17. Первичная структура нуклеиновых кислот

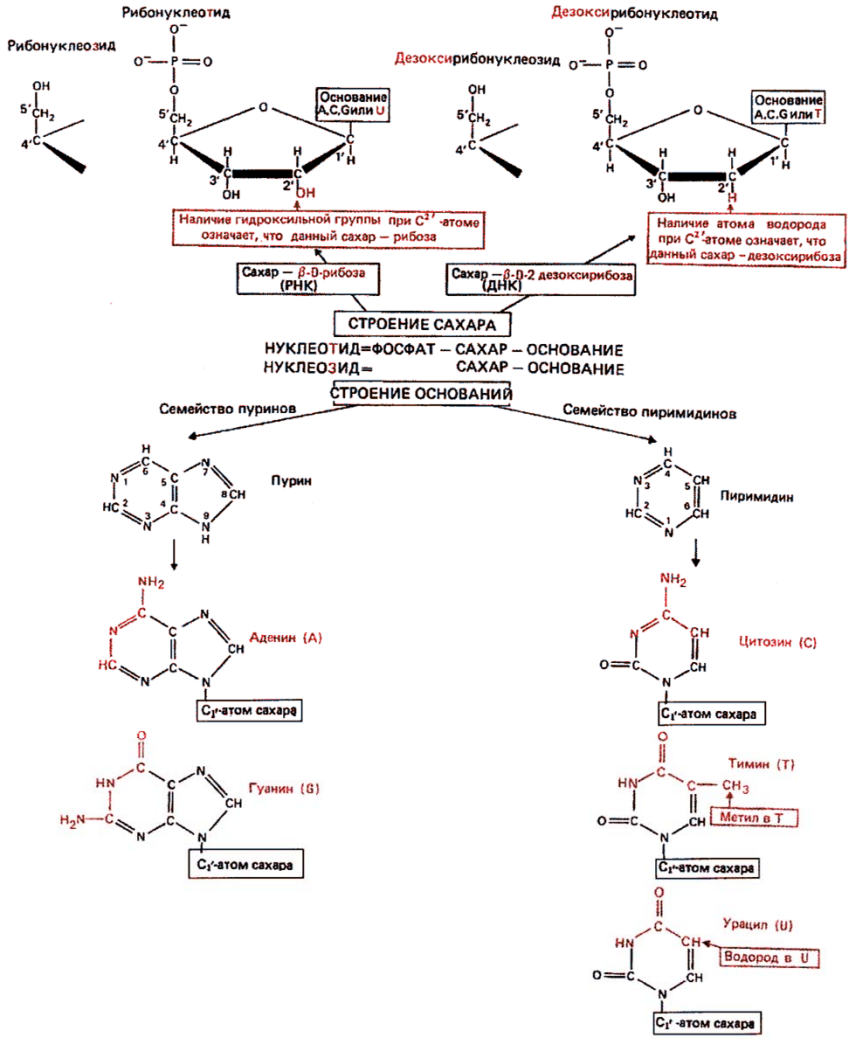
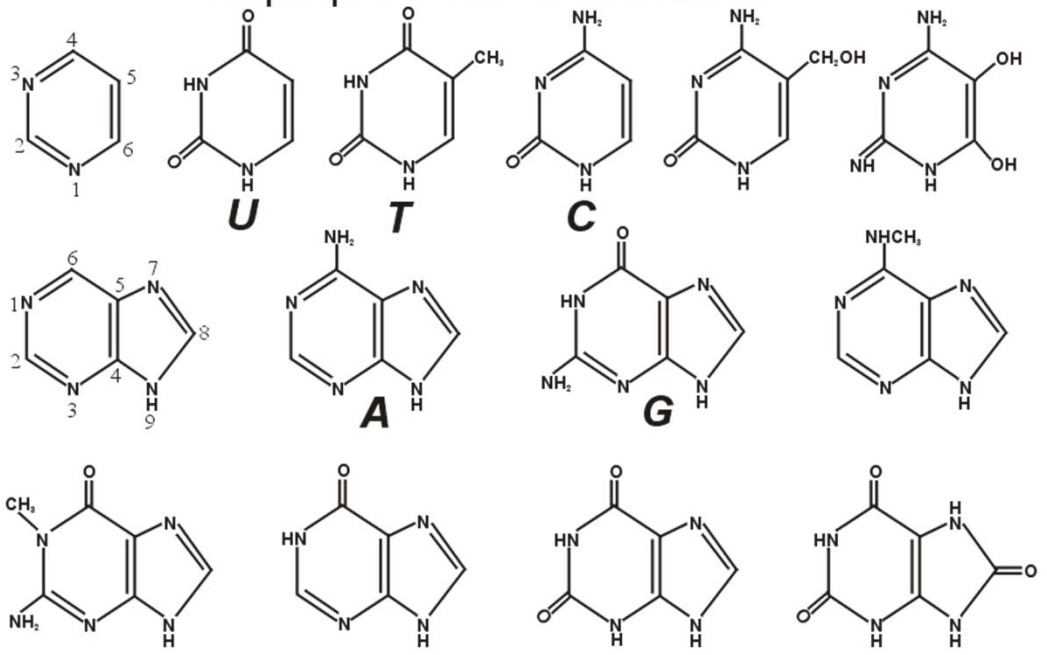
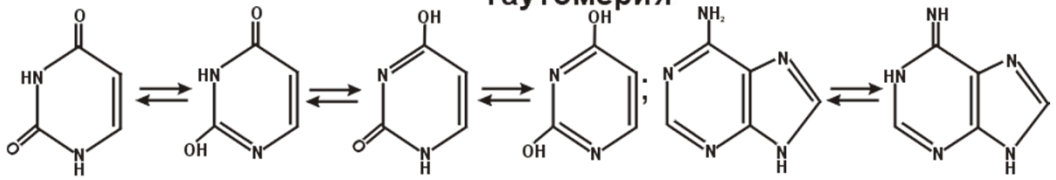


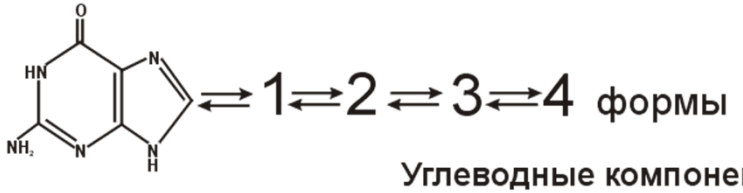
Рис. 17.1

Гетероциклические основания

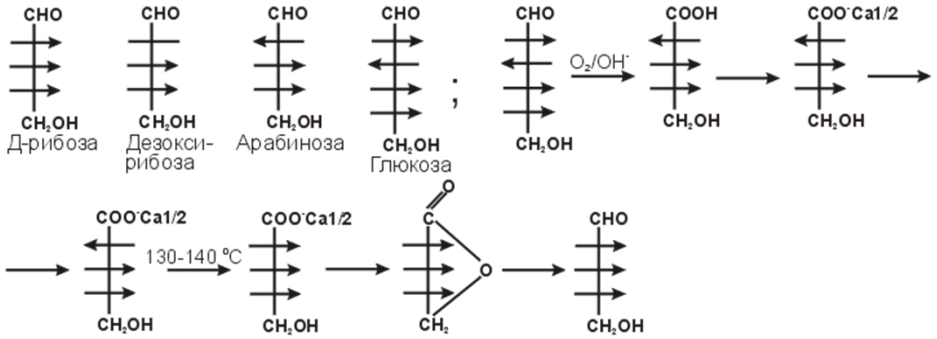


Таутомерия

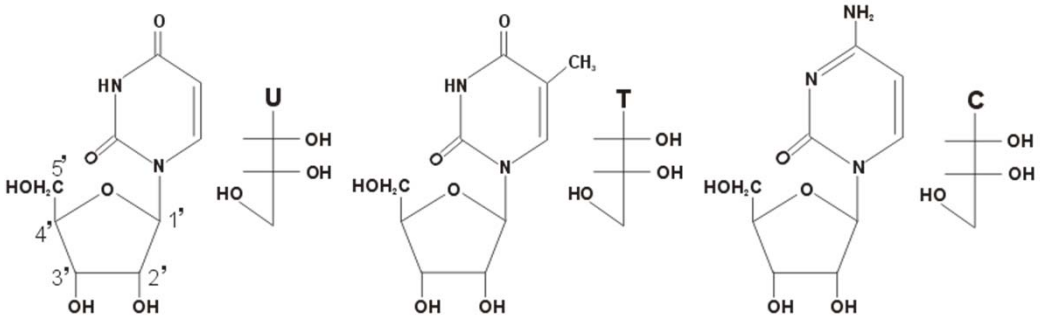


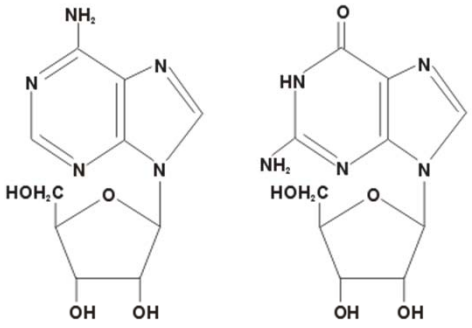


Углеводные компоненты



Нуклеозиды

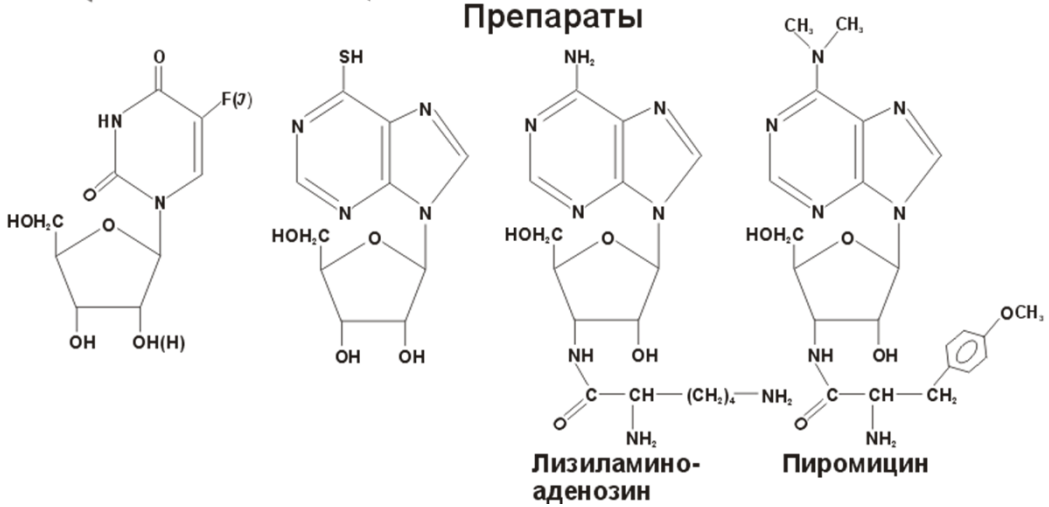


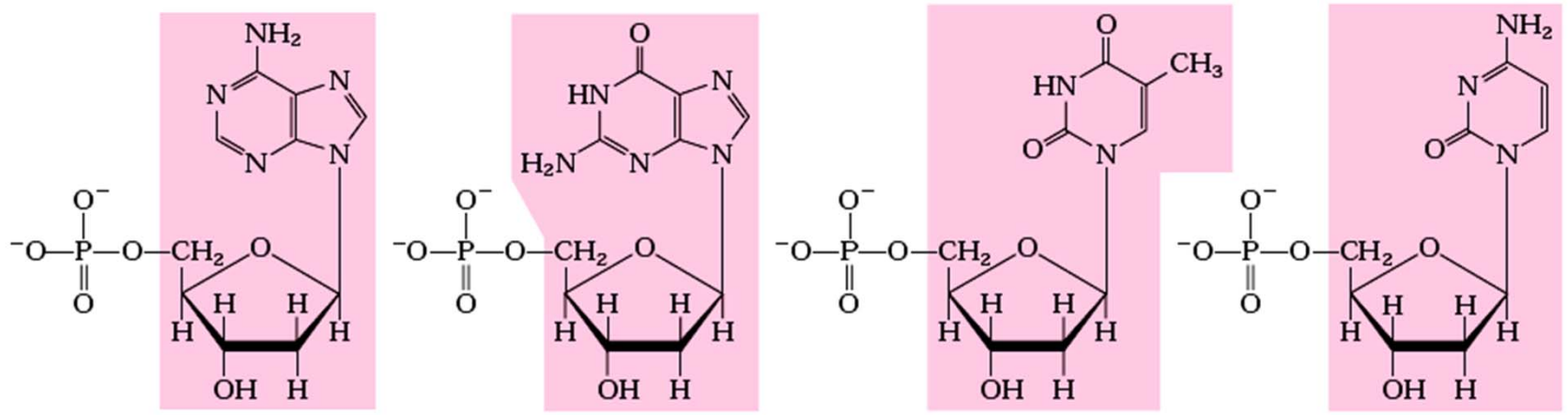


Основание	Нуклеозид
урацил	уридин
тимин	риботимидин
цитозин	цитидин
аденин	аденозин
гуанин	гуанозин
гипотаксантин	инозин

для ДНК дезокси - … но тимидин

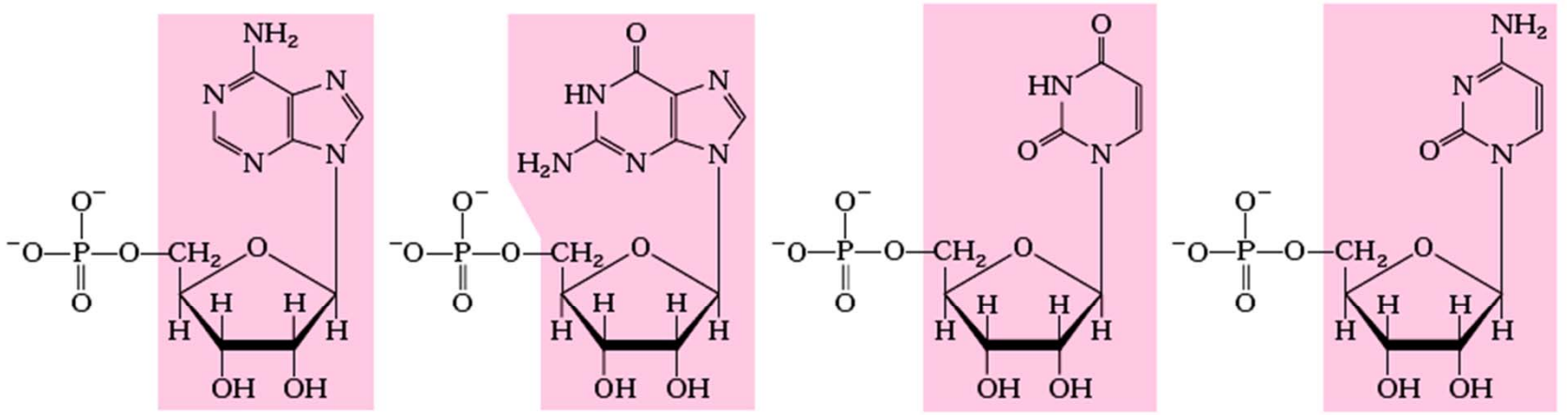
Препараты





Nucleotide:	Deoxyadenylate (deoxyadenosine 5′-monophosphate)	Deoxyguanylate (deoxyguanosine 5′-monophosphate)	Deoxythymidylate (deoxythymidine 5′-monophosphate)	Deoxycytidylate (deoxycytidine 5′-monophosphate)
Symbols:	A, dA, dAMP	G, dG, dGMP	T, dT, dTMP	C, dC, dCMP
Nucleoside:	Deoxyadenosine	Deoxyguanosine	Deoxythymidine	Deoxycytidine

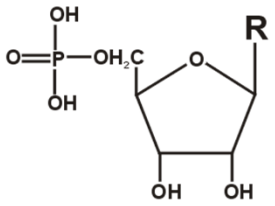
(a) Deoxyribonucleotides

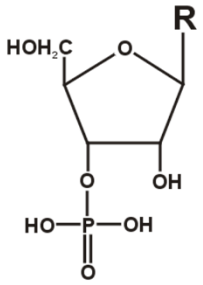


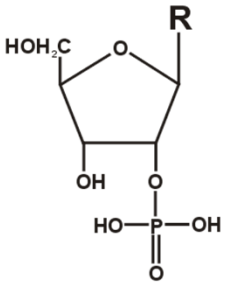
Nucleotide:	Adenylate (adenosine 5′-monophosphate)	Guanylate (guanosine 5′-monophosphate)	Uridylate (uridine 5′-monophosphate)	Cytidylate (cytidine 5′-monophosphate)
Symbols:	A, AMP	G, GMP	U, UMP	C, CMP
Nucleoside:	Adenosine	Guanosine	Uridine	Cytidine

