БИОТЕХНОЛОГИЯ

Курс лекций для студентов IV курса факультета биологии РГПУ им. А.И. Герцена

Направление 050100 Педагогическое образование

Профиль 01 Биологическое образование

Профессор кафедры Зоологии д.б.н., проф. Цымбаленко Надежда Васильевна

- **Базис молекулярной биотехнологии (МБТ)**
- **I. Биологические системы, использующиеся в МБТ**
- **Прокариоты: Escherichia coli и др. микроорганизмы**
- **а) как источники специфических генов**
- **б) созданные генноинженерными методами для решения определенных задач**
- **Эукариоты: дрожжи Sacharomyces cerevisiae и др; культуры эукариотических клеток.**
- **II. Фундаментальные знания**
- **о структуре ДНК, РНК и белка**
- **о процессах репликации ДНК, транскрипции и синтеза белка**
- **о механизмах регуляции процессов воспроизведения в потомстве и реализации генетической информации**
- **III. Технология рекомбинантных ДНК**
- **Рестрицирующие эндонуклеазы и другие ферменты-инструменты генной инженерии**
- **Плазмидные ДНК и создание векторов клонирования и экспрессии ДНК в клетках прокариот и эукариот**
- **Разработка методов создания и скрининга геномных библиотек**
- **Методы генетической трансформации прокариот и эукариот**
- **Методы молекулярной биологии и молекулярной генетики**

- ***Технология рекомбинантных ДНК*** ***(ее называют также молекулярным клонированием или генной инженерией) — это совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала (дезоксирибонуклеиновой кислоты, ДНК) из одного организма в другой (Глик Б. и Пастернак Дж).***

- ***По Баеву А.А. генетическая инженерия - конструирование in vitro функционально активных генетических структур (рекомбинантных ДНК), или иначе - создание искусственных генетических программ.***
-

- ***Генетическая инженерия*** ***- получение новых комбинаций генетического материала путем проводимых вне клетки манипуляций с молекулами нуклеиновых кислот и переноса созданных конструкций генов в живой организм, в результате которого достигается их включение и активность в этом организме и у его потомства.***

- ***Цель прикладной генетической инженерии заключается в конструировании таких рекомбинантных молекул ДНК, которые при внедрении в генетический аппарат придавали бы организму свойства, полезные для человека.***

Биотехнология

Технология рекомбинантной ДНК

Промышленная биотехнология

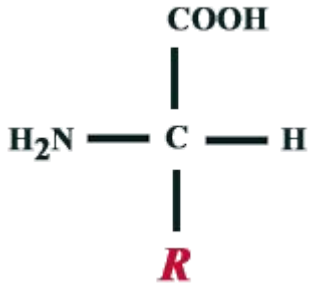
- **Что такое молекулярная биология**

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

α

- # Структура белков
- ***Белки - это нерегулярные полимеры, мономерами которых являются L-аминокислоты.***
- Помимо L - аминокислот, входящих в белки, в организме есть и D-аминокислоты, которые в белки не включаются

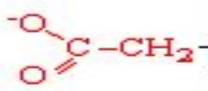
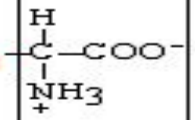
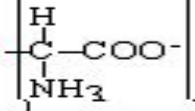
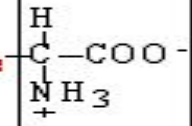
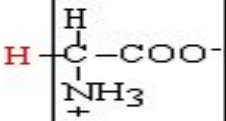
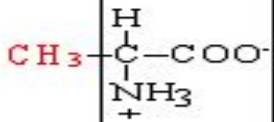
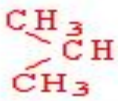
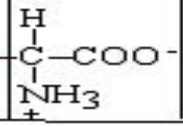
Во всех аминокислотах имеется аминогруппа. Отсюда и название – “ά- аминокислоты”. В пролине – ά -иминогруппа



- **Классификация аминокислот, входящих в состав белков, по принципу полярности (неполярности) радикала**
- **1. *Неполярные или гидрофобные радикалы.***
- **Алифатические - *аланин, валин, лейцин, изолейцин*.**
  Серусодержащий *метионин*.
  Ароматические - *фенилаланин, триптофан*.
  Иминокислота - *пролин*.
- **2. *Полярные, но незаряженные радикалы.***
- ***Глицин*.**
  Оксиаминокислоты - *серин, треонин, тирозин*.
  Содержащий сульфгидрильную группу *цистеин*.
  Содержащие амидную группу: *аспарагин, глутамин*.
- **3. *Отрицательно заряженные радикалы.***
- ***Аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота*.**
- **4. *Положительно заряженные радикалы.***
- ***Лизин, аргинин, гистидин***

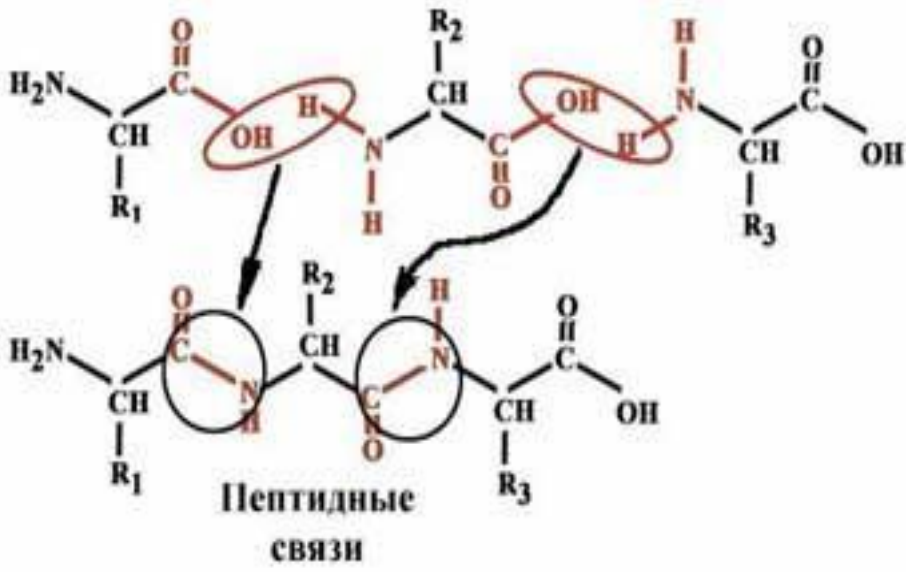
- .

