

Ферменты гидролиза и
биосинтеза нуклеиновых
КИСЛОТ

Международная классификация ферментов

- КФ 1 (ЕС 1): **Оксидоредуктазы**, катализирующие окисление или восстановление. Примеры: **каталаза**, катализирующие окисление или восстановление. Примеры: каталаза, **алкогольдегидрогеназа**
- КФ 2 (ЕС 2): **Трансферазы**, катализирующие перенос химических групп с одной молекулы **субстрата**, катализирующие перенос химических групп с одной молекулы субстрата на другую. Среди трансфераз особо выделяют **киназы**, катализирующие перенос химических групп с одной молекулы субстрата на другую. Среди трансфераз особо выделяют киназы, переносящие фосфатную группу, как правило, с молекулы **АТФ**.
- КФ 3 (ЕС 3): **Гидролазы**, катализирующие **гидролиз**, катализирующие гидролиз химических связей. Примеры: **эстеразы**, катализирующие гидролиз химических связей. Примеры: эстеразы, **пепсин**, катализирующие гидролиз химических связей. Примеры: эстеразы, пепсин, **трипсин**, катализирующие гидролиз химических связей. Примеры: эстеразы, пепсин, трипсин, **амилаза**, катализирующие гидролиз химических связей. Примеры: эстеразы, пепсин, трипсин, амилаза, **липопротеинлипаза**
- КФ 4 (ЕС 4): **Лиазы** катализирующие разрыв химических связей без

- **Нуклеаза (ЕС-3) - фермент, расщепляющий нуклеиновые кислоты в живых организмах.**
- **Нуклеазы участвуют:**
 - **в переваривании нуклеиновых кислот пищи;**
 - **в удалении чужеродных нуклеиновых кислот; и**
 - **в регуляции синтеза и распада нуклеиновых кислот в клетках.**

Энзиматический гидролиз

- Экзо- и эндонуклеазы
 - с 3'- или 5'-конца либо по середине цепи
- Расщепление цепи по а- и b- типу.
 - продукт 5'-фосфат – а-тип ($N^{\downarrow}p-N$)
 - продукт 3'-фосфат – b-тип ($N-p^{\downarrow}N$)
- Специфичность к ДНК или РНК
 - ДНазы и РНазы
- Отношение к фосфату
 - фосфодиэстеразы
 - Фосфомоноэстеразы

Экзонуклеаза

Фермент	Субстрат	Тип	Специфичность	Продукт реакции
Фосфодиэстераза змеиного яда	ДНК/РНК	a	с 3'- конца	5'-NMP
Фосфодиэстераза селезенки	ДНК/РНК	b	с 5'- конца	3'-NMP
Экзонуклеаза I из E.coli	оц ДНК в 40000 быстрее		с 3'- конца + свобод ОН-группа	5'-NMP
Экзонуклеаза III из E.coli	дц ДНК	a	с 3'- конца	5'-NMP
5'-экзонуклеаза из E.coli инф бф л	дц ДНК	a	с 5'- конца	5'-NMP
Экзонуклеаза VII из E.coli	оц ДНК		корот. ОН как с 5'- и с 3'- конца	олигонуклеотиды

Эндонуклеазы

Фермент	Субстрат	Тип	Специфичность	Продукт реакции
РНаза А (панкреатическая)	оцРНК	b	-Pu-3'-p	N...N-Pu-3'-p
<i>РНаза Bacillus subtilis</i>	РНК	b	-Pu-3'-p	N...N-Pu-3'-p
РНаза T ₁	РНК	b	-G-3'-p	N...N-G-3'-p
РНаза T ₂	РНК	b	Все 4 остнов. Предп. -A-3'-p	N...N-A-3'-p
РНаза U ₂	РНК	b	-A-3'-p	N...N-A-3'-p
ДНаза I (панкреатическая)	ДНК	a	Pu-p-Pu	разрывы в дц ДНК с 3'-ОН группой
ДНаза II (селезенка, тимус, <i>Staphylococcus aureus</i>)	ДНК	b	N-p-N	олигонуклеотиды
Нуклеаза S1	ДНК/РНК	a	одноцепочечные НК	дц НК и NMP

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы)

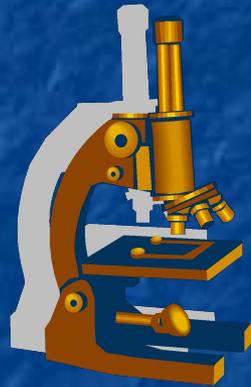
	АТР-зависимость	Метилирующая активность	Рестрицирующая активность	Место узнавания
Тип I	S-аденозил-метионин, АТР, Mg ²⁺	Да	Случайные разрывы	
Тип II	Mg ²⁺	Нет	Специфические участки	4-6 нуклеотидов /ось симметрии 2-ого порядка
Тип III	АТР, Mg ²⁺	Да	Специфические участки	на расстоянии 24-27 нукл.

