

Министерство образования Республики Беларусь  
Учреждение образования  
«Международный государственный экологический  
университет имени А. Д. Сахарова»



---

Факультет экологической медицины  
Кафедра биохимии и биофизики

**А. И. Зинченко**

# **ПРАКТИКУМ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ**

## **СОЕДИНЕНИЯ НУКЛЕИНОВОЙ ПРИРОДЫ**

Учебно-методическое пособие





Министерство образования Республики Беларусь  
Учреждение образования  
«Международный государственный экологический  
университет имени А. Д. Сахарова»



---

Факультет экологической медицины  
Кафедра биохимии и биофизики

**А. И. Зинченко**

# **ПРАКТИКУМ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ**

## **СОЕДИНЕНИЯ НУКЛЕИНОВОЙ ПРИРОДЫ**

Учебно-методическое пособие

Минск  
2009

УДК 577.113.3+577.15:075.8  
ББК 28.072  
363

*Рекомендовано к изданию НМС МГЭУ им. А. Д. Сахарова  
(протокол № 8 от 27 мая 2008 г.)*

**Авторы:**

*А. И. Зинченко*, профессор кафедры биохимии и биофизики  
УО «МГЭУ им. А. Д. Сахарова», д.б.н.

**Рецензенты:**

зав. кафедрой экологической медицины и радиобиологии  
УО «МГЭУ им. А. Д. Сахарова», к.б.н., доцент *В. Д. Свирид*,  
главный научный сотрудник ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси»,  
д.б.н., профессор *В. Г. Бабицкая*

**Зинченко, А. И.**

363 Практикум по биотехнологии. Соединения нуклеиновой природы : учебно-методическое пособие / А. И. Зинченко. – Минск : МГЭУ им. А. Д. Сахарова, 2009. – 84 с.

ISBN 978-985-6823-91-9.

Практикум содержит учебно-методические материалы для проведения лабораторных работ по дисциплине «Биотехнология» со студентами 5-го курса. Для каждой лабораторной работы приводятся: основы теории, необходимые для успешного выполнения практического задания, вопросы для подготовки к занятию, список рекомендуемой литературы, перечень заданий на занятие, перечень используемых приборов, материалов и реактивов. Приложение содержит информацию о строении и номенклатуре компонентов нуклеиновых кислот. Кроме того, дана информация о правилах работы с приближенными числами.

Практикум соответствует учебной программе спецкурса «Биотехнология» для студентов УО «МГЭУ им. А. Д. Сахарова».

УДК 577.113.3+577.15:075.8  
ББК 28.072

ISBN 978-985-6823-91-9

© Международный государственный экологический университет имени А. Д. Сахарова, 2009

# СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие .....	4
Лабораторная работа № 1 Качественный и количественный анализ компонентов нуклеиновых кислот методами тонкослойной хроматографии и УФ-спектрофотометрии.....	5
Лабораторная работа № 2 Ферментативный гидролиз дрожжевой рибонуклеиновой кислоты.....	11
Лабораторная работа № 3 Ферментативный синтез конъюгата противолейкозного нуклеозида с фосфолипидом с помощью микробной фосфолипазы D.....	22
Лабораторная работа № 4 Синтез противовирусного нуклеотида с использованием препарата рекомбинантной нуклеозидфосфотрансферазы <i>Erwinia herbicola</i> .....	31
Лабораторная работа № 5 Синтез диаденозин-тетрафосфата с использованием генно-инженерных лилиз-тРНК-синтетазы и неорганической пирофосфатазы .....	42
Лабораторная работа № 6 Синтез полирибонуклеотида из нуклеозид-5'-дифосфата с помощью полинуклеотидфосфорилазы бактерии <i>Enterobacter amnigenus</i> .....	50
Лабораторная работа № 7 Биокаталитический синтез противовирусного модифицированного нуклеозида .....	58
Лабораторная работа № 8 Характеристика первичной и вторичной структуры двухспиральной ДНК.....	66
Приложения .....	78

# ПРЕДИСЛОВИЕ

Согласно паспорту специальности 03.00.23 – биотехнология (биологические науки), утвержденному Высшей аттестационной комиссией Республики Беларусь, **БИОТЕХНОЛОГИЯ** – интегральная область науки, которая базируется на использовании достижений биологических, инженерных и других наук в целях реализации потенциала микроорганизмов, растительных, животных клеток и их компонентов в промышленности, сельском хозяйстве, медицине, пополнения энергетических ресурсов страны и защиты окружающей среды.

Задачей настоящего учебного пособия является ознакомление студентов с приемами и методами, необходимыми при изучении практических и теоретических вопросов биотехнологии фармацевтически важных соединений нуклеиновой природы.

В качестве основы для данного руководства использованы лабораторные работы по спецкурсу «Биотехнология», выполняемые в течение ряда лет студентами 5-го курса кафедры биохимии и биофизики УО «МГЭУ им. А. Д. Сахарова».

Практикум составлен с таким расчетом, чтобы студенты могли проводить предлагаемые работы по возможности самостоятельно. Каждому заданию предшествует краткое изложение теории рассматриваемого вопроса. В последней части пособия дана информация о правилах работы с приближенными числами.

# ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

## Качественный и количественный анализ компонентов нуклеиновых кислот методами тонкослойной хроматографии и УФ-спектрофотометрии

### Цель работы:

Определить состав смеси нуклеозидов, нуклеотидов и азотистых оснований с помощью ТСХ. Определить их количества путем УФ-спектрофотометрии.

### Оборудование и материалы:

- вытяжной шкаф;
- автоматические микропипетки;
- пробирки типа «Eppendorf»;
- термостат суховоздушный на 60 °С;
- камера для тонкослойной хроматографии (ТСХ);
- пластинки «Silufol-UV<sub>254</sub>» фирмы Serva (Германия);
- электрополотенце;
- ультрахемископ;
- УФ-спектрофотометр;
- кварцевые кюветы с длиной пробега луча 1 см (2 шт.);
- колба с притертой пробкой для приготовления системы растворителей;
- пробирки с притертой пробкой для элюции веществ с тонкослойных хроматографических пластинок (4 шт.);
- цилиндр на 100 мл;
- штатив для пробирок;
- ножницы, карандаш простой, линейка.

### Реактивы:

- анализируемый раствор, содержащий компонент нуклеиновой кислоты;
- раствор, содержащий смесь нуклеозидов и азотистых оснований – «свидетелей»;
- система растворителей для ТСХ;
- дистиллированная вода.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Этот вариант хроматографии является одним из наиболее простых и в то же время эффективных методов изучения состава смеси компонентов нуклеиновых кислот, а также установления степени чистоты этих соединений.

В зависимости от природы неподвижной фазы тонкослойная хроматография (ТСХ) может быть адсорбционной, распределительной, молекулярно-ситовой, ионообменной.

Впервые этот метод был применен в 1938 г. для анализа качества лекарственных препаратов. Однако только после 1956 г., когда были предложены стандартная процедура, оборудование и сорбенты, метод стал общепризнанным и начал использоваться в научно-исследовательских целях.

ТСХ сохраняет все преимущества хроматографии на бумаге, но при этом позволяет использовать любой материал, который можно тонко измельчить и получить затем однородный слой. Это могут быть неорганические вещества, например силикагель, окись алюминия, диатомовая земля и силикат магния, а также органические вещества, в частности целлюлоза, полиамиды, порошок полиэтилена и т. д.

В ТСХ неподвижной фазой служит слой (0,1–0,5 мм) сорбента, равномерно нанесенного на поверхность стеклянной, пластмассовой или металлической пластинки. Сначала получают суспензию сорбента в специфическом для него растворителе. Для очень маленьких хроматограмм предметное стекло микроскопа покрывают слоем сорбента, погружая его в суспензию. Для хроматограмм большего размера на стеклянную пластинку наносят несколько слоев узких лент по обоим краям таким образом, чтобы во время хроматографии они были вертикальными. Число слоев определяет толщину конечного слоя сорбента. Суспензию осторожно наливают на стекло, после чего выравнивают скользящим стеклянным стержнем, который захватывает при этом всю ширину пластинки. Затем пластинку высушивают и ленты удаляют.

В настоящее время многие фирмы выпускают пластинки с закрепленным (при помощи крахмала или гипса) слоем сорбента, изготовленные машинным способом и в готовом для экспериментов виде. Такие пластинки имеют стандартные характеристики закрепленного слоя, что позволяет получать высоковоспроизводимые результаты.

Пластинки обрабатывают так же, как при хроматографии на бумаге. Образец наносят микропипеткой и высушивают.

Подготовленную пластинку помещают в камеру, содержащую растворитель; при этом можно использовать восходящую, горизонтальную или нисходящую хроматографию. Поскольку аппаратное оформление последнего варианта наиболее простое, он применяется чаще других



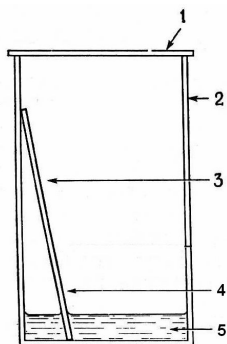


Рис. 1. Типичная камера для проведения тонкослойной хроматографии:  
1 – крышка; 2 – стеклянная камера;  
3 – пластинка с тонким слоем сорбента;  
4 – место нанесения анализируемого  
образца; 5 – растворитель

(см. рисунок). Для того, чтобы избежать испарения элюента с поверхности сорбента, хроматографирование ведется в закрытых камерах, чем обеспечивается равновесие между подвижной жидкой фазой и ее парами.

При погружении нижнего края пластинки в растворитель он начинает двигаться по слою сорбента под действием капиллярных сил. Разделение происходит за счет различных скоростей движения компонентов пробы в направлении перемещения подвижной фазы.

После того как фронт растворителя почти достигнет верхнего края, пластинку вынимают из камеры и сушат. Для получения двумерной хроматограммы высушенную пластинку можно повторно хроматографировать под прямым углом в другом растворителе. Положение пятен, как и при хроматографии на бумаге, определяют по окраске, по флуоресценции (в этом случае к сорбенту добавляют люминофор, чтобы при освещении пластинки УФ-светом обнаружить на ней темные пятна исследуемых веществ) или при опрыскивании различными реагентами, которые реагируют с веществами в пятне с образованием окрашенных продуктов. Обычно используют следующие реагенты: нингидрин для аминокислот, родамин В для липидов, хлорид сурьмы для стероидов и терпенов, серную кислоту с последующим нагреванием практически для всех органических соединений (происходит их обугливание), перманганат калия в серной кислоте для углеводов, анисовый альдегид в серной кислоте для углеводов, пары брома для олефинов и т. д. Вещества можно элюировать путем соскребания сорбента и промывания полученного порошка подходящим растворителем.

Как и в бумажной хроматографии, положение пятна на хроматограмме характеризуется фактором замедления  $R_f$ :

$$R_f = \frac{\text{Расстояние, пройденное веществом от линии старта}}{\text{Расстояние, пройденное элюентом от линии старта}}$$

Значение  $R_f$  определяется тремя основными факторами:

- степенью сродства вещества к сорбенту;
- свойствами сорбента;
- природой элюента.

**Степень родства хроматографируемого органического соединения к сорбенту** возрастает в следующем ряду: алканы < алкены < простые эфиры < нитросоединения < альдегиды < нитрилы < сложные эфиры < кетоны < амины < амиды < спирты < карбоновые кислоты. По мере увеличения числа функциональных групп сила адсорбции возрастает, что выражается в уменьшении  $R_f$ . Плоские молекулы адсорбируются лучше, чем неплоские.

Силигель химически инертен к большинству органических соединений, однако благодаря кислым свойствам своей поверхности (рН 3–5) достаточно прочно сорбирует основания с  $pK_a > 9$ . Поэтому на силикагеле такие основания, как правило, не хроматографируют.

### **Элюирующая способность элюентов**

По возрастанию элюирующей способности элюенты могут быть расположены в следующий ряд: фторзамещенные алканы < н-пентан < н-октан < циклогексан < четыреххлористый углерод < бензол < хлороформ < хлористый метилен < диэтиловый эфир < тетрагидрофуран < ацетон < диоксан < этилацетат < нитрометан < пропанол < этанол < метанол < уксусная кислота < вода.

Элюотропный ряд сохраняет указанный порядок практически для всех полярных веществ.

Для неполярных молекул элюотропный ряд имеет обратный порядок – элюирующая способность в этом ряду от воды к бензолу возрастает.

Элюент выбирают таким образом, чтобы значение  $R_f$  находилось в пределах 0,2–0,85. При этом приходится учитывать не только свойства элюента, но и свойства сорбента, а также природу подвергаемых исследованию веществ.

Далеко не всегда можно идентифицировать соединение по значению  $R_f$ , так как эта величина не является постоянной. Поэтому по возможности пробу следует хроматографировать вместе с известными соединениями (стандартами).