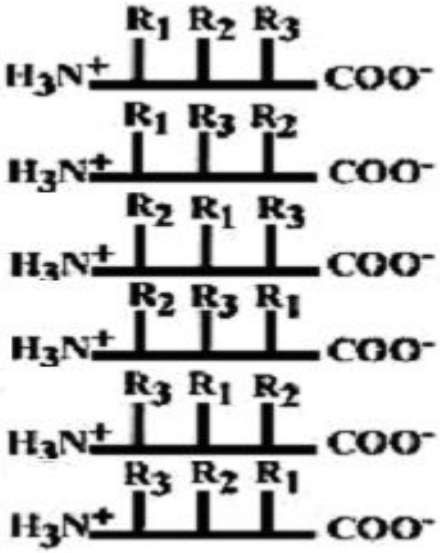
- **Индекс гидрофобности указывает на сродство радикала к воде, т.е. на его растворимость в водных растворителях. Положительные значения индекса имеют аминокислоты, которые плохо растворимы в воде – гидрофобные, а отрицательный – которые хорошо растворимы, т.е. гидрофильные.**

Name	Symbol		R group		Hydro-phobicity
	3 Lett.	1 Lett.			
Aspartate	Asp	D			-3.5
Glutamate	Glu	E			-3.5
Glutamine	Gln	Q			-3.5
Glycine	Gly	G			-0.4
Alanine	Ala	A			1.8
Valine	Val	V			4.2

Первичная структура белка

- ***Первичная структура белка*** **- *это последовательность расположения аминокислотных остатков в полипептидной цепи***
- **Аминокислоты соединяются в полипептид с помощью ковалентных пептидных (амидных) связей. У трипептида, состоящего из трех разных аминокислот, возможно 3! = 6 различных первичных структур. 20!, это ≈ 2х10 в степени 18.**

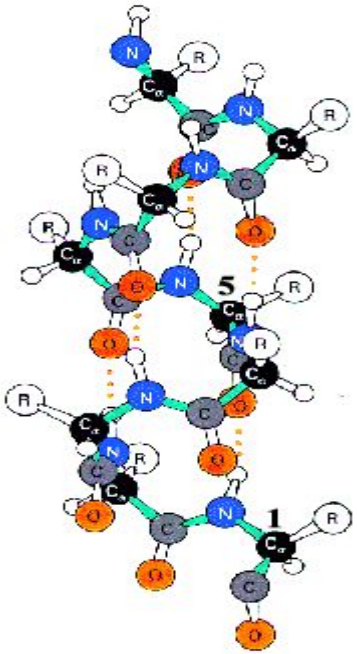


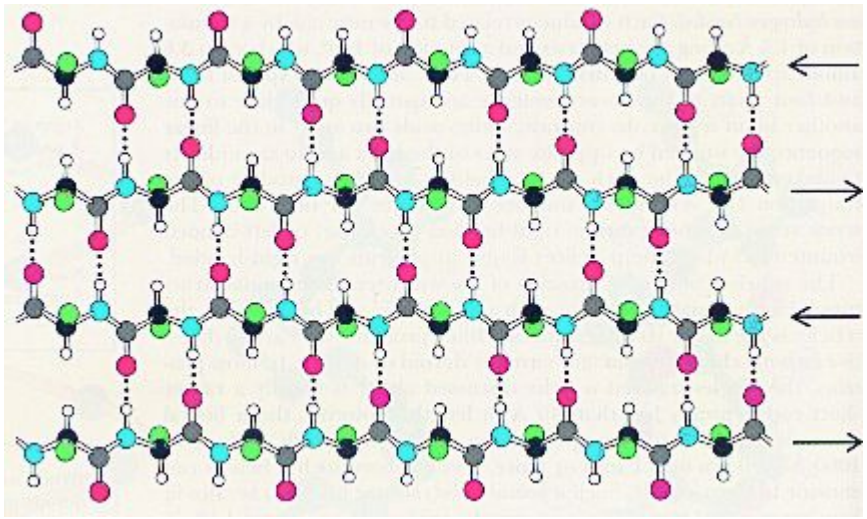


Вторичная структура белка

- ***Вторичная структура белка - это упорядоченное строение полипептидных цепей, обусловленное водородными связями между группами C=O и N-H разных аминокислот.***
- ***Вторичная структура может быть регулярной***
- ***α-спиралью и нерегулярной β-складчатой структурой***

