца с рибосомой. Завершается транслируемый участок *терминирующим кодоном*, за которым часто следует гексануклеотид ААУААА. У большинства мРНК 3'-конец содержит полиаденилатную цепочку из 20–250 адениловых нуклеотидов, не являющуюся результатом транскрипции, а присоединяющуюся ферментативным путём к мРНК в ходе её созревания в ядре. Предполагается, что полиаденилатная последовательность отвечает за поддержание внутриклеточной стабильности мРНК, определяет время её существования.

Кодовым элементом мРНК является триплет нуклеотидов (кодон), кодирующий аминокислоту.

Показано, что в линейной молекуле мРНК формируется несколько двухспиральных шпилек, на концах которых располагаются «знаки» инициации и терминации транскрипции. Во вторичной структуре — изогнутая цепь; по некоторым данным, в третичной структуре полинуклеотидная цепь связана с транспортным белком информофером.

Информационные РНК образуются из *гетерогенных ядерных РНК* (*предшественники цитоплазматической мРНК*), которые являются первичными транскриптами. Они синтезируются в ядре эукариотических клеток и здесь же подвергаются *сплайсингу* — процессу вырезания неинформативных участков

(интронов) и соединения информативных последовательностей (экзонов), сохраняющихся в «зрелой» молекуле, в ходе всего процессинга РНК. Сплайсосомные интроны часто находятся в генах, кодирующих белки.

Для сплайсинга необходимо наличие специальных 3'- и 5'- последовательностей. Сплайсинг катализируется сплайсосомой — большим комплексом, состоящим из РНК и белков и включающим пять малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП). РНК-составляющая мяРНП взаимодействует с интроном и, возможно, участвует в катализе. Обнаружены два типа сплайсосом (главная и дополнительная), отличающиеся по входящим в их состав мяРНП. Главная сплайсосома принимает участие в сплайсинге интронов, содержащих гуанин и урацил (GU) в 5' сайте, и аденин и гуанин (AG) в 3' сайте. Она состоит из мяРНП (snRNP): U1, U2, U4, U5 и U6. Схема сплайсинга: интрон вырезается с образованием лариата (лассо), экзоны сшиваются. В центре вырезаемого интрона обозначается «А-точка разветвления интрона» (содержатся адениловые нуклеотиды). От этой точки начинается первая реакция этерификации. На первом этапе 2'-ОН-группа аденозина, находящегося в точке разветвления интрона, вырезаемого из предшественника РНК, атакует фосфодиэфирную связь 5'-концевого сайта сплайсинга, что сопровождается освобождением экзона и образованием промежуточной структуры в виде лассо. В таком промежуточном соединении 5'-концевой нуклеотид интрона соединён 2'-5'-фосфодиэфирной связью с этим остатком аденозина, образуя петлю на конце интрона. На втором этапе 3'-концевая ОН-группа экзона атакует 3'-концевой сайт сплайсинга. В результате происходит объединение экзонов и освобождается интрон с петлёй на 5'-конце. Эти реакции не требуют затрат энергии и протекают самопроизвольно.

В результате образуются зрелые мРНК, которые поступают в цитоплазму и служат матрицей для биосинтеза белка. Их молекулярная масса около 10^7 Да.

Увеличение разнообразия белков, кодируемых близкими генами у эукариот по мере усложнения организмов, связано с ростом доли молекул пре-мРНК, подвергающихся альтернативному сплайсингу.

В случае *альтернативного сплайсинга* интроны в составе пре-мРНК вырезаются в разных комбинациях, в том числе иногда вместе с некоторыми экзонами. Показано, что у человека до 94 % генов подвержено альтернативному сплайсингу (у остальных 6 % генов нет интронов). Геном круглого червя *Caenorhabditis elegans* по количеству генов практически не отличается от генома человека, однако альтернативному сплайсингу подвергаются пре-мРНК только 15 % генов. Таким образом, альтернативный сплайсинг позволяет увеличить разнообразие белковых продуктов генов, не увеличивая пропорционально этому размер генома, в том числе не создавая дополнительных копий генов. Биологический смысл альтернативного сплайсинга для многоклеточных эукариот состоит в том, что он, по-видимому, является ключевым механизмом увеличения разнообразия белков и осуществления регуляции экспрессии генов в онтогенезе. Кроме альтернативного сплайсинга, представляют интерес аутосплайсинг и транс-сплайсинг. *Аутосплайсинг* был открыт Т. Чехом с соавтором в 1981 году при анализе процессинга рибосомной 26S рРНК у инфузории *Tetrahymena thermophila*. РНК тетрахимены обладает рибозимной активностью и может сплайсировать сама себя, замыкаясь в кольцо и одним своим концом вырезая интроны из другого (без участия ферментов). *Транс-сплайсинг* — форма сплайсинга, при которой соединяются РНК разных транскриптов.

2. *Транспортные РНК* (тРНК) — около 15 %. Транспортные РНК обладают небольшой молекулярной массой (около 25 000 Да) и содержатся в растворимой фракции цитоплазмы, выполняя функцию переноса аминокислот к месту синтеза белка — рибосоме. Первичные структуры тРНК содержат около 75 нуклеотидов. В клетке насчитывается не менее 20 видов молекул тРНК. Каждый или несколько видов тРНК соответствуют одной из 20 аминокислот, необходимых для биосинтеза белка. Вторичная структура всех тРНК напоминает «клеверный лист» (рис. 10) и имеет 4 основных участка и добавочную петлю:

- *акцепторный* участок имеет на 3' конце последовательность нуклеотидов ЦЦА. К 3'-гидроксильной группе рибозы аденозильного остатка происходит присоединение карбоксильной группы аминокислоты;

Транспортные РНК, соединённые с аминокислотами, называют *аминоацил-тРНК* (аатРНК). Они выполняют *адаптерную функцию* при переводе трёхбуквенного кода нуклеиновых кислот в 20-буквенную последовательность аминокислот в полипептидной цепи (всего 61 аминоксил-тРНК).

