

ФЕРМЕНТЫ МОДИФИКАЦИИ ДНК

ПОДГОТОВИЛА МАРТЫНОВА Д.А.

ФЕРМЕНТЫ МОДИФИКАЦИИ ДНК

Ферменты модификации ДНК в настоящее время научились синтезировать искусственно и применять для воздействия на ДНК таким образом, каким нам необходимо.

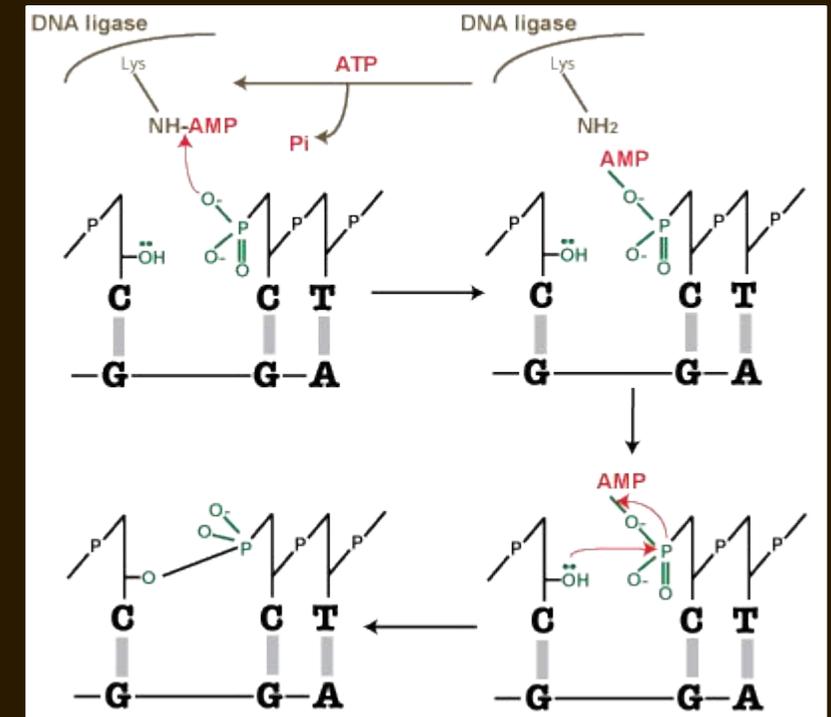
К этой группе белков относят:

- **лигазы** (соединяют фрагменты нуклеиновой кислоты);
- **фосфатазы** (удаляют концевые фосфатные группы нуклеиновой кислоты);
- **киназы** (фосфорилируют концы нуклеиновой кислоты);
- **полимеразы и обратные транскриптазы** (осуществляют синтез и удлинение цепи нуклеиновой кислоты);
- **трансферазы** (катализируют присоединение групп атомов или нуклеотидов к нуклеиновой кислоте);
- **нуклеазы** (специфически или неспецифически гидролизуют нуклеиновые кислоты);
- **другие белки** (альбумин, ингибиторы рибонуклеаз, агароза, протеиназа К, пирофосфатаза)
- **фосфотрансферазы**

ДНК-лигазы вирусов, бактерий, млекопитающих соединяют 5'-фосфатную и 3'-гидроксильную группы нуклеотидов, находящихся на противоположных концах одноцепочечного разрыва в дуплексе ДНК. В результате образуется фосфодиэфирная связь, ликвидирующая этот разрыв.

Для образования фосфодиэфирной связи между концами нуклеотидных цепей ДНК-лигазы используют энергию гидролиза АТФ (либо NAD). Реакция протекает в три стадии.