### **Характеристики ТСХ**

ТСХ очень широко распространена, так как обладает рядом преимуществ перед хроматографией на бумаге и колоночной хроматографией, к числу которых следует отнести большую разрешающую способность, потому что пятна здесь намного меньше, большую скорость разделения, более широкий выбор материалов для сорбентов, простое обнаружение пятен и легкость выделения веществ с тонкослойных пластинок.

Большую разрешающую способность тонкослойной хроматографии обеспечивают два фактора: во-первых, при ТСХ отношение массы растворенных веществ к массе сорбента составляет от  $1 \cdot 10^3$  до  $1 \cdot 10^4$ , тогда как в

колоночной хроматографии это отношение обычно равно 1:50; во-вторых, соотношение поверхность/объем – очень велико, поскольку частицы сорбента могут быть очень мелкими (менее 0,1 мм), что позволяет для данного объема сорбента получить большую активную поверхность. Такие маленькие частицы не применяются в колоночной хроматографии, поскольку под действием силы тяжести они спрессовываются, что приводит к уменьшению скорости движения жидкости, а это крайне нежелательно, так как при очень малой скорости потока возрастает размывание зон за счет диффузии.

При хроматографии на бумаге применяют только целлюлозу и те немногие продукты, из которых можно получать бумагу. ТСХ лишена этого недостатка. Кроме того, ТСХ по сравнению с хроматографией на бумаге – более быстрый процесс и дает лучшее разрешение. Волокнистая структура бумаги и связанные с этим капиллярные явления приводят к увеличению размера пятен. Материалы, используемые в ТСХ, можно измельчать с тем, чтобы устранить волокна. В случае меньших пятен время пробега можно уменьшить, так как для разделения пятен здесь требуется меньшее время. Зачастую ТСХ требует всего лишь нескольких минут. Это является серьезным преимуществом в том случае, когда неизвестен оптимальный растворитель для разделения и в течение одного дня требуется проверить большое число систем растворителей.

Меньший размер пятен означает также, что концентрация вещества в пятнах больше; таким образом, для обнаружения требуется меньшее количество вещества. Действительно, для многих веществ ТСХ является в 50–100 раз более чувствительным методом, чем хроматография на бумаге, причем можно обнаружить вещество в количестве до 1 нмоля. Обнаруживаемое количество аминокислот примерно в 10 раз меньше, чем в случае хроматографии на бумаге, что имеет большую ценность в случае, когда имеется лишь небольшое количество образца очищенного белка для проведения аминокислотного или пептидного анализа. Для ТСХ нуклеотидов требуется в 100 раз меньшее количество, чем для их хроматографии на бумаге.

### **Контрольные вопросы:**

1. Основные компоненты РНК и ДНК.
2. Классификация ТСХ в зависимости от природы неподвижной фазы.
3. Виды подложек для сорбентов.
4. Аппаратурное оформление восходящей ТСХ.
5. Приготовление пластинок для ТСХ.
6. Преимущества ТСХ перед бумажной хроматографией.
7. Степень сродства органических соединений к сорбенту.
8. Элюирующая способность элюентов.
9. Способы детекции веществ на хроматограммах.
10. Формула расчета фактора замедления.

## Список литературы:

1. Овчинников, Ю. А. Биоорганическая химия / Ю. А. Овчинников. – М. : Просвещение, 1987.
2. Айвазов, Б. В. Введение в хроматографию : учеб. пособие / Б. В. Айвазов. – М. : Высш. школа, 1983.
3. Количественный анализ хроматографическими методами / под. ред. Э. Кэц : пер. с англ. – М. : Мир, 1990.

## ХОД РАБОТЫ

1. На хроматографической пластинке простым карандашом отмечают 2 точки на расстоянии 1,5 см от нижнего края и 1,5 см друг от друга.
2. В отмеченные точки наносят автоматической пипеткой 5 мкл анализируемого раствора и раствора «свидетелей». Пятна подсушивают в токе теплого воздуха, создаваемого электрополотенцем.
3. Пластинку помещают в хроматографическую камеру с системой растворителей. Следует убедиться, что место нанесения проб находится несколько выше уровня элюента.
4. Когда фронт элюента поднимется на 4/5 высоты пластинки, ее вынимают и высушивают в токе теплого воздуха.
5. Просматривают хроматографическую пластинку в ультрафиолетовом свете.
6. Пятна на пластинке обводят простым карандашом и рассчитывают значение  $R_f$  для каждого из веществ на опытной хроматограмме и на хроматограмме смеси веществ-«свидетелей».
7. Вещества в опытной пробе идентифицируют, сравнивая их  $R_f$  с  $R_f$  веществ-«свидетелей».
8. Пятна веществ на пластинке обводят простым карандашом, вырезают ножницами и помещают в пробирку.
9. Приливают в пробирку 5 мл дистиллированной воды и проводят элюцию в течение 30 мин. в суховоздушном шкафу на 60 °С, периодически встряхивая.
10. Измеряют УФ-поглощение раствора на спектрофотометре против элюата, полученного из контрольного участка хроматограммы. Оптическую плотность измеряют при длине волны, характерной для максимума поглощения вещества, идентифицированного сравнением с хроматограммой веществ-«свидетелей».
11. Концентрацию вещества (в мг/мл) рассчитывают по формуле

$$C = \frac{[O.P.] \cdot MM \cdot 1000}{\varepsilon},$$

где  $O.P.$  – оптическая плотность элюата;  $MM$  – молекулярная масса вещества; 1000 – коэффициент разведения;  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции.

## Оформление работы

### К занятию:

- кратко законспектировать теоретические материалы по лабораторной работе.

### Во время занятия:

- кратко описать этапы работы;
- зарисовать хроматограмму;
- заполнить таблицу:

Длина волны, нм	Оптическая плотность	Rf					Обнаруженное вещество	Концентрация вещества в пробе, мг/мл
		Ade	dAdo	Ado	Ura	X		

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

### Ферментативный гидролиз дрожжевой рибонуклеиновой кислоты

#### Цель работы:

Расщепление дрожжевой РНК до нуклеозидов с использованием культуральной жидкости мицелиального гриба, содержащей экзонуклеазу и фосфатазу. Выявление двухфазного характера процесса. Количественная оценка глубины гидролиза биополимера.

### **Оборудование и материалы:**

- вытяжной шкаф;
- автоматические микропипетки;
- пробирки типа «Eppendorf»;
- термостат водяной на 50 °С;
- камера для тонкослойной хроматографии (ТСХ);
- пластинки «Silufol-UV<sub>254</sub>» фирмы Serva (Германия);
- электрополотенце;
- ультрамикроскоп;
- УФ-спектрофотометр;
- кварцевые кюветы с длиной пробега луча 1 см (2 шт.);
- колба с притертой пробкой для приготовления системы растворов;
- пробирки с притертой пробкой для элюции веществ с тонкослойных хроматографических пластинок (4 шт.);
- цилиндр на 100 мл;
- штатив для пробирок;
- ножницы;
- карандаш простой;
- линейка.

### **Реактивы:**

- рибонуклеиновая кислота из пекарских дрожжей;
- ферментный препарат (фильтрат культуральной жидкости мицелиального гриба *Spicaria violacea*), содержащий экзонуклеазу и фосфатазу;
- раствор, содержащий вещества-«свидетели»: РНК, рибонуклеозиды и рибонуклеозид-5'-монофосфаты.

## **ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ**

### **ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

#### **Роль и значение нуклеаз**

Ферменты, катализирующие деградацию нуклеиновых кислот путем разрыва межнуклеотидных фосфодиэфирных связей, присутствуют во всех живых организмах. Некоторые из них – РНКазы – активны исключительно по отношению к РНК, другие – ДНКазы – действуют на ДНК. Отдельная группа (так называемые неспецифические нуклеазы) проявляет активность в отношении как РНК, так и ДНК.

Родственными нуклеазам являются фосфомоноэстеразы (фосфатазы и нуклеотидазы) – ферменты, которые действуют на мононуклеотиды и полинуклеотиды, содержащие концевые фосфатные группы, освобождая при этом неорганический фосфат. Широкое распространение в природе нуклеаз и фосфатаз говорит о важной, хотя и далеко еще не окончательно понятой биологической роли, которую играют эти ферменты в живых организмах.

Говоря о роли нуклеаз в клетке, прежде всего следует отметить, что в клетках не только происходит синтез молекул ДНК и РНК, но и наблюдается их специфическая деградация при помощи довольно широкого спектра нуклеаз. Так, эндонуклеаза V *Escherichia coli* репарирует повреждения в одно- и двухнитевой ДНК, а эндонуклеаза Vsg инициирует репарацию T/G-ошибок спаривания. Участие экзонуклеаз в репарации ошибочно спаренных оснований показано также для *Saccharomyces cerevisiae* и вируса гриппа.

Показана роль нуклеаз у *E. coli* для поддержания структуры хромосом путем расщепления шпилечных структур, которые появляются в некоторых реакциях рекомбинации и мешают движению репликативной вилки.

3'-Экзонуклеазная активность у *E. coli* играет важную роль, обеспечивая образование брешей во время репарации межнитевых сшивок и повреждений в противолежащих нитях ДНК. Поэтому не является случайным то, что снижение активности экзонуклеазы *Bacillus subtilis* в результате мутации повышает чувствительность клеток к УФ-облучению.

Некоторые из нуклеаз выполняют несколько функций. Например, нуклеаза Mre11 *Sacch. cerevisiae* принимает участие в репарации и рекомбинации ДНК, а также в поддержании размера теломера.

Важная роль нуклеаз показана в так называемой запрограммированной гибели клеток (апоптозе) высших эукариот, в процессе которой происходит деградация ядерной ДНК под действием нескольких нуклеаз, находящихся под различной регуляцией. Аналогичная роль обнаружена недавно и для некоторых нуклеаз *Str. antibioticus*, которые участвуют в гибели клеток в процессе дифференцировки и споруляции мицелия. Мембран-связанная нуклеаза *Bac. subtilis* принимает основное участие в деградации ДНК в процессе гибели клеток, вызванной температурным шоком.

Интересное последовательное действие нуклеаз показано при деградации мРНК у эукариот. Так, на первой стадии специфическая нуклеаза проводит удаление полиаденилатного участка на 3'-конце молекулы мРНК, после чего специфическая фосфодиэстераза удаляет кэп на ее 5'-конце и, наконец, 5'→3'-экзонуклеаза полностью деградирует РНК до мононуклеотидов.

Некоторые внеклеточные нуклеазы защищают клетки бактерий от проникновения чужеродного генетического материала. Другие могут быть

вирулентными факторами у патогенных бактерий и вирусов. РНКазы, специфичные к субстратам poly(U) и poly(C), играют важную роль в процессинге РНК и терминеции транскрипции у бактерий и дрожжей.

Среди причин, привлекающих внимание многих исследователей к изучению нуклеаз, следует указать на перспективность использования этих ферментов:

- а) при получении нуклеотидов и нуклеозидов;
- б) в качестве противовирусных препаратов в медицине и сельском хозяйстве. В России разработан способ выращивания безвирусного картофеля методом апикальной меристемы с использованием бактериальных нуклеаз. Помимо антивирусной активности, эти нуклеазы обладают рост-стимулирующим действием, что способствует увеличению числа прижившихся меристем, увеличению длины ростков картофеля в 2–3 раза, увеличению числа и массы клубней. Бактериальные эндонуклеазы давно зарекомендовали себя как эффективное средство профилактики вирусного паралича пчел. Имеются данные о том, что РНКаза *B. intermedius* (РНКаза Bi) блокирует опухолевые клетки в G<sub>2</sub>/M-фазе клеточного цикла *in vitro* и *in vivo*, что представляет интерес с точки зрения возможности ее использования в комбинированной терапии опухолей;
- в) в качестве инструментов в исследовании структуры ДНК, создании рекомбинантных молекул, изучении генетического материала, в том числе геномной дактилоскопии;
- г) для удаления примесей РНК из препаратов ДНК и, наоборот, для решения обратной задачи;
- д) для уменьшения содержания нуклеиновых кислот в препаратах белков одноклеточных, предназначенных для пищевых и кормовых целей;
- е) для использования в качестве объектов изучения структурно-функциональных связей в химии белка;
- ж) для стимуляции роста микроорганизмов и растений, а также активации биосинтеза различных продуктов в микробиологической промышленности. Так, установлена способность микродоз РНКазы (биназы) ускорять образование биомассы лактобацилл и повышать их адгезивные свойства. РНКаза *Bac. intermedius* в дозе 0,01 мкг/мл стимулирует почкование пекарских дрожжей. При этом она не оказывает отрицательного влияния на такие важнейшие показатели дрожжей, как подъемная сила и осмочувствительность;

- з) для активации реакций клеточного и гуморального иммунитета.