(b) Ribonucleotides

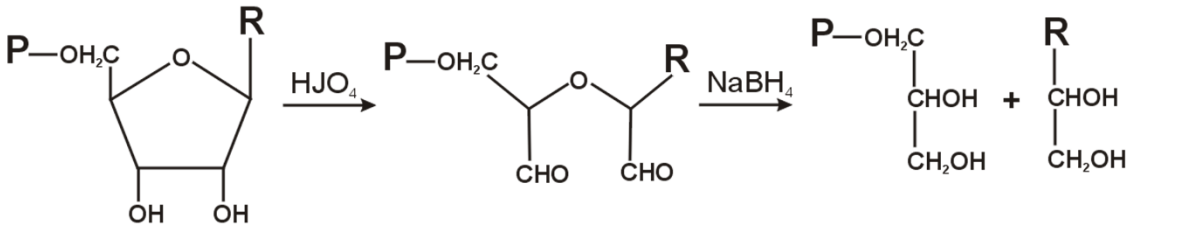
Нуклеотиды

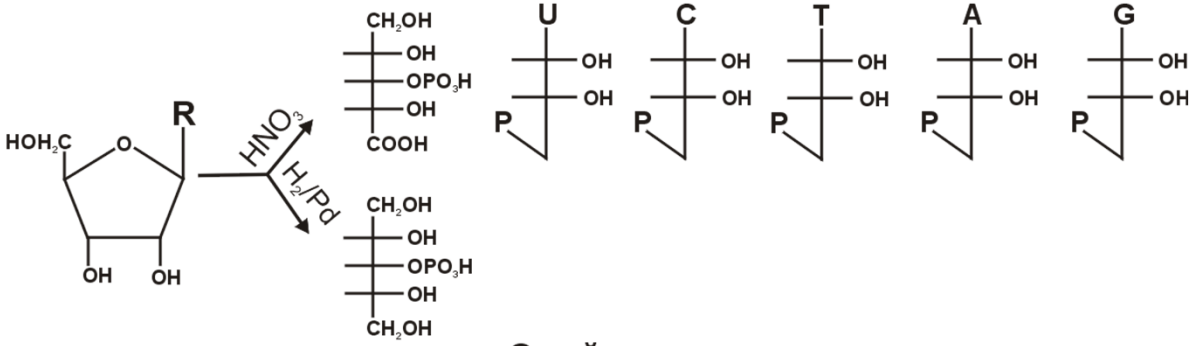




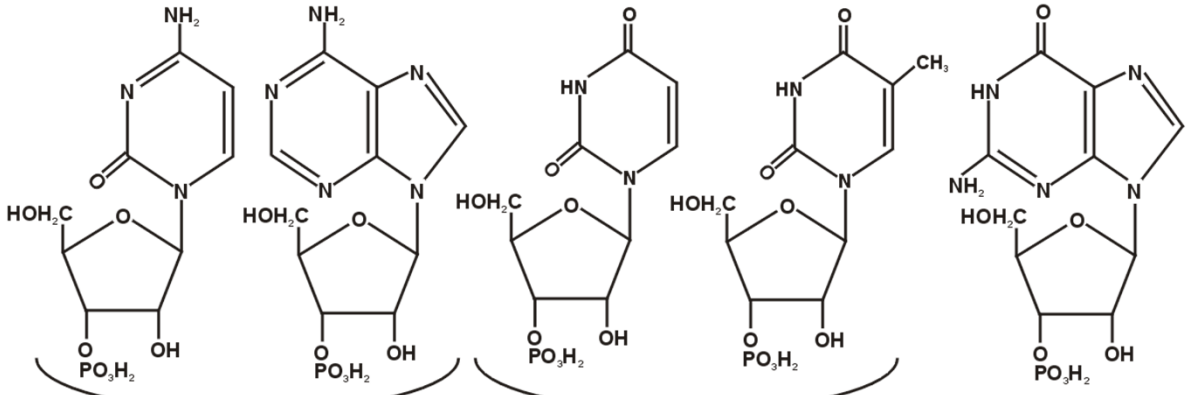


Строение

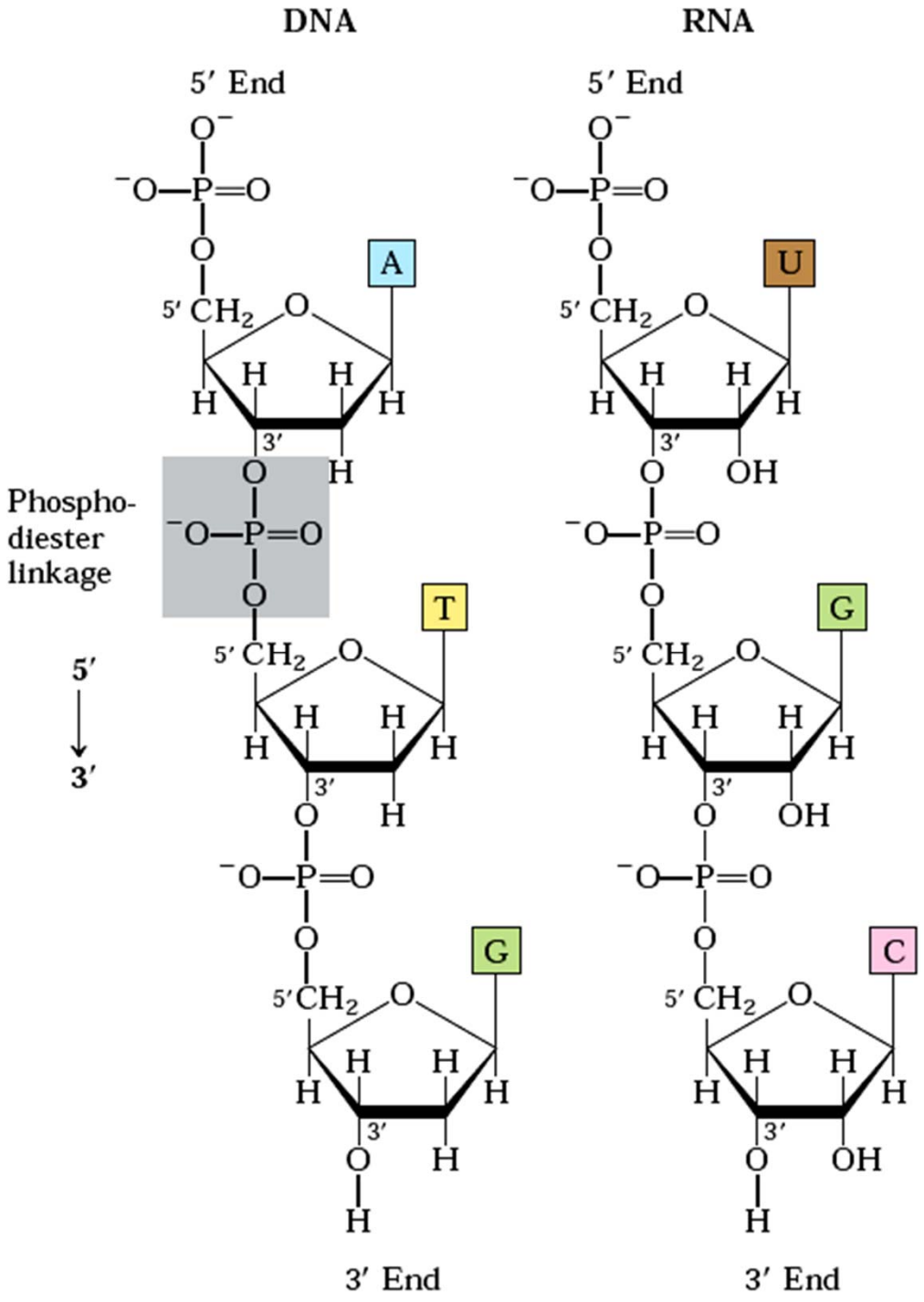




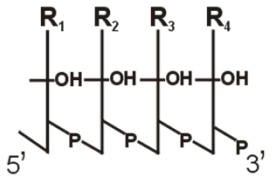
Свойства



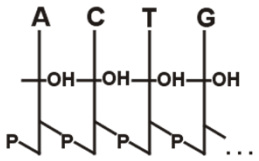
основные кислотные кислотные


DNA
RNA
5′ End
5′ End
A
U
Phospho-
diester
linkage
T
G
5′
3′
G
C
3′ End
3′ End

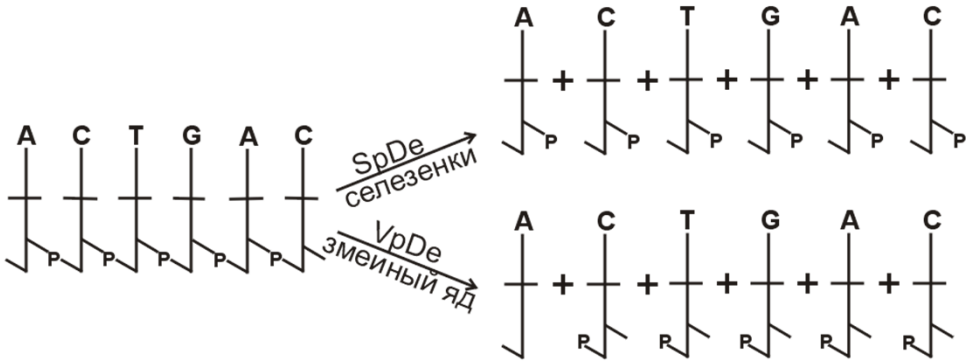
Полинуклеотиды



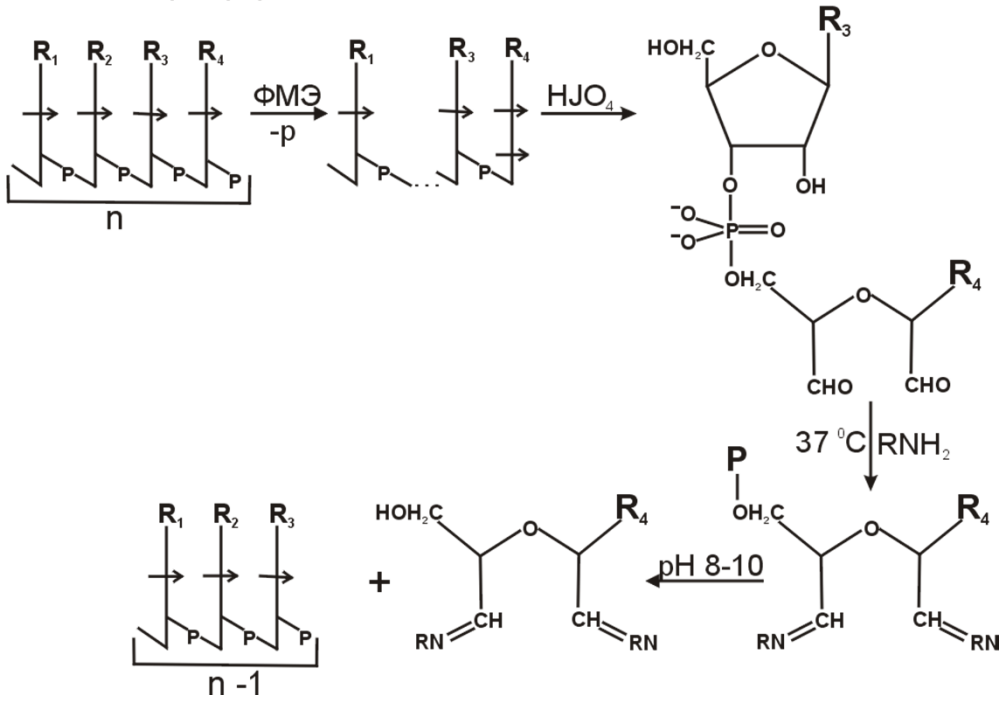
$pR_1R_2R_3R_4$

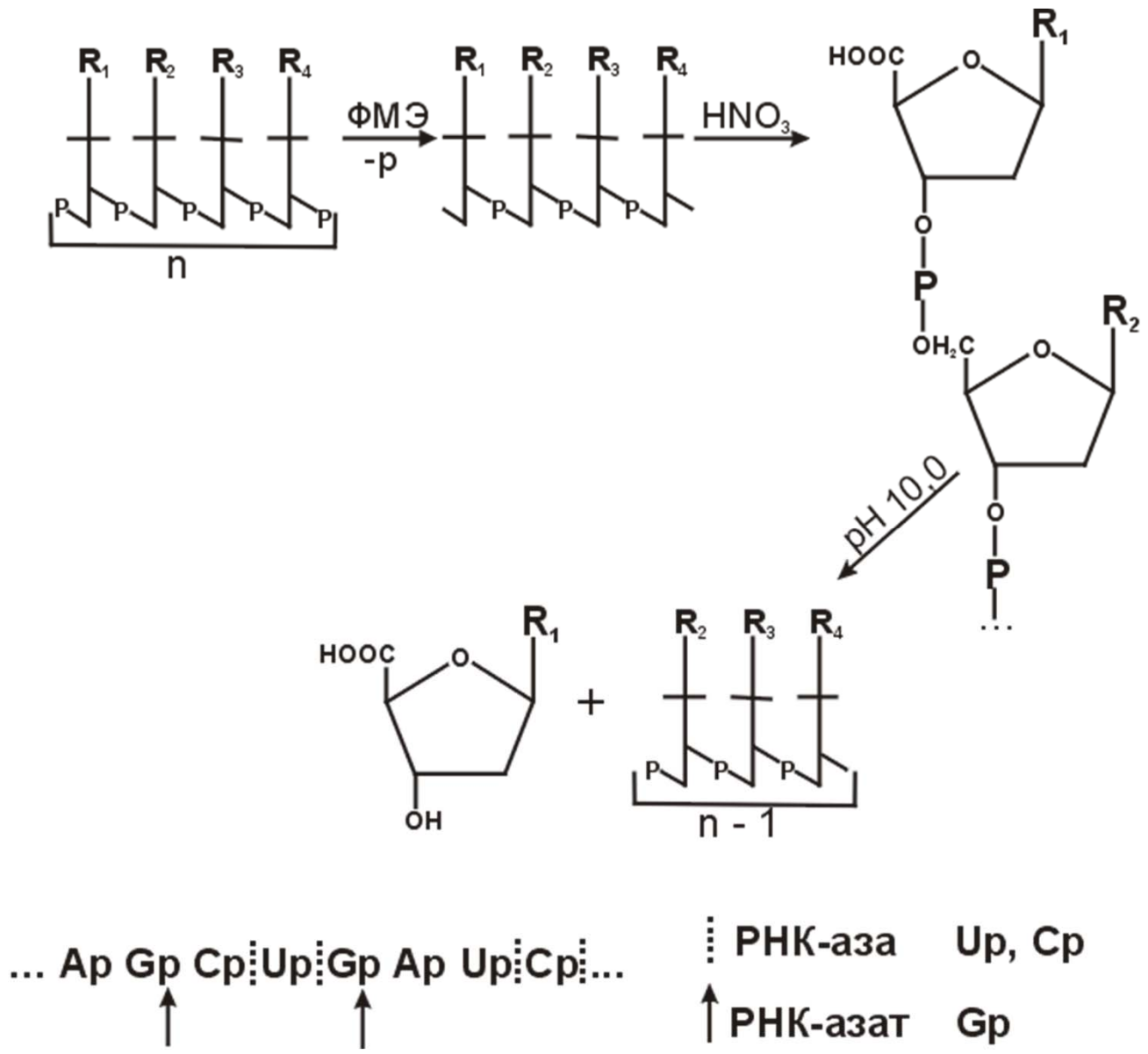


dpACTG



ApCpGpUpA $\xrightarrow[\text{фосфорилаза}]{\text{полинуклеотид-}}$ $\xrightarrow{P_i}$ ApCpGp + ppU +ppA




R1 R2 R3 R4
ФМЭ
-p
HNO3
n
HOOC
O
P
OH2C
pH 10.0
OH
n - 1
... Ap Gp Cp Up Gp Ap Up Cp ...
РНК-аза Up, Cp
РНК-азат Gp

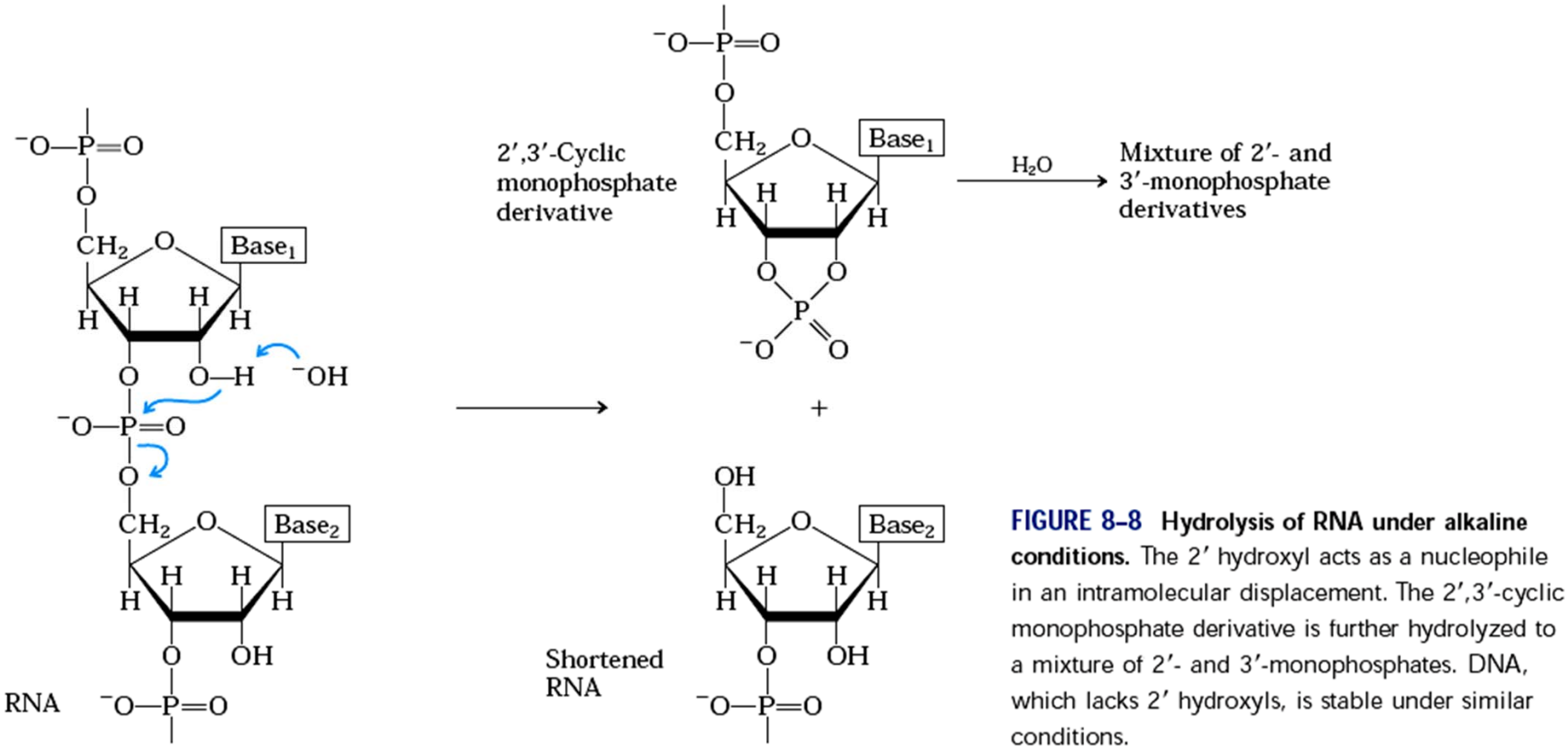
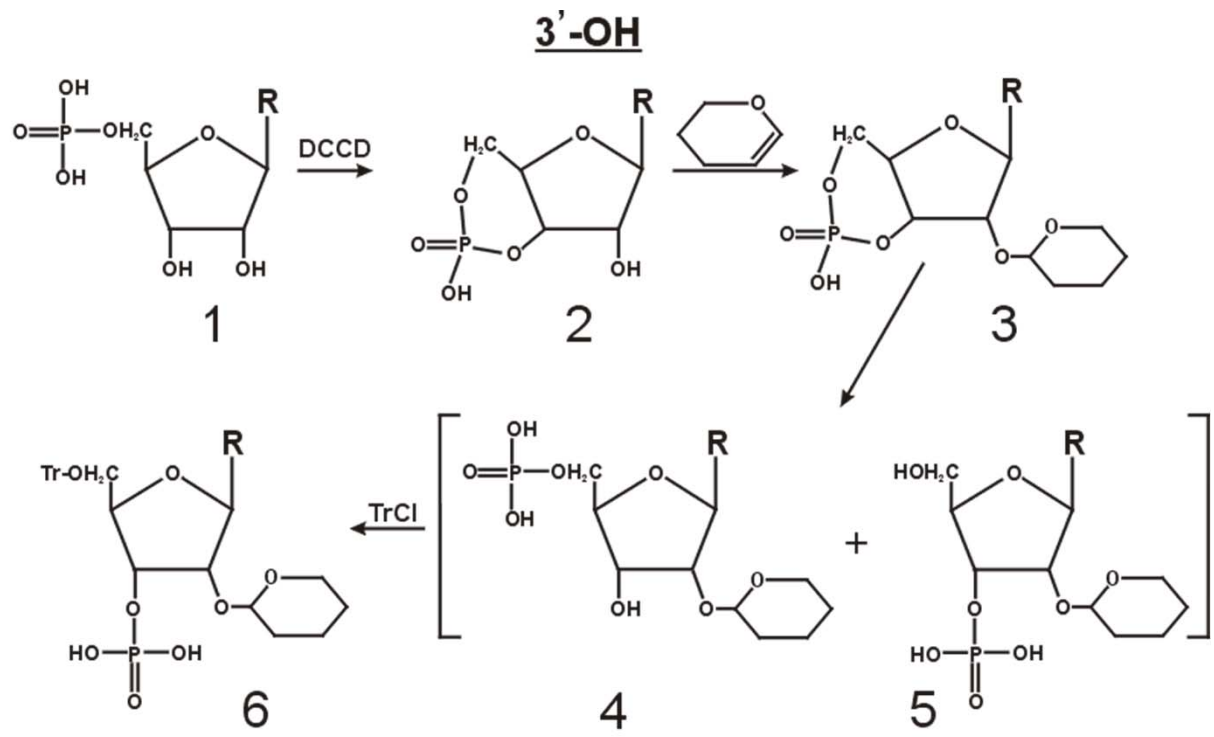
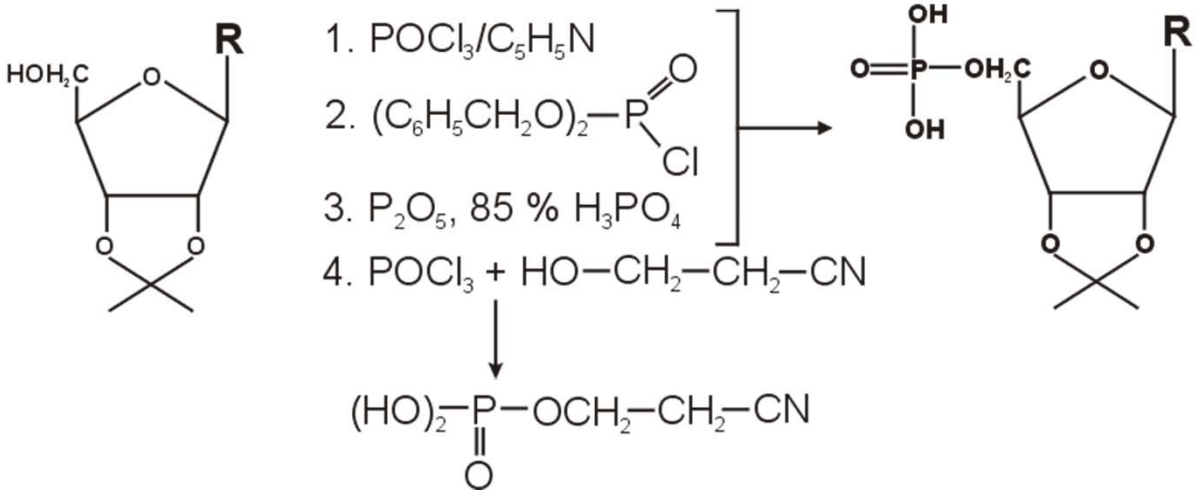


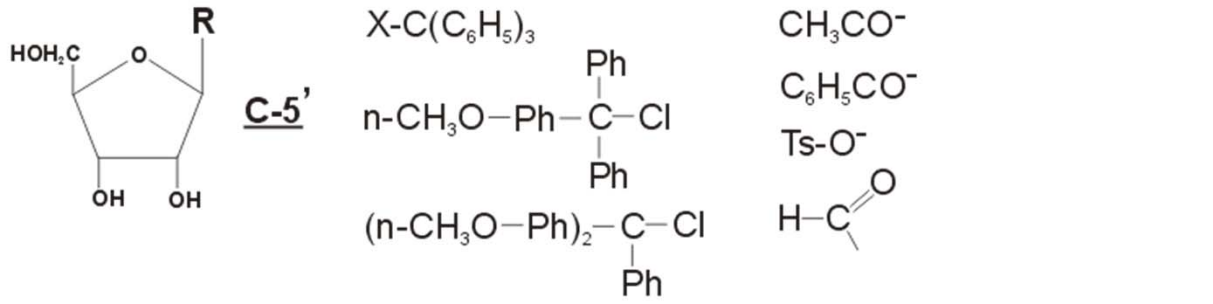
FIGURE 8–8 Hydrolysis of RNA under alkaline conditions. The 2′ hydroxyl acts as a nucleophile in an intramolecular displacement. The 2′,3′-cyclic monophosphate derivative is further hydrolyzed to a mixture of 2′- and 3′-monophosphates. DNA, which lacks 2′ hydroxyls, is stable under similar conditions.