- Чистых природных альфа - или бета - белков не существует

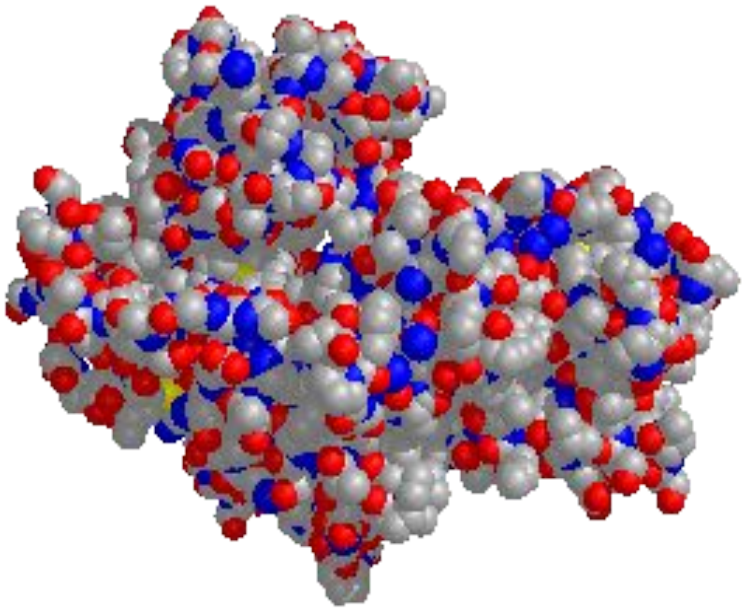




Третичная структура белка

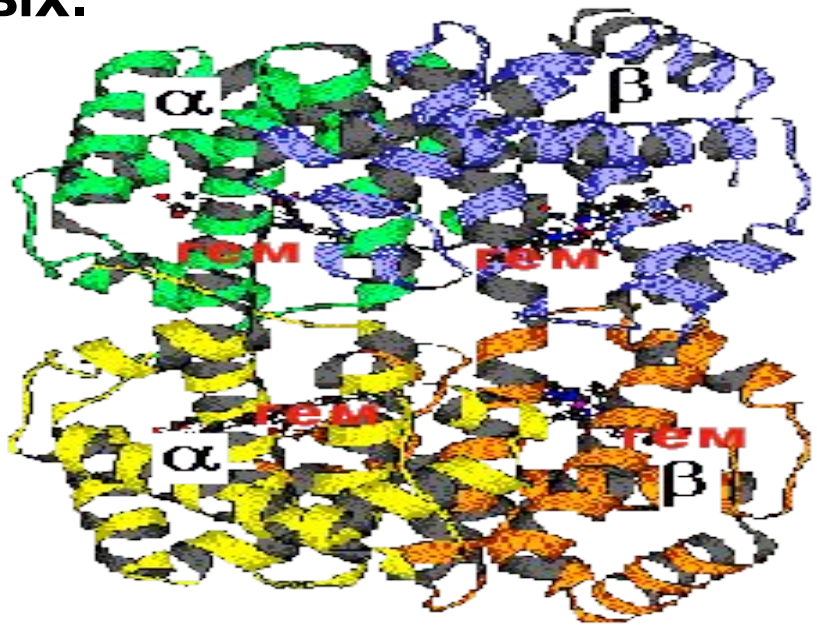
- **Третичная структура белка - это пространственная конформация полипептида, имеющего вторичную структуру, и обусловленная взаимодействиями между радикалами.**
- **Существует четыре типа взаимодействий между радикалами:**
- **1. *Ковалентные связи* между остатками двух цистеинов(дисульфидные мостики).**
- **2. *Ионные (электростатические*) взаимодействия между противоположно заряженными аминокислотными остатками.**
- **3. *Водородные связи.* Участвуют все аминокислоты, имеющие гидроксильные, амидные или карбоксильные группы.**
- **4. *Гидрофобные взаимодействия.* Образуются между неполярными радикалами в водной среде.**

- *Третичная структура полностью задается первичной.*
- **Определяющими являются гидрофобные взаимодействия в силу неизбирательности (неспецифичности) и многочисленности.**
- **Гидрофобное ядро существует у большинства белков.**



Четвертичная структура белка

- *Четвертичная структура - это агрегация двух или большего числа полипептидных цепей, имеющих третичную структуру, в олигомерную функционально значимую композицию*
- **Связи, образующие и поддерживающие четвертичную структуру, те же самые, что и при образовании третичной структуры, кроме гидрофобных.**



Глобулярные белки

- 95% белков имеют гидрофобное ядро.

Подавляющее число глобулярных белков растворимо.

- **Фибриллярные белки**
- **´5% природных белков – фибриллярные.**
- **Фибриллярные белки содержат большую долю заряженных аминокислот, чем глобулярные - отдельные цепи растворимы, а их комплексы неполярны и нерастворимы.**
- **Три типа структуры фибриллярных белков**
- ***β – слой (β-кератин шелка)***
- ***α – спираль (тропомиозин)***
- ***коллагеновая спираль***
- **Большинство фибриллярных - нерастворимо (α-кератины - на их долю приходится почти весь сухой вес волос, шерсти, рогов, копыт, ногтей, чешуи, перьев; коллаген - белок сухожилий, хрящей; фиброин - белок шелка).**

Функции белков

- ***Белок - это отдельный полипептид или агрегат нескольких полипептидов, выполняющий биологическую функцию.***

- ***Полипетид - понятие химическое. Белок - понятие биологическое.***

- ***<u>Например</u>,* иммуноглобулин состоит из четырех полипептидных цепей, которые по отдельности не являются белками, белок - только их функциональный агрегат.**

1. Структурная функция

Белки входят в состав всех клеточных органелл: мембранных и немембранных.