Следует также отметить следующий факт. Недавно созданы трансгенные растения табака, содержащие ген РНКазы (специфичной в отношении двунитевой РНК), изолированный из ДНК *Schizosaccharomyces pombe*. Такие растения проявляют устойчивость к заражению различными фитовирусами.



## Классификация нуклеаз

Принципы, используемые для классификации нуклеаз, связаны с тремя их главными свойствами. Первое – это субстратная специфичность. Указанный критерий позволяет дискриминировать ферменты по их способности узнавать в виде субстратов либо РНК, либо ДНК, либо обе нуклеиновые кислоты. Вторым свойством является способ атаки субстрата. Этот критерий позволяет различать эндонуклеазы – ферменты, расщепляющие связи внутри полимерной цепи, от экзонуклеаз, последовательно отщепляющих нуклеотиды с одного из концов цепи. Следует отметить, что некоторые экзонуклеазы (например, фермент, выделяемый из змеиного яда) в литературе называют фосфодиэстеразами. Однако, поскольку и эндонуклеазы являются фосфодиэстеразами, некорректно применять этот термин только к некоторым из них, а именно к экзонуклеазам. С третьим свойством связан способ разрыва фосфодиэфирной связи – гидролиз связи между 5'-ОН-группой и фосфатом или связи между 3'-ОН-группой и фосфатом с образованием продуктов, несущих соответственно 3'- или 5'-концевые фосфатные группы. Для характеристики действия нуклеаз привлекаются и другие критерии. Среди них:

а) отношение ко вторичной структуре субстрата. По этому признаку ДНКазы разделяются на ферменты, расщепляющие двухцепочечную, одноцепочечную или обе указанные формы ДНК;

б) способность расщеплять ДНК по одно- или двухударному механизму, разрывая обе цепи полимера в одном и том же участке или производя беспорядочные одиночные разрывы;

в) специфичность к азотистым основаниям у гидролизуемой фосфодиэфирной связи. Этот критерий, введенный после обнаружения специфичности панкреатической РНКазы к участкам РНК, содержащим пиримидины, оправдывает себя по отношению к некоторым РНКазам и особенно рестрикционным эндонуклеазам;

г) специфичность к определенным нуклеотидным последовательностям (так называемые рестриктазы).

Механизм разрыва фосфодиэфирных связей эндонуклеазами в молекулах нуклеиновых кислот может быть различным. Некоторые из них (так называемые циклизующие) вначале выступают как трансферазы, образуя по месту будущего разрыва циклофосфаты, а затем как гидролазы, гидролизуя циклические (2',3')-фосфодиэфирные связи образованных на первом этапе промежуточных продуктов (рис. 1). Это свойство присуще РНКазам, фрагментирующим РНК на олигонуклеотиды, несущие фосфат в положении 3'.

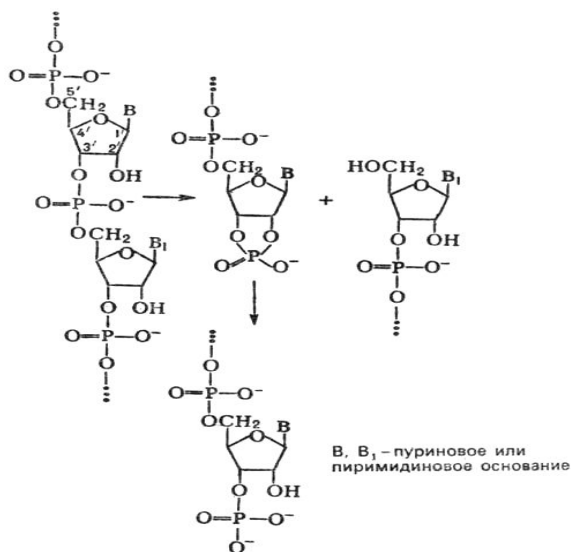


Рис. 1. Гидролиз РНК циклизующей эндонуклеазой

Другие эндонуклеазы ведут себя как истинные гидролазы, одноактно гидролизуют межнуклеотидные связи нуклеиновых кислот. К ним относятся все ДНКазы, а также ферменты, деградирующие РНК на олигонуклеотиды с концевым 5'-фосфатом. Гидролазами являются также все экзонуклеазы.

ДНКазы подразделяются на ДНКазы I, продукты которых несут фосфат на 5'-конце цепи, и ДНКазы II, образующие олигонуклеотиды с концевой фосфатной группой в положении 3'. На рис. 2 представлена несколько упрощенная классификационная схема нуклеаз. Следует отметить, что рассмотренная классификация нуклеаз на практике часто выявляет свою относительность. Например, имеется несколько ферментов, которые могут выступать и как эндо-, и как экзонуклеазы. Кроме того, недавно было показано, что некоторые бактериальные и дрожжевые ДНКазы имеют и геликазную активность. При этом дрожжевой фермент проявляет еще и ДНК-зависимую АТФазную активность. Некоторые РНКазы, например РНКазы Н, расщепляют РНК исключительно в составе гибрида с комплементарной цепочкой ДНК.

### Роль и значение фосфатаз

Фосфатазы (гидролазы моноэфиров фосфорной кислоты, КФ 3.1.3) широко распространены среди живых организмов. Они могут быть неспецифическими (гидролизуют широкий ряд субстратов) и специфическими

(например, 5'-нуклеотидазы, КФ 3.1.3.5, гидролизующие только нуклеозидмонофосфаты; NMP). По отношению к pH действия неспецифические фосфатазы подразделяют на кислые (КФ 3.1.3.2) и щелочные (КФ 3.1.3.1).

Неспецифические фосфатазы и нуклеотидазы встречаются в различных тканях животных, растений и микроорганизмах.

У млекопитающих кислые фосфатазы формируют семейство генетически различающихся изоферментов (так называемые эритроцитарная, лизосомальная, простатная и макрофагальная формы).

Кислые фосфатазы растений локализуются в основном внутри клетки, но могут секретироваться корнями некоторых растений в ризосферу при фосфорном голодании.

У простейших показано наличие внутриклеточной, мембран-связанной и секретируемой форм кислой фосфатазы.

У дрожжей и низших грибов кислая фосфатаза может как локализоваться внутри клеток, так и секретироваться в среду. При этом биосинтез большинства секретируемых форм кислой фосфатазы репрессируется неорганическим фосфатом ( $P_i$ ).

У бактерий, помимо внутриклеточного расположения, кислые фосфатазы локализуются в периплазме (грамотрицательные бактерии) или секретируются в среду (грамположительные бактерии).

Щелочная фосфатаза животных (так же как и кислая) локализуется внутриклеточно и может секретироваться в среду, но для нее показано наличие и мембран-связанной формы.

Среди микроорганизмов щелочная фосфатаза чаще всего встречается у бактерий с локализацией, аналогичной кислой фосфатазе. При этом следует отметить, что локализация фермента может меняться в зависимости от условий роста культуры. Так, секретируемая щелочная фосфатаза *Bac. intermedius* S3-19 обнаруживается также в клеточной стенке, мембране и цитоплазме. Количественное же ее распределение зависит от возраста культуры и состава среды.

5'-Нуклеотидазы в отличие от неспецифических фосфатаз значительно реже встречаются в природе. Наиболее широко они представлены в тканях высших животных. Так, высокий уровень их активности наблюдается в цитозоле клеток скелетной и сердечной мускулатуры, средний уровень – в клетках поджелудочной железы и мозга и низкий уровень – в клетках почек, яичек и матки. Высокая активность 5'-нуклеотидаз обнаруживается также в цитозоле миелоидных лейкозных клеток и в эритроцитах.

У бактерий 5'-нуклеотидазы могут экспонироваться на поверхности клеток (*Haemophilus influenzae*) или локализоваться в периплазматическом пространстве.

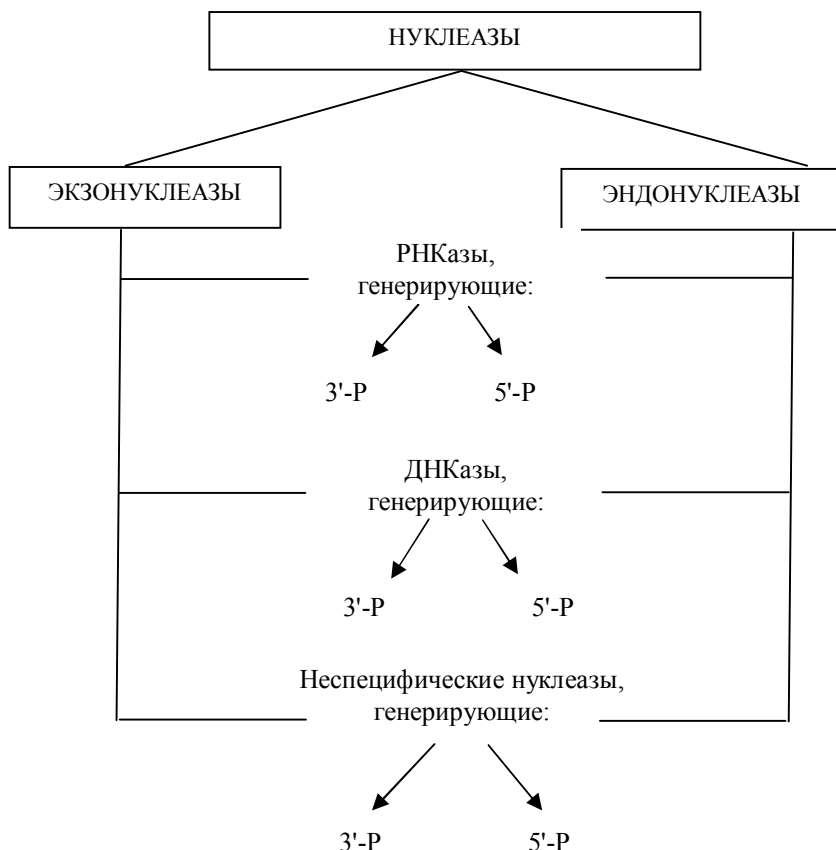


Рис. 2. Упрощенная классификация деполимераз нуклеиновых кислот

Функциональная роль неспецифических фосфатаз и нуклеотидаз, особенно у высших организмов, еще далеко не выяснена. Известно, что при раке предстательной железы у человека резко увеличивается уровень тартрат-чувствительной кислой фосфатазы в сыворотке крови, что уже достаточно давно используется в диагностике этого заболевания. Предполагается, что макрофагальная тканеспецифичная кислая фосфатаза (тартрат-устойчивая) вовлечена в резорбцию костей, гомеостаз железа (транспорт, метаболизм), связана с болезнью Гаушера селезенки и гигантоклеточной опухолью костей. Недавно получены данные о том, что этот фермент может играть важную биологическую роль в защитном механизме макрофагов путем генерирования внутриклеточного активного кислорода, который участвует в разрушении фагоцитируемого чужеродного материала. У микроор-

ганизмов и простейших кислая фосфатаза, по-видимому, принимает участие в температурной адаптации. Важную роль играют кислые фосфатазы у микроорганизмов и растений в катализе многочисленных реакций обмена с участием фосфорилированных метаболитов и фосфорном питании.

Физиологическая роль щелочной фосфатазы у высших организмов также еще далеко не выяснена. Показано, что она играет существенную роль в минерализации костной ткани. Ее недостаточная активность приводит к возникновению различных форм гипофосфатозии. По-видимому, щелочная фосфатаза играет определенную роль и в прогрессировании злокачественных образований в костях, поскольку экспрессия гена этого фермента в клетках остеосаркомы приводила к существенному снижению их агрессивности. Кроме того, недавно показано участие мембран-связанной щелочной фосфатазы в модуляции трансмембранных транспортных систем млекопитающих. Так, фермент, находящийся на апикальной поверхности клеток гематоэнцефалического барьера у крыс, способствует проникновению через него инсулина.

Специфические фосфатазы (пиримидиновые 5'-нуклеотидазы) специфически экспрессируются в ретикулоцитах и необходимы для созревания эритроцитов. При недостатке этого фермента наблюдается гемолитическая анемия. Имеет место повышенный уровень 5'-нуклеотидазы в миелоидных клетках при острой лейкемии и в клетках колоректальной карциномы.

В практическом аспекте неспецифические фосфатазы и нуклеотидазы привлекают к себе внимание по следующим причинам. Во-первых, эти ферменты незаменимы при ферментативном получении рибо- и дезоксирибонуклеозидов из природных источников – нуклеиновых кислот. В таких процессах они используются на второй стадии гидролиза ДНК или РНК до нуклеозидов – после расщепления нуклеиновых кислот экзонуклеазами до смеси мононуклеотидов. В ряде случаев доказана технологическая приемлемость получения нуклеозидов под действием фосфатаз из соответствующих изолированных мононуклеотидов. Во-вторых, в медицине по уровню их активности диагностируют или предлагается диагностировать хронический гепатит у детей и образование микрометастазов в печени (5'-нуклеотидаза), рак предстательной железы, гигантоклеточный рак костей и резорбцию костей (кислая фосфатаза). В-третьих, в пищевой промышленности их можно использовать для определения микробного заражения поверхности мяса и дефосфорилирования казеина в сыроделии (кислая фосфатаза).