- *антикодоновая петля* содержит специфический для каждой тРНК триплет нуклеотидов (антикодон) и служит для спаривания с соответствующим кодоном мРНК;

- *псевдоуридиловая петля* (ТψС) состоит из 7 нуклеотидов и содержит остаток псевдоуридина; служит для связывания тРНК с рибосомой;

- *дигидроуридиловая петля* (D) состоит из 8–12 нуклеотидных остатков. Необходима для связывания с аминоксил-тРНК-синтетазой, которая участвует в узнавании аминокислотой своей тРНК;

- *добавочная петля* представляет собой наиболее вариабельную структуру и служит основой классификации тРНК — тРНК класса 1 (75 % от их общего числа) обладают дополнительной петлёй в 3–5 пар оснований, тРНК класса 2 в этой петле содержат 13–21 пару оснований и часто включают неспаренную петлю.

Третичная структура представлена пространственной структурой в виде локтевого сгиба (L-форма).

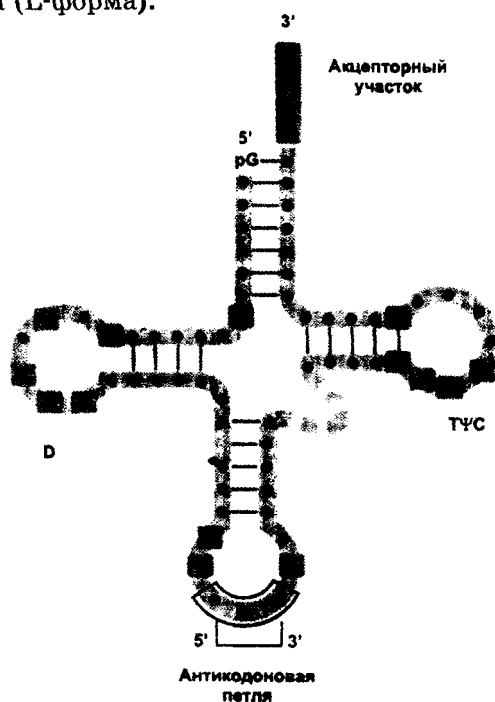


Рисунок 10 — Структура тРНК

3. *Рибосомные РНК* (рРНК) — 80–85 %, имеют разную и значительно большую молекулярную массу (35000–1000000 Да, что соответствует 100–3100 нуклеотидам), являются структурными компонентами рибосом. Полагают, что рРНК представляют собой совокупность коротких одотяжевых и двухспиральных участков. Вторичная структура рРНК образуется за счёт коротких двухспиральных участков молекулы — шпильек. Около 2/3 рРНК организовано в шпильки, 1/3 — представлена одотяжевыми участками, богатыми пуриновыми нуклеотидами, с которыми преимущественно связываются белки. Белки рибосом, подобно гистонам, обладают основным характером, выполняют как структурную, так и ферментативную роль. Последние образуются в результате комплементарного спаривания соседних или достаточно удалённых друг от друга участков одной и той же полинуклеотидной цепи. При этом наряду с каноническими Уотсон–Криковскими парами в двухспиральных участках встречаются пары Г–У, Г–А и А–Ц. Итак, вторичная структура представлена спиральными участками, соединёнными изогнутой одиночной цепью. Третичная структура рРНК — скелет рибосомы, имеет форму палочки или клубка; снаружи находятся рибосомальные белки.

Рибосомы обеспечивают специфический контакт мРНК и тРНК, в результате которого и происходит трансляция нуклеотидной последовательности, считанной с определённого гена, в аминокислотную последовательность соответствующего белка.

Рибосомы млекопитающих состоят из 2 нуклеопротеиновых субъединиц — большой с константной седиментацией 60S и малой — 40S (у прокариот — соответственно 50S и 30S). 60S-субъединица содержит 5S-рибосомную РНК (рРНК), 5,8S-рРНК и 28S-рРНК. Малая 40S-субъединица включает единственную 18S-рРНК и около 30 полипептидных цепей. Все рибосомные РНК, за исключением 5S-РНК, имеют общего предшественника — 45S-РНК, локализованную в ядрышке. В ядрышке происходит упаковка высокометилированных рибосомных РНК с рибосомными белками.

Прокариотические рибосомы и рибосомы митохондрий содержат меньше компонентов,

но структурно и функционально очень сходны с эукариотическими.

Содержание основных типов РНК в клетке: рРНК>тРНК>мРНК. В качестве примера приведены характеристики бактериальных РНК (таблица 3).

Таблица 3 — РНК кишечной палочки (*E.coli*)

Тип	Относительное содержание, %	Коэффициент седиментации (S)	Масса, кДа	Количество нуклеотидов
рРНК	80	23	1200	3700
		16	550	1700
		5	36	120
тРНК	15	4	25	75
мРНК	5	Гетерогенная		

У млекопитающих в процессе транскрипции часто образуются длинные некодирующие РНК, в том числе и двухспиральные. Фрагменты некодирующих РНК могут играть важную роль в регуляции трансляции.

К молекулам РНК, участвующим в регуляции экспрессии генов на этапе трансляции, относятся несколько типов:

микроРНК (microRNA, miRNA) — малые некодирующие молекулы РНК длиной 18–25 нуклеотидов участвуют в регуляции экспрессии генов путём РНК-интерференции. МикроРНК кодируются ядерной ДНК растений и животных и вирусной ДНК у некоторых ДНК-содержащих вирусов. В настоящее время известно около 2000 микроРНК человека. Считают, что мишенями микроРНК являются от 30 до 60 % генов человека, кодирующих белки.

МикроРНК участвуют в подавлении активности генов: 1) путём комплементарного спаривания с участками мРНК и ингибирования трансляции; 2) посредством быстрой деградации комплексов микроРНК с мРНК; 3) через прямое взаимодействие микроРНК с ДНК в процессе РНК-зависимого метилирования ДНК (например, в области промоторов генов).

