Ферменты гидролиза и биосинтеза нуклеиновых кислот

Международная классификация ферментов

- КФ 1 (EC 1): **Оксидоредуктазы**, катализирующие окисление или восстановление. Примеры: каталаза, катализирующие окисление или восстановление. Примеры: каталаза, алкогольдегидрогеназа
- КФ 2 (EC 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 (EC 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 (EC 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 нуклениновых кислот; и
  - в регуляции синтеза и распада нуклеиновых кислот в клетках.

Энзиматический гидролиз

- Экзо- и эндонкулеазы
  - с 3’- или 5’-конца либо по середине цепи
- Расщепление цепи по a- и b- типу.
  - продукт 5’-фосфат – a-тип (N-p-N)
  - продукт 3’-фосфат – b-тип (N-p-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 OH-группа	5′-NMP
Экзонуклеаза III из E.coli	дц ДНК	a	с 3′- конца	5′-NMP
5′-экзонуклеаза из E.coli инф бф λ	дц ДНК	a	с 5′- конца	5′-NMP
Экзонуклеаза VII из E.coli	оц ДНК		корот. OH как с 5′- и с 3′- конца	олигонуклеотиды

Эндонуклеазы

Фермент	Субстрат	Тип	Специфичность	Продукт реакции
РНаза А (панкреатическая)	оцРНК	b	-Py-3′-p	N…N-Py-3′-p
РНаза Bacillus subtulis	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	Py-p-Pu	разрывы в дц ДНК С 3′-OH группой
ДНаза II (селезенка, тимус, *Staphylococcus aureus)*	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.

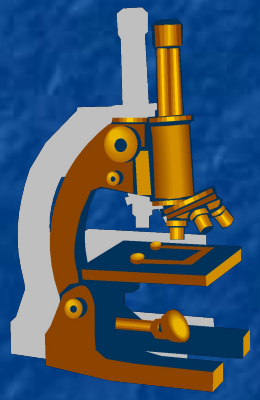
- В 1973 году Смит и Натанс предложили номенклатуру рестриктаз, включающую следующие пункты:

  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 ферментартивной активности.

Активность	Реакция	Субстратная специфичность
5′-3′-полимеразная	$ДНК_{он}$+ndNTP→$ДНК_{(pdN)n}$+nPPi	оцДНК (матрица) +затравка (праймер)
5′-3′-экзонуклеазная	дцДНК→pN+оцДНК	деградирует дцДНК с 5′-конца
3′-5′-экзонуклеазная (корректирующая)	дцДНК/оцДНК→pN+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) Достраивание 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’-экзонуклеазной активностью. Однако экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы фага Т4 более чем в 200 раз превышает экзонуклеазную активность ДНК-полимеразы I.
- Реакция обмена.
  - В присутствии только одного dNTP в результате 3’-5’-нуклеазной активности фермента происходит деградация дцДНК, начиная с 3’-OH-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 лигирование.

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 кДНКдля 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 ATP) к свободному 3’-OH-концу РНК
- Применение
  - Подготовка poly(A)-РНК для клонирования
  - Включение метки в 3’-конец РНК с помощью [a-^{32}P]ATP 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 тупами 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 дезоксинуклеотидилтрансфераза (из тимуса теленка)

- Фермент катализирует присоединение дезоксинуклеотидов к 3′-ОН-концу молекулы ДНК.
- Применеиние
  - 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 [α-^{32}P]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