## **Гидролиз РНК до нуклеозидов**

Гидролиз РНК до нуклеозидов можно осуществлять как химически, так и ферментативно. При этом в обоих случаях сначала гидролизуются фосфодиэфирные связи с образованием мононуклеотидов, которые затем

дефосфорилируются до нуклеозидов. Химический гидролиз РНК до нуклеозидов, как правило, осуществляют с помощью какого-то одного агента, например ионов  $Pb^{2+}$  или  $Ca^{2+}$ , в то время как ферментативный гидролиз требует наличия двух ферментов – экзонуклеазы и фосфатазы.

Химический гидролиз РНК до нуклеозидов протекает наиболее эффективно (глубина гидролиза достигает 95–100 %) под действием ионов  $Pb^{2+}$ . Однако из-за высокой токсичности соединений свинца указанный подход не нашел широкого применения. По этой причине чаще для гидролиза РНК используется кальций, который хотя и менее эффективен, чем свинец, но зато совершенно нетоксичен. Гидролиз РНК (концентрация 100–150 мг/мл) ионами  $Ca^{2+}$ , образующимися из вводимого в реакционную смесь  $Ca(OH)_2$ , проводят в течение 4 ч при 130 °С, достигая выхода нуклеозидов 75–87 % от теоретически возможного. При характеристике этого метода следует отметить, что он позволяет использовать РНК в высокой концентрации и, соответственно, получать высокие концентрации нуклеозидов в конечной среде. Это, в свою очередь, облегчает последующую кристаллизацию из нее Guo и Ado. Кроме того,  $P_i$ , образующийся в процессе дефосфорилирования мононуклеотидов, выводится из раствора в виде нерастворимых кальциевых солей, что значительно упрощает выделение из реакционной смеси Cud и Urd, поскольку они выделяются с помощью ионообменной хроматографии. Существенным недостатком рассматриваемого подхода являются жесткие экспериментальные условия, требующие специального оборудования, и недостаточно высокий выход нуклеозидов из-за образования побочных продуктов. Тем не менее промышленное получение нуклеозидов из РНК основано именно на этом методе.

Более высокими потенциальными возможностями обладают ферментативные способы получения нуклеозидов из РНК, поскольку они отличаются сравнительно высокой специфичностью и мягкими условиями проведения процесса.

### **Контрольные вопросы:**

1. Типы нуклеиновых кислот.
2. Основные компоненты РНК.
3. Основные компоненты ДНК.
4. Классификация нуклеаз.
5. Субстратная специфичность нуклеаз.
6. Эндонуклеазы.
7. Экзонуклеазы.
8. Химические способы получения нуклеозидов.
9. Ферментативные способы получения нуклеозидов.
10. Биологическая роль нуклеаз.

## Список литературы:

1. Елинов, Н. П. Основы биотехнологии / Н. П. Елинов. – СПб. : Наука, 1995.
2. Бокуть, С. Б. Курс лекций по молекулярной биологии клетки / С. Б. Бокуть, Н. В. Герасимович, А. А. Милютин. – Минск : Вышэйш. школа, 2005.
3. Белясова, Н. А. Биохимия и молекулярная биология : учеб. пособие / Н. А. Белясова. – Минск : Книжный Дом, 2004.
4. Пособие BIO (Biotechnology Industry Organization) по биотехнологии [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.cbio.ru/>. – Дата доступа: 01.01.2008.
5. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.cbio.ru/>. – Дата доступа: 01.01.2008.
6. Галимова, М. Х. Ферментативная кинетика: справочник по механизмам реакций / М. Х. Галимова. – М. : КомКнига, 2007. – 320 с.
7. Мушкамбаров, Н. Н. Молекулярная биология : учеб. пособие для студ. мед. вузов / Н. Н. Мушкамбаров, С. Л. Кузнецов. – М. : ООО «Мед. информ. агентство», 2007.

## ХОД РАБОТЫ

1. К 0,8 мл раствора, содержащего 5 мг дрожжевой РНК в 50 мМ Na-ацетатном буфере (рН 6,0) и помещенного в пробирку типа «Eppendorf», прибавляют 200 мкл культуральной жидкости гриба *Spicaria violacea*.
2. Быстро отбирают «нулевую пробу» (5 мкл) и наносят ее на тонкослойную хроматографическую пластинку.
3. Полученную реакционную смесь помещают в водяной термостат, в котором поддерживается температура 50 °С.
4. Спустя 15 мин. и 30 мин. из реакционной смеси вновь отбирают аликваты (по 5 мкл), помечая их соответственно «проба-15 мин» и «проба-30 мин». Эти пробы, а также раствор «свидетелей» по 5 мкл наносят на тонкослойную пластинку.
5. Пробы подвергают восходящей хроматографии с использованием системы растворителей изопропанол–25%-ный аммиак–вода (7:2:2).
6. После завершения процесса хроматографии пластинки тщательно высушивают в токе нагретого воздуха и просматривают в УФ-свете под ультрахемископом.
7. Идентифицируют положение продуктов реакции на хроматограмме, сравнивая ее с хроматограммой образцов-«свидетелей». Пятна продуктов реакции аккуратно обводят простым карандашом, вырезают ножницами и помещают в пробирки для элюции.

8. Вносят в пробирки по 5 мл воды и инкубируют их 30 мин. при комнатной температуре, периодически встряхивая.

9. Измеряют оптическую плотность элюатов при 260 нм против элюата, полученного из участка хроматограммы, не содержащего светопоглощающего материала.

10. Для расчета выхода реакции гидролиза РНК до нуклеозидов используют формулу

$$A = \frac{D \sum_{\text{нуклеозидов}}}{D \sum_{\text{нуклеозидов}} + D \sum_{\text{нуклеотидов}}} \times 100 \% ,$$

где  $D \sum_{\text{нуклеозидов}}$  – оптическая плотность суммарного элюата нуклеозидов;  $D \sum_{\text{нуклеотидов}}$  – оптическая плотность суммарного элюата нуклеотидов.

## **Оформление работы**

### **К занятию:**

- кратко законспектировать теоретические материалы по лабораторной работе.

### **Во время занятия:**

- кратко описать этапы работы, указав, выявлен ли двухстадийный характер процесса гидролиза РНК;
- указать достигнутый выход реакции ферментативного гидролиза РНК до нуклеозидов;
- зарисовать хроматограмму.

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3**

### **Ферментативный синтез конъюгата противолейкозного нуклеозида с фосфолипидом с помощью микробной фосфолипазы D**

#### **Цель работы:**

Синтезировать фосфолипидное производное модифицированного нуклеозида – 2-хлор-2'-дезоксиаденозина (ХДА) с использованием фосфолипазы D (ФЛД) из фильтрата культуральной жидкости (ФКЖ) *Streptomyces netropsis*.



## **Оборудование и материалы:**

- вытяжной шкаф;
- автоматические микропипетки;
- флакон (3–5 мл) с плотно закручивающейся крышкой;
- магнитная мешалка;
- микрокапилляр;
- термостат, поддерживающий температуру 37 °С;
- камера для тонкослойной хроматографии (ТСХ);
- пластинки «Silufol-UV254» фирмы Serva (Германия);
- электрополотенце;
- ультрамикроскоп;
- УФ-спектрофотометр;
- кварцевые кюветы с длиной пробега луча 1 см (2 шт.);
- колба с притертой пробкой для приготовления системы растворителей;
- пробирки с притертой пробкой на 10–20 мл для элюции веществ с тонкослойных хроматографических пластинок (4 шт.);
- цилиндр на 100 мл;
- штатив для пробирок;
- ножницы, карандаш простой, линейка.

## **Реактивы:**

- 2-хлор-2'-дезоксиаденозин (ХДА);
- яичный лецитин (фосфатидилхолин);
- Na-ацетатный буфер (рН 6,0);
- перегнанный хлороформ;
- этиловый спирт;
- ферментный препарат фосфолипазы D (ФЛД) *Streptomyces netropsis*;
- раствор, содержащий вещества-«свидетели»: ХДА, фосфатидил-ХДА.

## **ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ**

### **ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ТРАНСФОСФАТИДИЛИРОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ФОСФОЛИПАЗЫ D**

#### **Роль и значение фосфолипаз**

Фосфолипазы катализируют гидролиз фосфолипидов. Различают четыре типа ферментов с различной регио- и стереоселективностью; их сайты расщепления молекулы фосфолипида указаны на рис. 1.

ФЛД (КФ 3.1.4.4) – фермент, который катализирует гидролиз фосфатидилхолина с образованием фосфатидной кислоты и холина. В присутствии спиртов ФЛД может катализировать реакцию трансфосфатидилирования, в результате которой фосфатидильный остаток фосфолипида переносится на первичную или, в особых условиях, на вторичную спиртовую группу большого числа соединений. Соотношение указанных ферментативных превращений зависит как от условий проведения реакции, так и от происхождения фермента, который обнаруживают в клетках бактерий, грибов, растений и позвоночных.

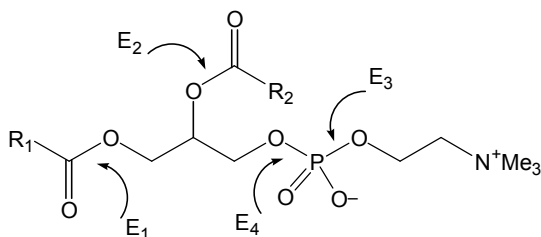


Рис. 1. Гидролиз фосфатидилхолина под действием фосфолипаз: E<sub>1</sub> – фосфолипаза A<sub>1</sub>; E<sub>2</sub> – фосфолипаза A<sub>2</sub>; E<sub>3</sub> – фосфолипаза C; E<sub>4</sub> – фосфолипаза D; R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> – алкилы

Бактериальная ФЛД может конкурентным образом реагировать с вновь синтезированным продуктом трансфосфатидилирования и гидролизовать его, что снижает эффективность реакции. Для предотвращения этого эффекта реакцию, как правило, проводят в двухфазной системе, состоящей из водного буфера и органического растворителя (например, хлороформа, диэтилового эфира, этилацетата и др.), в которой содержание воды понижено.

ФЛД вначале была обнаружена (1947 г.) у высших организмов, поэтому долгое время считалось, что фермент характерен только для растений. Однако дальнейшие исследования доказали наличие ФЛД и у других типов организмов, в том числе и у микроорганизмов.

ФЛД вначале была обнаружена (1947 г.) у высших организмов, поэтому долгое время считалось, что фермент характерен только для растений. Однако дальнейшие исследования доказали наличие ФЛД и у других типов организмов, в том числе и у микроорганизмов.

## Методы определения активности ФЛД

Так как фермент катализирует две реакции – трансферазную и гидролиз, то при выборе метода необходимо учитывать тип реакции, тип субстрата, форму его дисперсии, тип активатора и нуклеофильного акцептора. Определение активности фермента можно производить по скорости исчезновения субстрата или образования продукта. Однако необходимо помнить, что при наличии грубого экстракта или недостаточно очищенного фермента возможно действие других ферментов, действующих на субстрат и продукт, что может привести к появлению ошибки в результате.

ФЛД действует на фосфолипиды различной структуры, в том числе и естественно встречающиеся фосфолипиды, содержащие смесь насы-

щенных и ненасыщенных жирных кислот, которые могут быть в свободном или мембран-связанном виде.

Для определения активности ФЛД используют следующие методы:

- 1) физический;
- 2) ацидометрический;
- 3) спектрофотометрический;
- 4) радиохимический.

При этом продукт должен быть отделен от субстрата. Растворимый в воде продукт отделяют от липидов либо окислением (в конце реакции добавляют трихлоруксусную или хлорную кислоту), либо добавлением хлороформа и метанола, чтобы сформировать двухфазную систему. После окончания реакции происходит разделение продуктов между гидрофильной (водой) и гидрофобной системами. Затем проводят идентификацию продуктов с использованием ТСХ или химического анализа.

Самый чувствительный и надежный метод определения активности ФЛД – это использование радиоактивно меченого субстрата. Его можно приготовить биохимически или биологически, например, выделив меченый фосфолипид из клеток почек обезьяны, выращенных в присутствии [ $^3\text{H}$ ] $\text{CH}_3$  – холина, а также из клеток *Escherichia coli* или дрожжей, в присутствии [ $^{14}\text{C}$ ] $\text{CH}_3$  – холина, или из клеток *Hemophilus parainfluenza* и водорослей рода *Chlorella* в присутствии  $^{32}\text{P}$ ].