Интересно, что каждая микроРНК повсеместно может связываться с нуклеотидными

последовательностями до 200 транскриптов-мишеней. Причём одна микроРНК может умеренно репрессировать до сотни белков;

антисмысловые РНК (Antisense RNA) — это одноцепочечные РНК, которые комплементарны мРНК, образуемой в клетке. Антисмысловые РНК вводят в клетки для ингибирования трансляции комплементарных мРНК. Этот эффект достигается тем, что антисмысловые РНК стехиометрически спариваются с мРНК-мишенью и физически препятствуют формированию трансляционного комплекса;

малые интерферирующие РНК, или короткие интерферирующие РНК (*siRNA, small interfering RNA*), — это двухцепочечные РНК, длиной 20-25 пар нуклеотидов (чаще 21 нуклеотид) с двумя неспаренными выступающими 2–3 нуклеотидами (оверхенг в 2–3 нуклеотида) на 3'-концах. Каждая из двух цепей РНК имеет фосфатную группу на 5'-конце и гидроксильную группу на 3'-конце. Малые интерферирующие РНК и микроРНК образуются при «разрезании» длинных двухцепочечных РНК или коротких РНК, содержащих шпильки, рибонуклеазой типа III (фермент Dicer). Этот фермент инициирует образование РНК-индуцируемого комплекса выключения гена, комплекса RISC (RNA-induced silencing complex). Каталитическим компонентом комплекса RISC служит белок Аргонавт (Argonaute), являющийся эндонуклеазой, разрушающей участки мРНК, комплементарные ведущей цепи малой интерферирующей РНК. Деградация мРНК предотвращает трансляцию мРНК на рибосомах в кодируемый ею белок. Этот тип РНК часто образуется в результате расщепления вирусных РНК;

малые РНК, образующие шпильки, или короткие РНК, образующие шпильки (*shRNA, small hairpin RNA, short hairpin RNA*), — короткие молекулы РНК, образующие во вторичной структуре плотные шпильки (структуры типа «стебель–петля»). Малые РНК, образующие шпильки, синтезируются с помощью РНК-полимеразы III.

Малые интерферирующие и образующие шпильки РНК могут быть искусственно введены в клетки для нокдауна определённого гена (*Gene knockdown*), т. е. снижения экспрессии одного или нескольких генов. Аналогичный эффект может быть получен посредством участия микроРНК в метилировании нуклеотидов ДНК в области промотора гена;

малые ядерные РНК (мяРНК, *snRNA*) непосредственно не участвуют в синтезе белка, но могут оказывать влияние на процессинг РНК, в частности на этапе вырезания неинформационных участков пре-мРНК, регуляции факторов транскрипции и поддержании целостности теломер. Они транскрибируются РНК-полимеразой II или РНК-полимеразой III. Малые ядерные РНК содержат большое количество уридиловых нуклеотидов. Важной группой мяРНК являются малые ядрышковые РНК (*snRNA*), участвующие в процессинге рРНК и тРНК, и самих мяРНК.

7. Методы исследования нуклеиновых кислот (по Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L.)

Быстрый прогресс молекулярной биотехнологии основан на использовании основных пяти биохимических технологий.

1. Рестрикционный анализ ДНК. Рестриктазы — специфичные ферменты, разрезающие полинуклеотидные цепи в строго определённых местах.

2. Блоттинг. Саузерн- и Нозерн-блоттинг-технологии используются для выделения и анализа ДНК и РНК, соответственно.

3. Секвенирование ДНК. Точная последовательность нуклеотидов в полинуклеотидных цепях ДНК позволяет знать строение генов, контроль их экспрессии и структуру синтезированного по программе определённого гена белка.

4. Синтез нуклеиновых кислот. Знание полинуклеотидных последовательностей позволяет синтезировать фрагменты нуклеиновых кислот.

5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет в миллиард раз увеличивать концентрацию сегмента ДНК. Одна молекула ДНК может быть амплифицирована (размножена) до концентрации, когда её можно будет изучать физико-химическими способами.

Все эти технологии требуют шестого компонента, а именно мощного компьютерного обеспечения — основного инструмента новой науки биоинформатики.

Рестриктазы — это эндонуклеазы, которые узнают специальные последовательности в двойной спирали ДНК и катализируют гидролиз связей между строго определёнными нуклеотидами на обеих цепях. Они необходи-

мы для анализа структур хромосом, секвенирования очень длинных молекул ДНК, изоляции генов и создания новых рекомбинантных молекул ДНК. Эти ферменты были открыты в конце 60-х годов XX века у прокариот. Их биологическая роль заключается в уничтожении чужеродных ДНК. Собственная ДНК не расщепляется, поскольку места узнавания для собственных рестриктаз на ДНК метилированы. Обычно рестриктазы расщепляют фосфодиэфирные связи между нуклеотидами в палиндромных областях (рис. 11).

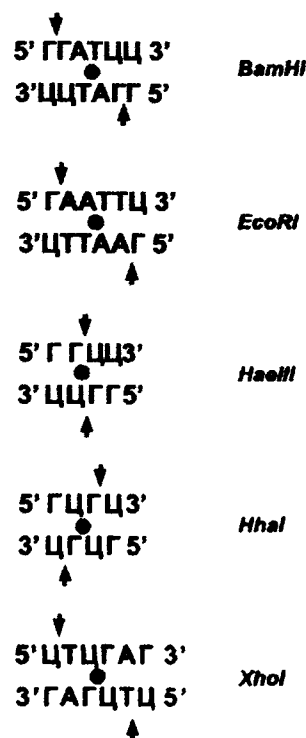


Рисунок 11 — Специфичность некоторых рестриктаз. Пары оснований узнаются рестриктазами по отношению к оси симметрии. Две цепи ДНК могут вращаться вокруг этой оси (помечено точкой) на 180°. Симметричные места разрыва цепей помечены стрелками

К настоящему времени выделено, очищено и синтезировано более 2000 рестриктаз. Их название состоит из 3 букв: из названия микроорганизма (например, *Eco* от *Escherichia coli*), характеристики культуры (если необходимо) и номера (если содержится несколько рестриктаз), в итоге *EcoRI*.