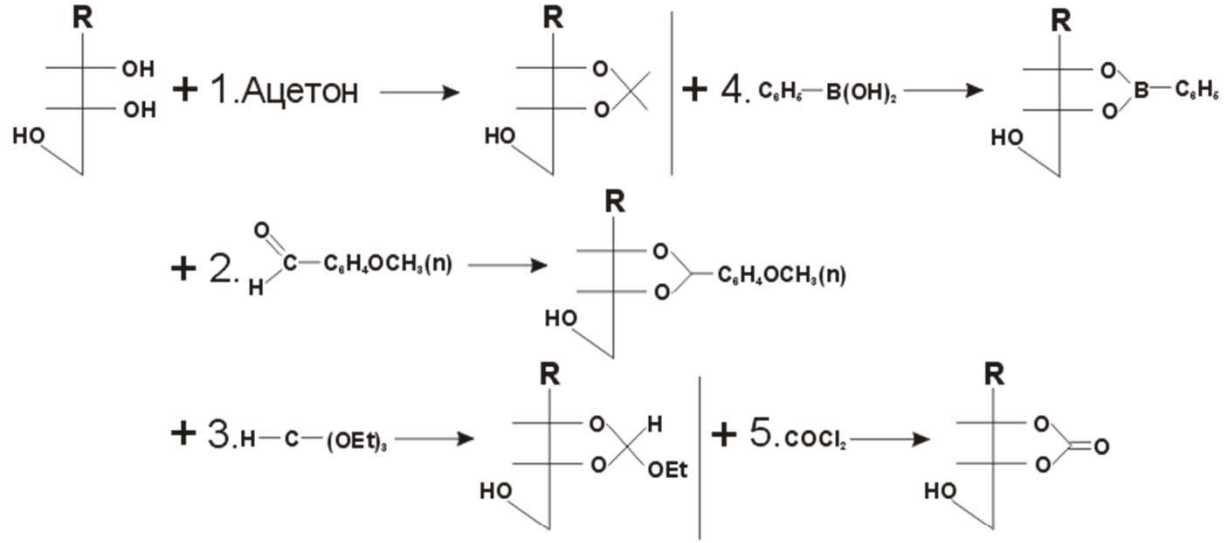
Фосфорилирование

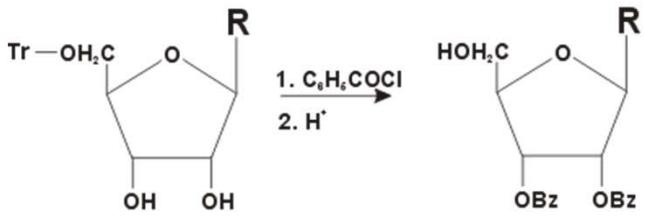


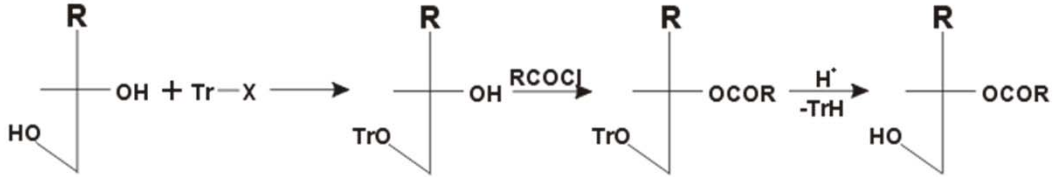
Синтез


C-5'
X-C(C6H5)3
n-CH3O-Ph-C(Ph)2-Cl
(n-CH3O-Ph)2-C(Ph)-Cl
CH3CO-
C6H5CO-
Ts-O-

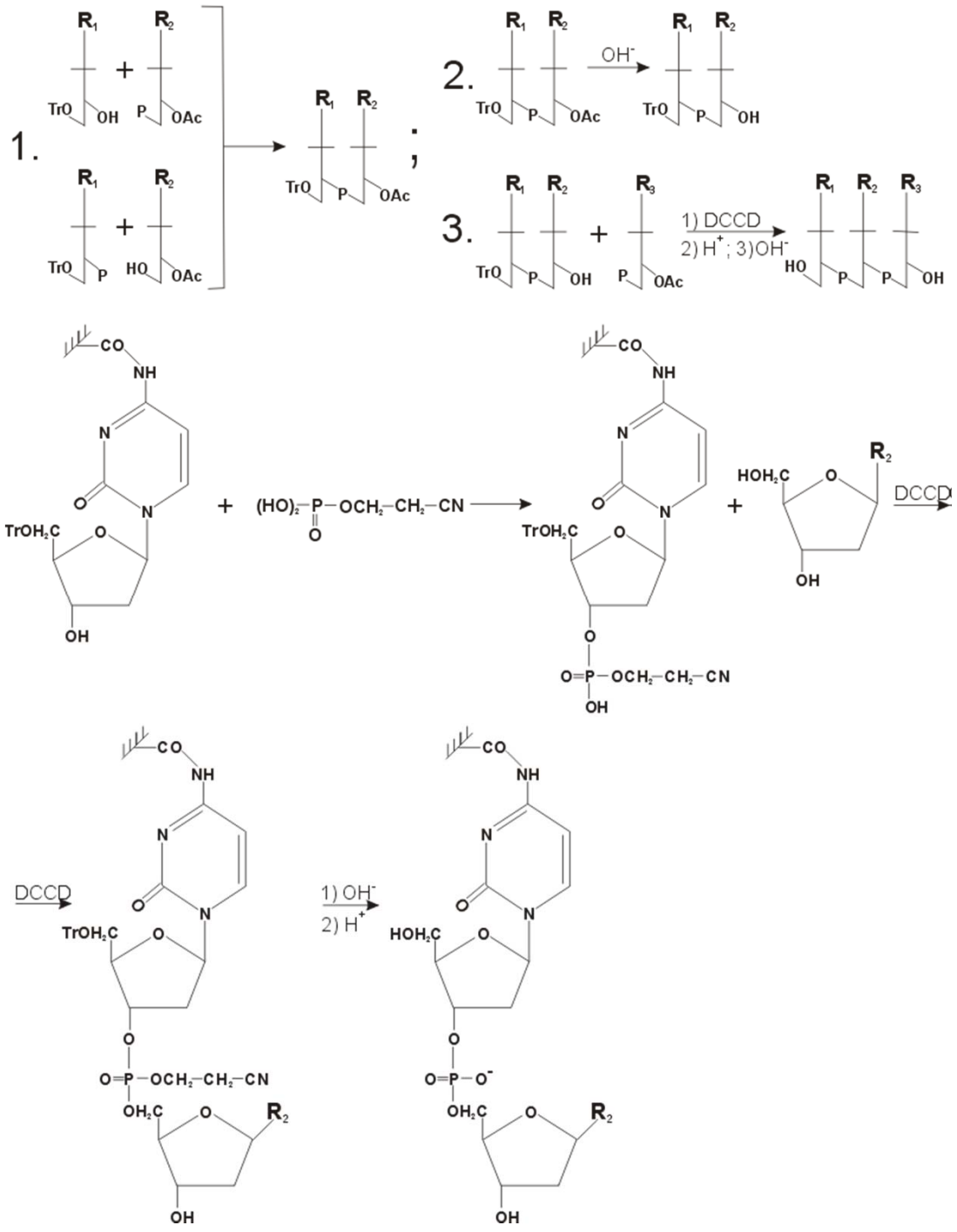
C'2-C'3

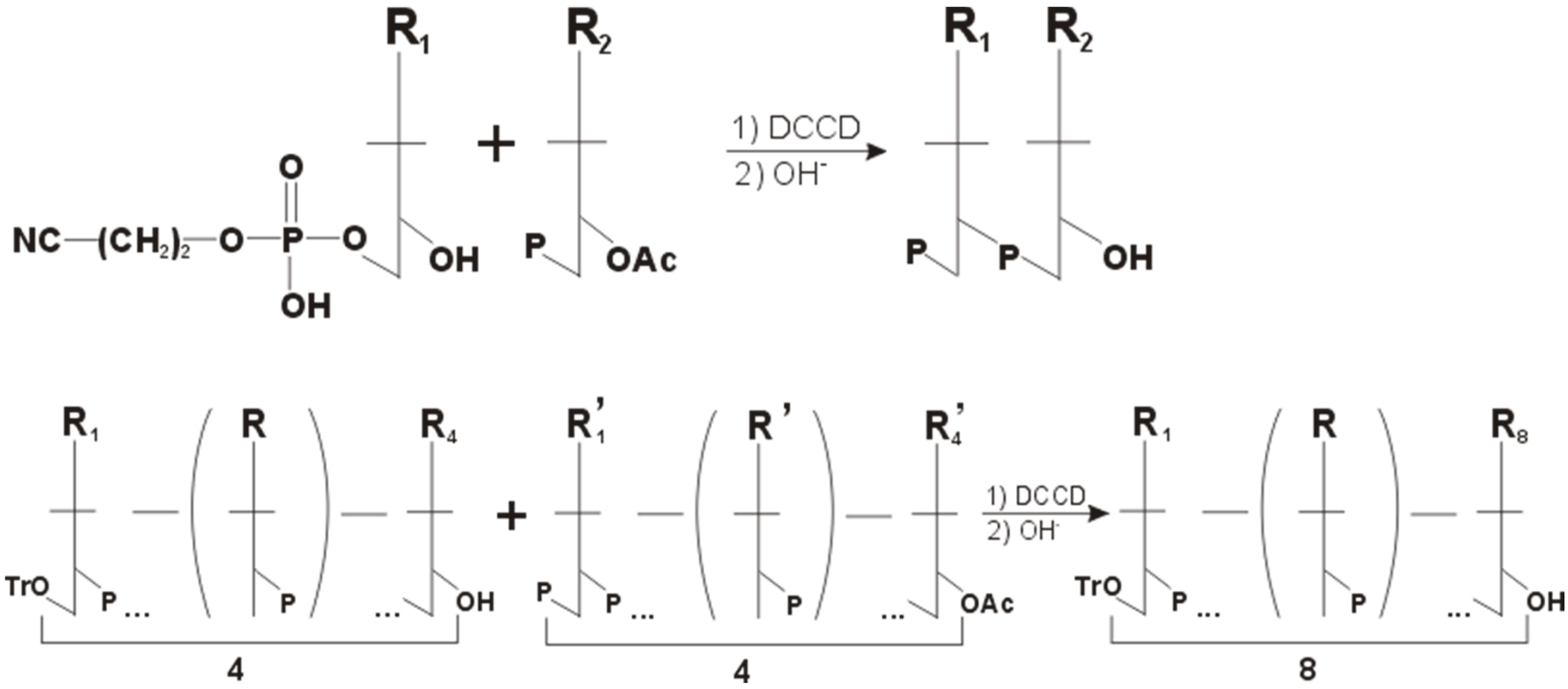

+ 1.Ацетон
+ 4. C6H6—B(OH)2
+ 2.
C6H4OCH3(n)
+ 3.H—C—(OEt)3
+ 5.COCl2


1. C6H5COCl
2. H+

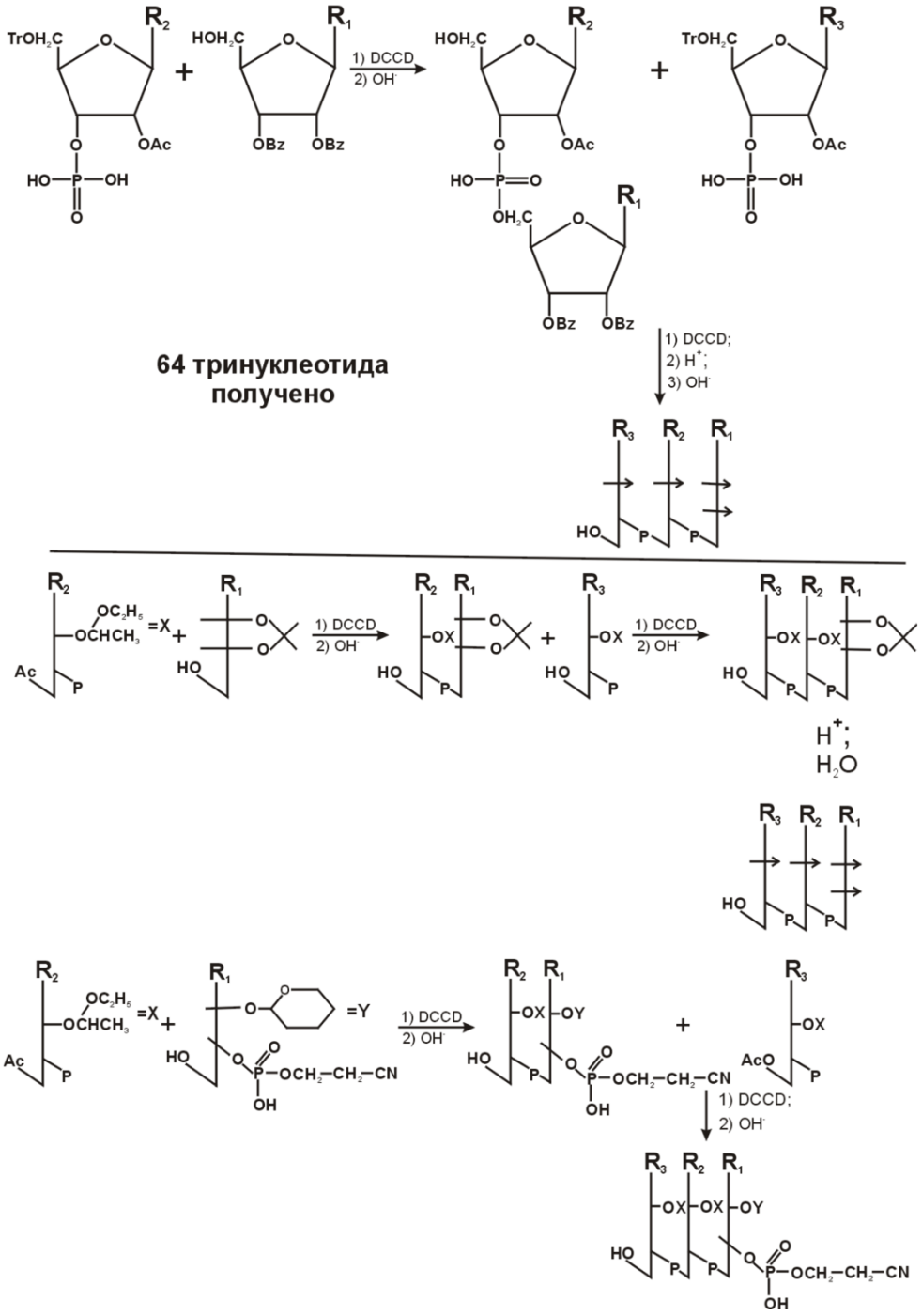

+ Tr—X
RCOCl
H+
-TrH

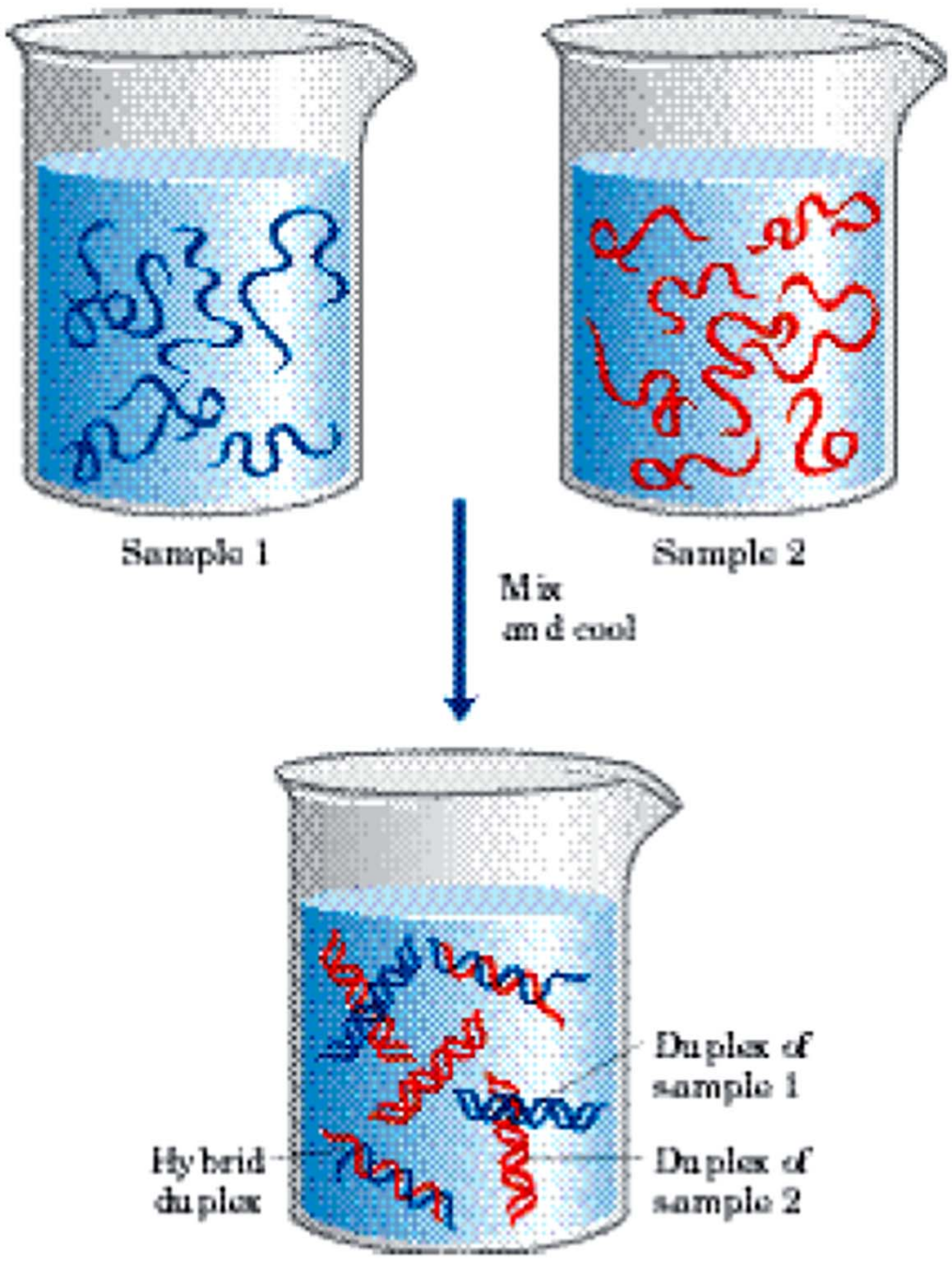
Синтез ДНК




R1
R2
NC—(CH2)2—O—P—O
O
OH
OH
P
OAc
1) DCCD
2) OH-
R1
R2
P
P
OH
R1
R
R4
TrO
P
P
OH
4
R1'
R'
R4'
P
P
OAc
4
1) DCCD
2) OH-
R1
R
R8
TrO
P
P
OH
8

СинтезРНК




Sample 1
Sample 2
Mix
and cool
Duplex of
sample 1
Hybrid
duplex
Duplex of
sample 2

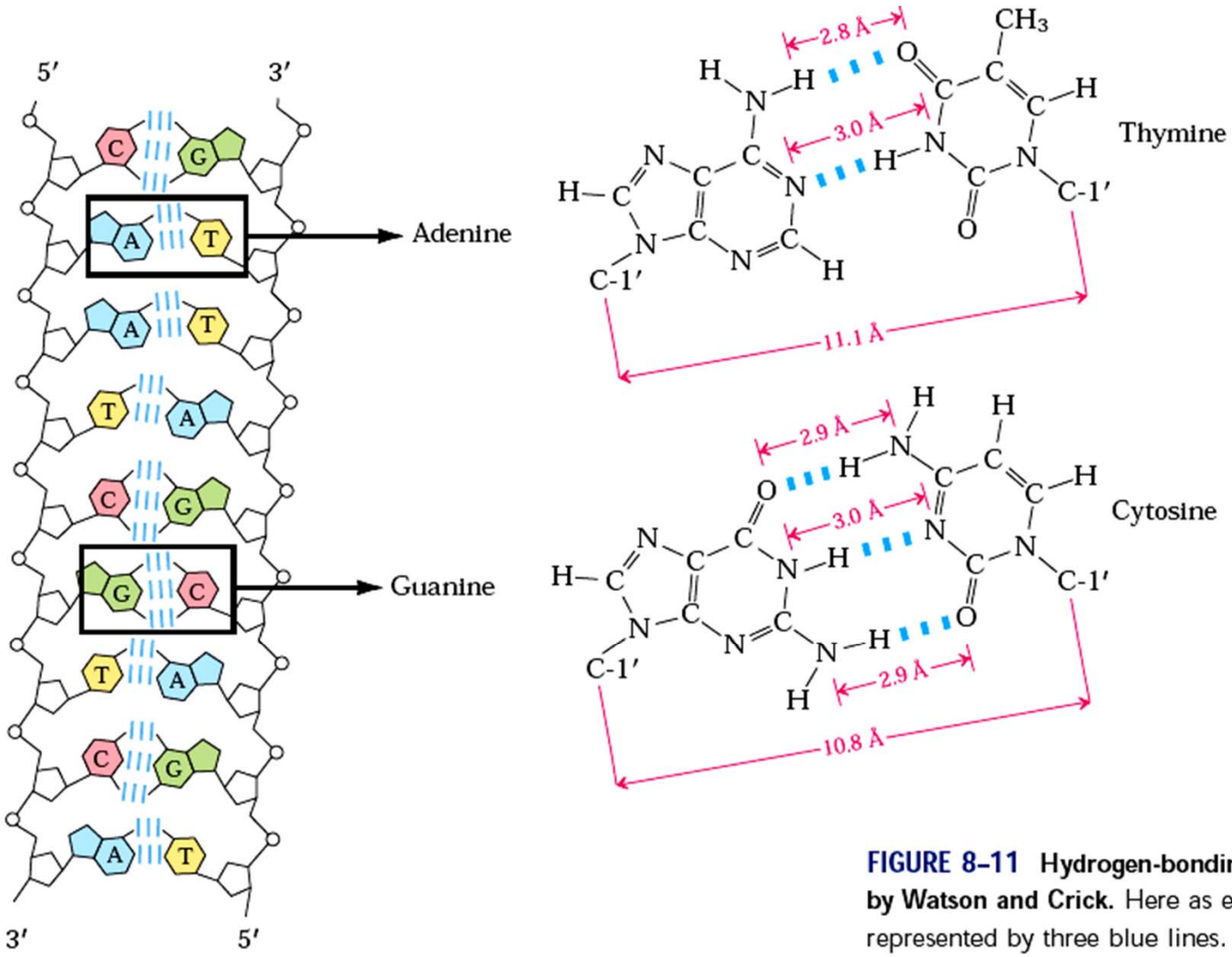
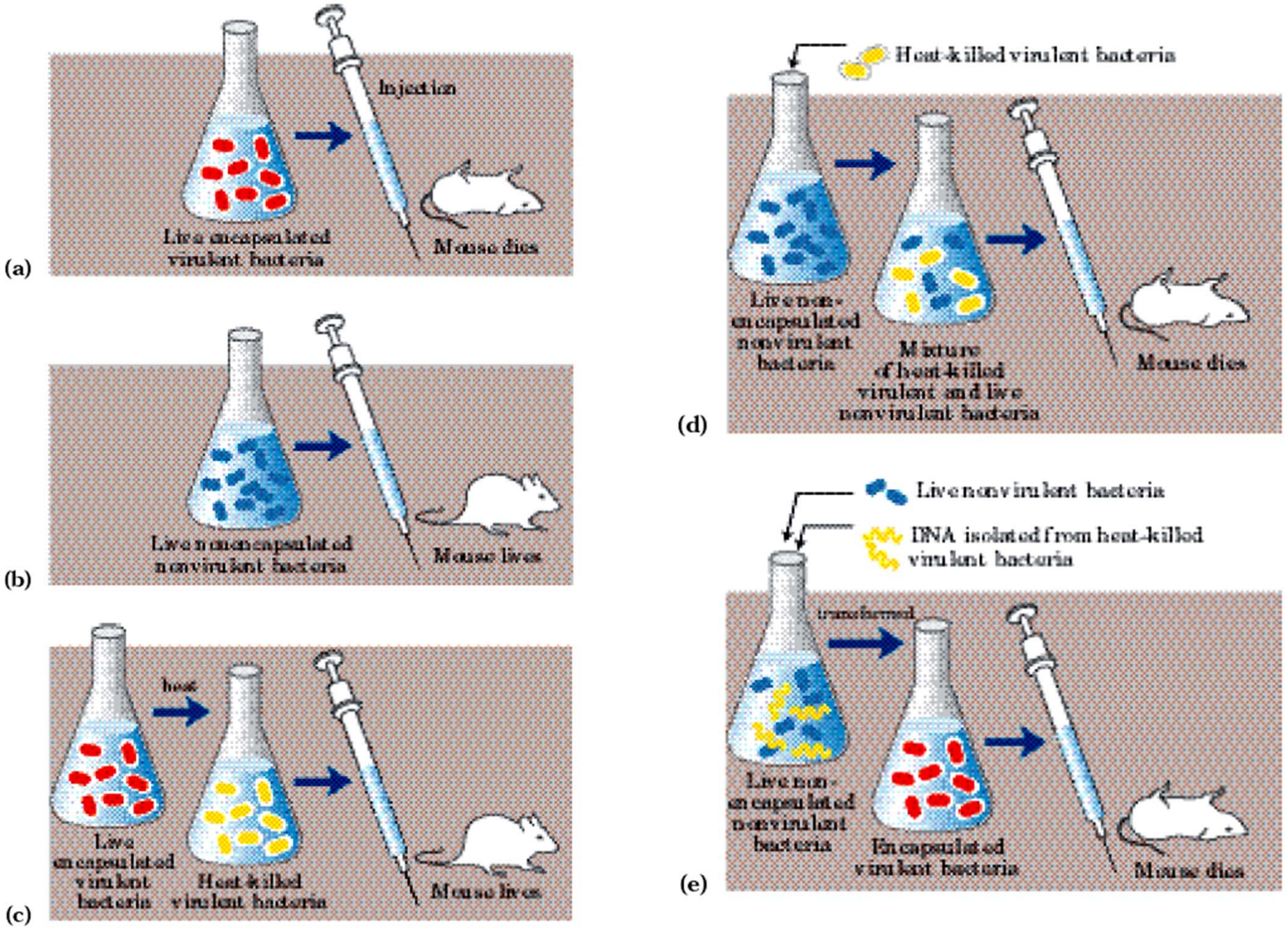
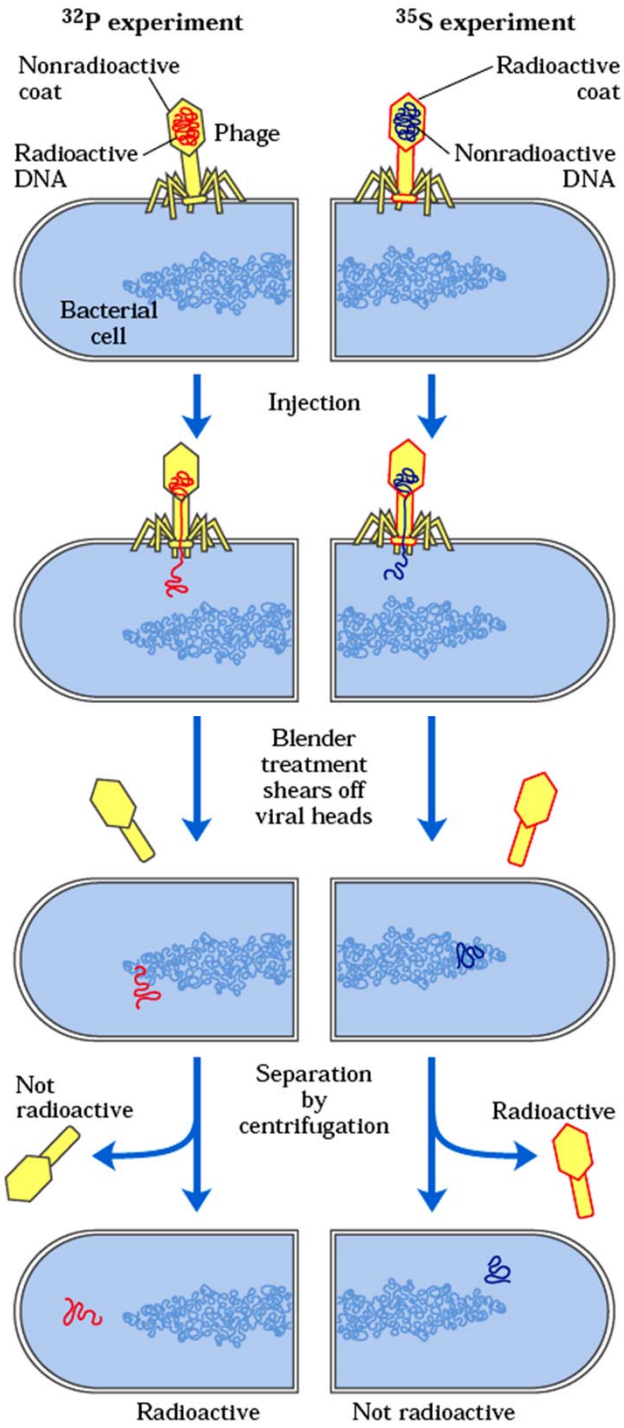


FIGURE 8–11 Hydrogen-bonding patterns in the base pairs defined by Watson and Crick. Here as elsewhere, hydrogen bonds are represented by three blue lines.