Другие методы менее чувствительны и специфичны. Можно измерить концентрацию полярных групп, генерированных ФЛД, спектрофотометрически. При этом определение холина идет по трийодиду или аммонию, этаноламина – по периодату или нингидриновым методом. Для определения глицерина используют ферментативную реакцию с участием глицерокиназы и 4-глицерол-3-фосфатдегидрогеназы. Эти процедуры могут быть использованы для одновременного разделения и количественного определения других возможных продуктов реакций, катализируемых ФЛД.

## Субстратная специфичность ФЛД

Действие фермента катализирует гидролиз широкого ряда фосфолипидов. Однако при определенных условиях это может ограничиваться небольшим числом фосфолипидов, а при изменении экспериментальных условий специфичность может варьироваться в широких пределах. Одним из факторов, влияющих на субстратную специфичность, является физическое состояние субстрата. Но также описаны препараты ФЛД, имеющие строгую специфику лишь для одного или двух субстратов. Особенно это характерно для бактериальных ферментов.

ФЛД актиномицетов, в отличие от других ферментов, имеет очень широкую субстратную специфичность. При гидролизе или трансфосфатилировании субстратами фермента являются практически все природные

фосфолипиды и достаточно широкий спектр синтетических фосфолипидов. Эти ферменты также воспринимают в качестве субстратов и различные алкилфосфатные эфиры. В обоих случаях субстратные свойства ухудшаются с уменьшением длины жирнокислых остатков.

В большинстве случаев для ФЛД более предпочтительным субстратом является фосфатидилхолин. Однако ФЛД из *Str. hashijiensis* лучше всего гидролизует фосфатидилэтаноламин, а для фермента *Streptoveriticulum cinnamomeum* в реакции гидролиза лучшим субстратом является фосфатидилэтаноламин, а в реакции трансфосфатидилирования – фосфатидилхолин.

## Реакция трансфосфатидилирования

Так как большинство фосфолипидов практически нерастворимо в воде, то реакция трансфосфатидилирования лучше проходит в эмульсионных системах, формируемых раствором фосфолипида в несмешивающемся с водой растворителе (это может быть эфир, хлороформ, гексан или этилацетат) и раствором фермента.

На выход и скорость реакции большое влияние оказывают: вид донора и акцептора фосфатидильного остатка, их концентрации и соотношение, эмульгированность реакционной среды, вид органического растворителя и его соотношение с водой (чем больше воды, тем преимущественнее идет реакция гидролиза) и ряд других факторов.

Сравнительно недавно опубликованы работы, где было показано влияние количества воды в реакционной среде. После иммобилизации ФЛД приобретает способность вести достаточно эффективно реакцию трансфосфатидилирования и в чисто водной среде. При этом выход реакции синтеза фосфатидилглицерина из фосфатидихолина и глицерина, катализируемой ФЛД, ковалентно связанной с аминопропильной поверхностью стеклянных шариков, достигал 60 % при практически полном отсутствии реакции гидролиза фосфатидихолина. С другой стороны, в присутствии катионообменной смолы, которая сорбирует холин, образующийся в процессе реакции, ФЛД способна очень эффективно вести реакцию трансфосфатидилирования в полностью безводной среде.

ФЛД отличаются друг от друга по соотношению между гидролазной и трансфосфатидилазной активностями. При анализе различных ФЛД актиномицетов в стандартных экспериментальных условиях было показано, что ферменты можно разделить на 2 группы. К первой группе относятся ФЛД, у которых гидролазная активность превалирует над трансфосфатидилазной, ко второй – ферменты, у которых, наоборот, вторая активность превалирует над первой. Поскольку с практической точки зрения трансфосфатидилазная активность представляет собой значительно больший интерес, чем гидролазная, некоторые исследователи при поиске продуцентов этих ферментов

специально ведут целенаправленный отбор штаммов по способности ФЛД вести преимущественное трансфосфатидилирование.

## **Механизмы действия фермента и способы активации**

Реакция катализа происходит на границе раздела фаз. Это обусловлено тем, что субстраты фермента не растворяются в воде, а находятся в ней в виде различных структур. Поэтому фермент оптимально функционирует на границе раздела фаз. Например, скорость гидролиза водорастворимых фосфатидилхолинов существенно возрастает при достижении критической концентрации, при которой происходит образование мицелл.

При работе с субстратформирующими комплексами существует ряд трудностей. Первая заключается в их аутоагрегации в водных средах, из-за чего возникают трудности с сохранением структуры. Вторая трудность – неустойчивость фермента по мере приближения к гомогенному состоянию. Поэтому взаимодействия между ФЛД и фосфолипидами относятся к реакциям ферментов в гетерогенных системах.

ФЛД *Streptomyces* способны осуществлять перенос фосфатидных остатков с фосфолипидов на нуклеозиды. Этот процесс происходит, скорее всего, через пинг-понг-механизм с образованием промежуточного ковалентного комплекса между ферментом (через гистидиновый остаток, находящийся в активном центре) и фосфатидным остатком, образующимся после разрыва терминальной фосфозфирной связи фосфолипида. Образовавшаяся ковалентная связь разрывается при наличии ионов гидроксидов (реакция гидролиза) или первичной спиртовой группы (реакция трансфосфатидилирования). При этом гидролиз фосфолипида идет через разрыв фосфозфирной связи Р-О, а не С-О.

Замечено, что наиболее превращаемые ФЛД субстраты содержат в полярной части молекулы положительно заряженные аминогруппы (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин) или гидроксильную группу (фосфатидилглицерол). Исходя из этого можно предположить, что во взаимодействии фермента с субстратом участвуют ионные и водородные связи. С другой стороны, наличие этих групп играет важную роль для фосфолипидов в обеспечении особой структуры и свойств границы раздела фаз, что облегчает образование фермент-субстратного комплекса. Скорость протекания реакции трансфосфатидилирования зависит не только от наличия гидроксид- или аминогрупп, но и от количества таких групп в полярной части фосфолипида. Считается, что увеличение количества этих групп увеличивает скорость трансфосфатидилирования. Показана зависимость и от размера. При введении в полярную часть фосфатидилэтаноламина объемного динитрофенильного заместителя он становится полностью неспособным к участию в реакциях гидролиза и трансфосфатидилирования, катализируемых ФЛД.

В реакциях превращения насыщенных фосфатидилхолинов при участии ФЛД, выделенной из капусты, скорость замедляется при увеличении количества атомов углерода в жирнокислотных остатках. Возможно, механизм этого эффекта заключается в меньших энергетических затратах на перенос фосфолипидов из интерфазы «эфир – вода» в активный центр фермента.

Очищенная ФЛД находится в неустойчивом состоянии на некоторых поверхностях. Присутствие в более концентрированных состояниях предотвращает ее инактивацию.

## Применение ФЛД

Первыми продемонстрировали возможность ферментативного получения фосфолипидных производных некоторых нуклеозидов, используя ФЛД, японские ученые. Химические методы конъюгирования фосфолипидов с нуклеозидами очень сложны и характеризуются низким выходом продуктов, особенно в случае с нуклеозидами, содержащими реактивные функциональные группы.

Действуя на фосфолипиды, ФЛД проявляет гидролитическую и трансфосфатидилазную активность. В настоящее время установлено, что, несмотря на широкое распространение ФЛД, трансфосфатидилирование с участием нуклеозидов осуществляет только фермент, выделенный из культуральной жидкости стрептомицетов (рис. 2).

Модифицированные нуклеозиды, обладающие высокой противовирусной и противоопухолевой активностью *in vitro*, часто не находят применения в клинике из-за быстрого катаболизма до неактивных соединений в кровяном русле и избыточной токсичности для быстро делящихся нормальных клеток. Для преодоления этих проблем в ряде стран начаты интенсивные исследования, целью которых является создание нового поколения лекарственных препаратов на основе конъюгатов антивирусных и противоопухолевых нуклеозидов с фосфолипидами.

Эти конъюгаты содержат фосфатидный остаток в качестве нетоксичной транспортной группы, которая защищает нуклеозид от инактивации ферментами и облегчает проникновение лекарств в пораженные клетки из-за высокой аффинности к клеточным мембранам. Внутри клеток происходит постепенное высвобождение нуклеозида, иногда уже в 5'-монофосфорилированной форме, что укорачивает цепь трансформации в нуклеозид 5'-трифосфат, который является действующим началом. Это также имеет решающее значение для тех систем, где отсутствует соответствующая нуклеозидкиназа. Помимо этого, в опухолевых клетках содержится довольно высокий уровень ФЛД. Этот фермент способствует высвобождению родительского нуклеозида в клетке, что может привести к увеличению селективности действия данных соединений.

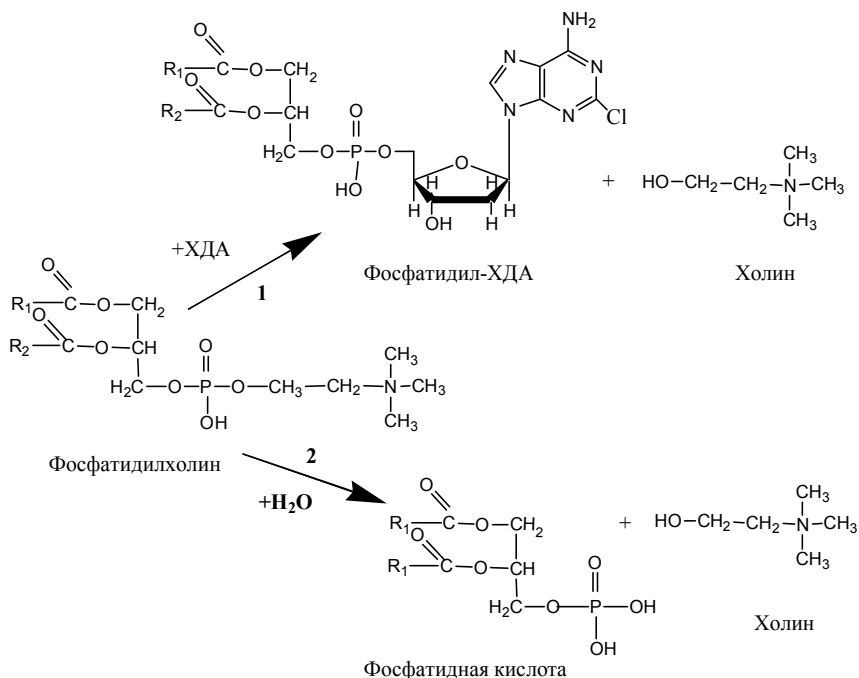


Рис. 2. Реакции трансфосфатидирования (1) и гидролиза (2), катализируемые ФЛД *Streptomyces netropsis*

Японскими исследователями предложен ферментативный метод получения фосфолипидных аналогов нуклеозидов. Он заключается в переносе фосфатидного остатка с лецитина на первичные спирты, катализируемом ФЛД. В настоящее время в некоторых лабораториях ведется химический синтез фосфатидных аналогов известных нуклеозидов, которые используются в терапии СПИДа: 3'-азидо-3'-дезокситимидин и 2',3'-дидезоксиинозин, 2',3'-дигидротимидин. Их антивирусная активность сопоставима с активностью входящих в их состав нуклеозидов, однако конъюгаты обладают меньшей токсичностью в отношении нормальных органов и тканей.

### Контрольные вопросы:

1. Типы фосфолипаз.
2. Реакции, катализируемые ФЛД.
3. Определения активности ФЛД.

4. Гидролиз фосфатидилхолина под действием фосфолипаз.
5. Гидролитическая активность ФЛД.
6. Трансфосфатидилазная активность ФЛД.
7. Механизм трансфосфатидилирования.
8. Субстратная специфичность ФЛД.
9. Особенности ФЛД стрептомицетов.
10. Применение ФЛД.

### **Список литературы:**

1. Овчинников, Ю. А. Биоорганическая химия / Ю. А. Овчинников. – М. : Просвещение, 1987.
2. Бокуть, С. Б. Курс лекций по молекулярной биологии клетки / С. Б. Бокуть, Н. В. Герасимович, А. А. Милютин. – Минск : Вышэйш. школа, 2005.
3. Беясова, Н. А. Биохимия и молекулярная биология : учеб. пособие / Н. А. Беясова. – Минск : Книжный Дом, 2004.
4. Галимова, М. Х. Ферментативная кинетика: справочник по механизмам реакций / М. Х. Галимова. – М. : КомКнига, 2007. – 320 с.
5. Итоги научной деятельности Института микробиологии Национальной академии наук Беларуси (1975–2005): обзорные статьи. – Минск, 2005.
6. Микробная биотехнология: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / под ред. Э. И. Коломиец, А. Г. Лобанка. – Т. 1. – Минск : Изд-во «ИП Логвинов», 2007.

