

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
проф. Цымбаленко Надежда Васильевна**

д.б.н.,

• **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

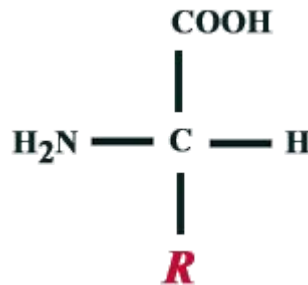
Промышленная биотехнология

- **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.

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 – “α- аминокислоты”. В пролине – α -иминогруппа



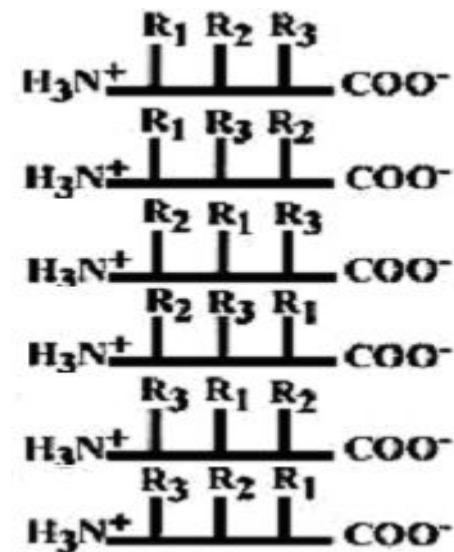
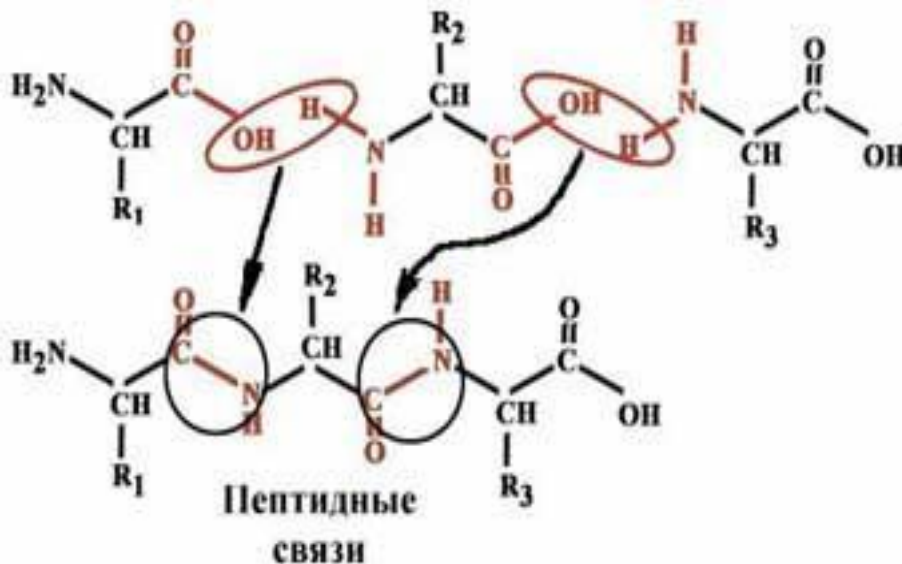
- **Классификация аминокислот, входящих в состав белков, по принципу полярности (неполярности) радикала**
- **1. Неполярные или гидрофобные радикалы.**
- Аليفатические - **аланин, валин, лейцин, изолейцин.**
Серусодержащий **метионин.**
Ароматические - **фенилаланин, триптофан.**
Иминокислота - **пролин.**
- **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		Hydrophobicity
	3 Lett.	1 Lett.			
Aspartate	Asp	D	$\text{O}=\text{C}(\text{O}^-)-\text{CH}_2$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	-3.5
Glutamate	Glu	E	$\text{O}=\text{C}(\text{O}^-)-\text{CH}_2-\text{CH}_2$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	-3.5
Glutamine	Gln	Q	$\text{NH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	-3.5
Glycine	Gly	G		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	-0.4
Alanine	Ala	A	CH_3	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	1.8
Valine	Val	V	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	4.2