(a)
Injection
Live encapsulated virulent bacteria
Mouse dies
(b)
Live nonencapsulated nonvirulent bacteria
Mouse lives
(c)
heat
Live encapsulated virulent bacteria
Heat-killed virulent bacteria
Mouse lives
(d)
Heat-killed virulent bacteria
Live nonencapsulated nonvirulent bacteria
Mixture of heat-killed virulent and live nonvirulent bacteria
Mouse dies
(e)
Live nonvirulent bacteria
DNA isolated from heat-killed virulent bacteria
transformed
Live nonencapsulated nonvirulent bacteria
Encapsulated virulent bacteria
Mouse dies


^{32}P experiment
^{35}S experiment
Nonradioactive coat
Radioactive DNA
Phage
Radioactive coat
Nonradioactive DNA
Bacterial cell
Injection
Blender treatment shears off viral heads
Not radioactive
Separation by centrifugation
Radioactive
Radioactive
Not radioactive

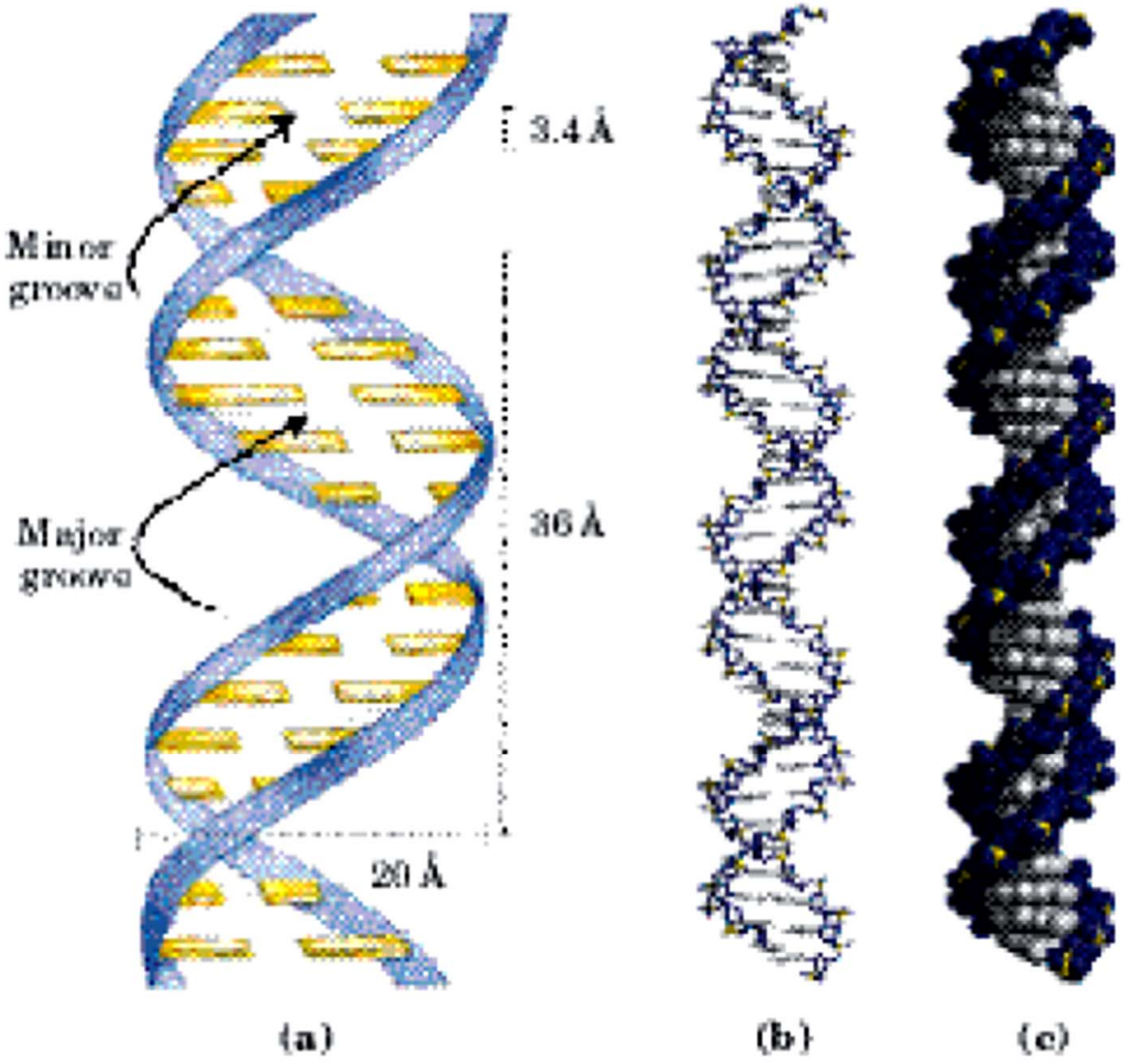


FIGURE 8–15 **Watson-Crick model for the structure of DNA.** The

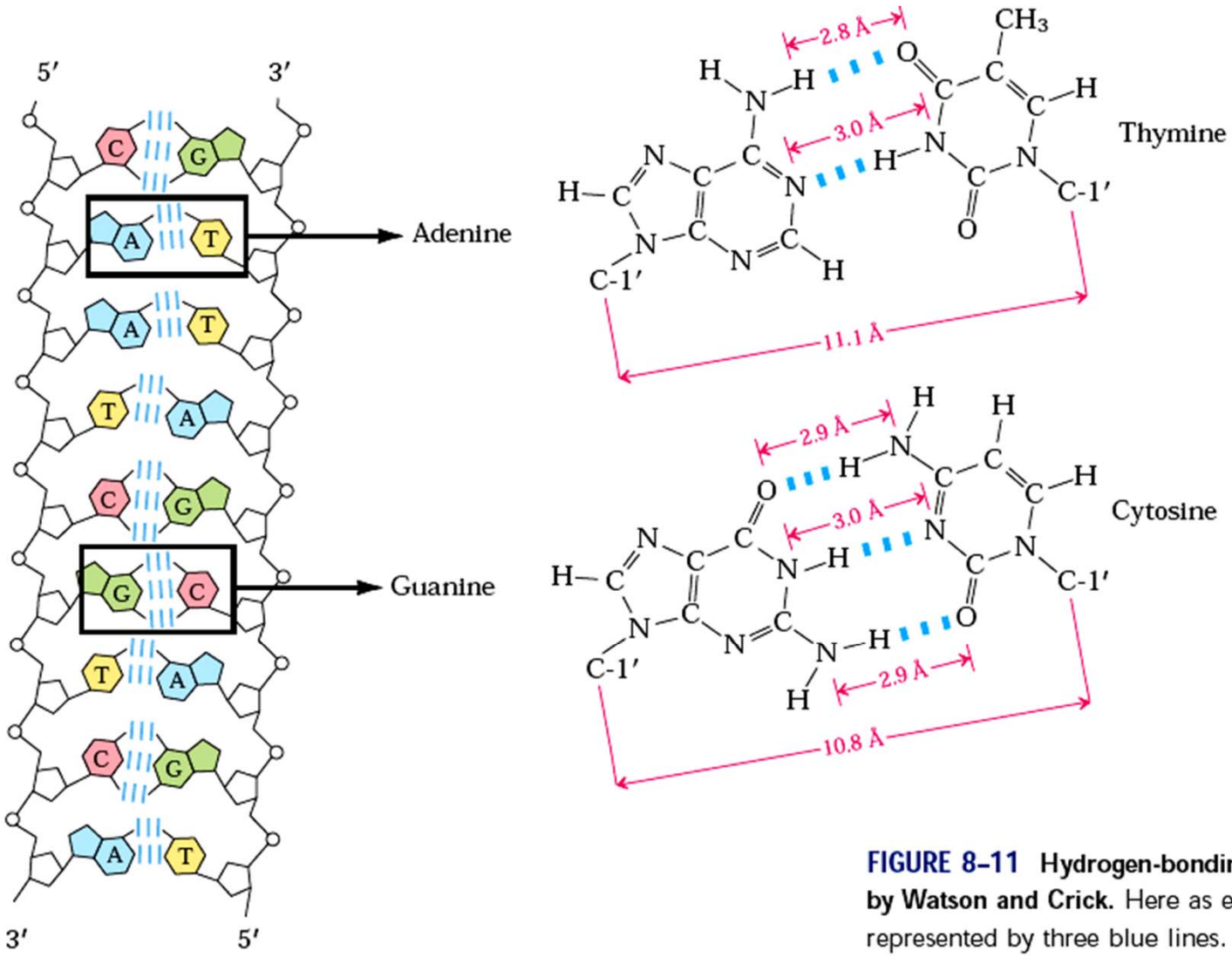


FIGURE 8–11 Hydrogen-bonding patterns in the base pairs defined by Watson and Crick. Here as elsewhere, hydrogen bonds are represented by three blue lines.

26. Упаковка генетического материала

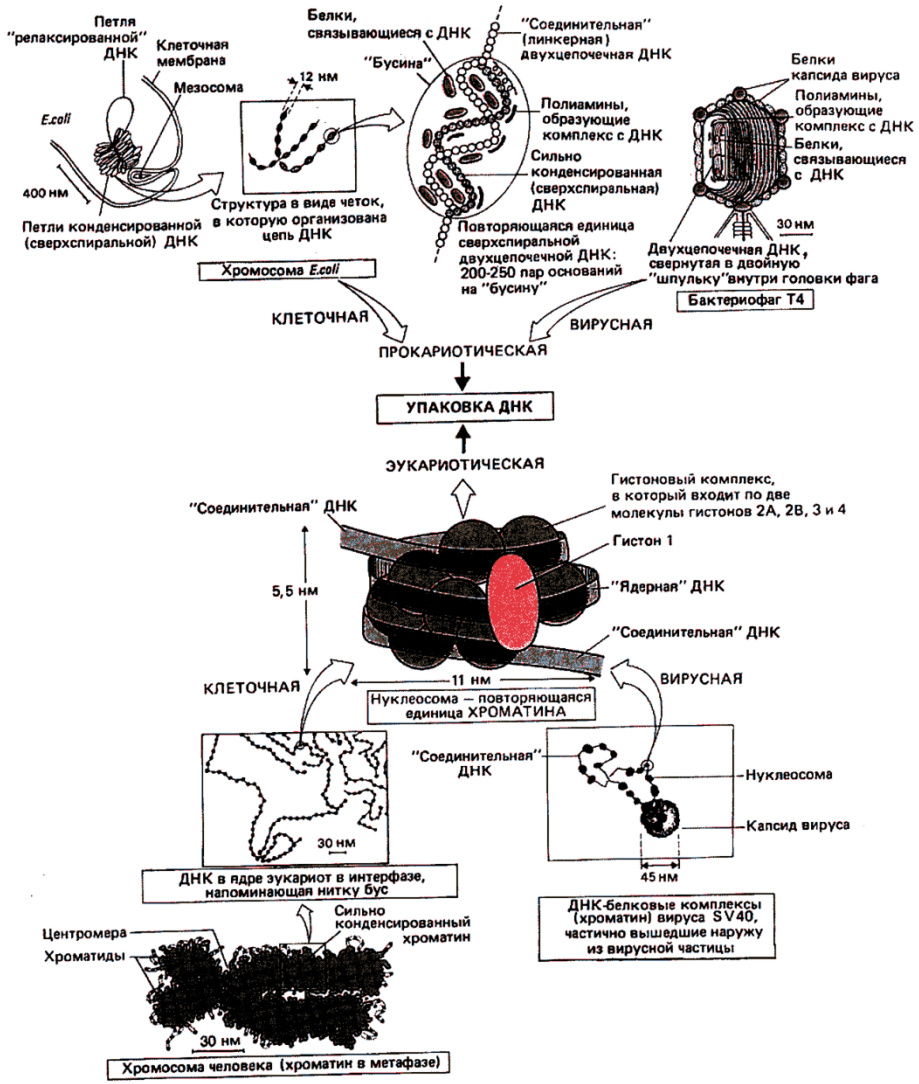
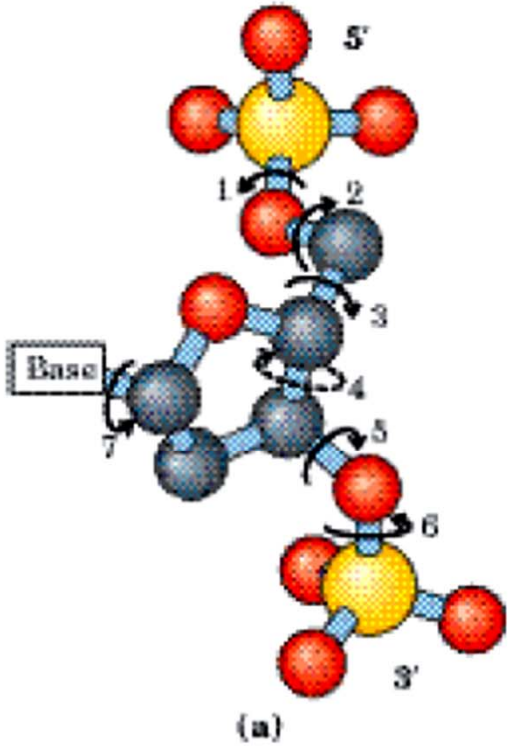


Рис. 26.1.



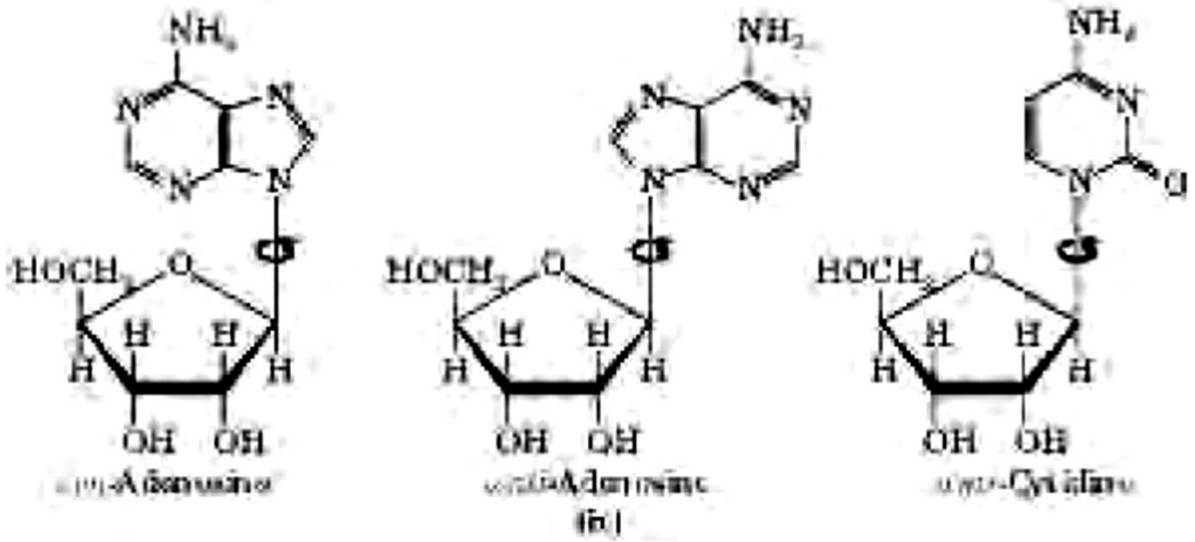
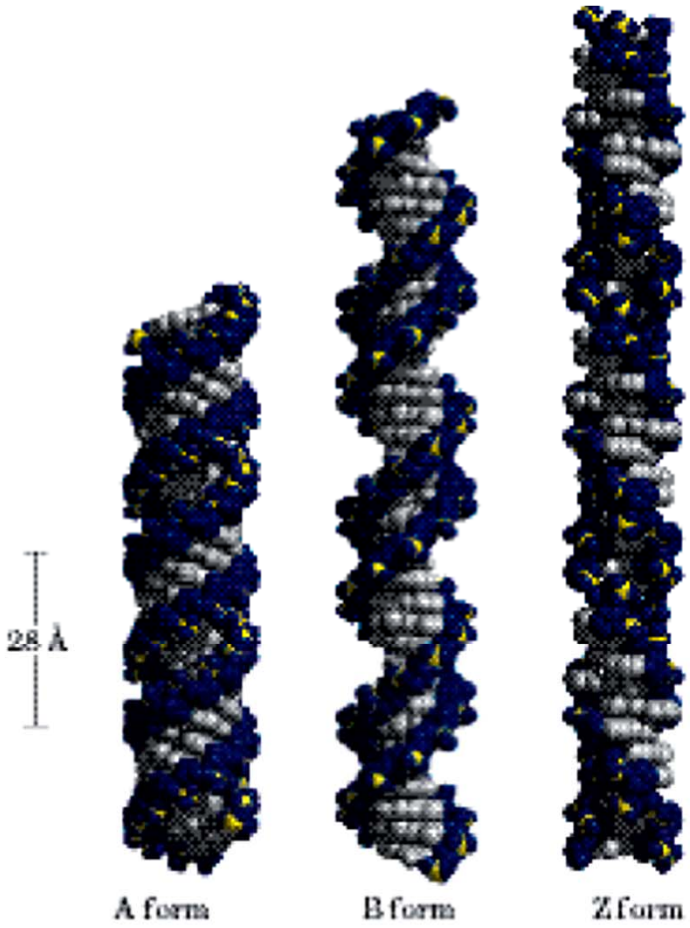


FIGURE 8–18 **Structural variation in DNA. (a)** The conformation of a nucleotide in DNA is affected by rotation about seven different bonds. Six of the bonds rotate freely. The limited rotation about bond 4 gives rise to ring pucker, in which one of the atoms in the five-membered furanose ring is out of the plane described by the other four. This conformation is endo or exo, depending on whether the atom is displaced to the same side of the plane as C-5′ or to the opposite side (see Fig. 8–3b). **(b)** For purine bases in nucleotides, only two conformations with respect to the attached ribose units are sterically permitted, anti or syn. Pyrimidines generally occur in the anti conformation.



	A form	*B form*	*Z form*
Helical sense	Right handed	Right handed	Left handed
Diameter	~26 Å	~20 Å	~18 Å
Base pairs per helical turn	11	10.5	12
Helix rise per base pair	2.6 Å	3.4 Å	3.7 Å
Base tilt normal to the helix axis	20°	6°	7°
Sugar pucker conformation	C-3′ endo	C-2′ endo	C-2′ endo for pyrimidines; C-3′ endo for purines
Glycosyl bond conformation	Anti	Anti	Anti for pyrimidines; syn for purines

FIGURE 8–19 Comparison of A, B, and Z forms of DNA. Each structure shown here has 36 base pairs. The bases are shown in gray, the phosphate atoms in yellow, and the riboses and phosphate oxygens in blue. Blue is the color used to represent DNA strands in later chapters. The table summarizes some properties of the three forms of DNA.