Методы исследования продуктов расщепления рестриктазами. Часто молекула ДНК подвергается последовательному действию ряда рестриктаз. Так, кольцевая ДНК туморигенного вируса SV40 расщепляется в



Рисунок 12 — Гель-электрофорез фрагментов ДНК. Показана флуоресценция фрагментов, полученных при расщеплении разными рестриктазами, после окрашивания этидием бромидом (препарат Jeffrey Sklar)

1 месте *EcoRI*, в 4 местах *HpaI* и в 11 местах *HindIII*. Образующаяся смесь фрагментов может быть разделена и визуализована методом, который называется *фингерпринт* (отпечаток пальцев) ДНК. Разделение основано на том, что электрофоретическая подвижность фрагментов пропорциональна логарифму числа пар оснований. Метод позволяет разделить одинаковые фрагменты длиной 100 нуклеотидов и

отличающиеся по одному нуклеотиду. Наиболее эффективен двумерный электрофорез в пульсирующем электрическом поле (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE). Электрофореграммы окрашивают этидием бромидом, после чего выявляются флуоресцирующие полосы фрагментов ДНК в концентрации более 50 нг (рис. 12).

Саузерн-блоттинг. Рестрикционные фрагменты, содержащие специфические последовательности нуклеотидов, идентифицируют при гибридизации с меченой полинуклеотидной цепью ДНК с известной последовательностью нуклеотидов (рис. 13).

На рисунке 13 показаны четыре этапа. На первом этапе производятся электрофорез фрагментов ДНК и их денатурация (т. е. разделение цепей двойной спирали). На втором этапе разделённые цепи переносятся на плёнку из нитрата целлюлозы. На третьем этапе добавляют меченый ^{32}P -фрагмент ДНК-зонд с известной последовательностью нуклеотидов. Происходит гибридизация комплементарных участков разделённой ДНК и добавленной ДНК-зонда. На четвёртом этапе проводят ауторадиографию и находят положение меченого гибрида разделённой ДНК и меченого ДНК-зонда. Этот метод позволяет находить мутации и имеет медицинское значение в варианте RFLP (restriction-fragment-length polymorphism) для диагностики генетических заболеваний серповидноклеточной анемии, cystic fibrosis, хореи Гантингтона.

С помощью рестриктаз создают карты хромосом, включающие сотни миллионов пар оснований. После разрыва двух цепей ДНК



Рисунок 13 — Саузерн-блоттинг

могут возникать «липкие концы». Поэтому если обработать две молекулы ДНК одной и той же рестриктазой, можно затем сконструировать гибридную молекулу благодаря спариванию липких концов.

Секвенирование ДНК — это определение нуклеотидной последовательности полинуклеотидных цепей. Без знания нуклеотидной последовательности генов невозможно осуществлять молекулярное клонирование. Для секвенирования используют несколько методов.

1. Дидезоксинуклеотидный метод, разработанный Ф. Сэнджером. Дидезоксинуклеотид — это полученный искусственным путём нуклеотид, лишённый 2'- и 3'-гидроксильных групп при углеродных атомах сахара. У дезоксирибонуклеотидов, входящих в ДНК, отсутствует только 2'-гидроксильная группа (дезоксирибоза). Как известно, удлинение цепи во время репликации ДНК происходит в результате присоединения очередного нуклеозидтрифосфата к 3'-гидроксильной группе дезоксирибозы последнего нуклеотида растущей цепи. Если же присоединяемым нуклеотидом является дидезоксинуклеотид, то синтез ДНК останавливается, поскольку следующий нуклеотид не может образовать фосфодиэфирную связь. *Остановка синтеза ДНК — ключевой этап дидезоксиметода.* Для секвенирования в разных пробирках одновременно проводят четыре реакции синтеза ДНК, каждая — в присутствии одного из четырёх дидезоксинуклеотидов (ддАТФ, ддГТФ, ддЦТФ и ддТТФ). Продукты реакций разделяют с помощью гель-электрофореза, проводят радиоавтографию и «считывают» с радиоавтографа нуклеотидную последовательность синтезированного фрагмента ДНК. Таким методом была впер-

вые описана последовательность нуклеотидов в двойной спирали кольцевой ДНК митохондрий человека — 16 569 пар оснований.

2. Для секвенирования более длинных генов используют систему на основе фага M13. В ДНК фага встраивают фрагмент ДНК длиной до 500 нуклеотидов, который хотят секвенировать. Эту рекомбинантную ДНК легко получить в одноцепочечной форме и использовать её в качестве матрицы для секвенирования вставки. Можно использовать также двухцепочечные плазмиды, содержащие клонированную ДНК.

3. Для определения нуклеотидной последовательности протяжённых клонированных сегментов сначала подбирают синтетический олигонуклеотидный праймер, комплементарный участку, расположенному рядом со вставкой. Затем с помощью дидезоксиметода секвенируют первые 250–300 нуклеотидов. Затем по результатам секвенирования синтезируют второй праймер и определяют последовательность следующих 250–350 нуклеотидов клонированного участка и т. д. Этот метод, называемый «праймер-опосредованной прогулкой» (или «блуждающей затравкой»), позволяет секвенировать протяжённые фрагменты ДНК без их субклонирования, как в случае системы на основе фага M13.

Единица измерения 1 kb — это 1000 пар оснований двойной спирали ДНК или 1000 оснований одиночной полинуклеотидной цепи. 1 kb двойной спирали ДНК имеет длину 0,34 мкм и массу около 650 кДа.

В таблице 4 представлен прогресс в секвенировании генов.

Таблица 4 — Историческая справка о секвенировании ДНК генов (S. V. Primrose, R. M. Twyman, 2003)

Секвенированный ген	Год	Размер гена	Комментарий
Бактериофаг фх174	1977	5,38 kb	Первый ген
Плаزمида pBR322	1979	4,30 kb	Первая плазмида
Дрожжевая хромосома III	1992	315 kb	Первая хромосома
<i>Haemophilus influenzae</i>	1995	1,8 Mb	Первый геном организма-клетки
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1996	12 Mb	Первый геном клетки-эукариота
<i>Ceanorhabditis elegans</i>	1998	97 Mb	Первый геном многоклеточного организма
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2000	125 Mb	Первый геном растения
<i>Homo sapiens</i>	2001	3000 Mb	Первый геном млекопитающего
Мышь (<i>Mus musculus</i>)	2002/3	2700 Mb	Генетическая модель человека

Хімічны синтез ДНК используют для получения:

1) одноцепочечных цепей дезоксирибонуклеотидов (олигонуклеотиды) и 2) двухцепочечных цепей ДНК (синтез генов).