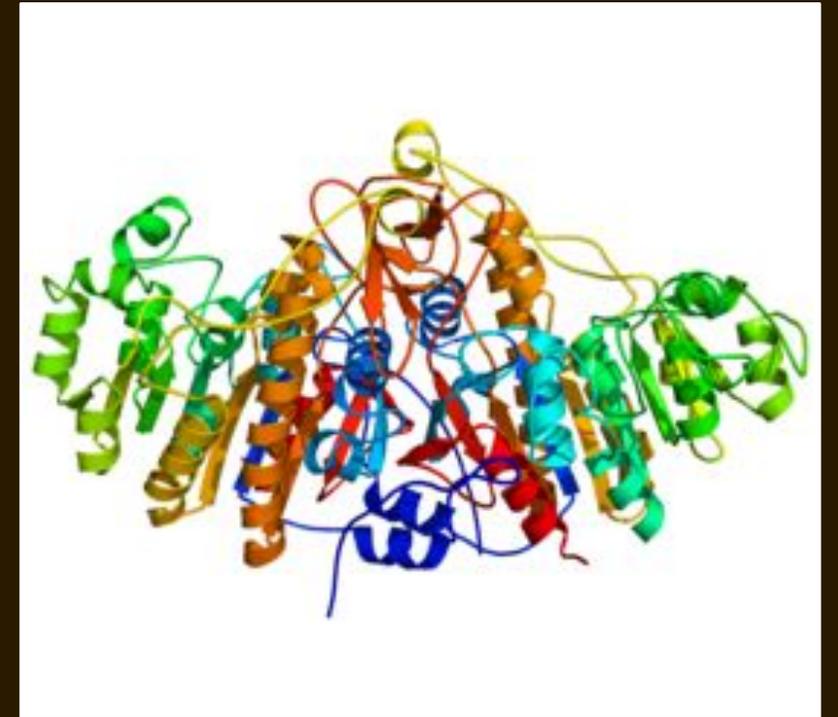
ЛИГАЗЫ



ФОСФАТАЗ Ы

Это фермент гидролаза, отщепляющая фосфат от нуклеотидов, белков и алкалоидов.

Наиболее часто щелочная фосфатаза применяется для удаления фосфатных групп с 5'-концов фрагментов ДНК, полученных в результате гидролиза эндонуклеазами рестрикции. Поскольку дефосфорилированные концы не сшиваются ДНК-лигазой, то такая обработка позволяет предотвратить самолигирование фрагментов ДНК, например, плазмидных векторов, предназначенных для последующего клонирования.



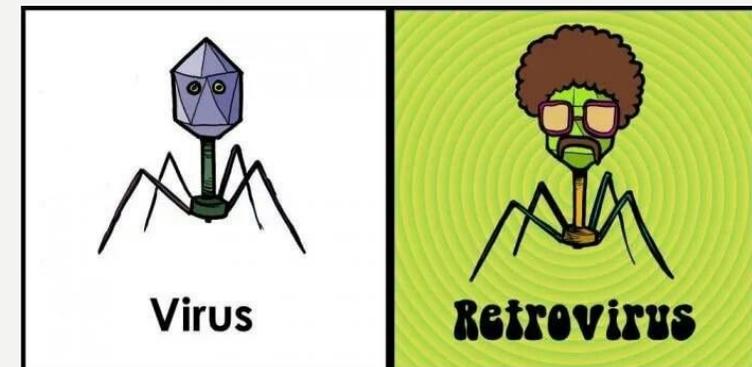
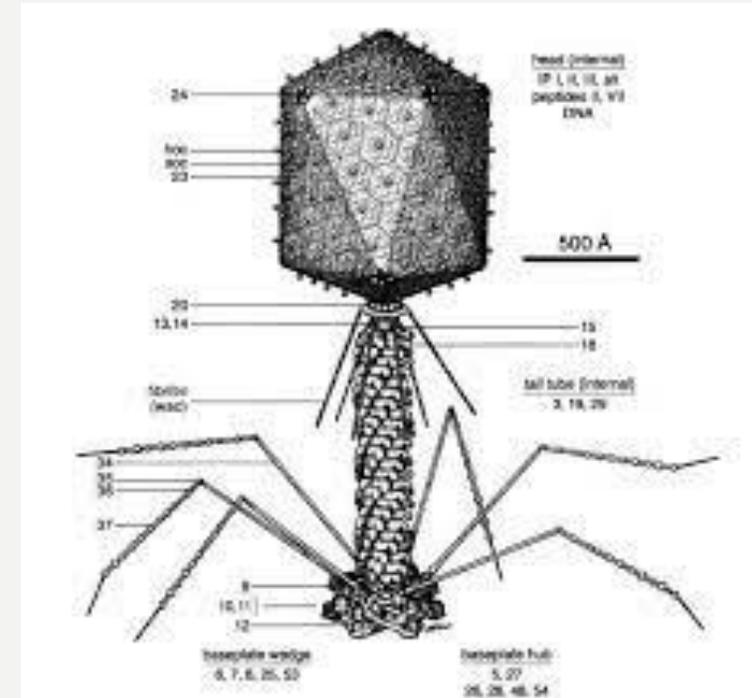
Димер щелочной фосфатазы бактерий. Синим выделен N-конец, красным — C-конец