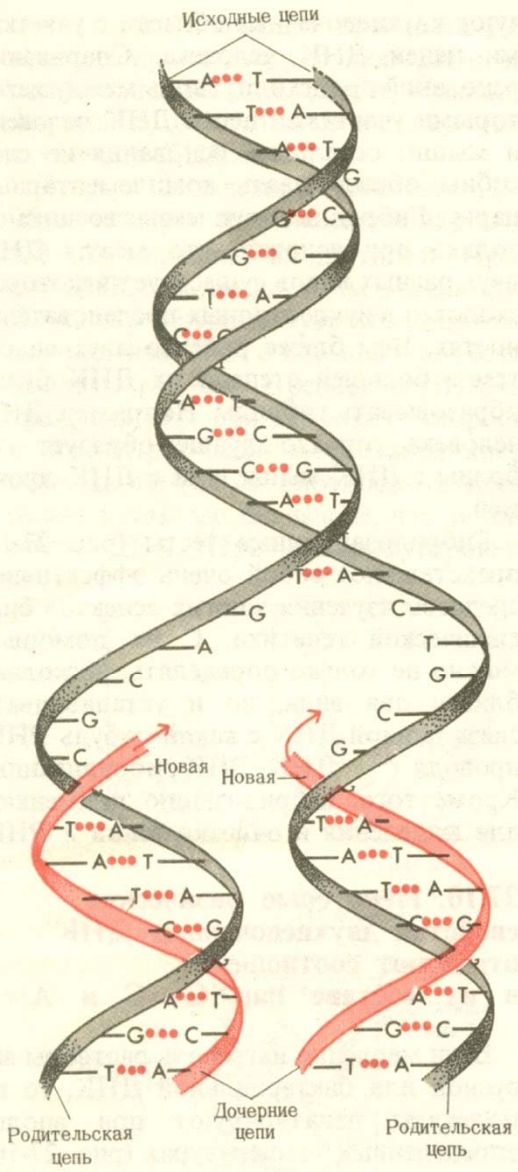
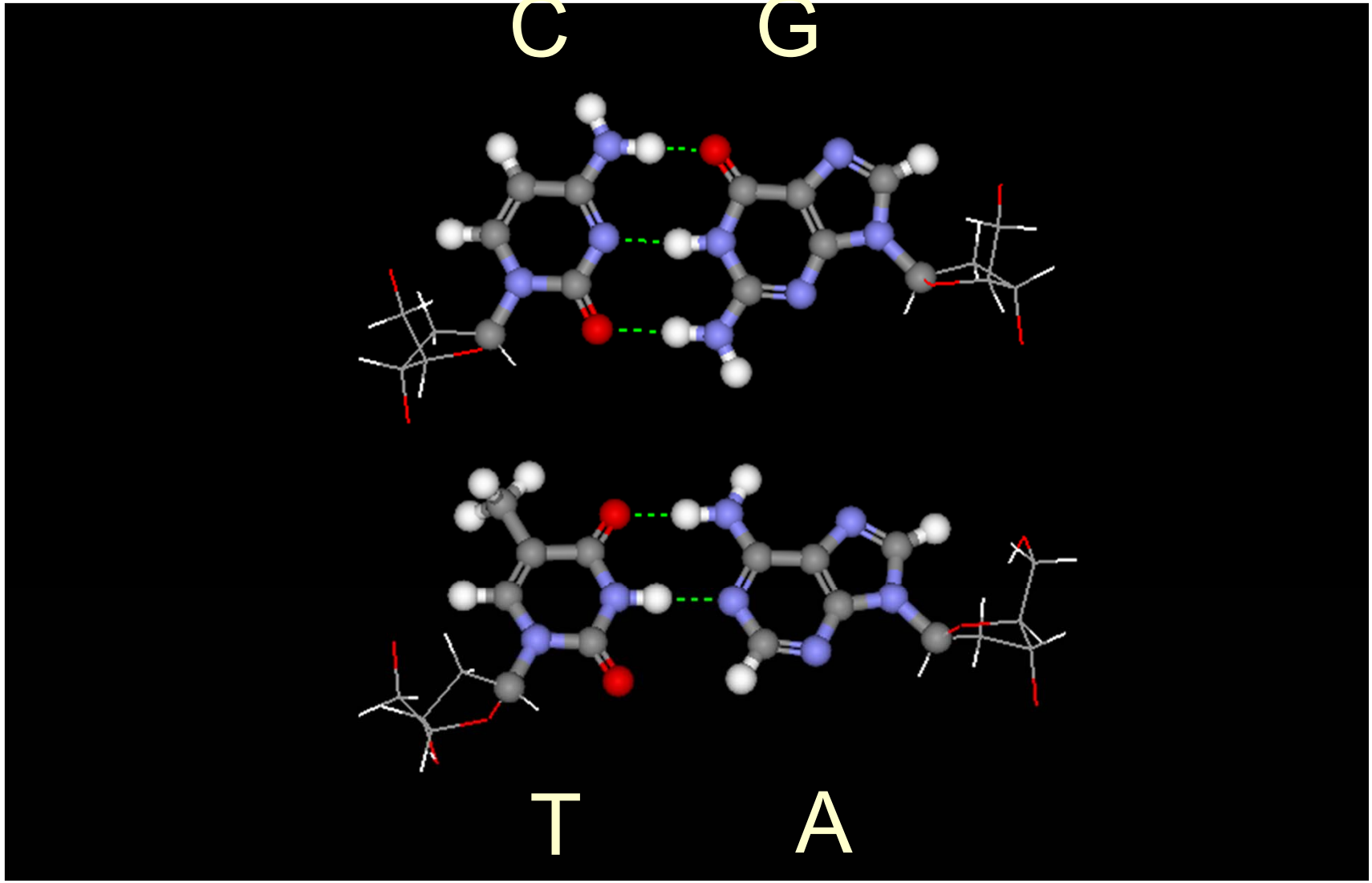
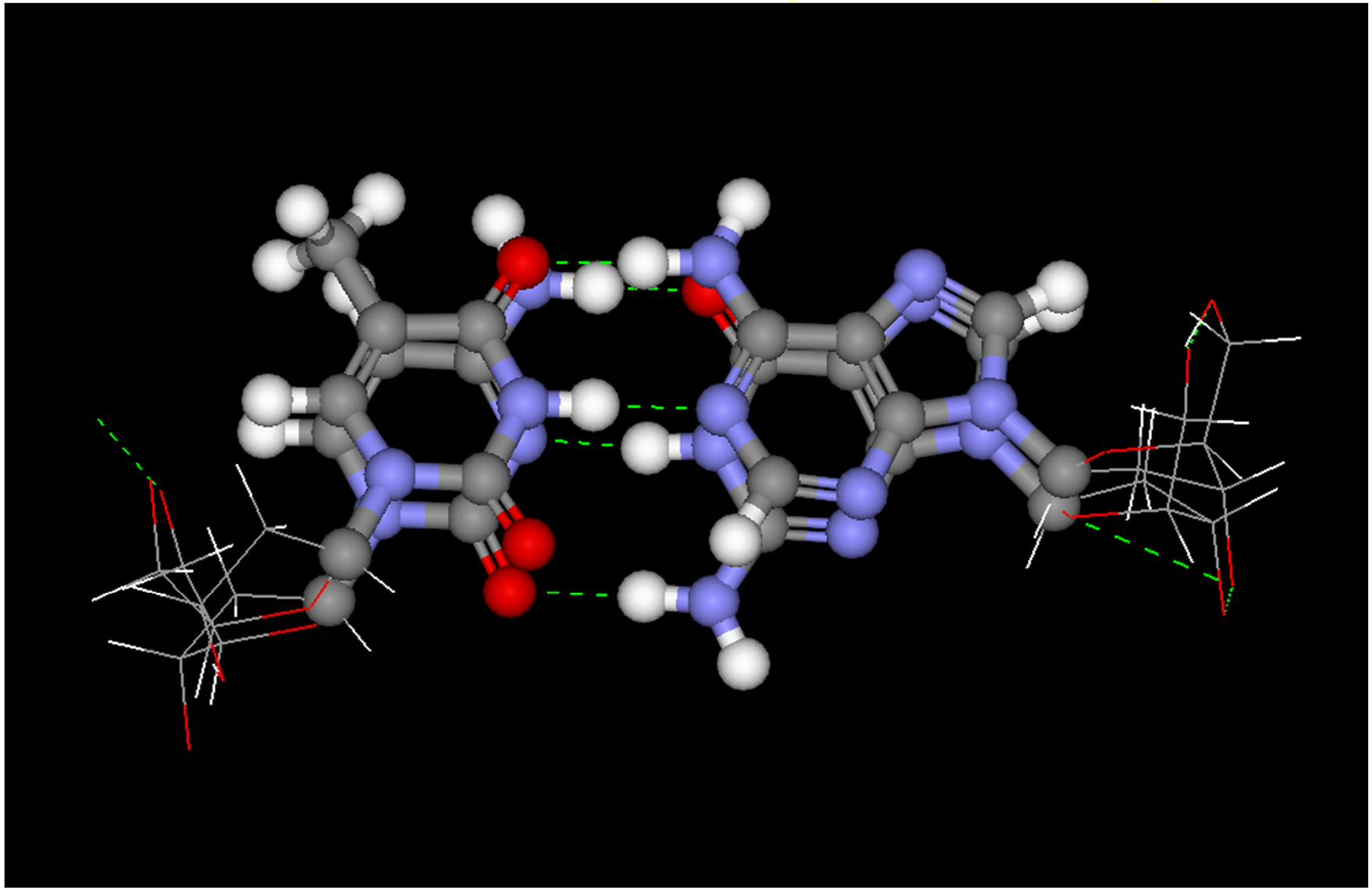


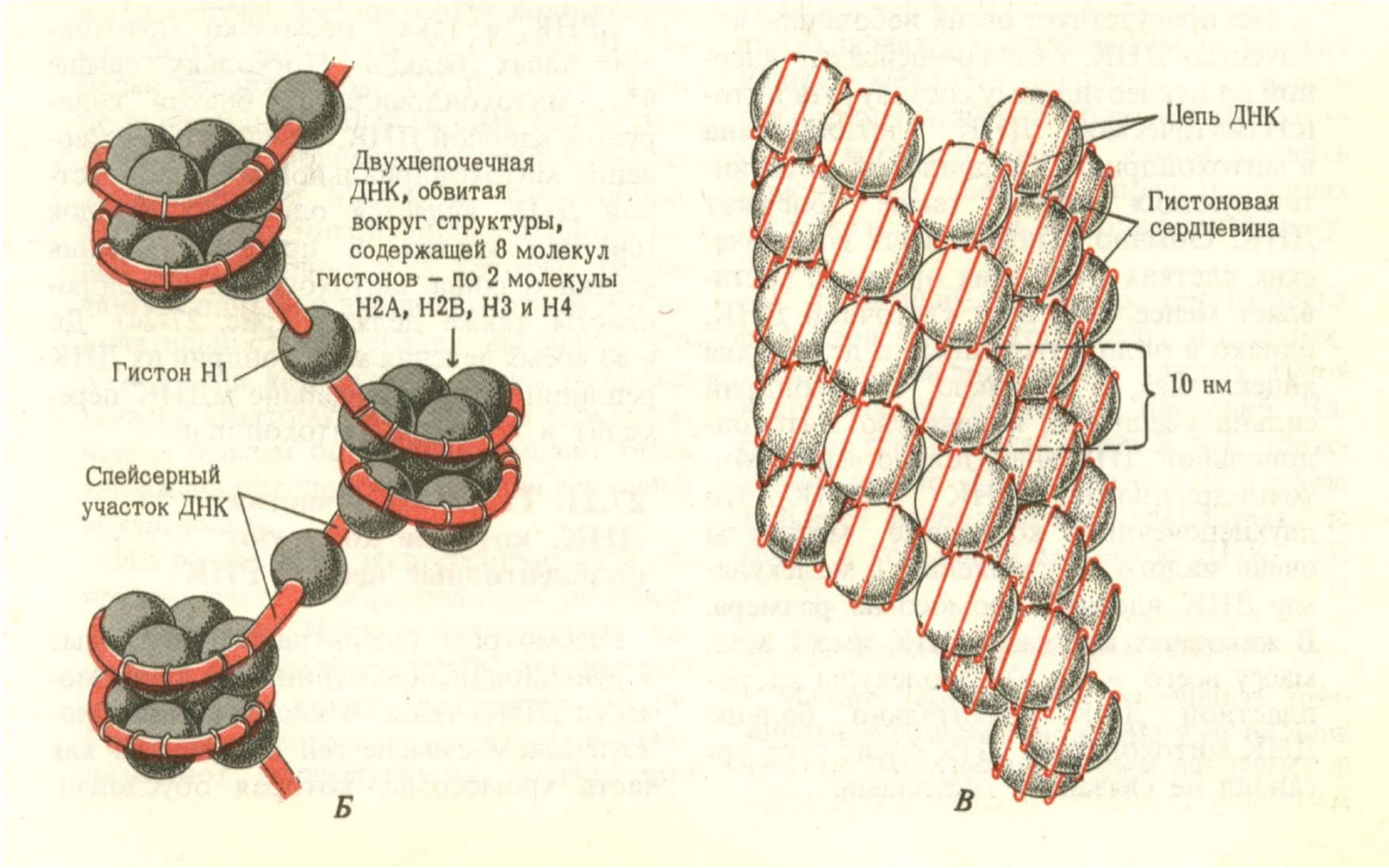
Рис. 27-13. Модель репликации ДНК, предложенная Уотсоном и Криком. Комплементарные цепи родительской ДНК разделяются, и каждая из них служит матрицей для биосинтеза комплементарной дочерней цепи (дочерние цепи показаны красным цветом).

Комплементарные пары



Изогеометричность комплементарных пар




Двухцепочечная ДНК, обвитая вокруг структуры, содержащей 8 молекул гистонов – по 2 молекулы H2A, H2B, H3 и H4
Гистон H1
Спейсерный участок ДНК
Б
Цепь ДНК
Гистоновая сердцевина
10 нм
В

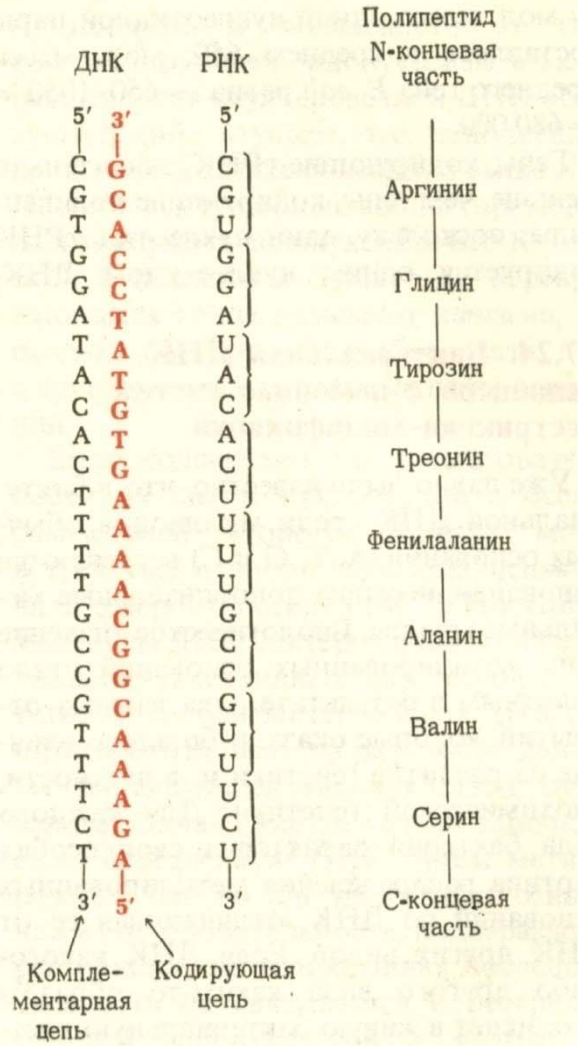


Рис. 27-27. Коллинеарность нуклеотидных последовательностей ДНК и мРНК и аминокислотной последовательности полипептидных цепей. Триплеты нуклеотидов ДНК определяют последовательность аминокислот в белке; посредником в этом процессе выступает мРНК, нуклеотидные триплеты которой (кодоны) комплементарны триплетам кодирующей цепи ДНК.

Таблица 27-7. Специфичность некоторых рестриктирующих эндонуклеаз[1)]

Образует тупые концы

Hin dII

5′ –G–T–Py–Pu–A–C– 3′

3′ –C–A–Pu–Py–T–G– 5′

Hpa I

5′ –G–T–T–A–A–C– 3′

3′ –C–A–A–T–T–G– 5′

Образует выступающие концы

Eco RI

5′ –G–A–A–T–T–C– 3′

3′ –C–T–T–A–A–G– 5′

Eco RII

5′ –N–C–C–N–G–G–N– 3′

3′ –N–G–G–N–C–C–N– 5′

Hin dIII

5′ –A–A–G–C–T–T– 3′

3′ –T–T–C–G–A–A– 5′

[1)] Жирной красной точкой обозначена ось симметрии второго порядка, красными стрелками показаны места расщепления. Красными звездочками указаны места метилирования (если они известны) в организме, из которого данный фермент выделен: *Haemophilus influenza* для *Hin* dII и *Hin* dIII, *E. coli* для *Eco* RI и *Eco* RII и *Haemophilus parainfluenza* для *Hpa* II. Pu – пурин, Py – пиримидин, N – A или T.

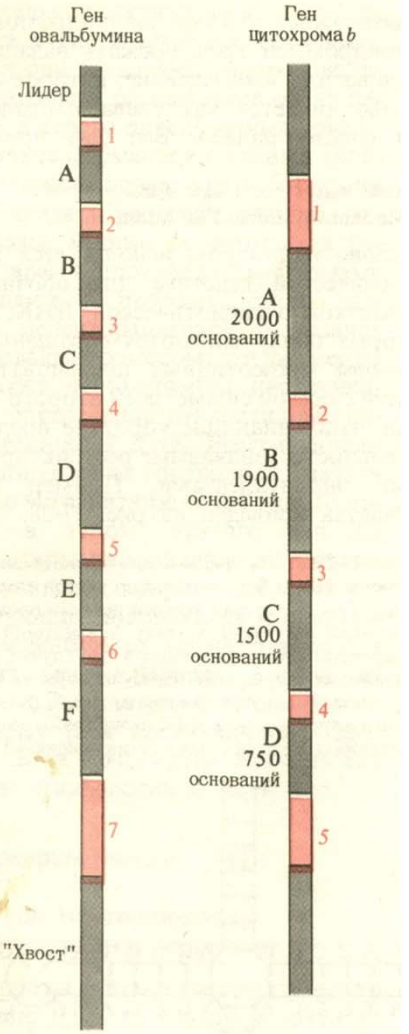


Рис. 27-29. Вставочные последовательности (интроны) в двух эукариотических генах. Ген овальбумина содержит шесть интронов (они обозначены серым цветом и буквами *A–F*) и, следовательно, разделен на семь участков, или экзонов (указаны красным цветом и цифрами *1–7*). В гене цитохрома *b* присутствуют четыре интрона (серые, *A–D*) и пять экзонов (красные, *1–5*). В обоих случаях интроны составляют бóльшую часть ДНК гена. Указано число оснований, входящих в состав интронов гена цитохрома *b*.

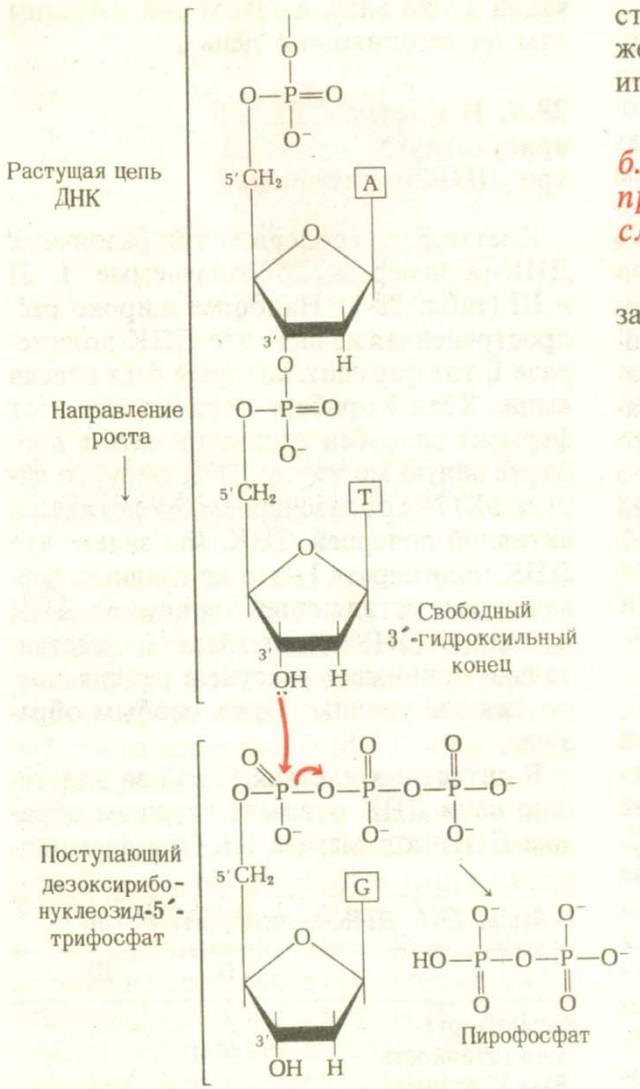


Рис. 28-7. Удлинение цепи ДНК с помощью ДНК-полимеразы. Новая межнуклеотидная связь образуется в результате нуклеофильной атаки свободной 3′-гидроксильной группой атома фосфора, находящегося в α-положении присоединяющегося дезоксирибонуклеозидтрифосфата. В ходе реакции высвобождается пирофосфат. Полинуклеотидная цепь ДНК-матрицы на рисунке не показана.

ствующую цепь, причем даже это она может делать только в присутствии цепи, играющей роль матрицы.

б. Другая цепь предсуществующей ДНК служит матрицей

Нуклеотиды присоединяются к цепи-затравке в соответствии с нуклеотидной

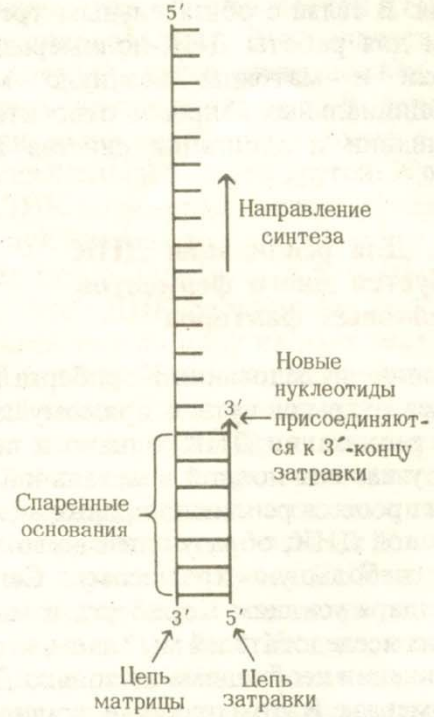


Рис. 28-8. Структура предсуществующей двухцепочечной ДНК, которая требуется для действия ДНК-полимеразы. Для того чтобы шел синтез, нужна одиночная неспаренная цепь, которая служит матрицей. Кроме того, необходимо присутствие цепи-затравки, к которой присоединяются новые нуклеотидные звенья.

последовательностью цепи-матрицы по

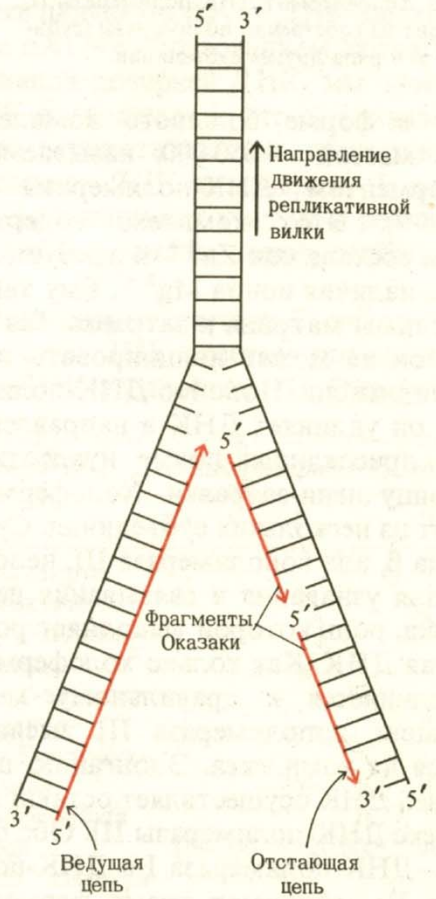


Рис. 28-10. Прерывистая репликация одной из цепей ДНК в виде коротких фрагментов. Цепь, которая реплицируется непрерывно (в направлении движения репликативной вилки), называется ведущей. Другая цепь реплицируется с перерывами, в виде коротких фрагментов (фрагменты Оказаки); направление ее репликации противоположно направлению движения репликативной вилки. Фрагменты Оказаки соединяются затем друг с другом с помощью ДНК-лигазы, образуя отстающую цепь. У прокариот фрагменты Оказаки достигают длины 1000–2000 нуклеотидов. В животных клетках они содержат 150–200 нуклеотидов.