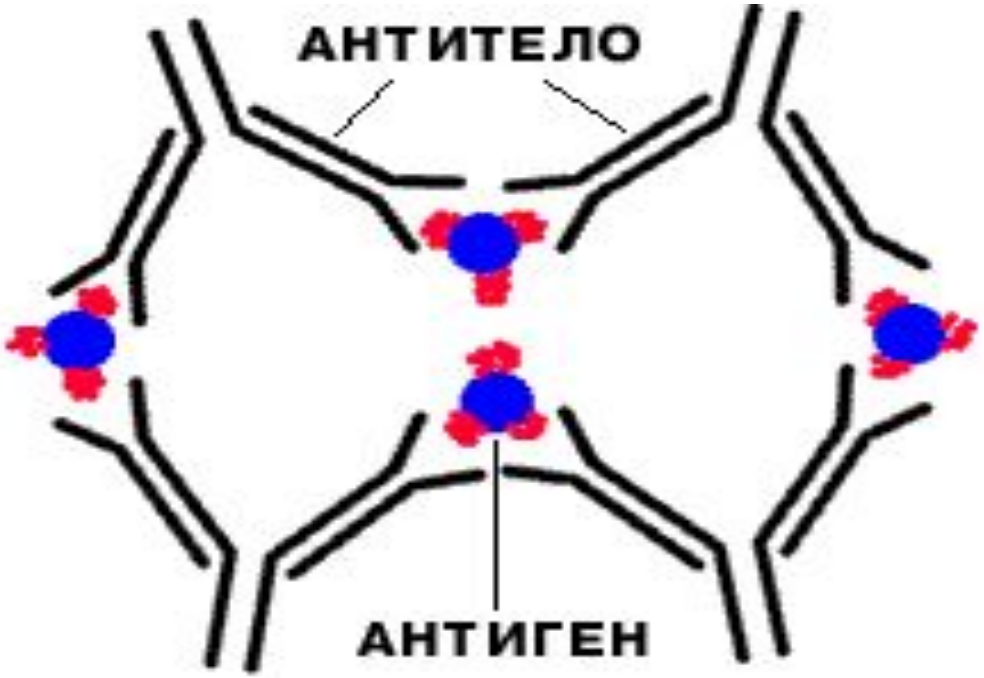
Структурная функция

2. Каталитическая функция.

- Все ферменты - белки. Эта функция в 1982 году перестала считаться уникальной. Выяснилось, что некоторые РНК тоже обладают каталитической активностью. Их называют РНКзимами.

3. Защитная функция (пока уникальна). Антитела - это белки. Иммуноглобулины "склеивают" антигены и образуется преципитат.

- .

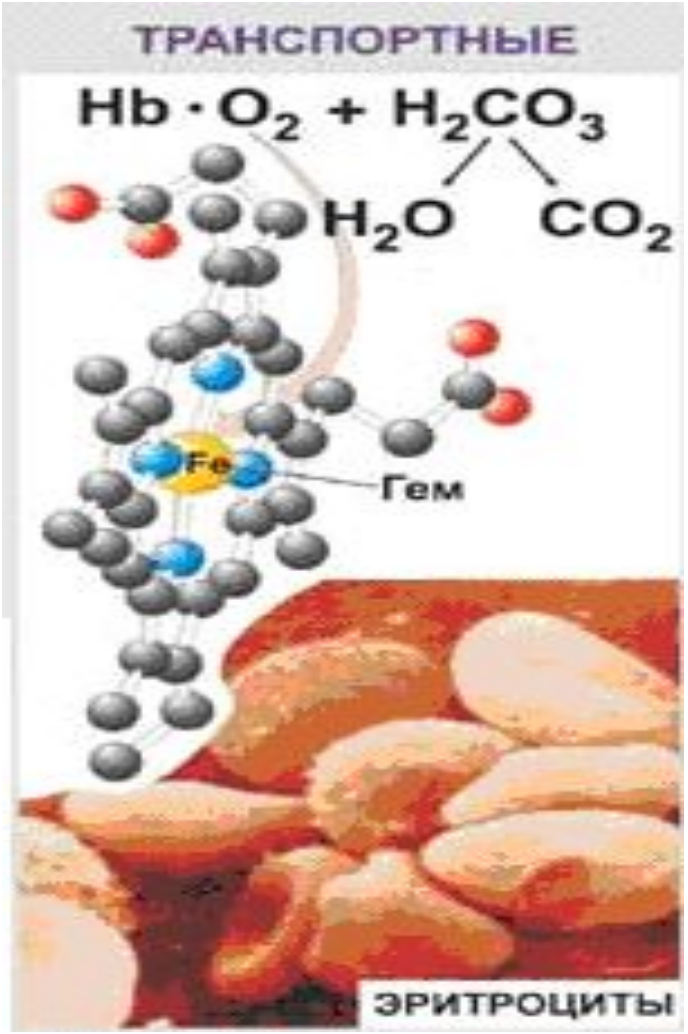


- **4. Регуляторная функция.**
- **На клеточном уровне: белки - репрессоры и белки - активаторы транскрипции. На организменном уровне: некоторые гормоны - белки.**

- **5. Трансформация энергии.**
- **Белки сетчатки глаза родопсин и ретинен трансформируют световую энергию в электрическую. Актино-миозиновые комплексы в мышцах преобразуют энергию химических связей в механическую.**

6. Транспортная функция.

Гемоглобин осуществляет транспорт кислорода и углекислого газа. Трансферрин - транспорт железа.



- **7. Энергетическая функция.**
- **11 из 20 аминокислот, входящих в состав белков, в организме человека "сгорают" с выделением энергии. Это - заменимые аминокислоты. Они могут быть синтезированы в клетке из продуктов расщепления углеводов и липидов .**
- **8. Питательная функция.**
- **а) Поставка незаменимых аминокислот (9 из 20). Понятие "заменимые и незаменимые аминокислоты" - видоспецифическое и касается только животных и грибов.**
- **б) Запасные белки для развития зародыша и вскармливания младенца. Например, казеин - белок молока, овальбумин - яичный белок, глиадин - белок зерен пшеницы.**
- **9. Буферная функция. Любой белок - амфотерный полиэлектролит. Белки способствуют поддержанию определенных значений pH в разных отсеках клетки, обеспечивая этим компартментализацию.**

ФЕРМЕНТЫ

Фермент – белок, который увеличивает скорость биохимической реакции, т.е. работает как катализатор.