### **ХОД РАБОТЫ**

1. Навеску яичного лецитина (40 мг) вносят во флакон (3–5 мл) с плотно завинчивающейся крышкой, растворяют в 0,67 мл хлороформа и прибавляют 150 мкл раствора ХДА в буфере (19 мг/мл).
2. Смесь выдерживают 5 мин. при 37 °С в термостате, перемешивая на магнитной мешалке.
3. Прибавляют 0,18 мл раствора фермента в буфере, интенсивно перемешивают несколько секунд на мешалке.
4. Отбирают «нулевую» пробу (5 мкл) и наносят ее на пластинку для тонкослойной хроматографии.
5. Реакционную смесь инкубируют при 37 °С и интенсивном перемешивании, обеспечивающем максимальное соприкосновение двух фаз.
6. Через 15 и 40 мин. отбирают аликвоты по 5 мкл, наносят их на пластину для ТСХ, на которую для контроля также наносится раствор ХДА.
7. Вещества подвергают восходящей хроматографии в системе растворителей хлороформ – этанол – вода (15:5:0,7).



8. Хроматограммы рассматривают в УФ-свете; пятна, соответствующие ХДА и фосфатидил-ХДА, вырезают и элюируют нуклеозид в 5 мл дистиллированной воды, а фосфолипидное производное – в 5 мл этанола.

9. Оптическую плотность элюатов измеряют на спектрофотометре при  $\lambda = 265$  нм.

10. Выход продукта – фосфатидил-ХДА – рассчитывают по формуле

$$X = \frac{C_1}{C_1 + C_2} \times 100\%$$

где  $C_1$  – молярная концентрация фосфатидил-ХДА в элюате;  $C_2$  – молярная концентрация ХДА в элюате.

Для расчета  $C_1$  и  $C_2$  используют коэффициент молярной экстинкции фосфатидил-ХДА и ХДА при  $\lambda = 265$  нм, равный  $15\,700\text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

## Оформление работы

### К занятию:

- кратко законспектировать теоретические материалы по лабораторной работе.

### Во время занятия:

- кратко описать этапы работы;
- определить выход фосфатидил-ХДА за 20 и 40 мин. реакции;
- зарисовать хроматограммы.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

### Синтез противовирусного нуклеотида с использованием препарата рекомбинантной нуклеозидфосфотрансферазы *Erwinia herbicola*

#### Цель работы:

Синтезировать противовирусный нуклеотид – аденин-арабинозид-5'-монофосфат (ара-АМФ) из аденин-арабинозида (ара-А) и *para*-нитрофенилфосфата (*p*-НФФ) под действием рекомбинантной нуклеозидфосфотрансферазы (рекНФТ) *Erw. herbicola*.

### **Оборудование и материалы:**

- вытяжной шкаф;
- автоматические микропипетки;
- пробирки типа «Eppendorf»;
- термостат водяной на 50 °С;
- магнитная мешалка;
- камера для тонкослойной хроматографии (ТСХ);
- пластинки «Silufol-UV254» фирмы Serva (Германия);
- электрополотенце;
- ультрамикроскоп;
- УФ-спектрофотометр;
- кварцевые кюветы с длиной пробега луча 1 см (2 шт.);
- колба с притертой пробкой для приготовления системы растворителей;
- пробирки с притертой пробкой для элюции веществ с тонкослойных хроматографических пластинок (4 шт.);
- цилиндр на 100 мл;
- штатив для пробирок;
- ножницы;
- карандаш простой;
- линейка.

### **Реактивы:**

- аденинарабинозид (ара-А);
- *n*-нитрофенилфосфат (*n*-НФФ);
- ферментный препарат (рекНФТ *Erw. herbicola*);
- Na-ацетатный буфер (рН 4,75);
- раствор, содержащий вещества-«свидетели»: ара-А, *n*-НФФ, ара-АМФ, *n*-нитрофенол (*n*-НФ).

## **ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ**

### **ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ НУКЛЕОЗИДОВ**

#### **Применение нуклеозидмонофосфатов (НМФ)**

Как известно, большинство химических субстанций для противовирусных и противоопухолевых лекарственных препаратов представляют собой модифицированные нуклеозиды. В качестве примеров можно привести азидотимидин, аденинарабинозид, кладрибин, керецид, BVDU, ви-

разол и т. д. В ряде случаев продемонстрировано, что в качестве субстанций целесообразнее применять не сами нуклеозиды, а их 5'-монофосфаты, поскольку при этом:

а) повышается растворимость субстанции, что делает ее более удобной в применении;

б) реже развивается устойчивость вируса или опухолевых клеток к лекарственному средству, поскольку укорачивается цепь метаболической активации нуклеозида – трансформации его в нуклеозид-5'-трифосфат, который является истинным действующим началом нуклеозидных лекарственных препаратов;

в) наконец, следует отметить, что иногда (например, в случае некоторых Т-лейкозов) клетки вообще не проявляют ожидаемой чувствительности к модифицированным нуклеозидам (например, к тем, которые эффективно подавляют В-лейкемические клетки). Как показали исследования, это объясняется отсутствием в Т-лимфоцитах необходимых нуклеозидкиназ – ферментов начальной стадии в цепи фосфорилирования нуклеозидов.

Примеры применения НМФ в хозяйственной деятельности человека разнообразны. Гуанозин-5'-монофосфат (ГМФ) и инозин-5'-монофосфат (ИМФ) вошли практику многих стран в качестве вкусовых добавок к мясным блюдам. Эти нуклеотиды заметно усиливают природный вкус пищи, не принося своего привкуса. Также широкое применение модифицированные нуклеозиды получили в фармацевтической промышленности. Например, для синтеза цитидин-5'-дифосфатхолина, применяемого в развитых странах для терапии повреждения мозга при инсультах, необходим цитидин-5'-монофосфат (ЦМФ). А уридин-5'-монофосфат (УМФ) является субстанцией для создания лекарственных препаратов, необходимых в кардиологии. В некоторых странах СНГ АМФ применяется как средство метаболической терапии при остром радикулите, циррозе и гепатите печени, сердечно-сосудистых заболеваниях.

В качестве лекарственных средств также могут использоваться некоторые модифицированные НМФ. Например, 5'-монофосфат модифицированного нуклеозида 2-фтораденинарабинозида служит химической субстанцией препарата «Флудара», который применяется для лечения хронических лимфолейкозов.

### **Получение НМФ с помощью нуклеозидфосфотрансферазы (НФТ)**

В настоящее время природные НМФ получают в основном путем гидролиза нуклеиновых кислот до образования смеси нуклеотидов под действием 5'-эксонуклаз. Эти ферменты последовательно отщепляют мононуклеотиды с 3'-конца цепи ДНК или РНК. В зависимости от своей субстратной специфичности, 5'-эксонуклазы способны узнавать в качест-

ве субстратов обычно либо РНК, либо ДНК, реже – обе нуклеиновые кислоты. На практике возможно применение нуклеаз, изолированных из микроорганизмов, проросших семян злаков, печени рыб. Однако из вкусовых добавок указанным способом можно получить только ГМФ, так как ИМФ в РНК содержится в очень незначительных количествах.

Некоторые НМФ получают с использованием микроорганизмов, которые продуцируют эти соединения, или, очень редко, посредством химического фосфорилирования соответствующих нуклеозидов.

С технологической точки зрения оправданным считается использование трансформации азотистых оснований или нуклеозидов в НМФ через фосфорибозилтрансферазные или киназные реакции.

При ферментативном фосфорилировании нуклеозидов наиболее часто в качестве биокатализаторов применяются препараты нуклеозидфосфотрансфераз (НФТ) растительного или микробного происхождения. Эти ферменты, в отличие от нуклеозидкиназ, обладают относительно низкой специфичностью в отношении акцепторов фосфата и в качестве доноров фосфата используют низкоэнергетические моноэфиры фосфорной кислоты – нуклеозидмонофосфаты, *п*-нитрофенилфосфат (пНФФ) и др. Также в последнее время показана возможность использования бактериальных неспецифических кислых фосфатаз (НКФ) для синтеза 5'-IMP. Пример реакции, используемой для синтеза ара-АМФ, приведен на рис. 1.

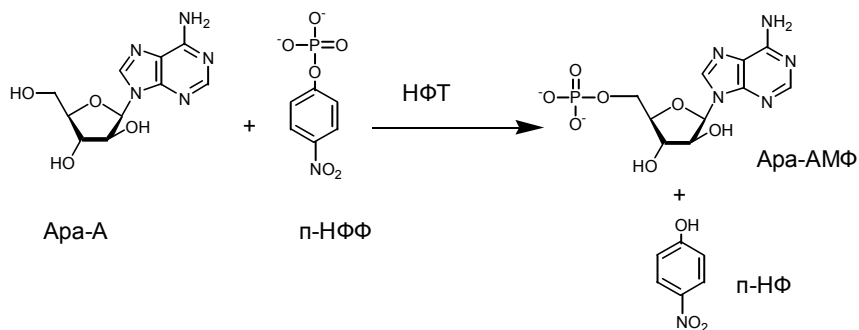


Рис. 1. Схема синтеза ара-АМФ с использованием НФТ *Erwinia herbicola*

## Распространение и свойства НФТ

На присутствие НФТ проверялись бесклеточные экстракты большого числа бактерий, и многие из них проявили необходимую активность. Микроорганизмы, обладающие НФТ, можно подразделить на две группы в зависимости от структуры конечных продуктов:

1) продуценты, ферменты которых образуют главным образом НМФ. К ним относятся большинство видов, принадлежащих родам *Pseudomonas*, *Serratia* и *Staphylococcus*;

2) микроорганизмы, ферменты которых трансформируют нуклеозиды в их 3'- и 2'-монофосфаты, а именно: микроорганизмы родов *Escherichia*, *Proteus* и *Salmonella*.

НФТ проявляет субстратную специфичность по отношению как к акцепторам фосфата, так и его донорам. Донорами фосфата могут служить НМФ, 3'-НМФ, 2'-НМФ, нуклеозид-5'-дифосфаты, рибозо-5-фосфат, ароматические фосфаты, такие как *п*-НФФ о-нитрофенилфосфат, фенилфосфат, бензилфосфат, 2-цианэтилфосфат, а также ацетилфосфат.

Фермент из *Erwinia herbicola* может использовать в качестве акцептора фосфатной группы пуриновые и пиримидиновые нуклеозиды, а в качестве донора – 5'- и 3'-моонуклеотиды, причем и рибо-, и 2'-дезоксирibo-ряда. Первые из них получаются наиболее эффективно. При фосфорилировании рибонуклеозидов очищенная НФТ трансформирует их исключительно в соответствующие 5'-монофосфаты. В случае же использования в качестве акцепторов фосфата 2'-дезоксирибонуклеозидов продуктами реакции являются 5'- и 3'-моонуклеотиды в соотношении приблизительно 2:1.

НМФ обладают немного худшими донорными свойствами. Эти свойства ухудшаются в ряду УМФ>АМФ>ГМФ>ЦМФ, что указывает на влияние структуры оснований на эффективность реакции.

НФТ в составе клеток *Erw. herbicola*, наподобие НФТ некоторых растений, оказалась способна фосфорилировать нуклеозиды в неприродной  $\alpha$ -конфигурации.

Интересно, что аналог природного тимидина – 2'-, 3'-дидезокситимидин, у которого отсутствуют гидроксилы при С-2' и С-3'-атомах фуранозного кольца и имеется двойная связь между этими атомами углерода, придающая, конформационную жесткость фуранозному кольцу, также является эффективным субстратом изученной НФТ.

Фермент, выделенный из клеток *Escherichia coli*, катализирует перенос фосфатных групп на 2'- или 3'-гидроксилы нуклеозидов и их 5'-моно-, ди- и трифосфатных производных. Поскольку в большинстве случаев нуклеотиды оказались лучшими акцепторами фосфата, чем нуклеозиды, фермент из *E. coli* чаще называют «нуклеотидфосфотрансферазой».

Клетки *Tetrahimena pyriformis* содержат НФТ с очень узкой субстратной специфичностью. Этот фермент переносит фосфат только с дАМФ и исключительно на 5'-гидроксил тимидина (2'-dThd).

Необходимо отметить, что кроме ферментов микробного происхождения выявлены и изучаются НФТ моркови, ячменя, пшеницы и млекопитающих.

Что касается НФТ млекопитающих, недавно обнаружено, что 5'-нуклеотидаза, специфичная к ИМФ и ГМФ и их 2'-дезоксипроизводным, в присутствии нуклеозидов может действовать как НФТ, катализируя перенос фосфата от НМФ к нуклеозидному акцептору. Эта активность привлекает особое внимание исследователей, так как цитозольная 5'-нуклеотидаза представляет собой единственный клеточный фермент, который способен фосфорилировать модифицированные аналоги инозина (Ino) и гуанозина (Guo) (в том числе нуклеозидные «pro-drugs»), не являющиеся субстратами известных нуклеозидкиназ.