Синтез олигонуклеотидов длиной около 50 нуклеотидов осуществляется с помощью ДНК-синтезаторов с использованием фосфорамидитного метода. В отличие от биологического синтеза ДНК (присоединение каждого последующего нуклеотида по 3'-ОН группе дезоксирибозы) в химическом синтезе каждый новый нуклеотид присоединяется к 5'-ОН группе, т. е. 5'-концу олигонуклеотида. Синтезированные олигонуклеотиды используются:

- для конструирования фрагментов или целых генов;
- для амплификации (усиление синтеза) специфических фрагментов ДНК;
- для направленных мутаций изолированных ДНК;
- в качестве зондов при гибридизации (нуклеотидную последовательность зондов длиной 20–40 звеньев находят из данных об аминокислотной последовательности соответствующих белков и затем синтезируют с помощью обратной транскриптазы);
- в качестве линкеров, облегчающих клонирование (линкер — синтетический олигонуклеотид, содержащий сайт рестрикции; используется для соединения векторной и клонируемой ДНК, к концам которой по методу сшивания тупых концов присоединены линкеры);
- олигонуклеотиды длиной 17–24 звеньев, которые служат праймерами при секвенировании ДНК и проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Синтез генов из химически синтезированных отдельных комплементарных цепей олигонуклеотидов: как правило, синтетические двухцепочечные гены собирают из модулей — одноцепочечных фрагментов длиной от 20 до 60 нуклеотидов с перекрывающимися концами. Нуклеотидные последовательности цепей задают так, чтобы после отжига (образование комплементарных двухцепочечных фрагментов) концевые сегменты гена имели тупые концы. Каждый внутренний сегмент имеет выступающие 3'- и 5'-концы, комплементарные таковым соседнего сегмента. После сборки гена остаётся сшить одноцепочечные разрывы с помощью ДНК-лигазы T4. Синтетические

гены могут быть сконструированы так, чтобы, помимо белок-кодирующих последовательностей, они содержали концевые участки, обеспечивающие:

- встраивание в клонирующий вектор (сайты для рестриктаз);
- сигнальные последовательности для правильной инициации и терминации транскрипции и трансляции.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — это эффективный способ получения *in vitro* большого числа копий специфических нуклеотидных последовательностей (Kary Mullis; США, патент 4683202). Их амплификация (иногда в миллионы раз) осуществляется в ходе трёхэтапного циклического процесса. Для ПЦР необходимы:

- два синтетических олигонуклеотидных праймера (длиной примерно по 20 нуклеотидов), комплементарные участкам ДНК из противоположных цепей, фланкирующим (ограничивающим) отрезок последовательности-мишени; 3'-гидроксильные группы праймеров после отжига с ДНК должны быть ориентированы навстречу друг другу (таким образом, отмечаются начальный и конечный участки нужного фрагмента на ДНК-матрице);
- ДНК-мишень длиной от 100 до 35 000 п. н.;
- термостабильная ДНК-полимераза *Taq*, выделенная из бактерий *Thermus aquaticus*, которая не теряет своей активности при температуре 95 °С и выше;
- четыре дезоксирибонуклеотида;
- буфер, содержащий ионы магния.

Этапы ПЦР (рис. 14):

1. **Денатурация (плавление)**. Для денатурации ДНК (расхождение цепей) её выдерживают до 1 мин при 95 °С. Помимо ДНК, в реакционной смеси содержатся в избытке два праймера, термостабильная ДНК-полимераза и четыре типа дезоксирибонуклеотидов.

2. **Ренатурация (отжиг)**. Температуру смеси медленно понижают до 55 °С, при этом праймеры спариваются с комплементарными последовательностями ДНК.

3. **Синтез (элонгация)**. Температуру повышают до 75 °С, т. е. температурного оптимума для ДНК-полимеразы *Taq*. Начинается синтез комплементарной цепи ДНК, иницируемой 3'-гидроксильной группой праймера. Все реакции проводятся в регулируемом термостате

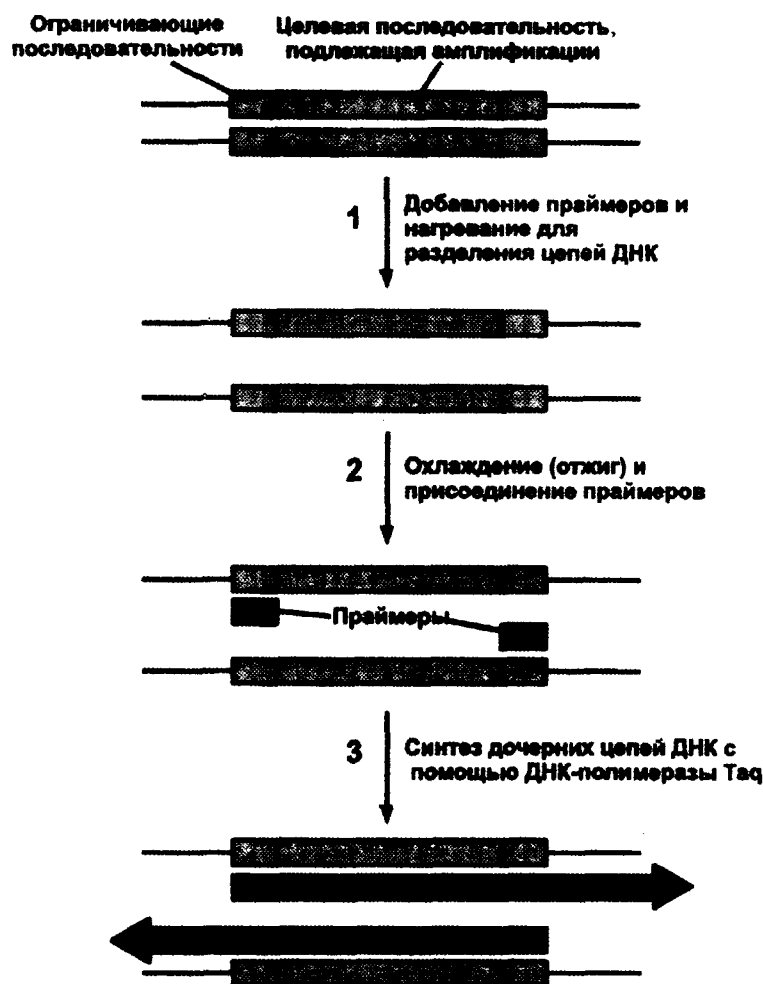


Рисунок 14 — Первый цикл ПЦР

с повторением циклов, продолжительностью 3–5 мин. Эти циклы повторяют до 30 раз.