Субстрат (S) **– молекула, которая после взаимодействия с *ферментом (E)* превращается в *продукт (P).***

Активный центр фермента **– особый участок E, где может связываться S с образованием *ES-комплекса*.**

EX – комплекс **ES в переходном состоянии.**

- **Фермент увеличивает скорость реакции:**
- **1. Понижая свободную энергию переходного состояния путем стабилизации активированного комплекса.**
- **2. Увеличивая энергию S при образовании ES.**
- **3. Поддерживая микроокружение активного центра в состоянии, отличном от такового в водной среде.**
- **4. Ориентация атомов и групп в необходимом порядке.**
- **Ингибиторы – молекулы, которые при связывании с ферментом блокируют какую-то стадию ферментативной реакции.**
- **Ингибирование бывает обратимым (конкурентноспособным) и необратимым (неконкурентноспособным).**

- # КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

По рекомендации International Union of Biochemistry и Molecular Biology (IUBMB) предложена классификация ферментов на основе типов, катализируемых реакций.

1. Оксидоредуктазы. Катализ окислительно-восстановительных реакций: *дегидрогеназы, оксидазы, редуктазы и каталазы*.

2. Трансферазы. Катализ переноса различных групп (ацетильная, метильная, фосфатная и т.д.): *ацетилтрансферазы, метилазы, протеинкиназы и полимеразы* (синтез ДНК и РНК).

3. Гидролазы. Катализ реакций гидролиза – распад молекулы на две или более меньших размеров: *протеазы* (разрушение молекул белков), *нуклеазы* (ДНК- и РНК-экзонуклеазы и эндонуклеазы), *фосфотазы* (дефосфорилирование).

4. Лиазы. **Катализ разрыва связи C–C, C-O, C-S и C-N без гидролиза: *декарбоксилазы и альдолазы*.**

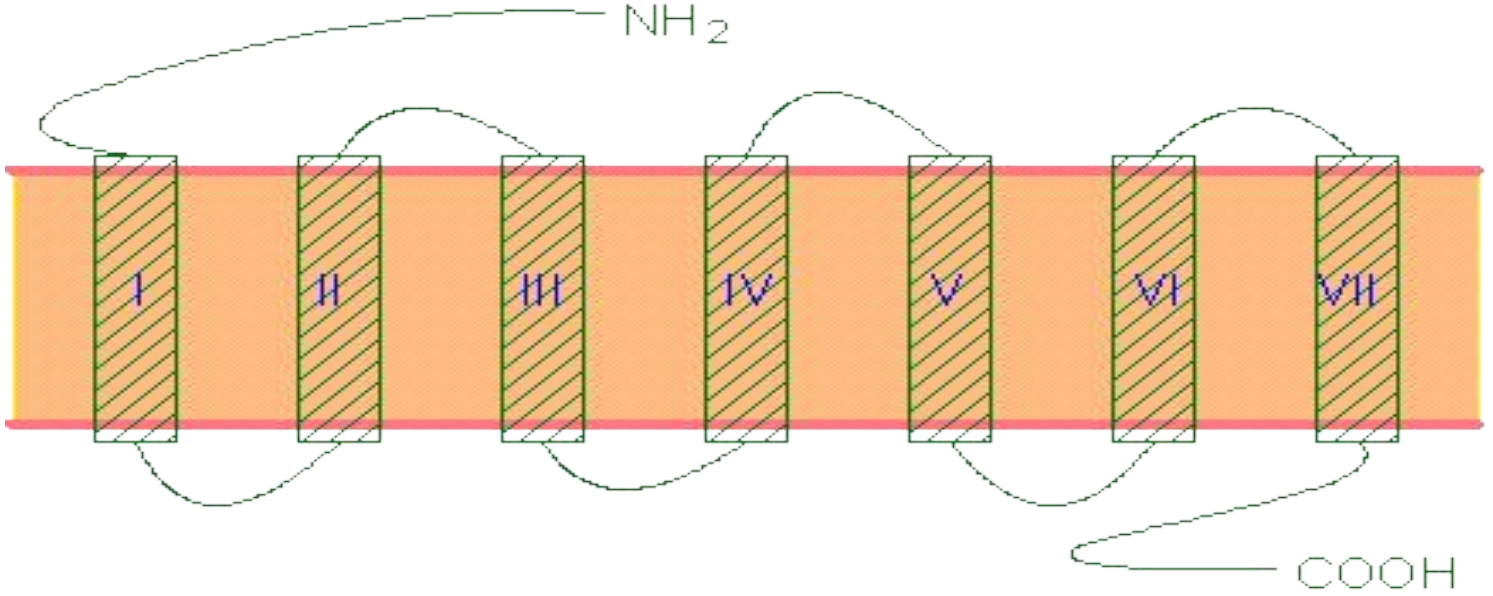
5. Изомеразы. **Катализ перестановки атомов внутри молекул: *ротамазы, эпимеразы, рацемазы.***

6. Лигазы. **Катализ реакций сшивания двух молекул: *синтетазы, ДНК- и РНК-лигазы.***