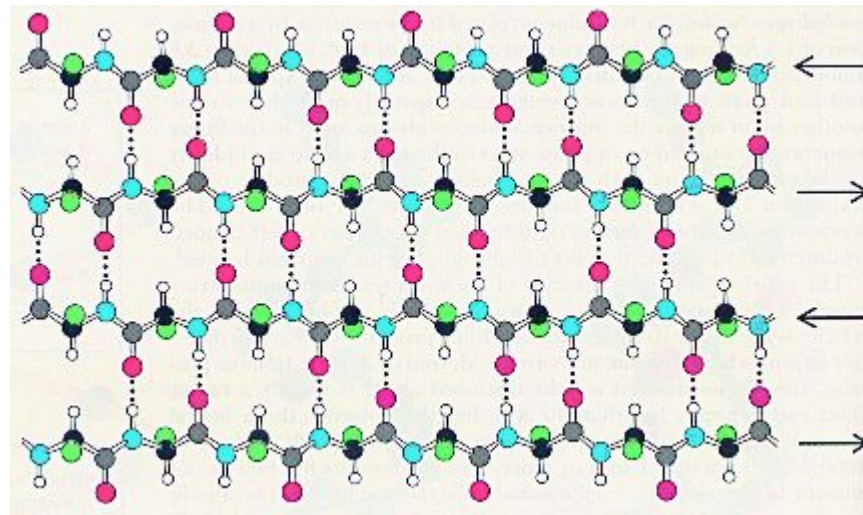
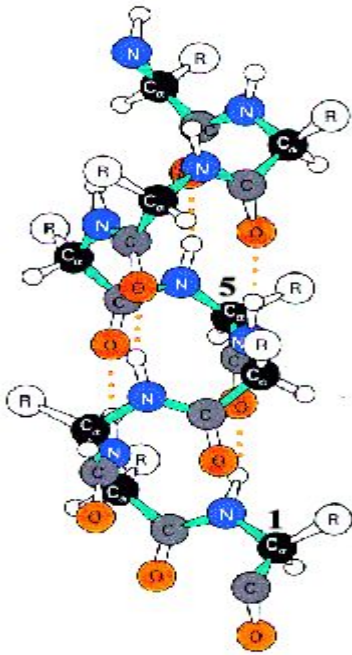
Первичная структура белка

- **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 $\approx 2 \times 10$ в степени 18.



Вторичная структура белка

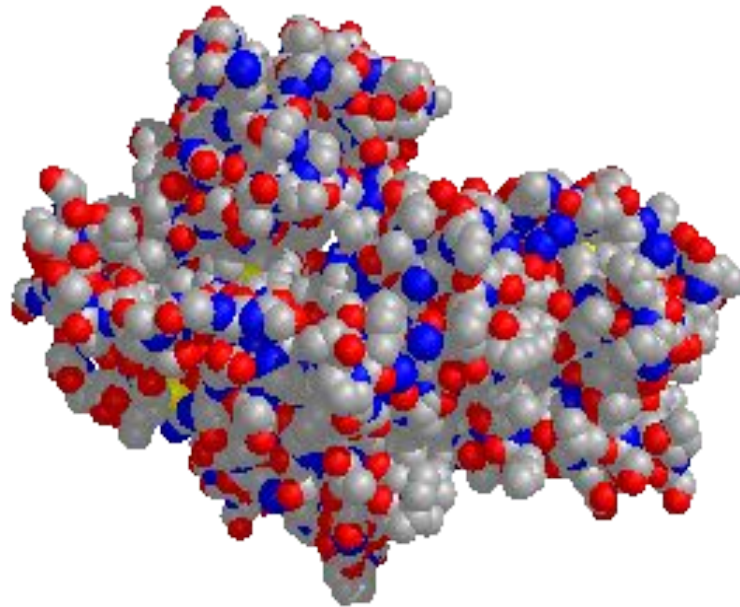
- **Вторичная структура белка - это упорядоченное строение полипептидных цепей, обусловленное водородными связями между группами C=O и N-H разных аминокислот.**
- **Вторичная структура может быть регулярной**
- **α -спиралью и нерегулярной β -складчатой структурой**
- Чистых природных альфа - или бета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