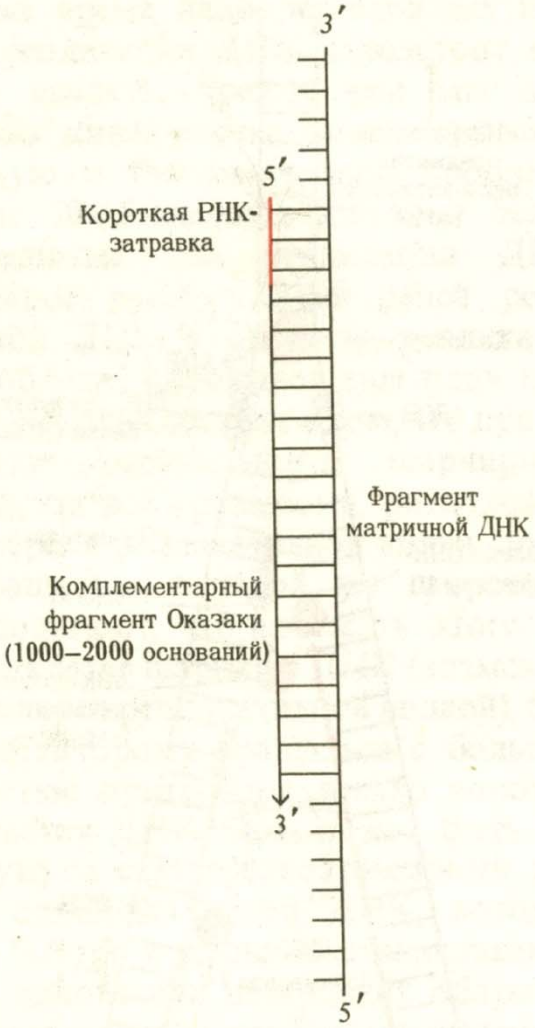


Рис. 28-11. Участие короткого фрагмента комплементарной РНК в качестве затравки при синтезе фрагментов Оказаки. Синтез этой РНК катализируется примазой, для действия которой затравка не требуется.

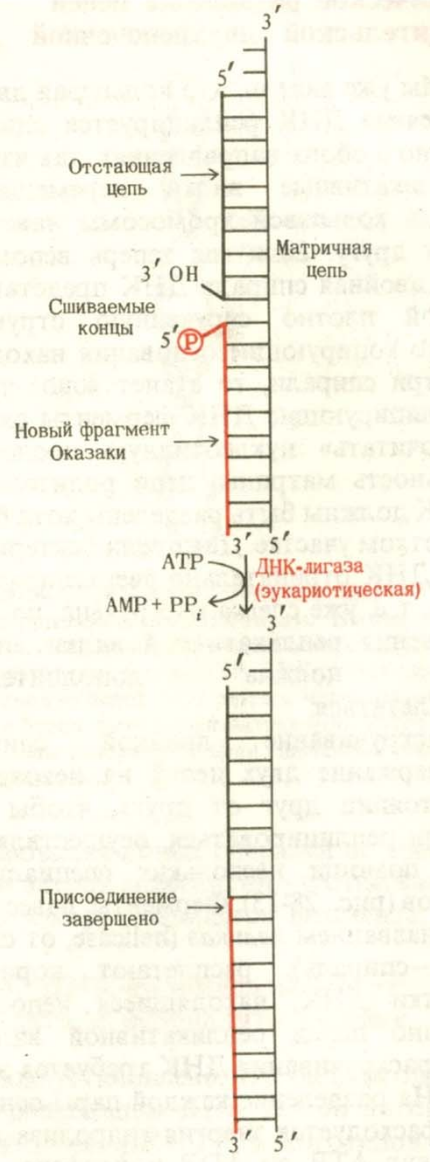


Рис. 28-12. Присоединение фрагмента Оказаки к отстающей цепи, катализируемое ДНК-лигазой. Два нуклеотида, которые надлежит соединить, должны быть комплементарны матричной цепи. На самом деле реакция протекает в несколько этапов.

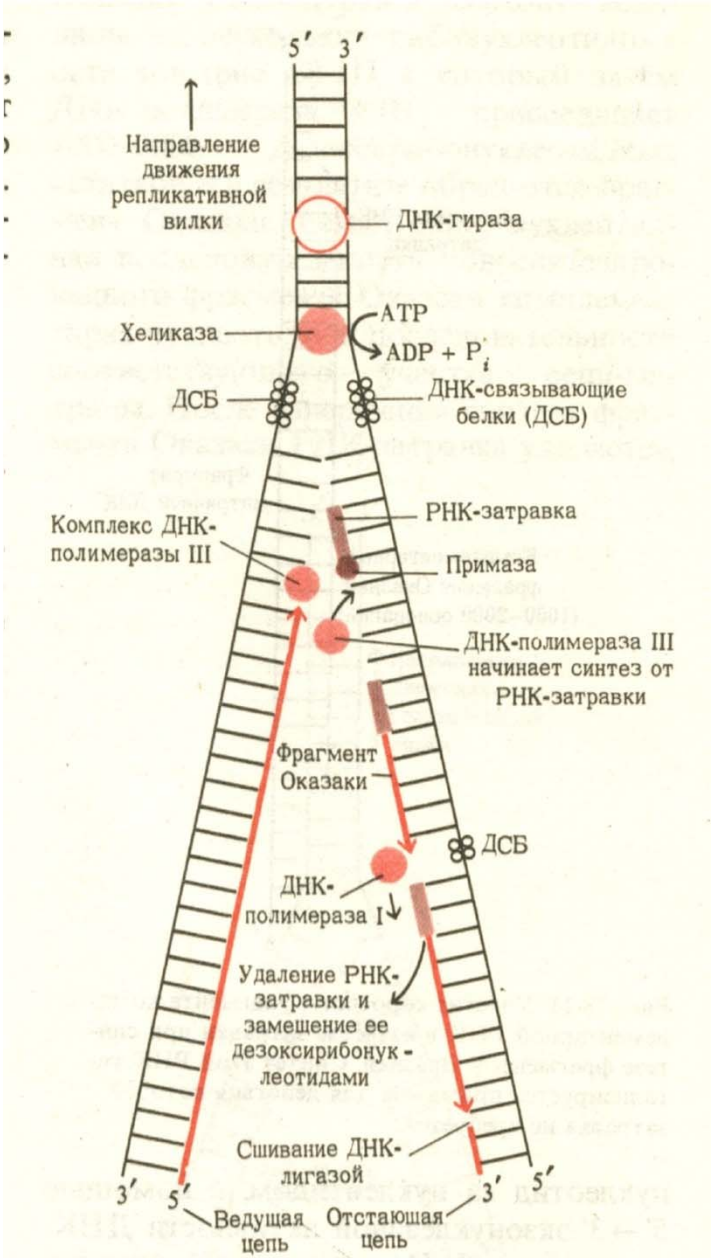
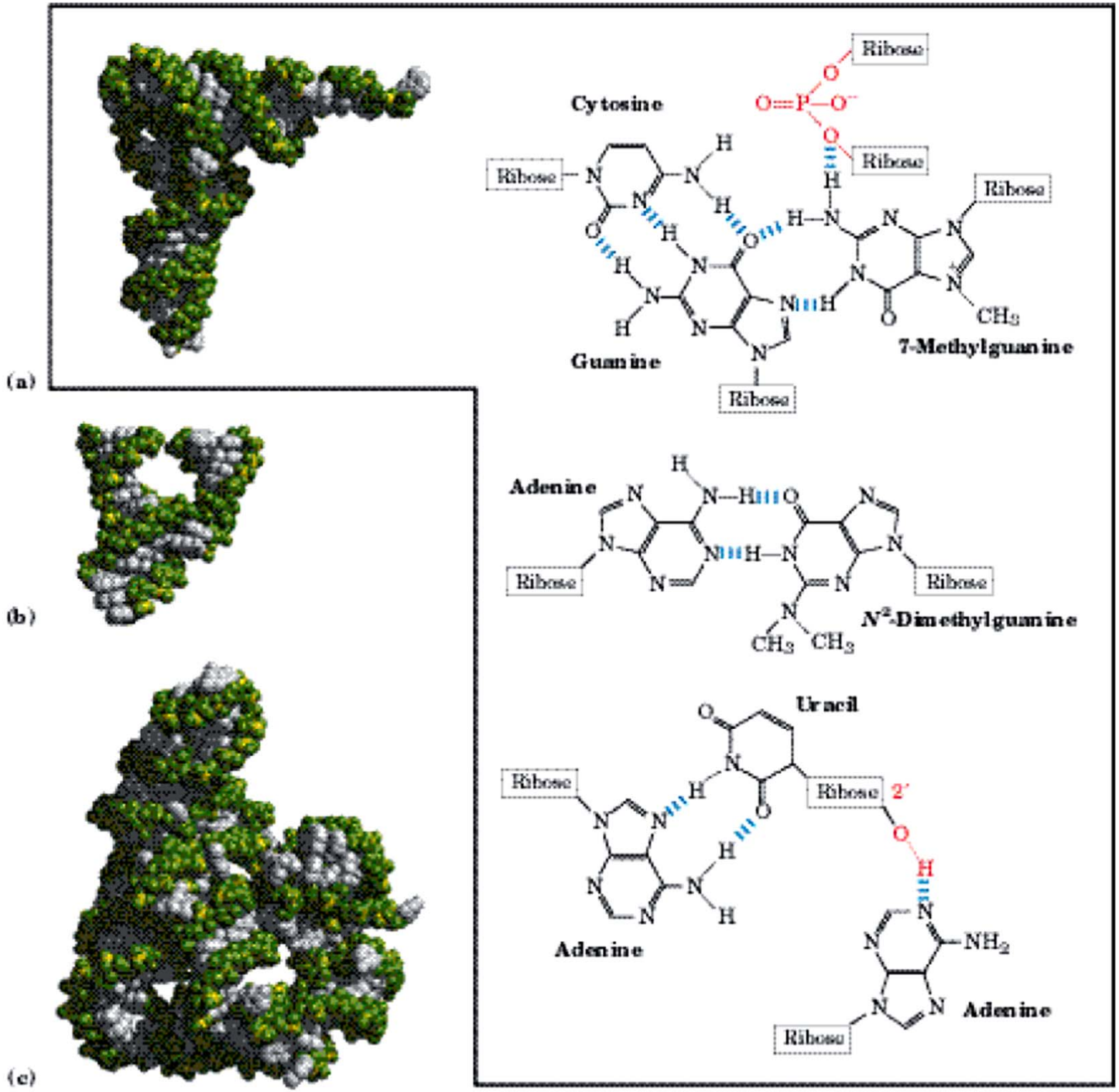


Рис. 28-13. Схематическое изображение основных этапов репликации ДНК. Существует некоторая неопределенность относительно точного места действия ДНК-гиразы.


(a)
(b)
(c)
Cytosine
Guanine
7-Methylguanine
Adenine
N^2-Dimethylguanine
Uracil
Adenine
Adenine
Ribose
2′

22. Транскрипция ДНК

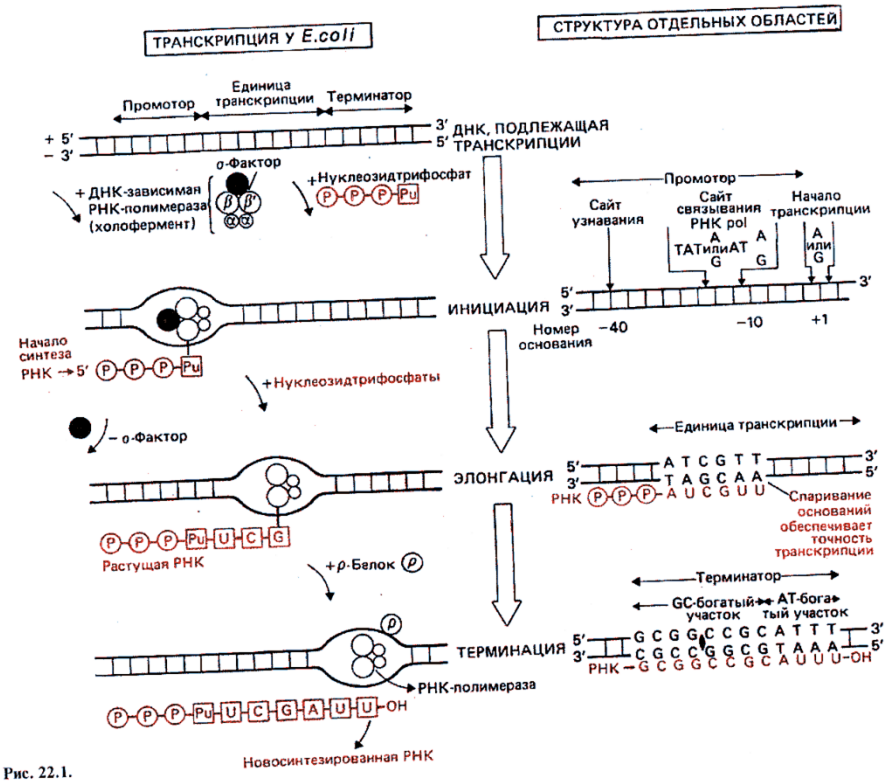


Рис. 22.1.

Транскрипция – процесс переноса генетической информации от ДНК к РНК. Все виды РНК – мРНК, рРНК и тРНК – синтезируются в соответствии с последовательностью оснований в ДНК, служащей матрицей. Транскрибируется только одна, так называемая «+»-цепь ДНК. Процесс транскрипции у прокариот и эукариот существенно различается.

ТРАНСКРИПЦИЯ У ПРОКАРИОТ

ДНК-зависимая РНК-полимераза – это фермент, катализирующий синтез РНК. Он состоит из нескольких субъединиц: двух α, одной β, одной β′ и одной σ. Их комплекс называется холоферментом ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) и имеет мол. массу ($M_r$) около 500 000. Фермент, лишенный σ-субъединицы, называется кор-ферментом ($\alpha_2\beta\beta'$).

Для инициации транскрипции необходимы холофермент, нуклеозидтрифосфат (всегда ATP или GTP) и наличие специального участка в ДНК, называемого *промотором*. Когда полимераза связывается с промотором, происходит локальное расплетание двойной спирали ДНК и образуется открытый промоторный комплекс.

Промотор – это участок молекулы ДНК, имеющий размер около 40 пар оснований и расположенный непосредственно перед участком инициации транскрипции. Синтез РНК всегда начинается с оснований A или G в «+»-цепи ДНК. Участок связывания холофермента расположен «левее» сайта инициации (в направлении 3′ → 5′ в «+»-цепи) на расстоянии примерно 10 оснований. Если сравнить последовательности оснований «+»-цепи ДНК у разных промоторов, то

полимеразы II препятствует инициации синтеза РНК. Однако у эукариот рифампицин не ингибирует синтез РНК. Специфическое ингибирующее действие на синтез РНК в животных клетках оказывает α-аманитин – токсичное начало ядовитого гриба *Amanita phalloides*. Этот ингибитор блокирует синтез матричной РНК,

Рис. 28-19. Процессинг («созревание») транскрипта рРНК у прокариот. Зрелые молекулы 16S- и 23S-рРНК образуются из более длинного предшественника – 30S-РНК в результате действия специфических нуклеаз. Перед расщеплением 30S-РНК метилируется по определенным основаниям (отмечены красными вертикальными черточками). Из средней части предшественника образуется одна молекула тРНК.

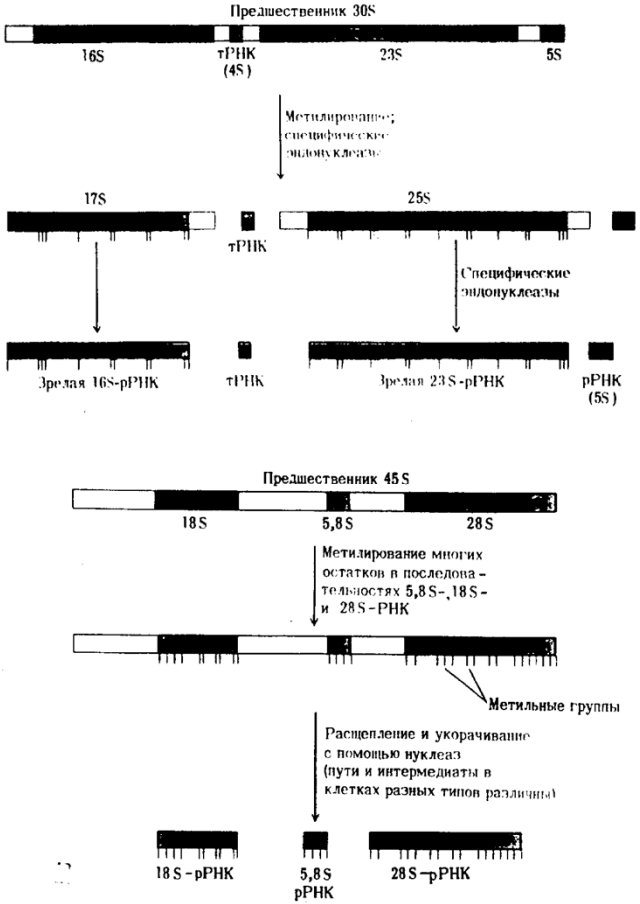


Рис. 28-20. Процессинг транскриптов эукариотических рРНК. Метилирование, представляющее собой первый этап процессинга, осуществляется по 2′-гидроксильным группам рибозных остатков в тех участках предшественника, которые сохраняются в зрелых РНК. 5S-рРНК образуется отдельно.

100 из 14 000 нуклеотидов 45S-ственника; модификации подве главным образом 2′-гидрок группы рибозных остатков. Как г на рис. 28-20, метилированная 4 претерпевает затем ряд фермент

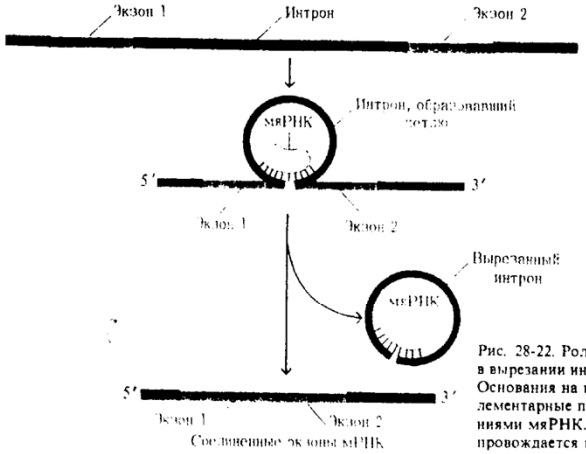


Рис. 28-22. Роль малой ядерной РНК (мяРНК) в вырезании интронов и воссоединении экзонов. Основания на концах интрона образуют комплементарные пары с определенными основаниями мяРНК. Процесс соединения экзонов сопровождается вырезанием интрона.

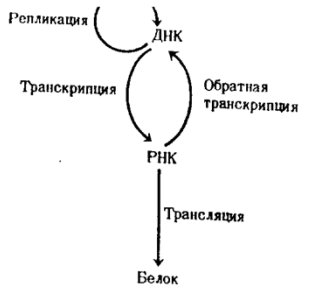


Рис. 28-25. Расширенное толкование центральной догмы молекулярной генетики, учитывающее возможность передачи генетической информации от РНК к ДНК в связи с открытием обратных транскриптаз.

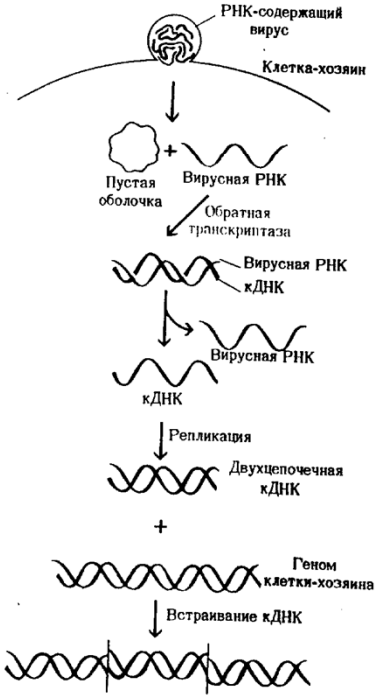


Рис. 28-24. Участие обратной транскриптазы в образовании комплементарной ДНК на вирусной одноцепочечной РНК-матрице в животной клетке. Полученная кДНК может встраиваться в геном клетки-хозяина.

А

Рис. 28-23. *А*. Схема, поясняющая процесс транскрипции. Благодаря образованию вторичной структуры новосинтезированные одноцепочечные молекулы РНК выглядят гораздо короче, чем ДНК, с которой они транскрибированы. *Б*. Электронная микрофотография рибосомных генов *Xenopus* в процессе транскрипции, осуществляемой одновременно большим числом молекул РНК-полимеразы.

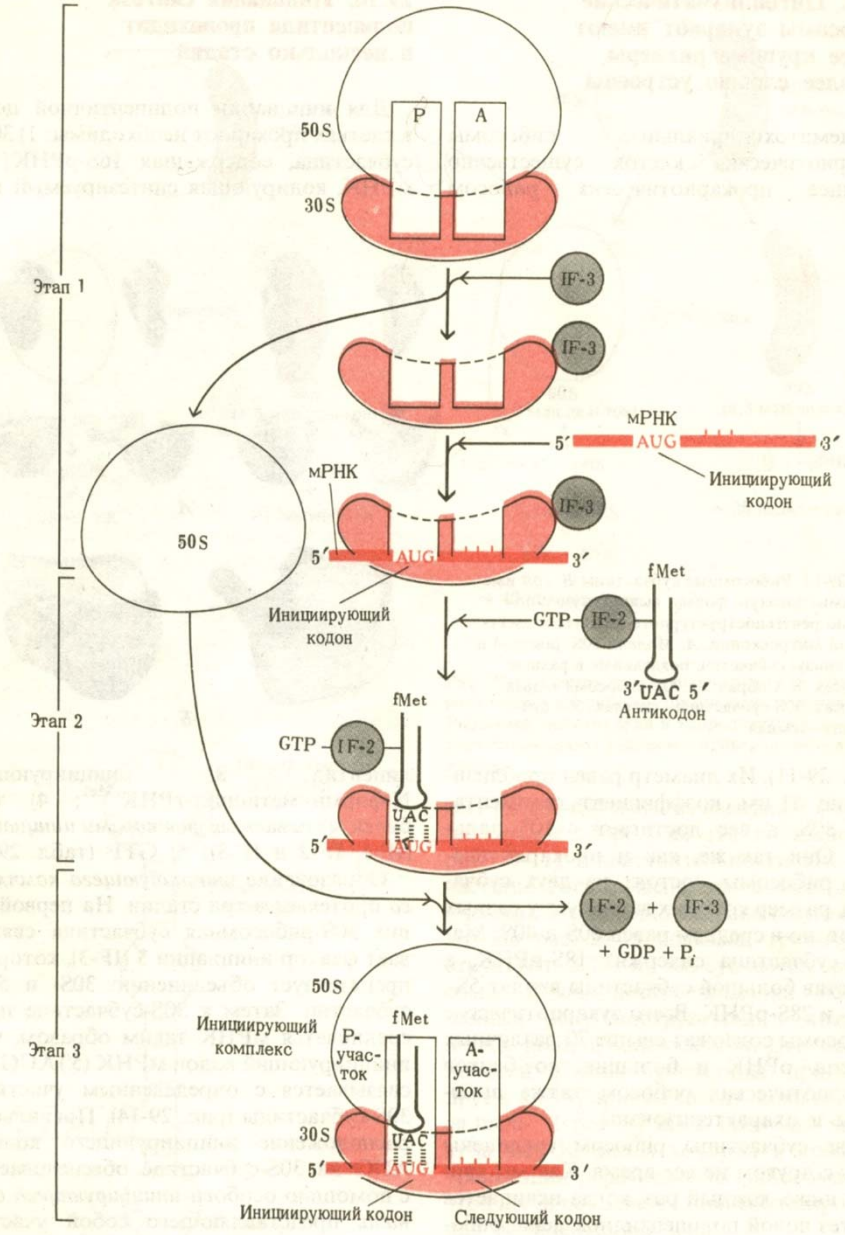


Рис. 29-14. Три стадии процесса образования инициирующего комплекса, протекающего за счет энергии гидролиза GTP до GDP и P_i. IF-1, IF-2 и IF-3 – факторы инициации. Буквами *P* и *A* обозначают соответственно пептидильный и аминоацильный участки рибосомы. Роль IF-1 до конца не выяснена.