В плаценте человека обнаружили еще одну НФТ с уникально узкой специфичностью. Фермент, названный аденозинфосфотрансферазой, способен использовать в качестве акцепторов и доноров фосфата соответственно Aдо и АМФ (и их 2'-производные аналоги).

## Механизм реакции, катализируемой НФТ

Кинетика данного фермента основывается на пинг-понговом механизме с образованием промежуточного фосфат-ферментного комплекса, откуда фосфат переносится на акцептор (трансферазная активность) либо на воду (фосфатазная активность). Присутствие промежуточного фосфат-ферментного комплекса было обнаружено также для НФТ, выделенной из солода и моркови.

Наиболее подробно данный механизм реакции описан для НФТ, выделенной из солода.

Если сравнивать активности НФТ по отношению к 3'- и 5'-донорам фосфатной группы, то карбоксильная группа фермента может атаковать 3'- и 5'-гидроксильные группы доноров из одного положения. Следова-

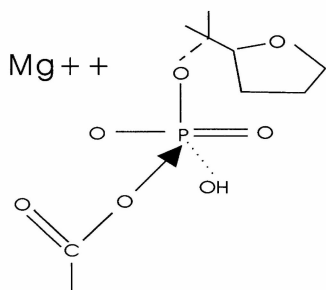


Рис. 2. Атака карбоксильной группы фосфатного тетраэдра напротив кислорода при C-5'- или C-3' атомах углерода

тельно, 5'-ОН группа должна лежать в плоскости кольца и никак не над кольцом рибозы (данное положение является для нее наиболее предпочтительным). Переориентация нуклеотидного донора осуществляется положительно заряженной группой и фосфатной группой. Фиксация в этих двух положениях позволяет карбоксильной группе атаковать фосфатный тетраэдр напротив кислорода при C-5'- или C-3' атомах (рис. 2).

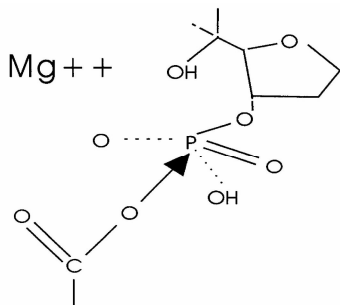


Рис. 3. Взаимодействие катиона  $Mg^{2+}$  с двумя ионизированными кислородами

В дальнейших экспериментах было показано, что роль положительно заряженной группы выполняет  $Mg^{2+}$ , а имидазольное кольцо связывается с  $\gamma$ -карбоксильной группой фермента, которая атакует фосфат. Таким образом, карбоксильная группа строго фиксируется напротив кислорода фосфоэфирной связи, что увеличивает вероятность ее атаки.

Если же в субстрате имеется моноэфирная связь (например, 3'- или 5'-нуклеотиды), катион  $Mg^{2+}$  взаимодействует с двумя ионизированными кислородами (рис. 3).

Опираясь на данные, описанные выше, реакцию, катализируемую НФТ, выделенной из солода, представляют в виде следующей схемы (рис. 4).

Выделяются три этапа:

1) 5'-моонуклеотид связывается с активным центром фермента посредством гидрофобного взаимодействия. Фосфатная группа электростатически взаимодействует с катионом  $Mg^{2+}$ , образуя комплекс Е-НМФ;

2) карбоксильная группа атакует фосфатную группу, одновременно с этим имидазольное кольцо поляризует фосфокислородную связь и стабилизирует отрицательно заряженный временный комплекс. Затем этот комплекс разрушается с формированием ацил-фосфатного промежуточного соединения. Образовавшийся нуклеозид покидает активный центр и замещается на другой нуклеозид;

3) 5'-гидроксильная группа нуклеозида, вода или другие нуклеофильные соединения атакуют ацилфосфат. С помощью имидазольного катиона образуется следующий промежуточный комплекс, который распадается с образованием 5'-моонуклеотида,  $P_i$  или других соединений. Далее имидазольное кольцо связывается с карбоксильной группой, и фермент возвращается в исходное состояние.

## Получение генно-инженерной НФТ

Одной из тенденций современной биотехнологии является переход от ферментов, продуцируемых микроорганизмами, полученными стандартными селекционными приемами, к генно-инженерным ферментам. Возможности генной инженерии позволяют во много раз увеличить дозу

необходимых генов, помещая их в многокопийные плазмидные векторы. Так, гетерологичная экспрессия гена микробной НФТ в клетках *Escherichia coli* позволила достигнуть повышенного в 250 раз уровня продуцирования рекомбинантной НФТ по сравнению с исходным родительским штаммом *Erwinia herbicola*. Этапы получения штамма-продуцента генно-инженерной НФТ иллюстрирует рис. 5.

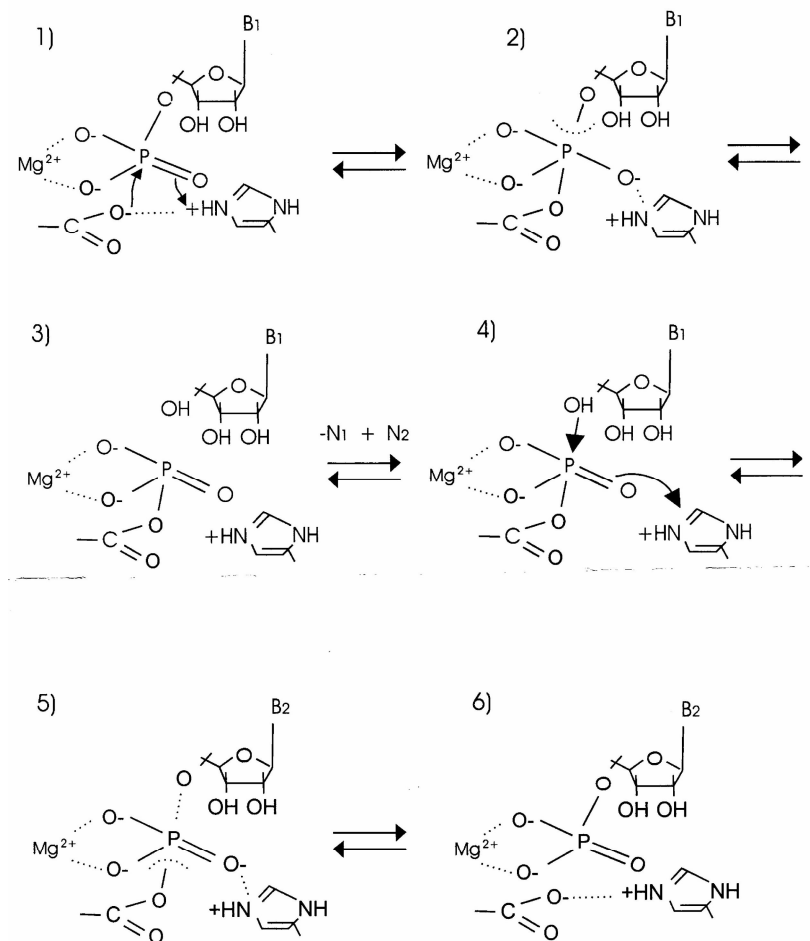


Рис. 4. Механизм реакции, катализируемой НФТ, выделенной из солода



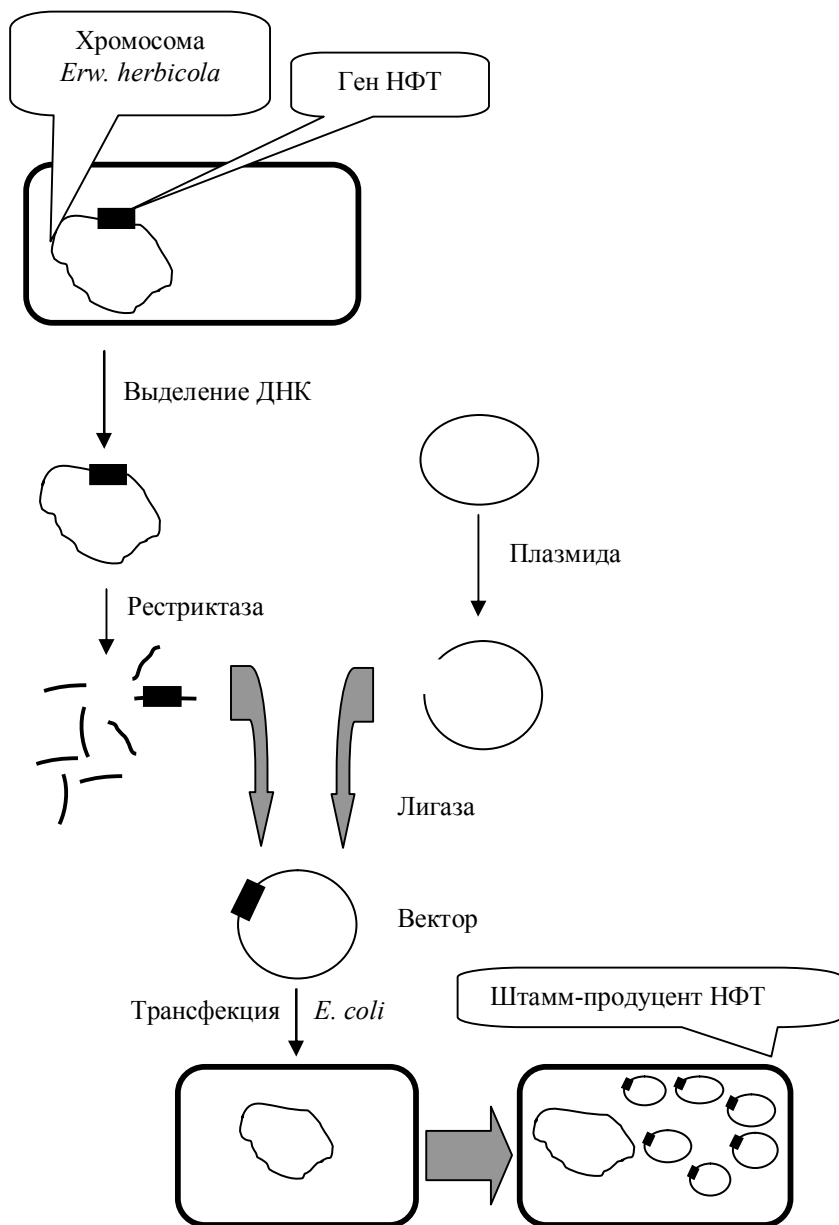


Рис. 5. Схема конструирования штамма *E. coli*, продуцирующего НФТ *Erw. herbicola*

### Контрольные вопросы:

1. Применение природных НМФ.
2. Применение модифицированных НМФ.
3. Преимущества НМФ как лекарственных субстанций в сравнении с нуклеозидами.
4. Способы получения природных НМФ.
5. Способы получения модифицированных НМФ.
6. Распространение НФТ.
7. Субстратная специфичность НФТ.
8. Механизмы реакции, катализируемой НФТ.
9. Этапы конструирования генно-инженерного штамма-продуцента НФТ.
10. Схема синтеза ара-АМФ с использованием НФТ *Erwinia herbicola*.

### Список литературы:

1. Елинов, Н. П. Основы биотехнологии / Н. П. Елинов. – СПб. : Наука, 1995.
2. Бокуть, С. Б. Курс лекций по молекулярной биологии клетки / С. Б. Бокуть, Н. В. Герасимович, А. А. Милютин. – Минск : Вышэйш. школа, 2005.
3. Галимова, М. Х. Ферментативная кинетика: справочник по механизмам реакций / М. Х. Галимова. – М. : КомКнига, 2007. – 320 с.
4. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия : учеб.-справ. пособие / С. Н. Щелкунов. – Новосибирск : Изд-во Сиб. ун-та, 2004.
5. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А. П. Ермишин [и др.] ; под. ред. А. П. Ермишина. – Минск : Тэхналогія, 2005.
6. Гончаренко, Г. Г. Основы генетической инженерии / Г. Г. Гончаренко. – Минск : Вышэйш. школа, 2005.
7. Мушкамбаров, Н. Н. Молекулярная биология : учеб. пособие для студ. мед. вузов / Н. Н. Мушкамбаров, С. Л. Кузнецов. – М. : Мед. информ. агентство, 2007.

### ХОД РАБОТЫ

1. Реакционную смесь (0,9 мл), содержащую следующие компоненты (мкмоль): ара-А – 10, *n*-НФФ – 30, Na-ацетатный буфер (pH 4,5) – 200 – предварительно кипятят в течение 2 мин. для растворения ара-А.
2. После этого смесь помещают в водяную баню при температуре 45 °С и выдерживают в течение 5 мин.
3. Затем к пробе прибавляют 10 мкл препарата рекНФТ.