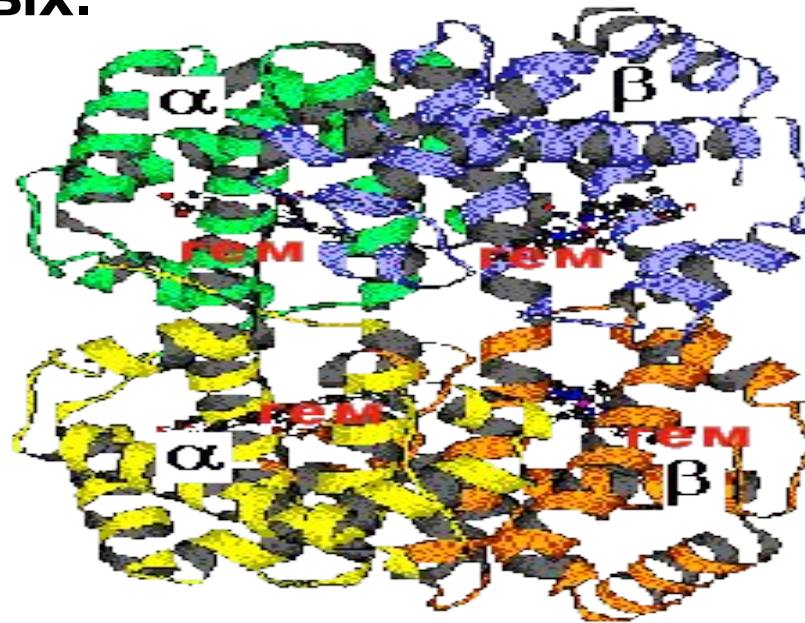
Третичная структура белка

- 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.**
- **Полипептид - понятие химическое. Белок - понятие биологическое.**
- **Например, 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



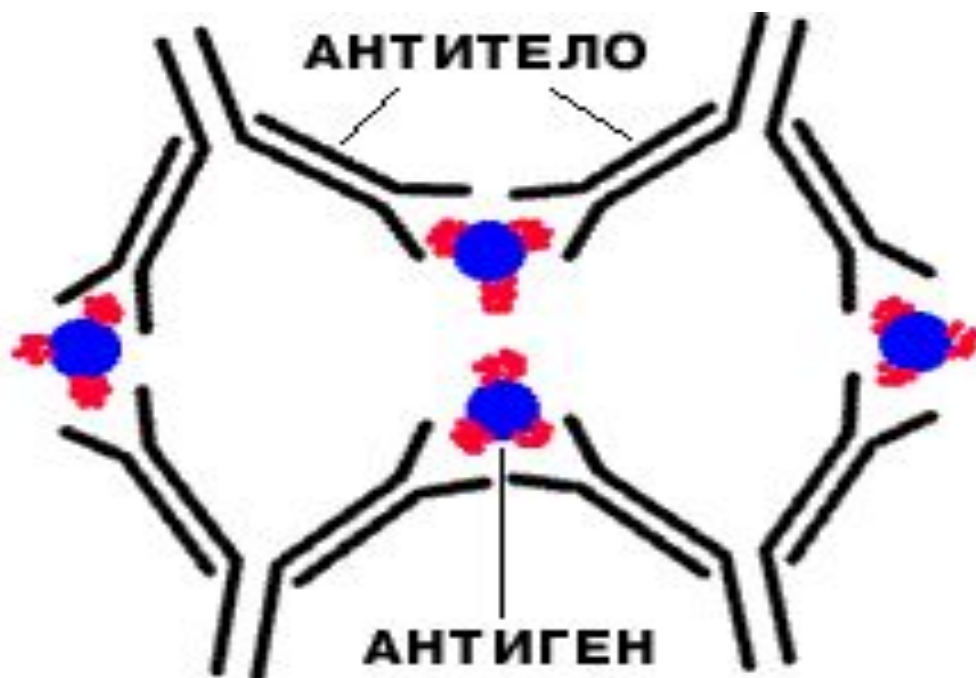
2. Каталитическая функция.