КИНАЗЫ

Полинуклеотидкиназа катализирует передачу гамма-фосфата из АТФ в 5'-ОН-группу одно- и двухцепочечных ДНК и РНК, олигонуклеотидов или нуклеозидных 3'-монофосфатов (прямая реакция). Реакция обратима.

Иными словами, киназы осуществляют действие обратное фосфатазам, то есть присоединяют фосфатную группу к 5' концу ДНК (РНК).

Полинуклеотидкиназа бактериофага Т4 используется для введения радиоактивной метки в ДНК (РНК) с целью получения радиоактивно меченных зондов или секвенирования НК.

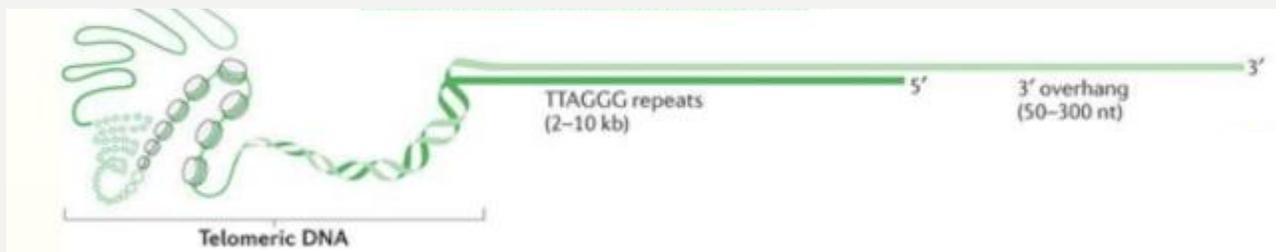
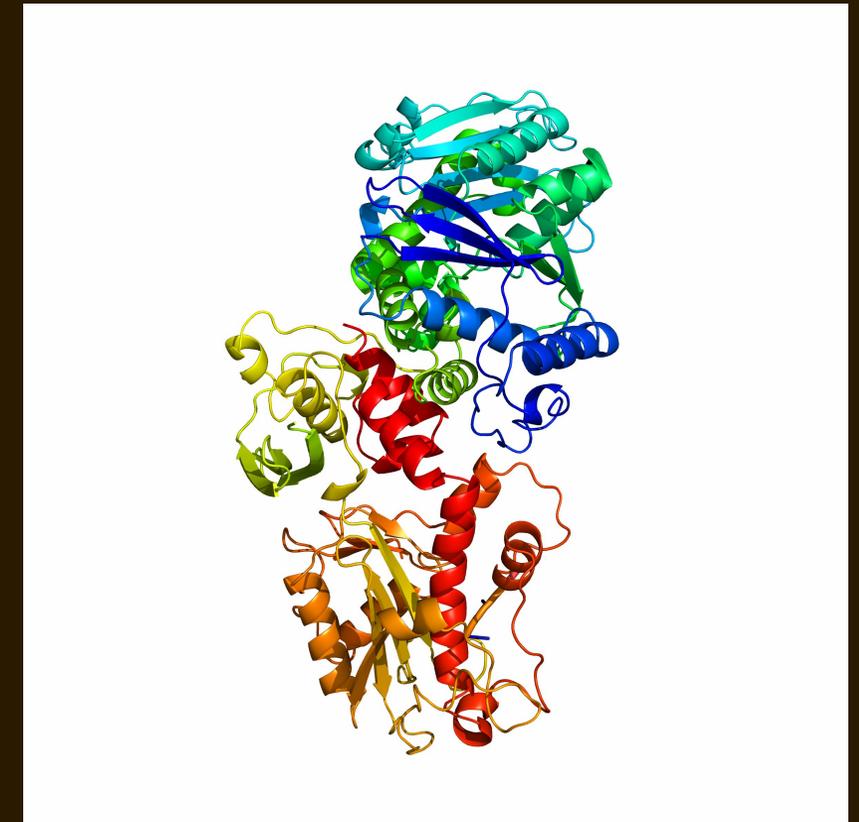