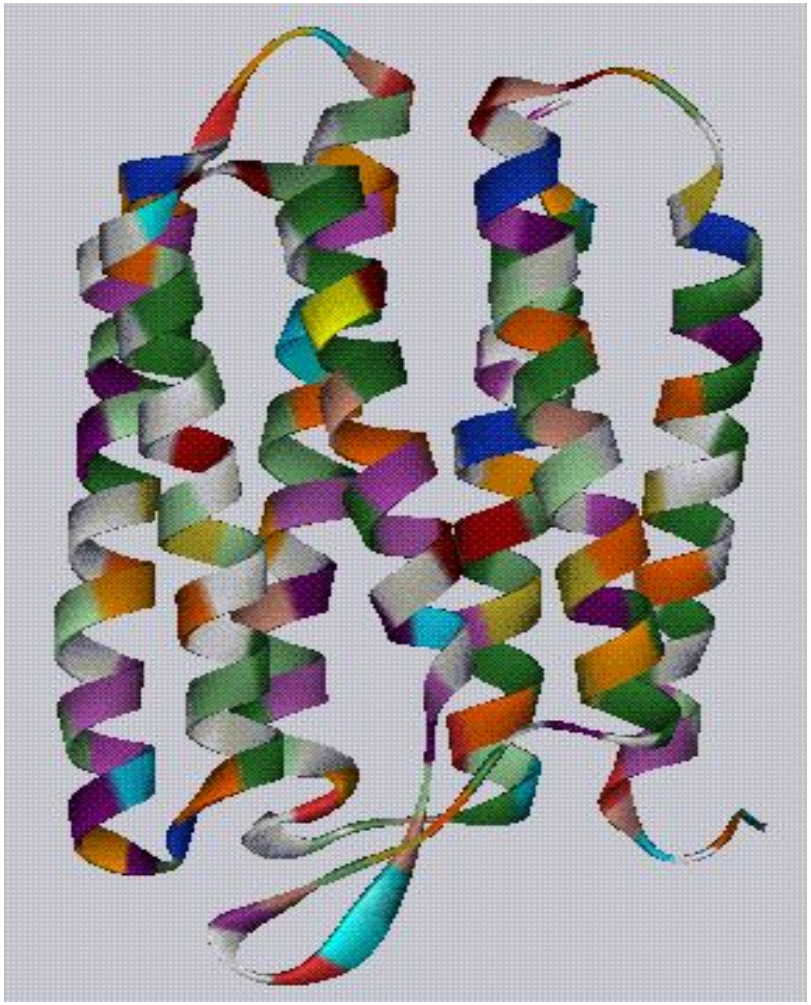
IUBMB – комитет разработал и установил правила записи номера фермента: EC-номер. Например: EC номер каталазы – EC1.11.1.6. (первая цифра указывает, что этот фермент относится к классу оксидоредуктаз (класс 1), следующие цифры указывают на субкласс и суб-субкласс.

Мембранные белки

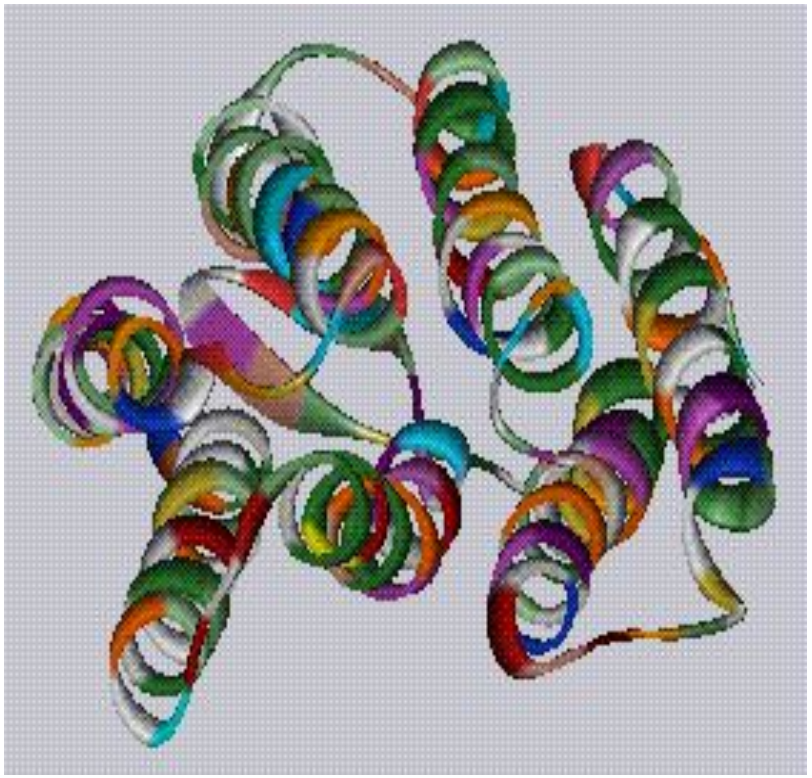
Рецепторы, сопряженные с G-белком (GTP-связывающим регуляторным белком), входят в группу рецепторов клеточной мембраны. Они запускают целую сеть событий, изменяющих концентрацию одного или нескольких малых внутриклеточных сигнальных молекул – внутриклеточных медиаторов, например, циклический АМФ (cAMP), которые изменяют поведение других белков-мишеней в клетке. Белки этой группы состоят из семи трансмембранных сегментов.