- 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.



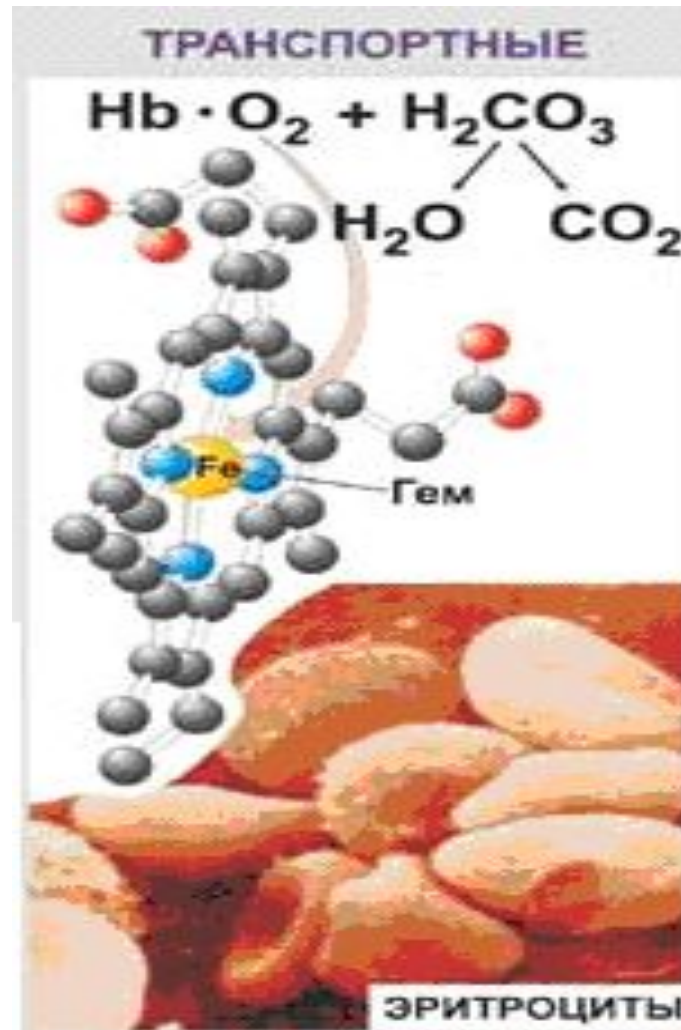
- **5. Трансформация энергии.**

- 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 "заменяемые 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.