Применение метода ПЦР:

1. *Идентификация патогенных микроорганизмов и вирусов, возбудителей заболеваний человека, животных и растений.* Для синтеза праймеров, специфичных в отношении исключительно ДНК-мишени, необходимо знать нуклеотидную последовательность ДНК предполагаемого патогенного микроорганизма. В этом случае в ходе ПЦР будет амплифицироваться только фрагмент ДНК, длина которого равна суммарной длине двух праймеров и фрагмента ДНК между ними.

2. *Получение кДНК* (ДНК, комплементарные информационной РНК, мРНК). Метод называют RACE (rapid amplification of cDNA ends). Обычно получают кДНК, комплементарные 3'- и 5'- концам мРНК (3'RACE и 5'RACE). В случае 3'RACE праймером для

синтеза первой цепи кДНК является олиго(дТ) с присоединённым к нему вторым праймером (Р). Олиго(дТ) спаривается с поли(А)-хвостом мРНК (3'-конец молекулы). С помощью обратной транскриптазы на матрице мРНК синтезируется цепь кДНК. На матрице синтезированной цепи кДНК синтезируется вторая цепь и затем в последовательных циклах ПЦР с введением «внутренних праймеров» накапливаются значимые количества кДНК, комплементарной 3'-концу мРНК.

3. *Синтез генов с помощью ПЦР.*

4. *Выделение делеций или вставок в генах, ответственных за то или иное наследственное заболевание.* Например, определение мутаций с помощью аллельспецифических проб производится следующим образом. Синтезируются 2 коротких ³²P-олигонуклеотидов, один из которых содержит ДНК-последовательность, включающую мутацию, а другой не изменён. С помощью этих аллельспецифичных

проб ДНК пациентов проверяют на носительство исследуемой мутации. Для этого область гена, содержащую интересующий участок, амплифицируют с помощью ПЦР. Образцы наносят на узкие полоски нитрата целлюлозы и обрабатывают мечеными олигонуклеотидами, содержащими нормальную или мутантную последовательность. Радиоавтографически оценивают, с какой из проб преимущественно связывается ДНК пациента.

5. *Исследование индивидуального паттерна (спектра, соотношения) генов при диагностике и контроле лечения опухолевых заболеваний и отборе тканей (органов) для трансплантации.*

8. ДНК как носитель генов

Ген — единица наследственности, представляющая собой часть молекулы ДНК, кодирующей последовательность аминокислот одной полипептидной цепи.

Экспрессией гена называют синтез белка или РНК по программе гена. Большинство генов относят к «стандартным» кодирующим белки или функциональные РНК.

Полное секвенирование показало, что человеческий геном содержит 20–25 тысяч активных генов, экзоны которых составляют только 1,5 % всего генетического материала. Остальная часть является некодирующей ДНК, которую часто называют «мусорной ДНК».

В результате дубликации гена в процессе эволюции возможны множественные копии одного и того же гена для более быстрого синтеза белка. Альтернативный сплайсинг также позволяет увеличить количество родственных белков, синтезируемых по программе гена. Основные регуляторы работы генома — это промоторные и энхансерные участки ДНК. Промотор представляет собой последовательность нуклеотидов, которая даёт старт транскрипции — первого этапа работы гена, когда на участке ДНК по принципу комплементарности синтезируется матричная РНК. Особенности строения ДНК промотора играют регулируемую роль в работе ключевого фермента транскрипции — ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Энхансер — это умножитель работы гена. Он является последовательностью нуклеотидов, которая может располагаться в разных участках хромосом. Энхансер,

действуя через определённые белки, способен в несколько раз увеличить транскрипцию того или иного гена. К настоящему времени в рамках Международной программы «Fantom» в 180 типах клеток человека идентифицировано более 180 тысяч промоторов и 44 тысячи энхансеров.

К некодирующим отделам генома человека относят свыше 80 % его ДНК. Известны псевдогены, не способные к экспрессии или кодирующие синтез нефункциональных белков. Более трети человеческого генома занимают два класса «мусорной» ДНК — длинные и короткие рассеянные (диспергированные) повторы. Длинные диспергированные повторы (у человека повтор LINE1, занимающий 17 % длины генома) интересны тем, что при их анализе были найдены *две открытые рамки считывания*. Были выделены соответствующие белки. Оказалось, что оба белка обладают свойствами, необходимыми для ретропозиции (копирования и расселения повтора по геному). С длинного повтора с помощью этих белков считывается РНК, которая затем обратно транскрибируется. ДНК-копия повтора встраивается в геном в новом месте. Транспозоны (прыгающие гены) способны изменять своё место расположения в хромосоме. Говоря о генах, следует заметить, что в составе ДНК существуют также повторяющиеся тысячи раз и состоящие из нескольких сотен оснований Alu-последовательности. Имеется ещё один вид повторяющихся последовательностей ДНК — сателлитная ДНК (короткие тандемно повторяющиеся последовательности оснований). Эти последовательности образуют более лёгкую фракцию, сопровождающую основную фракцию ДНК при градиентном ультрацентрифугировании. У мыши эта фракция имеет плотность, равную 1,691 г/мл, а основная часть ДНК — 1,700 г/мл. Эти различия плотности связаны с нуклеотидным составом фракций ДНК. Например, у мыши в этой фракции имеется 35 % Г и Ц пар, а в основном пике ДНК — 42 %. Отсюда и название — сателлитная ДНК. Повторы нуклеотидных последовательностей используются как объективный критерий для установления родственных связей.