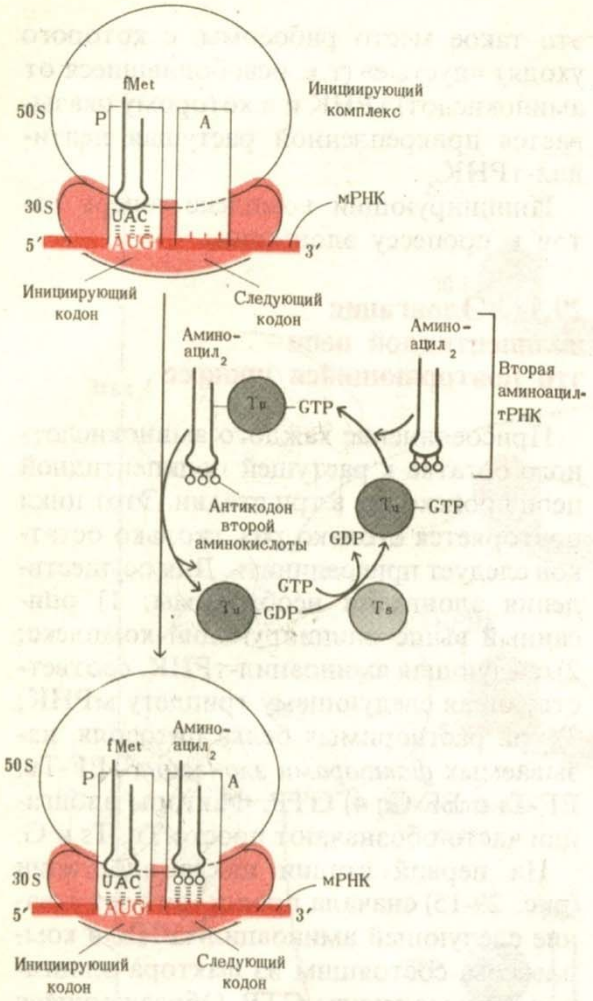


Рис. 29-15. Первая стадия элонгации – связывание второй аминоацил-тРНК, которая поступает в рибосому в комплексе с фактором элонгации Tu, содержащим связанный GTP. Присоединение второй аминоацил-тРНК сопровождается гидролизом связанного GTP. Образующийся при этом связанный GDP вновь превращается в GTP в ходе реакции, катализируемой фактором элонгации Ts. Нуклеотиды антикодона следующей аминокислоты обозначены кружками.

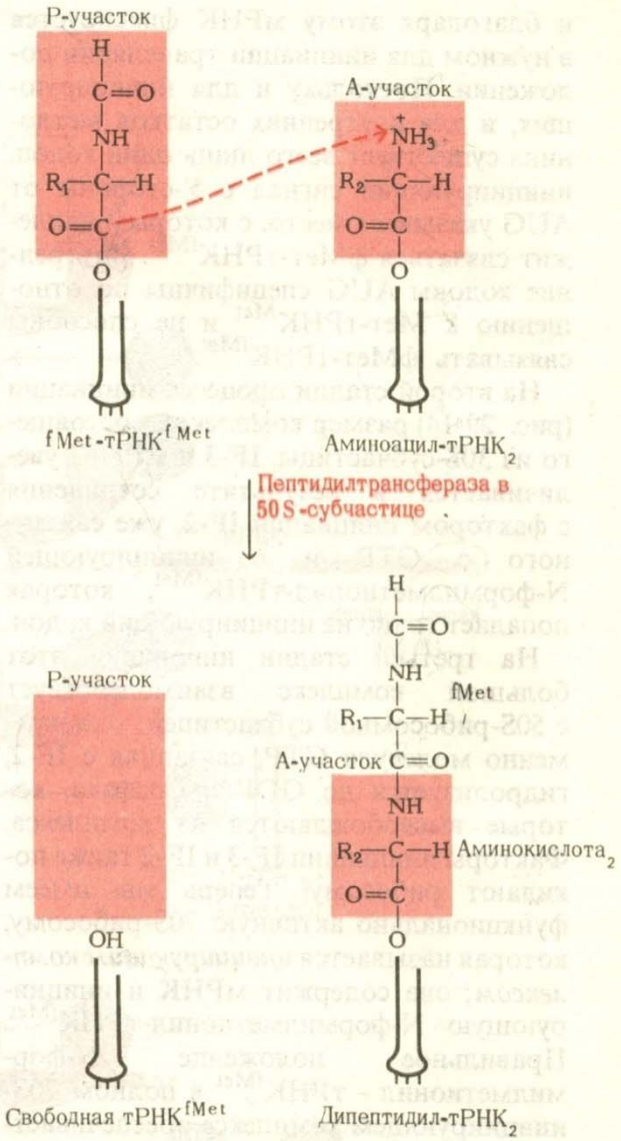


Рис. 29-16. Образование первой пептидной связи. N-формилметионильная группа переносится на аминогруппу второй аминоацил-тРНК; в результате в А-участке оказывается дипептидил-тРНК.

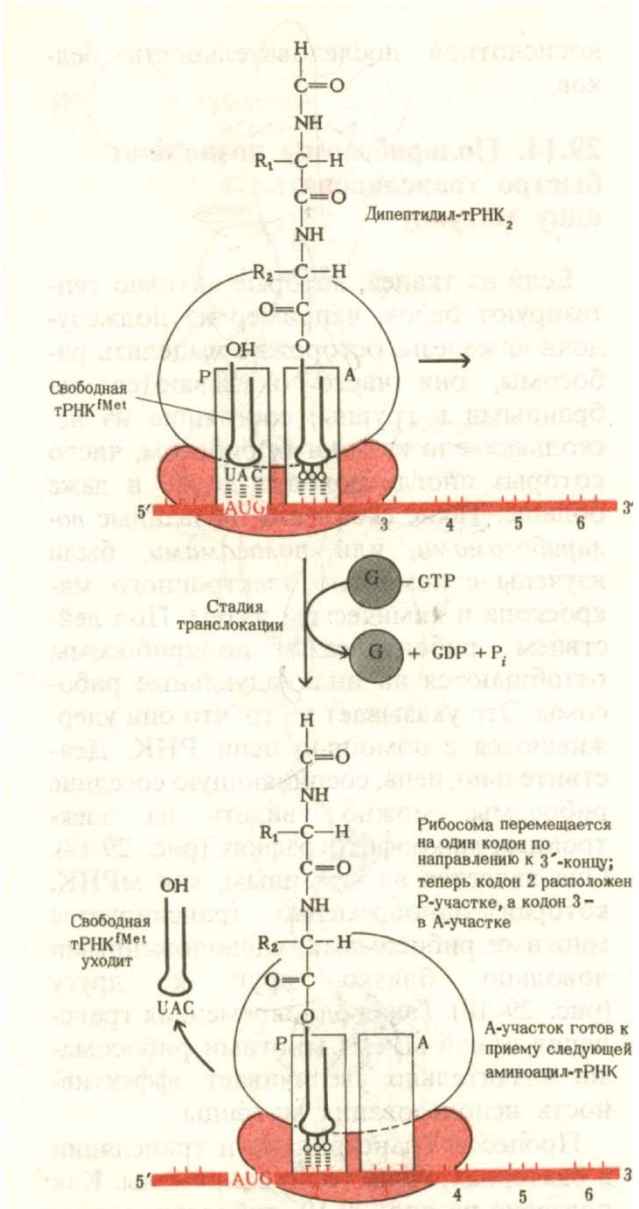


Рис. 29-17. Стадия транслокации. Рибосома передвигается на один кодон вперед в направлении 3′-конца мРНК за счет энергии, выделяющейся при гидролизе GTP, связанного с фактором элонгации G. Дипептидил-тРНК$_2$ перемещается в Р-участок рибосомы, освобождая А-участок для следующей аминоацил-тРНК$_3$.

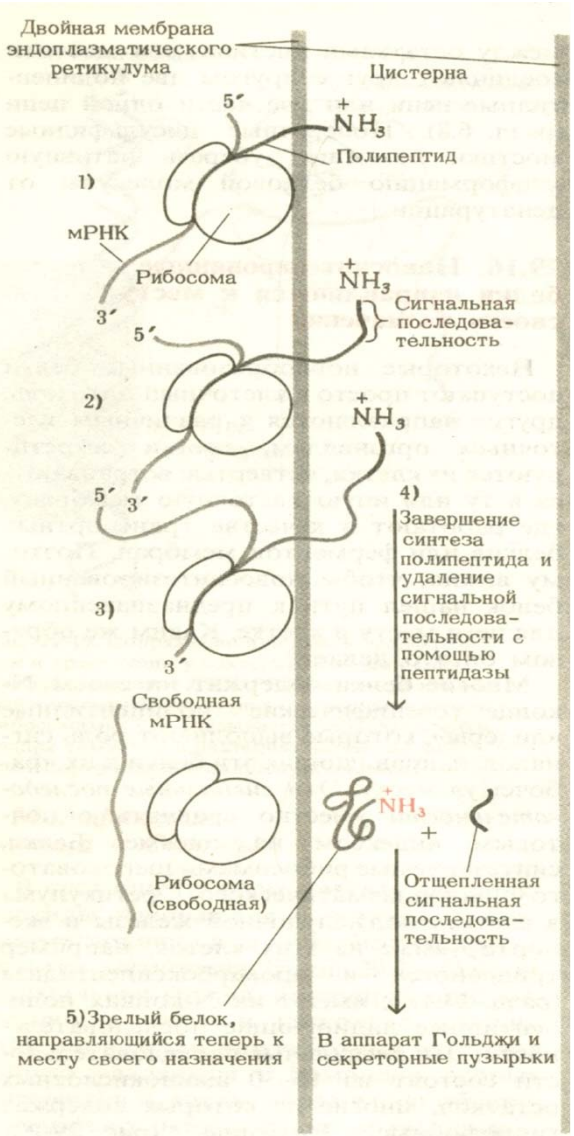


Рис. 29-20. Этапы синтеза белка, предназначенного для экспорта из клетки (*1*–*5*). Показаны образование и дальнейшие превращения сигнальной последовательности – полипептидного лидера, находящегося на N-конце многих белков, синтезируемых рибосомами шероховатого эндоплазматического ретикулума. Сигнальные последовательности помогают новообразованной полипептидной цепи проникать сквозь мембрану внутрь цистерн. Во время или после попадания полипептида в цистерну сигнальная последовательность отщепляется от него с помощью пептидазы.

23. Генетический код

Первое положение (5′-конец)	Второе положение в кодоне				Третье положение (3′-конец)
	U(T)	C	A	G	
U(T)	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA Терм. UAG Терм.	UGU Cys UGC Cys UGA Терм. UGG Trp	U(T) C A G
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg	U(T) C A G
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile *AUG Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg	U(T) C A G
G	GUU Val GUC Val GUA Val *GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly	U(T) C A G

* Инициирующий кодон

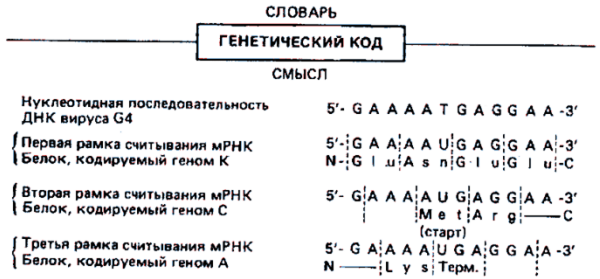


Рис. 23.1.

Генетический код связывает последовательность оснований данного гена или его РНК-транскрипта с аминокислотной последовательностью соответствующего белка.

Код триплетный, т. е. одна аминокислота задается последовательностью из трех нуклеотидов, называемой кодоном. В ДНК имеются четыре основания, а в белках – 20 аминокислотных остатков; синглетный код мог бы кодировать только четыре аминокислотных остатка, дублетный $4 \cdot 4 = 16$ аминокислот, а триплетный образует $4 \cdot 4 \cdot 4 = 64$ разных кодона.

Код не перекрывается, т. е. в последовательности оснований ABCDEFGHI первые три основания, ABC, кодируют аминокислоту 1, DEF – аминокислоту 2 и т. д. Если бы код был перекрывающимся, то последовательность ABC кодировала бы аминокислоту 1, CDE – аминокислоту 2 и т. д. Неперекрывающийся характер кода относится только к случаю, когда рамка считывания не меняется (см. ниже). В коде отсутствуют запятые, т. е. нет знаков, отделяющих один кодон от другого.

Направление чтения закодированной записи – от 5′-конца к 3′-концу мРНК, являющейся транскриптом «+»-цепи ДНК, считанным с нее в направлении 5′ → 3′. Первый с 5′-конца кодон отвечает N-концевой аминокислоте полипептидной цепи. Следовательно, белки синтезируются от N-конца к C-концу.

Таблица кода указывает, какая аминокислота кодируется тем или иным кодоном (рис. 23.1). В таблице на рис. 23.1 первый (с 5′-конца) нуклеотид помещен в левом столбце, второй – в верхней строке, а третий (на 3′-конце) – в правом столбце. Из представленных в таблице 64 кодонов 61 кодон детерминирует ту или иную аминокислоту (например, CUA отвечает лейцину Leu), а три остальных кодона являются сигналами терминации (Терм.). Эти три кодона называются нонсенс-кодонами, поскольку они не определяют никакой аминокислоты. Помимо этого, когда кодоны

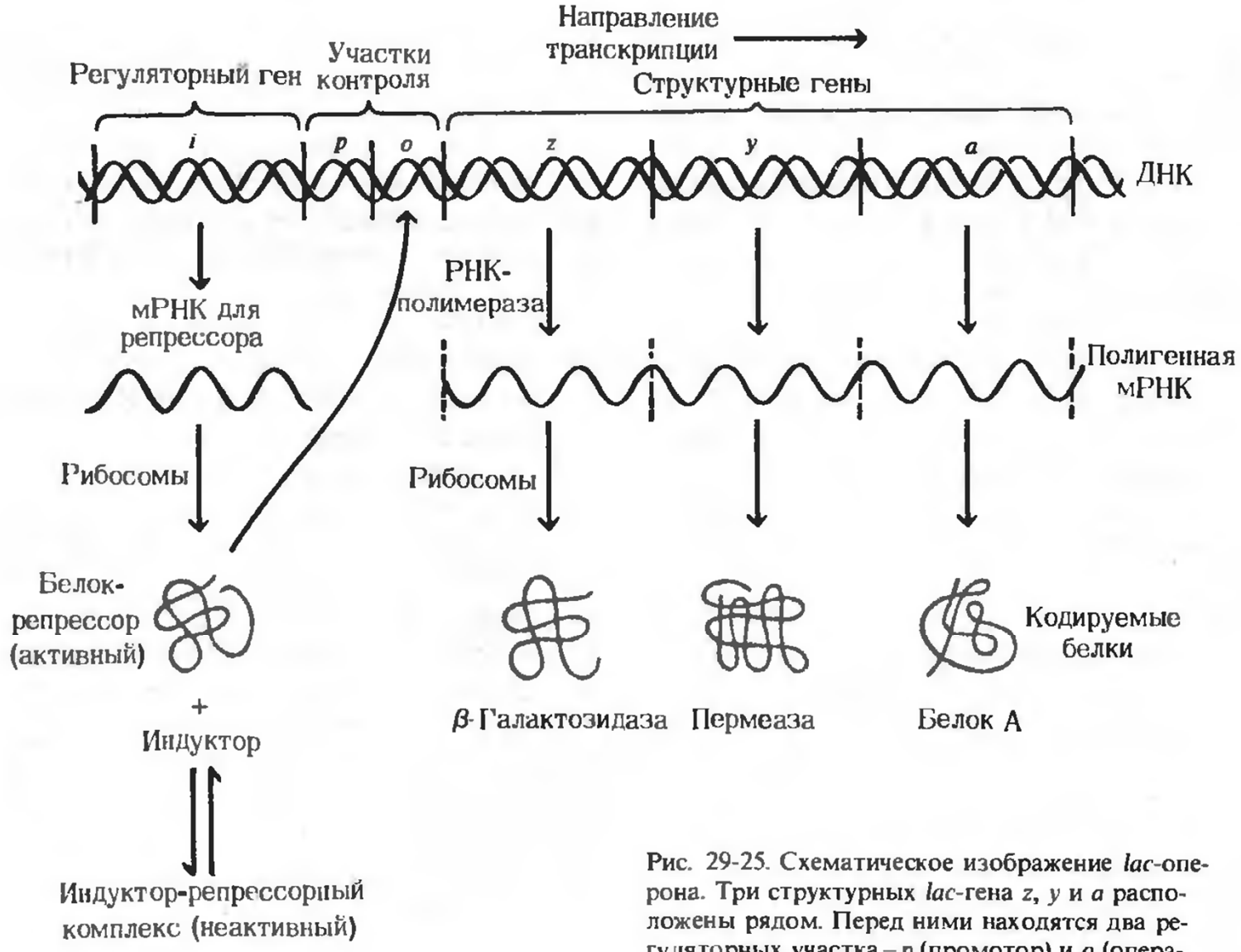


Рис. 29-25. Схематическое изображение *lac*-оперона. Три структурных *lac*-гена *z*, *y* и *a* расположены рядом. Перед ними находятся два регуляторных участка – *p* (промотор) и *o* (опера-

28. Регуляция экспрессии генов

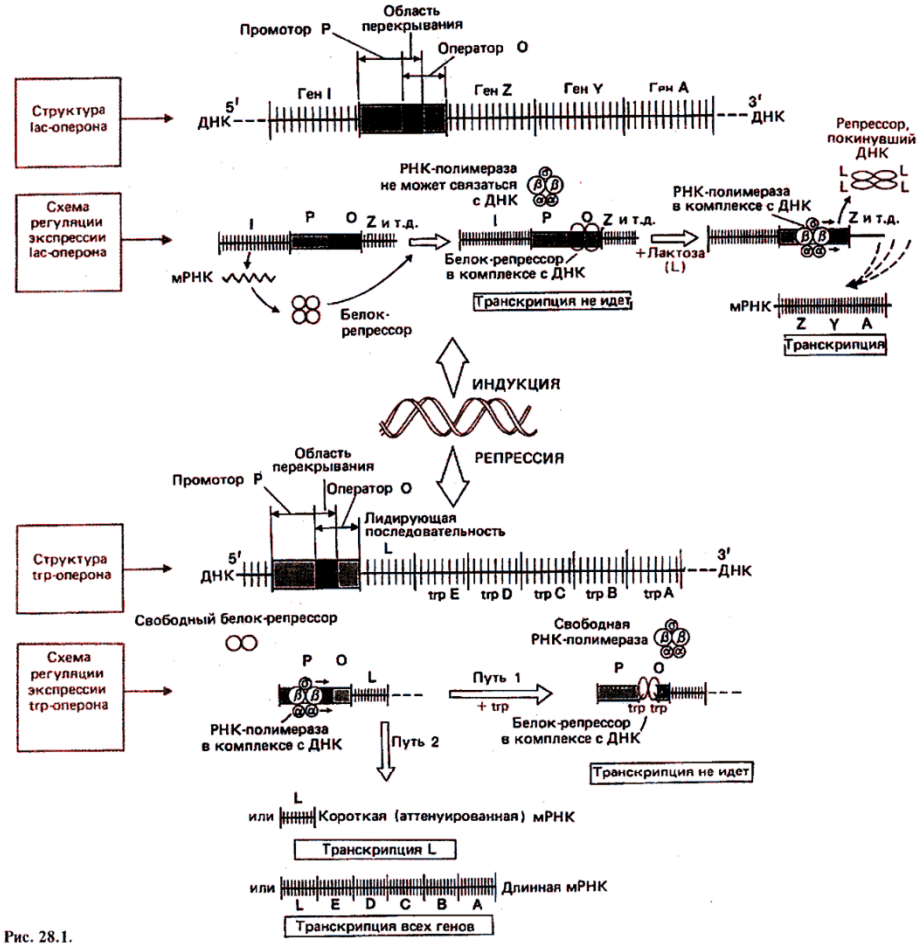


Рис. 28.1.

Экспрессия генов как у прокариот, так и у эукариот регулируется при помощи целого ряда механизмов. Некоторые из механизмов такого рода, действующие в бактериальных системах, изучены довольно хорошо, и два из них будут рассмотрены ниже, но о том, как действуют регуляторные механизмы в клетках эукариот, известно немного.

ПРОКАРИОТЫ – это простейшие одноклеточные организмы, которым для того, чтобы выжить, требуется лишь благоприятная химическая среда. Если для обеспечения жизнедеятельности клетке необходим какой-то метаболит, она должна быть способна к синтезу ферментов, которые «пристроят» его в нужное место. Однако синтезировать такие ферменты в отсут-

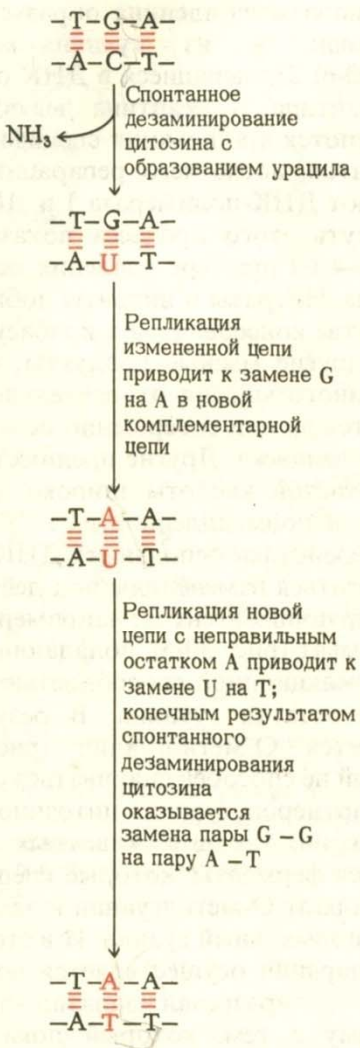


Рис. 30-3. Спонтанное превращение цитозина ДНК в урацил; такое изменение, если его не исправить, может вызвать мутацию.