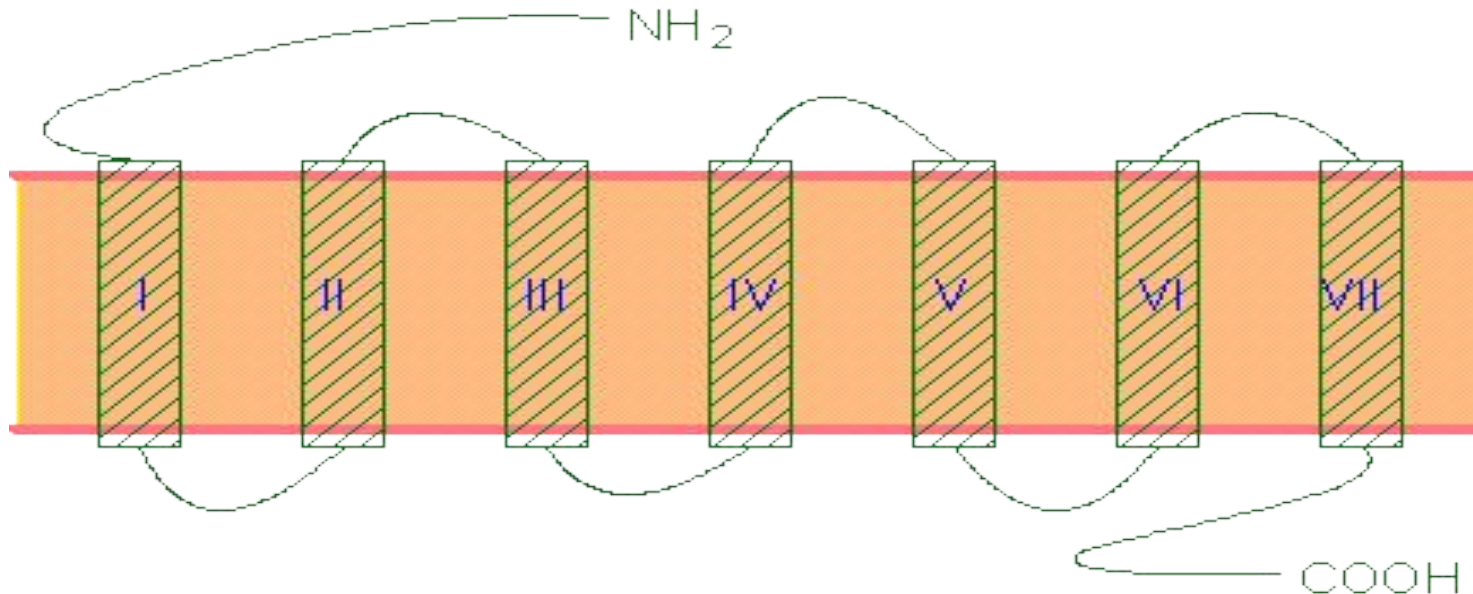
- 1. Оксидоредуктазы.** Катализ окислительно-восстановительных реакций: *дегидрогеназы, оксидазы, редуктазы и каталазы.*
- 2. Трансферазы.** Катализ переноса различных групп (ацетильная, метильная, фосфатная и т.д.): *ацетилтрансферазы, метилазы, протеинкиназы и полимеразы (синтез ДНК и РНК).*
- 3. Гидролазы.** 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: ЕС-номер. Например: ЕС номер каталазы – ЕС1.11.1.6. (первая цифра указывает, что этот фермент относится к классу оксидоредуктаз (класс 1), следующие цифры указывают на субкласс и суб-субкласс.

Мембранные белки

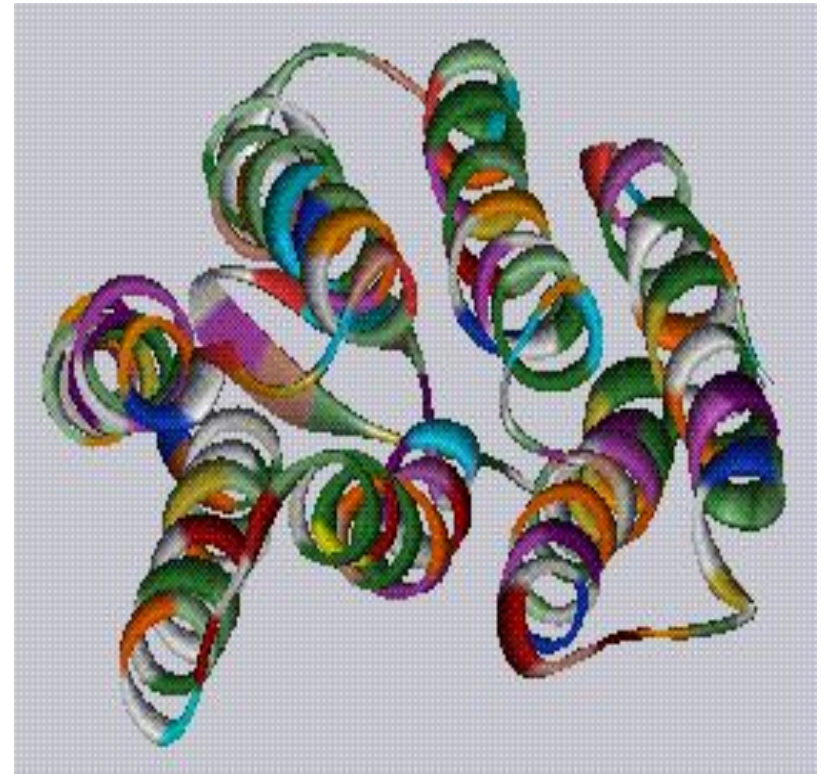
Рецепторы, сопряженные с G-белком (GTP-связывающим регуляторным белком), входят в группу рецепторов клеточной мембраны. Они запускают целую сеть событий, изменяющих концентрацию одного или нескольких малых внутриклеточных сигнальных молекул – внутриклеточных медиаторов, например, циклический АМФ (сАМФ), 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