Если сравнить данные, полученные при анализе генома дрожжей и анализе генома человека, то становится очевидным, что доля кодирующих участков в расчёте на весь геном в

ходе эволюции резко уменьшается — у дрожжей она очень высока, у человека — очень мала. Следовательно, эволюция эукариот от низших форм к высшим сопряжена с «разбавлением» генома, поскольку на единицу длины ДНК приходится всё меньше информации о структуре белков и РНК.

В последние годы показано, что некодирующая белок ДНК используется как матрица для синтеза различных видов РНК (тРНК, рРНК, микроРНК, малые ядерные РНК, малые ядрышковые РНК и др.). Все эти РНК участвуют в регуляции экспрессии генов и других важных процессах жизнедеятельности клеток и многоклеточных организмов.

Рассматривая разнообразие геномов, следует учитывать следующее:

1. Чёткая корреляция между размером генома и генетической сложностью отсутствует.

2. Минимальный размер генома возрастает пропорционально увеличению сложности организма.

3. Размеры геномов могут сильно варьировать даже в пределах одного таксона.

4. Общее количество ДНК в гаплоидном гене является характерной чертой каждого вида и называется *величиной С*.

5. *Величина С* колеблется в широких пределах от менее чем 10^6 п. н. микоплазмы до свыше 10^{11} п. н. некоторых растений и амфибий.

В настоящее время выделяют следующие уровни реализации генетической информации:

1. *Геном* — совокупность наследственного материала (ДНК), заключённого в гаплоидном наборе хромосом клеток данного вида организмов. Геном человека содержит от 20 000 до 25 000 генов.

2. *Транскриптом* — совокупность всех транскриптов (РНК), синтезируемых одной клеткой, группой клеток или организмом, включая мРНК и некодирующие РНК. От 60 до 94 % генов человека могут экспрессироваться по механизму альтернативного сплайсинга.

3. *Протеом* — термин для обозначения совокупности белков (протеинов) организма. Протеом человека представлен 50 000–60 000 различных полипептидных цепей.

4. *Метаболом* — представляет собой полный набор низкомолекулярных метаболитов (таких как промежуточные продукты обмена веществ, гормоны и другие сигнальные мо-

лекулы и вторичные метаболиты), которые могут быть найдены как в биологическом образце, так и в единичном организме.

Выводы

Отличиями в строении ДНК и РНК являются: в ДНК — углевод дезоксирибоза, в РНК — рибоза; в ДНК содержится тимин, в РНК — урацил. Нуклеозид состоит из азотистого основания и углеводного компонента. Нуклеозиды являются не заряженными молекулами, поэтому могут вводиться в организм парентеральным путём. Нуклеотиды — это низкомолекулярные вещества, которые выполняют функции биорегуляторов (НАД, НАДФ, ФМН, ФАД, АТФ, АДФ, АМФ и др.), либо входят в состав полимерных молекул ДНК и РНК (пуриновые и пиримидиновые рибо- и дезоксирибонуклеотиды). Функция ДНК состоит в хранении генетической информации, РНК — в передаче наследственной информации. Направление биохимии и молекулярной биологии, исследующее структуру и функцию нуклеотидных последовательностей геномов живых организмов, изучает современная отрасль науки — геномика. Различают следующие основные виды ДНК: 1) ядерные (хромосомные) ДНК; 2) ДНК плазмид; 3) ДНК хлоропластов; 4) ДНК митохондрий; 5) ДНК вирусов. При физиологических условиях доминирующей вторичной структурой ДНК является В-форма. А-форма встречается в двухцепочечной РНК и гибридах ДНК-РНК. В последние годы активно исследуется явление сверхспирализации ДНК, когда ось двойной спирали молекулы закручивается в спираль более высокого уровня — третичная структура ДНК. В образовании многонитевых структур ДНК (триплексы и квадруплексы) важную роль играют водородные связи между азотистыми основаниями нуклеотидов двух типов — классические Уотсон-Криковские и Хугстиновские взаимодействия. В каждой хромосоме находится одна молекула ДНК. Межнуклеосомный разрыв ДНК — способ запрограммированной гибели клеток — апоптоз. По классическим представлениям, РНК является одиночной полинуклеотидной цепью, построенной из четырёх основных типов рибонуклеотидов — АМФ, ГМФ, ЦМФ и УМФ. Для РНК характерны минорные нуклеотиды с необычными азотистыми основаниями — дигидроурацил, 3-метилурацил,

1-метилгуанин и др. (до 50 типов). Кодовым элементом мРНК является триплет нуклеотидов (кодон), кодирующий аминокислоту. Увеличение разнообразия белков, кодируемых близкими генами у эукариот по мере усложнения организмов, связано с ростом доли молекул пре-мРНК, подвергающихся альтернативному сплайсингу. Транспортные РНК, соединённые с аминокислотами, называют аминоацил-тРНК (аатРНК). Они выполняют адаптерную функцию при переводе трёхбуквенного кода нуклеиновых кислот в 20-буквенную последовательность аминокислот в полипептидной цепи (всего 61 аминоацил-тРНК). Рибосомы обеспечивают специфический контакт мРНК и тРНК, в результате которого и происходит трансляция нуклеотидной последовательности, считанной с определённого гена в аминокислотную последовательность соответствующего белка. МикроРНК участвуют в подавлении активности генов: 1) путём комплементарного спаривания с участками мРНК и ингибирования трансля-

ции; 2) посредством быстрой деградации комплексов микроРНК с мРНК; 3) через прямое взаимодействие микроРНК с ДНК в процессе РНК-зависимого метилирования ДНК (например, в области промоторов генов). Единица измерения 1 kb — это 1000 пар оснований двойной спирали ДНК или 1000 оснований одиночной полинуклеотидной цепи; 1 kb двойной спирали ДНК имеет длину 0,34 мкм и массу около 660 кДа. Экспрессией гена называют синтез белка или РНК по программе гена. Большинство генов относят к «стандартным» кодирующим белки или функциональные РНК. Быстрый прогресс молекулярной биотехнологии основан на использовании основных пяти биохимических технологий: 1) рестрикционный анализ ДНК; 2) саузерн- и нозерн-блоттинг-технологии; 3) секвенирование ДНК; 4) синтез нуклеиновых кислот; 5) полимеразная цепная реакция (ПЦР). Все эти технологии требуют шестого компонента, а именно — мощного компьютерного обеспечения (биоинформатика).