ДНК-полимераза Т4 - матрично-зависимая ДНК-полимераза, которая катализирует синтез 5'-3' из праймированной одноцепочечной ДНК. Фермент обладает 3'-5' экзонуклеазной активностью, но не обладает 5'-3' экзонуклеазной активностью.

Т4 ДНК-полимераза выделена из штамма *E. coli*, содержащего рекомбинантную плазмиду.

Оптимальная температура работы Т4 ДНК-полимеразы 37 °С.

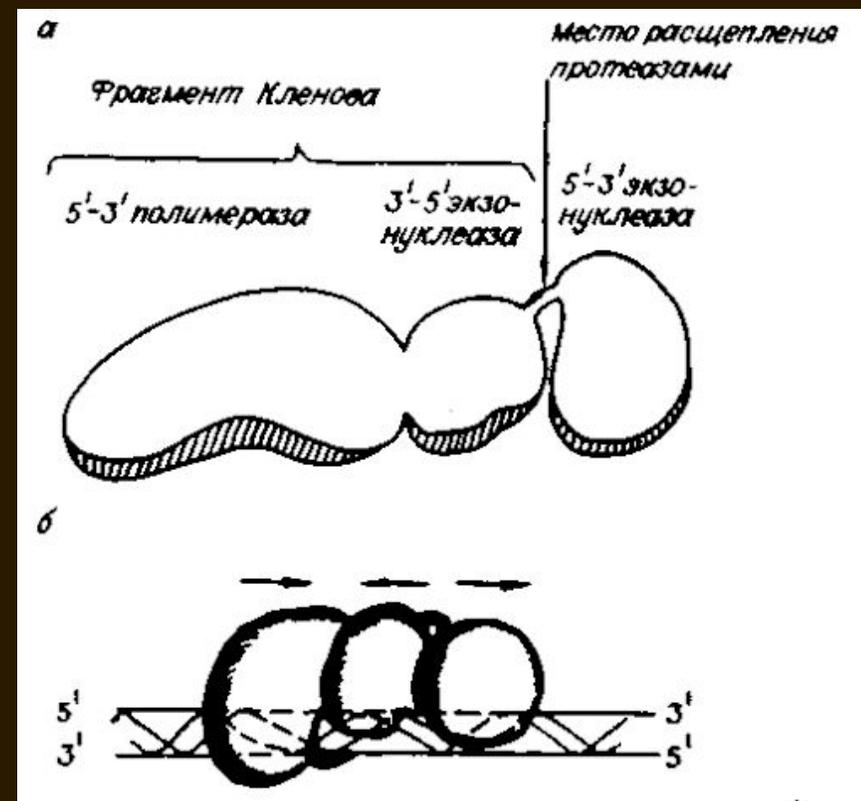
Т4 ДНК-ПОЛИМЕРАЗА



Это большой белковый фрагмент, образующийся при ферментативном расщеплении ДНК-полимеразы I из *Escherichia coli* протеазой субтилизином (subtilisin). Впервые фрагмент Кленова был описан в 1970 году, и имел 5' → 3'-полимеразную активность в сочетании с 3' → 5'-экзонуклеазной активностью (корректорной), но не имел 5' → 3'-экзонуклеазной активности.

- На данный момент используется для маркировки ДНК ("fill-in" 3' укороченных концов с помощью "random hexamers"), для секвенирования ДНК методом Сэнгера и для синтеза второй цепи ДНК.

ФРАГМЕНТ КЛЁНОВА





**СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ!**