- В 1973 году Смит и Натанс предложили номенклатуру рестриктаз, включающую следующие пункты:
 1. Аббревиатура названия каждого фермента является производной от бинарного названия микроорганизма, содержащего данную метилазно-рестриктазную систему. Составляют по правилу: к первой прописной букве названия рода добавляют две первые строчные буквы вида. *Streptomyces albus* - Sal, *Escherichia coli* - Eco
 2. В случае необходимости добавляют обозначение серотипа или штамма, например, Eco B.
 3. Различные системы рестрикции - модификации, кодируемые одной бактериальной клеткой, обозначают римскими цифрами: Hind II, Hind I, Hind III (*Haemophilus influenzae*).
 4. Рестриктазы обозначают буквой R (R Hind III), метилазы - M (M Hind III).

- Открытие новых рестриктаз заставило Робертса в 1978 году внести дополнения в систему рациональных обозначений ферментов: если сокращенное название совпадает для нескольких ферментов, то 2 первые буквы аббревиатуры остаются неизменными, а третья берется из последующих букв видового названия:
Haemophilus parainfluenzae - Hpa I
Haemophilus parahaemolyticus - Hph I.

- Изошизомеры – ферменты рестрикции выделенные из разных источников и узнающие одинаковые последовательности.

Рестрикция ДНК и гель-электрофорез рестриктных фрагментов



Ферменты синтеза нуклеиновых кислот

- ДНК-полимераза
- РНК-зависимая ДНК полимераза
- РНК-полимераза
- Poly(A)-полимераза
- ДНК-лигаза
- РНК-лигаза
- Терминальная трансфераза
- Полинуклеотидкиназа
- Щелочная фосфатаза

ДНК-полимераза I (E.coli)

- Фермент состоит из одной полинуклеотидной цепи (мол. Масса 109 000) обладающей тремя типами ферментативной активности.

Активность	Реакция	Субстратная специфичность
5'-3'-полимеразная	$\text{ДНК}_{\text{OH}} + n\text{dNTP} \rightarrow \text{ДНК}_{(\text{pdN})_n} + n\text{PPi}$	оцДНК (матрица) +затравка (праймер)
5'-3'-эксонуклеазная	$\text{дцДНК} \rightarrow \text{pN} + \text{оцДНК}$	деградирует дцДНК с 5'-конца
3'-5'-эксонуклеазная (корректирующая)	$\text{дцДНК/оцДНК} \rightarrow \text{pN} + \text{дцДНК}$	деградирует дц- или оцДНК начиная со свободного 3'-ОН конца, Активность на дцДНК блокируется 5'-3'-полимеразной акт.

Применение:

- 1) Внесение метки в ДНК с помощью ник-трансляции
- 2) При синтезе второй цепи кДНК.

Большой фрагмент ДНК-полимераза I E.coli (фрагмент Кленова)

- Фермент состоит из одной полипептидной цепи (мол. масса 76000), полученной при расщеплении нативной ДНК полимеразы I субтилизином. Обладает 5'-3' полимеразной активностью и
- 3'-5' экзонуклеазной активностью.