Задачи, примеры решения и вопросы

Примеры решения задач (по А. Ленинджеру).

1. В препаратах ДНК, выделенных из двух видов бактерий, содержание аденина (А) составляет соответственно 32 % и 17 % общего содержания оснований. Какие относительные количества гуанина (Г), тимина (Т) и цитозина (Ц) можно найти в этих двух препаратах ДНК? Известно, что одна из этих бактерий была выделена из горячего источника (64 °С). Какая из ДНК принадлежит термофильной бактерии?

Решение. Одна ДНК содержит 32 % А, 32 % Т, 18 % Г и 18 % Ц; другая — 17 % А, 17 % Т, 33 % Г и 33 % Ц. Обе молекулы двухцепочечные. ДНК, содержащая 33 % Г и 33 % Ц, должна принадлежать термофильной бактерии, поскольку она более устойчива к нагреванию из-за более высокого содержания пар Г-Ц, соединённых тремя водородными связями и являющихся более прочными, чем пары А-Т, имеющие 2 водородные связи.

2. Рассчитайте количество генов, длину и массу усреднённого гена, кодирующих полипептидные цепи, содержащие по 350 остатков аминокислот при наличии в ДНК идеализированной бактерии 4 млн пар нуклеотидов.

Решение. Согласно генетическому коду положение каждой аминокислоты в полипептидной цепи кодируется тремя нуклеотидами, поэтому усреднённой полипептиду, состоящему из 350 аминокислотных остатков, будет соответствовать ген, включающий в среднем 1050 нуклеотидных пар, а в геноме такой бактерии может содержаться $(4000000:1050) \approx 3810$ генов. Тот факт, что пары оснований в двойной спирали ДНК расположены на расстоянии 0,34 нм друг от друга, позволяет рассчитать длину гена среднего полипептида: $0,34 \cdot 1050 = 357$ нм $\approx 0,36$ мкм. Поскольку молекулярная масса одной нуклеотидной пары составляет в среднем 650 Да, молекулярная масса среднего гена бактерии будет равна: $650 \cdot 1050 \approx 680000$ Да. Самостоятельно ответьте на вопрос: что тяжелее ген или кодируемый им белок и примерно во сколько раз?

3. Сравните длину ДНК в одной нуклеосоме с диаметром нуклеосомы, который равен 10–11 нм. Затем сравните длину всей ДНК в клетке человека с диаметром клеточного ядра — около 2 мкм. В какой из структур ДНК уложена более компактно?

Решение. Отношение длины ДНК к диаметру составляет 5,0 для нуклеосомы и

10^5 для ядра. В ядре ДНК уложена гораздо более компактно.

4. Используя уравнение $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, опишите возможную термодинамику структурных превращений молекулы ДНК при повышении температуры.

Решение. При температуре точки плавления двойная спираль ДНК превращается в две одиночные цепи, при понижении температуры вновь образуется двойная спираль. При низкой температуре величина ΔG положительная, поскольку энтропия низкая из-за более высокой структурной организации двойной спирали, имеющей лимит конформаций по сравнению с одиночными полинуклеотидными цепями. Поскольку $T\Delta S$ будет меньше ΔH , $\Delta G > 0$, и двойная спираль будет устойчивой. При повышении температуры величина $T\Delta S$ будет возрастать и превысит величину ΔH , в результате величина ΔG будет отрицательной и двойная спираль станет неустойчивой вплоть до разделения полинуклеотидных цепей.

5. Фрагмент молекулы ДНК состоит из 1000 нуклеотидов, при этом количество тимидиловых нуклеотидов в два раза больше гуа-

ниловых нуклеотидов. Сколько нуклеотидов А, Т, Г и Ц содержится в данном фрагменте ДНК?

6. Фрагмент цепи ДНК имеет последовательность ТАГАТГГЦТ. Определите нуклеотидную последовательность второй цепи и подсчитайте общее количество водородных связей, которые образуются между двумя цепями.

7. Определите число А, Т, Г и Ц нуклеотидов в двухцепочечном фрагменте ДНК, если известно, что 15 из них соединены между собой двумя водородными связями, а 35 — тремя.

8. Общее количество нуклеотидов в соматических клетках женщины равно $12,0 \cdot 10^9$. Рассчитайте суммарную длину всех молекул ДНК соматической клетки и яйцеклетки.

9. Используя рисунок 1, дайте химические названия приведённым азотистым основаниям. Используя таблицу 1, назовите нуклеозидтрифосфаты, которые являются исходным материалом для построения молекул РНК и ДНК.

Список использованных источников

1. Аветисов, В. А. Фрактальная глобула как молекулярная машина / В. А. Аветисов, В. А. Иванов, Д. А. Мешков, С. К. Нечаев // Письма в ЖЭТФ. — 2013. — Т. 98. — Вып. 4. — С. 270–274.
2. Биоорганическая химия / Н. А. Тюкавкина, Ю. И. Бауков, С. Э. Зурабян. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. — 416 с.
3. Биохимия. Учебное руководство / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко. — М. : Мед. лит., 2010. — 624 с.
4. Носова, Е. В. Урок-эксперимент «удивительная молекула ДНК» / Е. В. Носова // Биология в школе. — 2016. — № 3. — С. 41–46.
5. Ленинджер, А. Основы биохимии: в 3 т. / А. Ленинджер; пер. с англ. — М. : Мир, 1985. — 1056 с.
6. Тарантул, В. З. Геном человека: Энциклопедия, написанная четырьмя буквами / В. З. Тарантул. — www.razym.ru.
7. Biochemistry. Concepts and connections / D. R. Appling, S. J. Anthony-Cahill, C. K. Mathews. — Pearson, 2015. — 912 p.
8. Biochemistry / J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer. — N-Y. : W. H. Freeman and Company, 2002. — 1514 p.
9. Lehninger principles of biochemistry / D. L. Nelson, M. M. Cox. — N-Y. : Worth Publishers, 2000. — 1152 p.