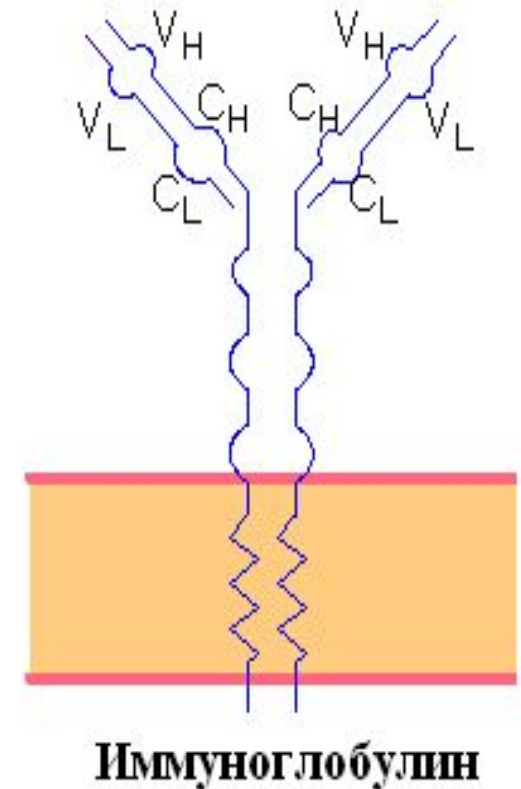
- **Семейство иммуноглобулинов** – это молекулы, циркулирующие в организме и отвечающие за распознавание чужеродных, или “не своих”, элементов.

За этим узнаванием следует серия реакций, составляющих гуморальный, или опосредованный антителами, ответ. Каждый из них содержит один или два трансмембранных доменов.

Имуноглобулины (антитела) состоят из четырех полипептидных цепей: двух легких (VL и CL) и двух тяжелых (VH и CH).