Рецепторы, сопряженные с G-белком (GTP-связывающим регуляторным белком),



Вид сбоку

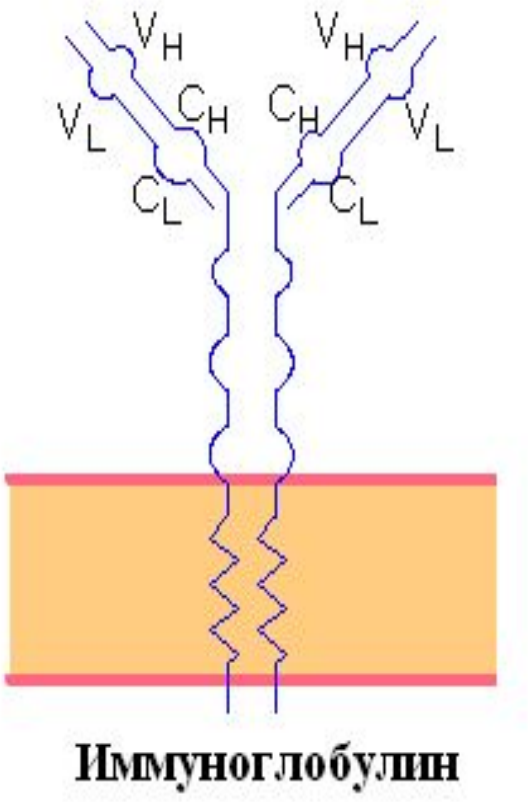


Вид сверху

- **Семейство иммуноглобулинов – это молекулы, циркулирующие в организме и отвечающие за распознавание чужеродных, или “не своих”, элементов.**

За этим узнаванием следует серия реакций, составляющих гуморальный, или опосредованный антителами,ответ. Каждый из них содержит один или два т Рансмембранных доменов. Иммуноглобулины (антитела) состоят из четырех полипептидных цепей: двух легких (VL и CL) и двух тяжелых (VH и CH).

V – изменяющиеся вариабельные, C – консервативные домены. V содержат участки связывания антигенов



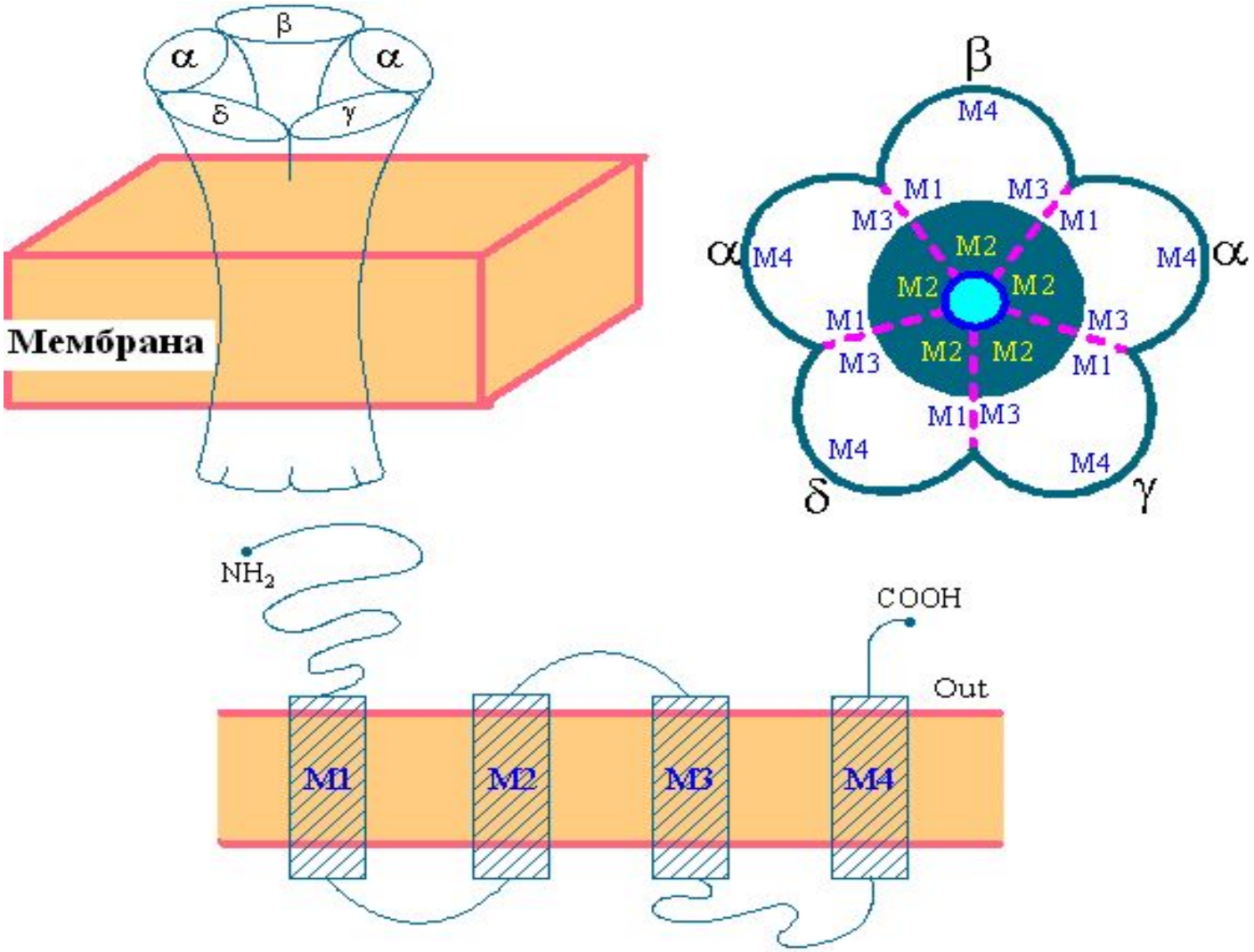
Иммуноглобулин

- **Белки ионных каналов. Существует много типов ионных трансмембранных каналов. Они различаются по типу проводимых ионов: *кальциевые, натриевые, калиевые и т.д.***

- **Также они могут быть классифицированы по механизму “запирания” канала:**
- **- либо *это перепад напряжения,***
- **- либо *лиганд-опосредованный механизм* (с помощью небольших молекул).**
- **Этот механизм связан с существованием на мембране *рецепторов* для лигандов.**