остаток цитидина, который образует комплементарную пару с гуаниловым остатком, находящимся в неповрежденной цепи. Завершает репарацию ДНК ли-

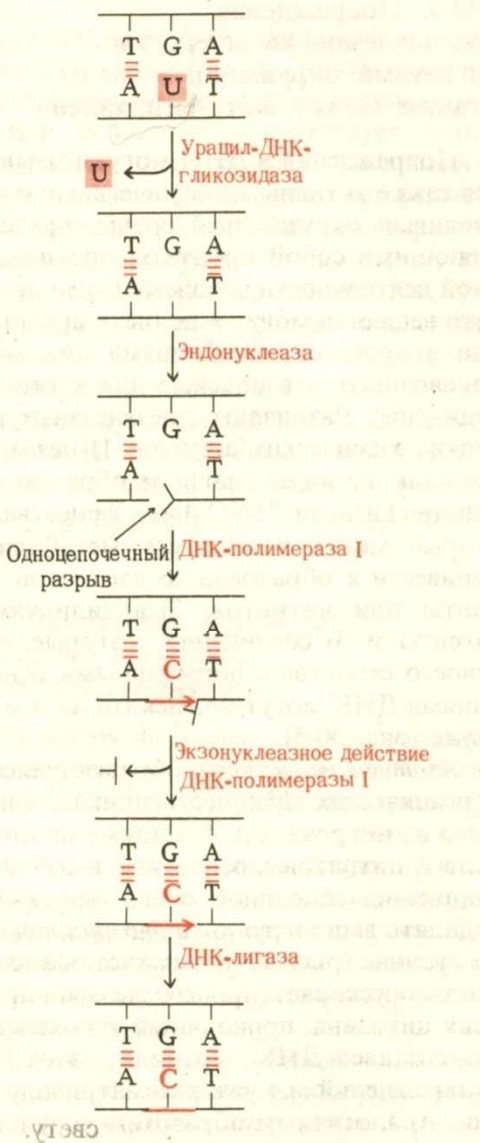


Рис. 30-4. Репарация спонтанного превращения цитозина в урацил. Урацил может быть удален при помощи ферментов, после чего лишенный основания дезоксирибозофосфат замещается на правильный остаток дезоксицитидинфосфата.

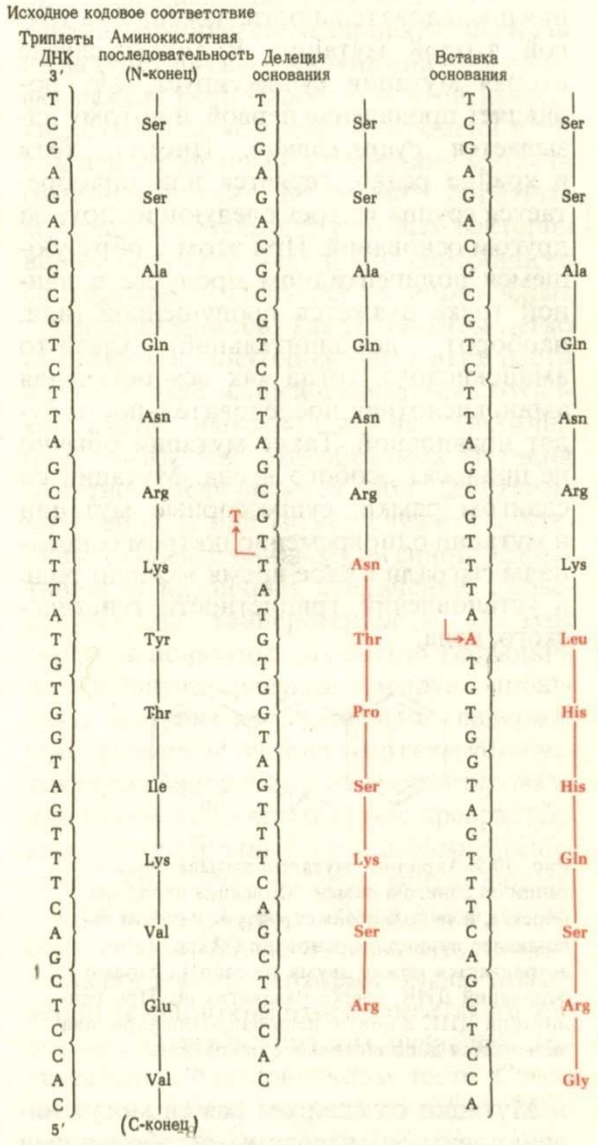


Рис. 30-8. Мутации со сдвигом рамки вызываются делецией или вставкой основания (показаны красными стрелками). Начиная с кодона, в котором потеряно или приобретено основание, аминокислотная последовательность будет полностью искажена (изображена красным цветом). Большинство мутаций со сдвигом рамки летальны.

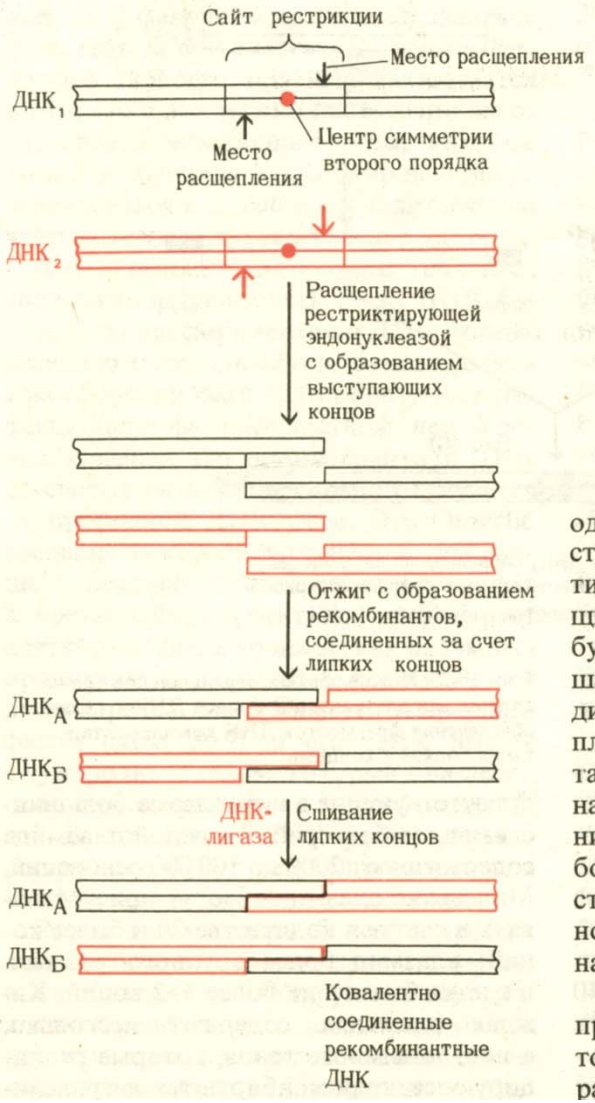
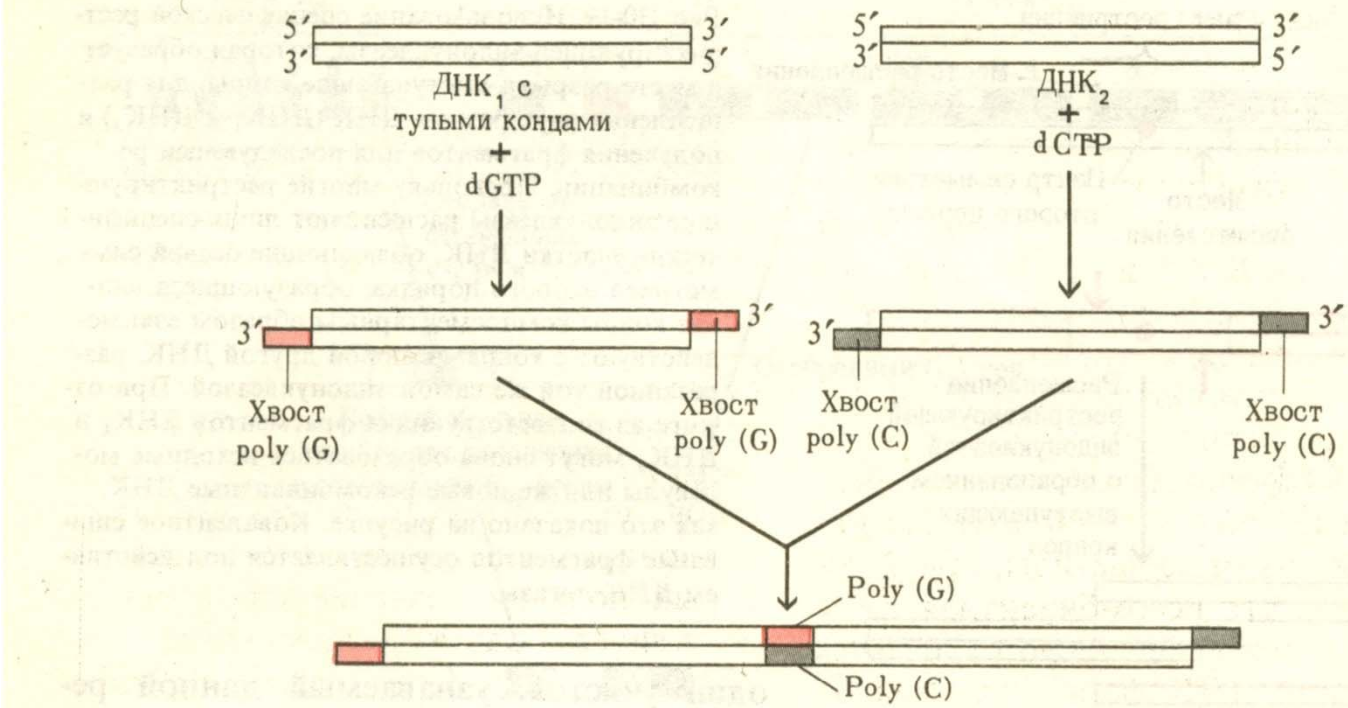


Рис. 30-19. Использование специфической рестриктирующей эндонуклеазы, которая образует в месте разрыва выступающие концы, для расщепления двух разных ДНК ($ДНК_1$ и $ДНК_2$) и получения фрагментов для последующей рекомбинации. Поскольку многие рестриктирующие эндонуклеазы расщепляют лишь специфические участки ДНК, обладающие осевой симметрией второго порядка, образующиеся липкие концы комплементарным образом взаимодействуют с концами любой другой ДНК, разрезанной той же самой эндонуклеазой. При отжиге из соответствующих фрагментов $ДНК_1$ и $ДНК_2$ могут снова образоваться исходные молекулы или же новые рекомбинантные ДНК, как это показано на рисунке. Ковалентное сшивание фрагментов осуществляется под действием ДНК-лигазы.

один участок, узнаваемый данной рестриктазой. Следовательно, нуклеотидные последовательности выступающих концов двух расщепленных ДНК будут комплементарны. Если теперь смешать эти ДНК, нагреть и медленно охладить, то их липкие концы образуют комплементарные пары оснований, в результате чего возникнет новая рекомбинантная ДНК, цепи которой имеют единичные разрывы (рис. 30-19). При обработке таких ДНК ДНК-лигазой в присутствии источников энергии образуется новая ковалентно сшитая рекомбинантная ДНК.

Другой ключевой фермент, широко применяемый для соединения фрагментов ДНК,–это терминальная трансфераза, которая способна присоединять



Рекомбинантная ДНК, собранная из двух частей, поддерживаемых вместе за счет комплементарного взаимодействия хвостов poly (C) и poly (G)

ковалентная сшивка соединенных таким образом ДНК осуществляется ДНК-лигазой.

С помощью этих и других ферментов

Рис. 30-20. Использование терминальной трансферазы для достраивания концов ДНК с целью обеспечения фрагментов ДНК комплементарными липкими концами.

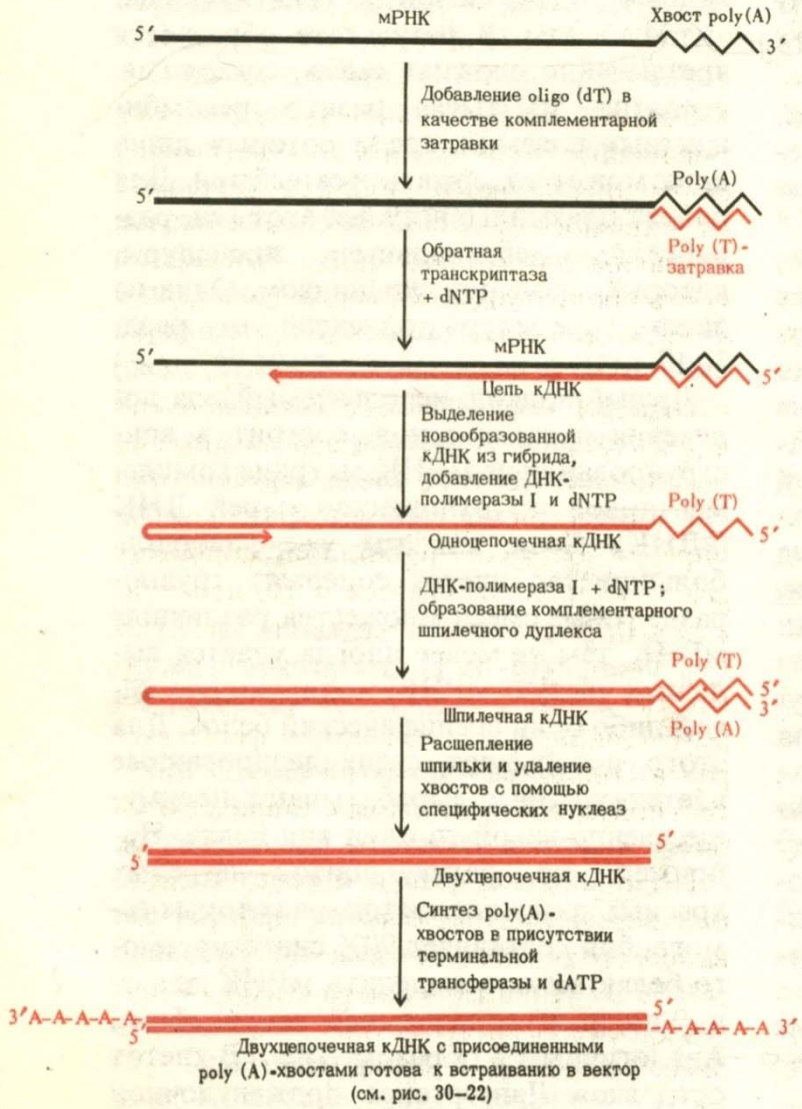
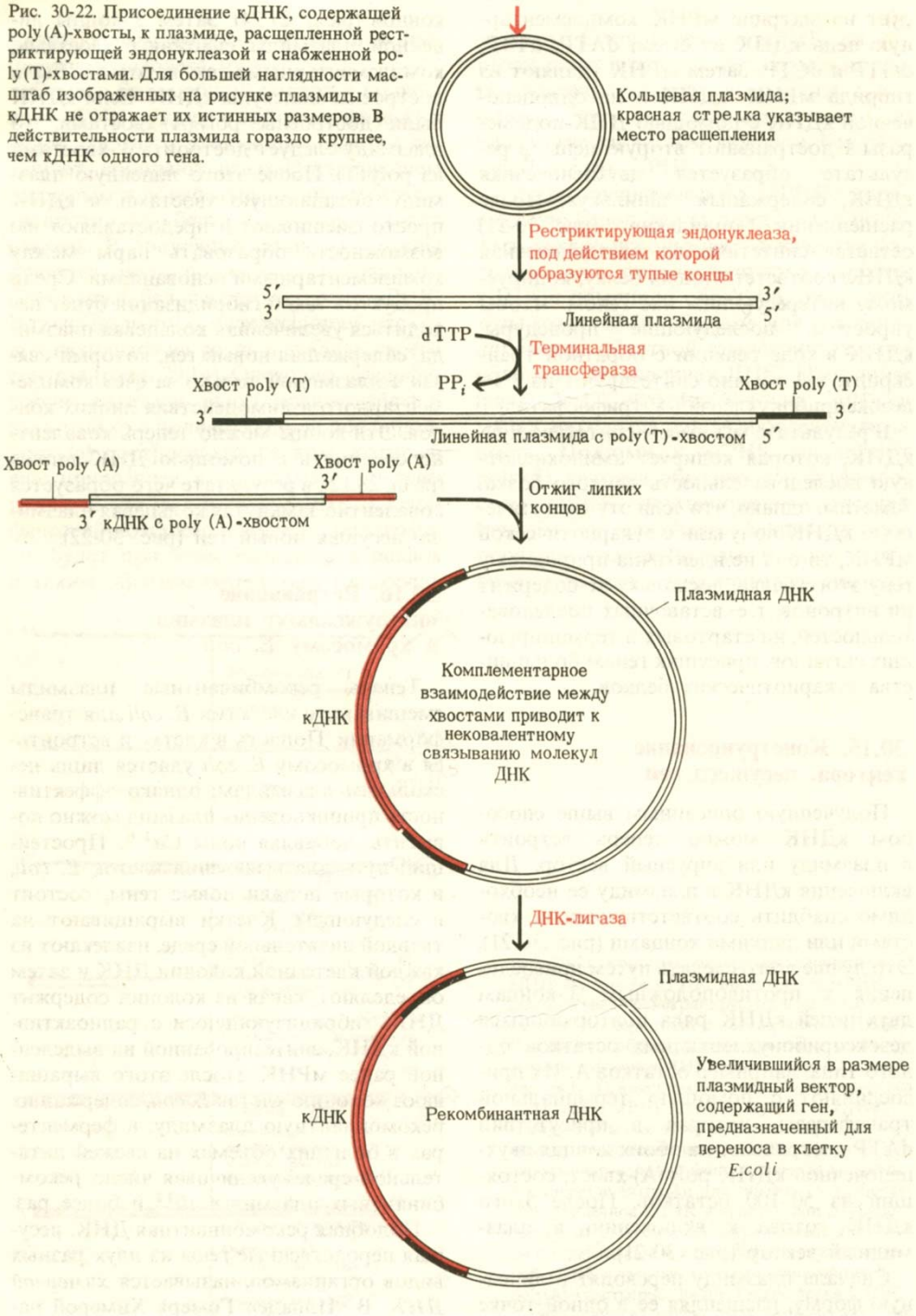


Рис. 30-21. Конструирование двухцепочечной кДНК на основе мРНК. Выделенную мРНК данного гена транскрибируют с помощью обратной транскриптазы с образованием кДНК. Для работы обратной транскриптазы необходима затравочная ДНК, роль которой выполняет poly(T), комплементарная 3′-концевому poly(A)-хвосту мРНК. Полученную цепь кДНК, которую обычно метят с помощью радиоактивных предшественников dNTP, отделяют и используют одновременно в качестве матрицы и в качестве затравки для синтеза двухцепочечной шпилечной кДНК в присутствии ДНК-полимеразы I. Затем «шпильку» расщепляют, цепи подравнивают и к полученной двухцепочечной кДНК с тупыми концами присоединяют poly(A)-хвосты(рис. 30-20). Теперь такая кДНК, несущая poly(A), может быть встроена в вектор (рис. 30-22). Для обнаружения соответствующего природного гена во фрагментированных хромосомах применяют радиоактивную кДНК.

Рис. 30-22. Присоединение кДНК, содержащей poly (A)-хвосты, к плазмиде, расщепленной рестриктирующей эндонуклеазой и снабженной poly (T)-хвостами. Для большей наглядности масштаб изображенных на рисунке плазмиды и кДНК не отражает их истинных размеров. В действительности плазмида гораздо крупнее, чем кДНК одного гена.



30. Генная инженерия: клонирование генов

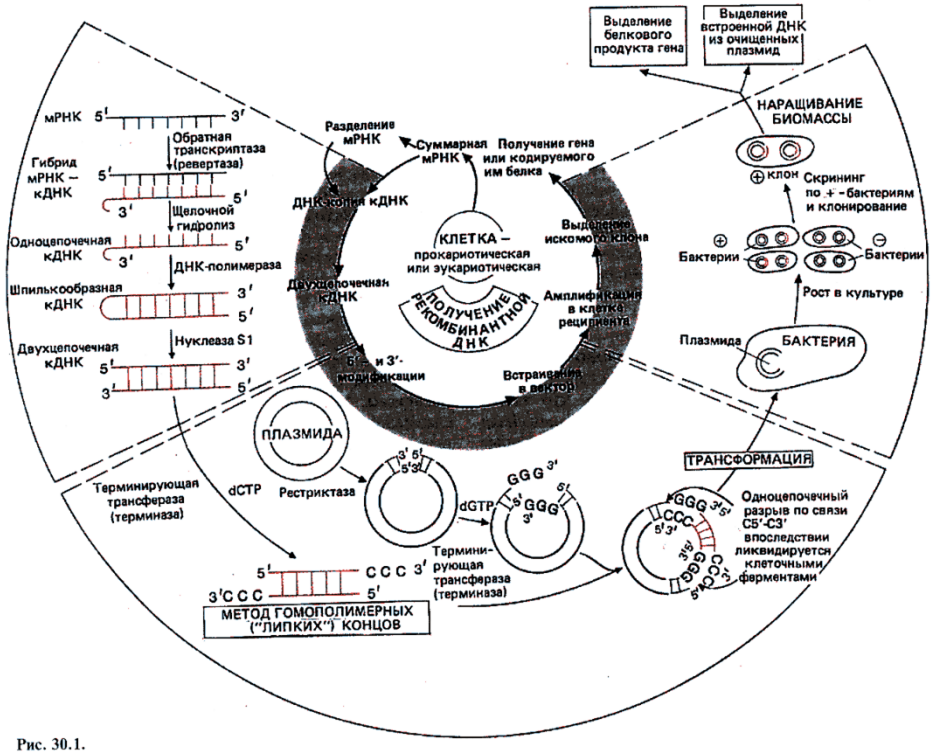


Рис. 30.1.

Клонирование генов – это процедура, включающая выделение и амплификацию отдельных генов в реципиентных клетках, про- или эукариотических. Эти клетки, содержащие нужный нам ген, можно использовать для получения либо а) большого количества белка, кодируемого данным геном, либо б) большого количества самого гена в высокоочищенном виде. В настоящее время используют две схемы клонирования гена. Согласно первой из них, геномную ДНК сначала расщепляют случайным образом с помощью рестрицирующих эндонуклеаз (см. ниже) на небольшие фрагменты примерно такой же длины, что и ген. Далее каждый фрагмент вводят с помощью вектора в реципиентную клетку, которая затем размножается, амплифицируя при этом ген или гены, содержащиеся в данном фрагменте. К этой методике мы больше возвращаться не будем. Согласно второй схеме, с информационной РНК, выделяемой из однотипных клеток организма, снимают ДНК-копии (кДНК), которые затем вводят в реципиентные клетки, в среднем по одному гену на клетку, и амплифицируют тем же способом, что и в первом случае.

Реципиентные клетки, т. е. клетки, выбранные для клонирования гена, могут быть как про-, так и эукариотическими. Чаще всего для этой цели используют бактерии, поскольку их легко получать в большом количестве. Если, однако, ген был выделен из клеток млекопитающих по первой методике, то его нужно клонировать в клетках эукариот, например в клетках дрожжей, из-за неспособности ДНК, содержащей интроны (гл. 27), экспрессироваться в прокариотической клетке. Рассмотрим теперь вторую методику.

Матричную (информационную) РНК (мРНК) выделяют из клеток или тканей, в которых экспрессиру-