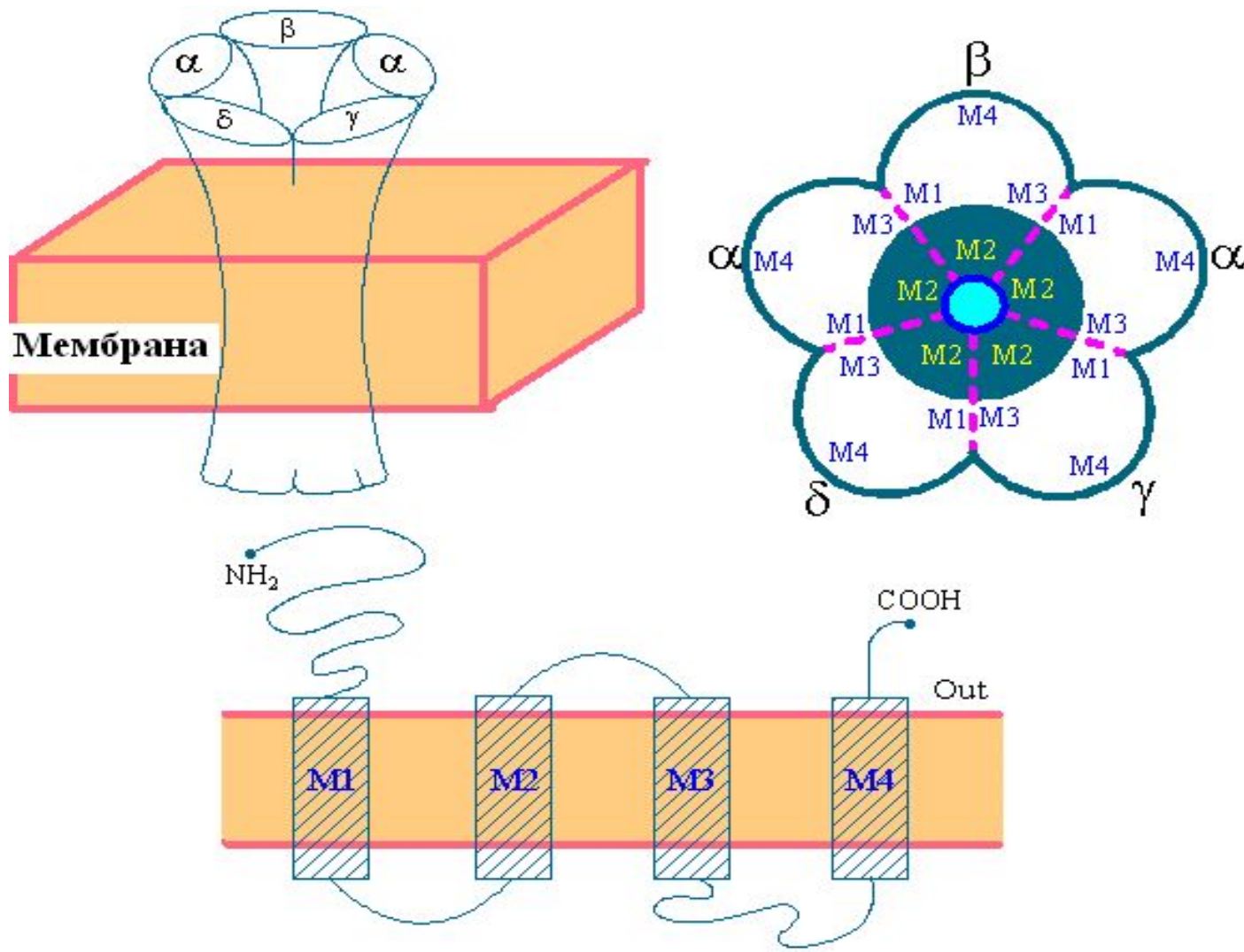
V – изменяющиеся вариабельные,
C – консервативные домены.

V содержат участки связывания антигенов



- **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.

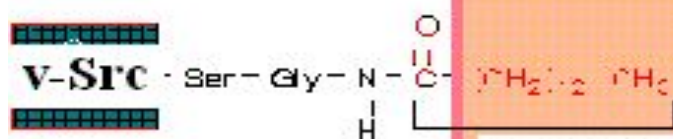
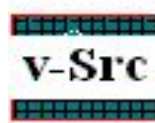
- nAChR канал состоит из пяти субъединиц α , α , β , γ , и δ . пять M2-сегментов образуют пору канала. Для активации этого канала необходимо связывание двух молекул ацетилхолина α -субъединицами



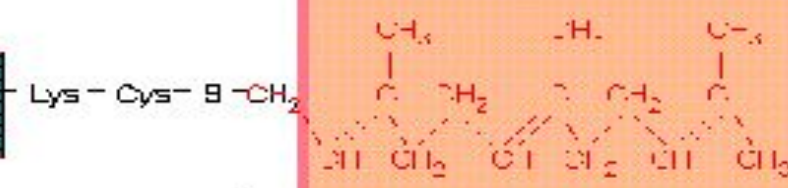
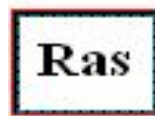
- **Мембраносвязанные белки** можно подразделить на три группы:
 - связанные с цитозольной стороной плазматической мембраны посредством *миристата* (*v-Src* случай нерецепторного белка (тирозинкиназа), включенный в “сигнальную” систему клетки. Signaling) ;
 - - связанные с цитозольной стороной плазматической 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



Миристат



Фарнезил

Церулоплазмин

ГФИ-ЦП

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.**