Применение:

- 1) Достаивание укороченных 3'-концов, образовавшихся при расщеплении ДНК ферментами рестрикции.
- 2) Концевое включение метки в фрагмент ДНК
- 3) Синтез второй цепи кДНК при клонировании
- 4) Определение нуклеотидной последовательности по Сенгеру
- 5) Расщепление выступающих 3'-концов

ДНК полимераза фага Т4

(из E.coli, инфицированной фагом Т4)

- Подобно фрагменту Кленова ДНК-полимеразы I из E.coli.
- Обладает 5'-3' полимеразной активностью и 3'-5'-эксонуклеазной активностью. Однако эксонуклеазная активность ДНК-полимеразы фага Т4 более чем в 200 раз превышает эксонуклеазную активность ДНК-полимеразы I.
- Реакция обмена.
 - В присутствии только одного dNTP в результате 3'-5'-нуклеазной активности фермента происходит деградация дцДНК, начиная с 3'-ОН-конца до основания, комплементарного внесенному dNTP. Далее с этого места начинается серия реакций синтеза и обмена.
- Применение
 1. Концевое включение метки в фрагмент ДНК с выступающими 5'-концами
 2. Концевое включение метки в фрагмент ДНК с тупыми концами или выступающими 5'-концами
 3. Включение метки в фрагменты ДНК, используемые в качестве гибридизационных зондов.
 4. Определение нуклеотидной последовательности ДНК «плюс-минус» методом

Полинуклеотидкиназа фага Т4

- Фермент катализирует перенос γ -фосфата на 5'-ОН-конец ДНК или РНК
- Применение
 - Включение метки в 5'-концы ДНК для определения последовательности по методу Максама-Гилберта
 - Фосфорилирование синтетических линкеров и различных фрагментов ДНК, у которых отсутствует концевой 5'-фосфат перед лигированием.

РНК-зависимая ДНК полимераза

(обратная транскриптаза)

- Фермент состоит из двух полипептидов цепей, один из которых обладает и 5'-3'-полимеразной активностью, и специфической по отношению к РНК-ДНК-гибридам двухсторонней рибонуклеазной активностью.
- Применение:
 - Синтез кДНК для клонирования (и первой и второй цепи) или для использования в качестве гибридизационных зондов.
 - Концевое включение метки в ДНК с выступающими 5'-концами (реакция достраивания)

Щелочная фосфатаза

(из бактерий (BAP), из кишечника теленка (CIP))

- Фермент катализирует отщепление 5'-фосфатных остатков ДНК, РНК, рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов.
- Применение
 - Отщепление 5'-фосфатов от ДНК или РНК перед включением 5'-концевого ^{32}P
 - Отщепление 5'-фосфатов от фрагментов ДНК для предотвращения сшивания концов одной молекулы.

Poly(A)-полимераза (E.coli)

- Фермент катализирует присоединение AMP (полученных из АТР) к свободному 3'-ОН-концу РНК
- Применение
 - Подготовка poly(A)-РНК для клонирования
 - Включение метки в 3'-конец РНК с помощью [α - ^{32}P]АТР для получения гибридизационных зондов

ДНК-лигаза фага Т4

- Фермент состоит из одной полипептидной цепи (мол. масса 68000), катализирует образование фосфодиэфирной связи между 3'-ОН и 5'-фосфатными концами ДНК
- Применение
 - Сшивание молекул ДНК с совместимыми липкими концами.
 - Сшивание двухцепочечных молекул ДНК с тупыми концами друг с другом или синтетическими линкерами. Активность ДНК-лигазы фага Т4 по отношению к молекулам ДНК с тупыми концами может быть повышена примерно в 20 раз при добавлении РНК-лигазы фага Т4

РНК-лигаза фага Т4

- Фермент катализирует ковалентное соединение фосфорилированных по 5'-концу одноцепочечных ДНК или РНК с одноцепочечными ДНК или РНК имеющими 3'-гидроксильные группы
- Применение
 - РНК-лигаза фага Т4 повышает эффективность сшивания двухцепочечных молекул ДНК с тупыми концами, катализируемого ДНК-лигазой фага Т4

Терминальная дезоксиинуклеотидилтрансфераза (из тимуса теленка)

- Фермент катализирует присоединение дезоксиинуклеотидов к 3'-ОН-концу молекулы ДНК.
- Применение
 - Присоединение комплементарных концевых гомополимерных последовательностей к вектору или к кДНК
 - Включение метки в 3'-концы фрагментов ДНК с помощью меченого ^{32}P -3'-нуклеозида. Для введения метки в составе рибонуклеозида используют $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{rNTP}$ с последующей обработкой щелочью.

- <http://humbio.ru/humbio/default.htm>
- <http://www.dnaftb.org/dnaftb/>
- <http://www.dnalc.org/home.html>
- <http://www.ch.cam.ac.uk/magnus/molecules/nucleic/index.html>