- **Например: никотин-ацетилхолиновый рецептор (nAChR), глутаматный рецептор (GluR), АТФ-чувствительный канал, канал, активируемы G-белком и др. В каждом случае структура отличается своими характерными особенностями.**

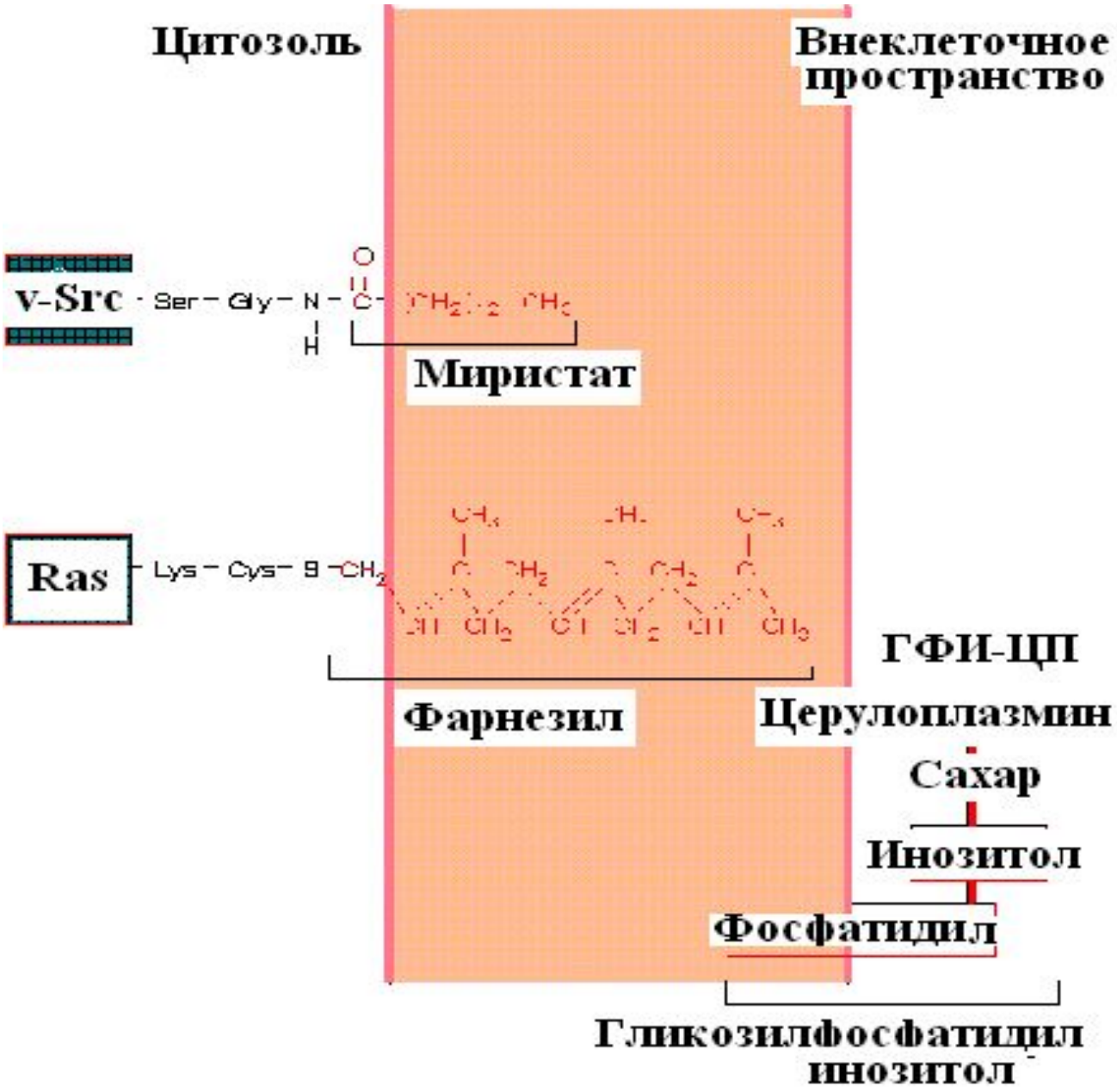
- **nAChR канал состоит из пяти субъединиц α, α, β, ɣ, и δ . пять M2-сегментовобразуют пору канала. Для активации этого канала необходимо связывание двух молекул ацетилхолина α-субъединицами**



- **Мембраносвязанные белки можно подразделить на три группы:**

  - связанные с цитозольной стороной плазматической мембраны посредством *миристата* (v-Src случай нерецепторного белка (тирозинкиназа), в ключенный в “сигнальную” систему клетки. Signaling) ;

- **- связанные с цитозольной стороной плазматической мембраны посредством *фарнезила* (Ras – белок, также входящий в сигнальную систему);**
- **- связанные с экстрацеллюлярной частью плазматической мембраны посредством *гликозилфосфатидилинозитолового якоря* – ГФИ-церулоплазмин (участник метаболизма меди).**


Цитозоль
Внеклеточное пространство
v-Src
Ser – Gly – N – C
Миристат
Ras
Lys – Cys – S – CH2
ГФИ-ЦП
Фарнезил
Церулоплазмин
Сахар
Инозитол
Фосфатидил
Гликозилфосфатидил инозитол

- **Задание**
- **Подготовиться к терминологическому диктанту**

- **Активный центр фермента, амидная связь, аминокислота, белок, вторичная структура белка, глобулярные белки, иминокислота, колагеновая спираль,, пептид, пептидная связь, первичная структура белка, полипептид, структуры α-спираль и β-складчатая, субстрат, третичная структура белка, фермент, фибриллярные белки, четвертичная структура белка.**