4. Быстро отбирают «нулевую» пробу (5 мкл) и наносят ее на пластинку для ТСХ.

5. Спустя 15 и 30 мин. из реакционной смеси отбирают аликвоты (5 мкл), наносят их на пластину для ТСХ.

6. На пластинку также наносятся вещества-«свидетели».

7. Вещества подвергают восходящей хроматографии в системе растворителей хлороформ-этанол (4:1).

8. Затем пластинку высушивают и помещают в систему изопропанол – 25%-ный аммиак-вода (7:2:2).

9. После окончания хроматографии пластинку высушивают и помещают под ультрамикроскоп.

10. Пятна, соответствующие ара-АМФ и ара-А, вырезают и элюируют в 4 мл дистиллированной воды.

11. Оптическую плотность (ОП) элюатов измеряют на спектрофотометре при  $\lambda = 260$  нм.

12. Выход продукта – ара-АМФ – рассчитывают по формуле

$$X = \frac{C_1}{C_1 + C_2} \times 100\%,$$

где  $C_1$  – молярная концентрация ара-АМФ в элюате;  $C_2$  – молярная концентрация ара-А в элюате.

Для расчета  $C_1$  и  $C_2$  используют коэффициент молярной экстинкции ара-АМФ и ара-А при  $\lambda = 260$  нм, равный  $15\,400\text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

## Оформление работы

### К занятию:

- кратко законспектировать теоретические материалы по лабораторной работе.

### Во время занятия:

- кратко описать этапы работы;
- указать выход реакции ферментативного синтеза ара-АМФ, достигнутый к 15 и 30 мин. после начала инкубации;
- зарисовать хроматограмму.

# ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

## Синтез диаденозин-тетрафосфата с использованием генно-инженерных лизил-тРНК-синтетазы и неорганической пирофосфатазы

### Цель работы:

Синтезировать диаденозин-тетрафосфат ( $\text{Ap}_4\text{A}$ ) с использованием очищенных препаратов генно-инженерных ферментов лизил-тРНК-синтетазы (LysU) и неорганической пирофосфатазы *Escherichia coli*.

### Оборудование и материалы:

- вытяжной шкаф;
- автоматические микропипетки;
- пробирки типа «Eppendorf» на 1,5 мл;
- микрокапилляр;
- термостат суховоздушный на 37 °C;
- магнитная мешалка;
- камера для тонкослойной хроматографии (ТСХ);
- пластинки для тонкослойной хроматографии «Sorbfil» фирмы «Сорбполимер» (Россия);
- электрополотенце;
- ультрамикроскоп;
- УФ-спектрофотометр;
- кварцевые кюветы с длиной пробега луча 1 см (2 шт.);
- колба с притертой пробкой с системой растворителей диоксан–аммиак–вода (6:1:4);
- пробирки с притертой пробкой объемом 10–20 мл для элюции веществ с тонкослойных хроматографических пластинок (4 шт.);
- цилиндр на 100 мл;
- штатив для пробирок;
- ножницы;
- карандаш простой;
- линейка.

### Реактивы:

- аденозин-5'-трифосфорная кислота (АТФ);
- ферментный препарат (смесь генно-инженерных LysU и неорганической пирофосфатазы *E. coli*);
- раствор, содержащий вещества-«свидетели»: АТФ,  $\text{Ap}_4\text{A}$ ;

• буферный раствор для проведения реакции, содержащий 8 мМ  $MgCl_2$ , 300 мМ  $NaCl$ , 0,32 мМ  $ZnCl_2$ , 4,8 мМ L-лизин, 40 мМ буфер MOPS-KOH (pH = 7,5).

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### СВОЙСТВА

### И ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ $Ap_4A$

#### Структура $Ap_4A$

$Ap_4A$  входит в группу динуклеотид-полифосфатов, которые распространены как у про-, так и у эукариот. Данное соединение представляет собой молекулу, состоящую из двух аденозиновых остатков, соединенных тетрафосфатным мостиком (рис. 1).

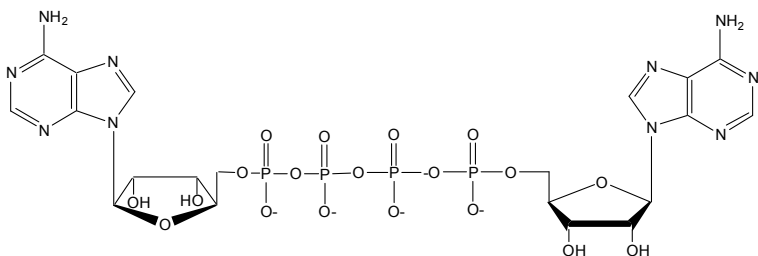


Рис. 1. Химическая формула диаденозин-тетрафосфата ( $Ap_4A$ )

#### Локализация $Ap_4A$

$Ap_4A$  присутствует в различных клетках эу- и прокариот в концентрации от 0,03 до 100 мкМ в зависимости от пролиферативного статуса клетки и наличия стрессовых условий, таких как, например, тепловой шок и окислительный стресс. Факт повышения концентрации этого динуклеотида при стрессовых условиях обусловил отнесение его к классу так называемых алармонов. Установлено, что этот динуклеотид содержится в большой концентрации в гранулах тромбоцитов, в плазме крови, в нервных окончаниях, в эритроцитах и миоцитах человека, в слезной жидкости млекопитающих и т. п.

## **Функции Ар<sub>4</sub>А как внутриклеточной молекулы**

Несмотря на то, что Ар<sub>4</sub>А был обнаружен 30 лет назад, его функции до сих пор до конца не выяснены. В общих чертах постулировано участие Ар<sub>4</sub>А в клеточной пролиферации, инициации репликации ДНК и ее репарации, а также клеточном ответе на стресс. Показано, что Ар<sub>4</sub>А входит в состав праймера ДНК-полимеразы как дополняющая субъединица и, таким образом, влияет на репликацию.

В некоторых стрессовых состояниях, таких как тепловой и окислительный шок, увеличивается уровень экспрессии белков теплового шока и, как следствие, происходит увеличение концентрации Ар<sub>4</sub>А, который является триггером клеточного ответа на стресс.

## **Функции Ар<sub>4</sub>А как внеклеточной молекулы**

Действие Ар<sub>4</sub>А как внеклеточной молекулы обусловлено высвобождением ее из клетки при определенных физиологических условиях во внеклеточное пространство. При этом Ар<sub>4</sub>А может либо действовать как целая молекула, либо при помощи специфических ферментов расщепляться до ее производных (например, АТФ).

Функции Ар<sub>4</sub>А как внеклеточной молекулы обусловлены способностью этого соединения связываться с пуриновыми рецепторами, расположенными в различных клетках. Посредством связывания с рецепторами Ар<sub>4</sub>А способен уменьшать кровообращение почек, снижать клубочковую фильтрацию и вызывать диурез.

Установлено, что Ар<sub>4</sub>А является веществом, способным ингибировать ADP-индуцируемую агрегацию тромбоцитов. На этом его свойстве основано предположение о том, что Ар<sub>4</sub>А может являться субстанцией фармакологически перспективного препарата для лечения и предотвращения образования тромбов в сердечно-сосудистой системе человека, а именно в сердце, мозге и периферических сосудах.

Ишемическое повреждение миокарда на сегодняшний день является серьезным и распространенным заболеванием, смертность от которого находится на высоком уровне. Пока не существует эффективных препаратов для его терапии и профилактики. Известно, что для предотвращения этого заболевания используются такие препараты, как нитроглицерин и тромболитики, которые очень часто оказываются неэффективными. Для лечения ишемии миокарда используется АТР, но большим его недостатком является очень быстрый распад в плазме крови. Ар<sub>4</sub>А может стать субстанцией для фармакологически перспективного и эффективного препарата лечения ишемии миокарда. Основными его преимуществами перед используемым сегодня АТР являются способность усиливать (в отличие от АТР) коронарное кровообращение, а также его антитромбическое действие.

Ar<sub>4</sub>A способен снижать внутриглазное давление, повышение которого ведет к риску развития глаукомы.

### **Синтез Ar<sub>4</sub>A при различных условиях роста клеток**

При воздействии теплового шока (от 28 до 56 °C) на бактерии *Salmonella typhimurium* рост клеток прекращается и повышается уровень белков теплового шока, катализирующих реакцию образования различных динуклеозид-полифосфатов. Среди этих соединений преимущественную позицию занимает Ar<sub>4</sub>A.

Воздействие этанола (в концентрации 10 %) оказывает на клетки эффект, подобный тепловому шоку. Влияние этанола на образование Ar<sub>4</sub>A было также обнаружено на модели клеток *E. coli* и млекопитающих.

Окислительный стресс, так же как и повышенная температура и этанол, может приводить к аккумуляции Ar<sub>4</sub>A. Например, если клетки *Salmonella typhimurium* подвергнуть воздействию окислительных веществ, таких как хиноны (менадион и 1,4-нафтохинон), пероксид водорода, соединения, снижающие уровень глутатиона в клетке (1-хлор-2,4-динитробензол), наблюдается высокий уровень синтеза белков теплового шока и Ar<sub>4</sub>A.

### **Способы синтеза Ar<sub>4</sub>A *in vitro***

Известны химический и ферментативный методы синтеза Ar<sub>4</sub>A. При химическом синтезе на первой стадии АМР переводят в активированную форму, такую как аденозин-5'-фосфолибдат, что позволяет получить на следующей стадии Ar<sub>4</sub>A при реакции с АТР в безводном пиридине. Критическими недостатками данного метода является необходимость применения безводных органических растворителей и образование множества побочных продуктов, что затрудняет весь процесс получения индивидуального Ar<sub>4</sub>A. К тому же и выход реакции химического синтеза не превышает 25 %.

Ферментативные методы получения Ar<sub>4</sub>A с помощью бактериальных аминоксил-тРНК-синтетаз позволяют достичь более высоких выходов целевого продукта, особенно при сочетании с системой регенерации АТР (более 90 %). При этом почти не происходит образования побочных продуктов. К тому же ферментативные методы не требуют создания труднореализуемых условий (безводные и токсичные растворители, высокая температура и давление).

*Escherichia coli* являются на сегодняшний день единственными бактериями, у которых обнаружено, что лизил-тРНК-синтетаза кодируется двумя генами *lysS* и *lysU*, но условия экспрессии этих генов и основные функции продуктов генов различаются. Изоэнзим LysS экспрессируется при обычных условиях, и основной функцией его является аминокислоти-

рование соответствующей тРНК. Вариант LysU экспрессируется при стрессовых условиях для клетки, и ее основной функцией является синтез Ар<sub>4</sub>А.

В литературе описана возможность применения для синтеза Ар<sub>4</sub>А как фермента, выделенного из диких микробных штаммов, так и рекомбинантной LysU. Для синтеза чаще всего используют очищенный фермент, который получают стандартными методами очистки белков (осаждение солями тяжелых металлов, ионообменная хроматография, осаждение сульфатом аммония).

С использованием фермента, выделенного из клеток дикого штамма *E. coli* K12, были разработаны схемы синтеза Ар<sub>4</sub>А, включающие использование неорганической пироглутаматазы и регенеративной системы, позволившие достигнуть 96 % выхода без образования побочных продуктов (Ар<sub>3</sub>А, ADP, AMP). Главным недостатком данной схемы является использование дикого бактериального штамма, обладающего низким уровнем биосинтеза необходимого фермента, что приводит к необходимости использования крупногабаритного ферментационного оборудования для наработки нужной биомассы и последующей очистки фермента с использованием сложной хроматографической техники.

Синтез Ар<sub>4</sub>А может осуществляться не только LysU, но также и другими ферментами. Были исследованы различные ферменты: лейцил-, валил-, фенилаланил- и метионил-тРНК-синтетазы. Полученные в ходе исследований результаты показали, что другие ферменты этой группы уступают LysU по выходу Ар<sub>4</sub>А в несколько раз.

Реакции синтеза Ар<sub>4</sub>А можно проводить при помощи фермента иного типа – ацетил-коэнзимА-синтетазы. Однако для этого фермента синтез Ар<sub>4</sub>А не является приоритетным, и наряду с синтезом Ар<sub>4</sub>А идет синтез многих побочных продуктов.

## **Механизм синтеза Ар<sub>4</sub>А с помощью LysU**

Молекула LysU *E. coli* представляет собой гомодимер вытянутой формы. Молекулярная масса каждой мономерной субъединицы равна ~58 кДа. Мономер включает в себя 504 аминокислотных остатка и состоит из трех доменов: небольшой N-концевой домен, который связывается антикодоном тРНК, С-концевой домен – каталитический активный центр фермента и α-домен, отвечающий за узнавание соответствующей тРНК.

Реакция синтеза Ар<sub>4</sub>А, катализируемая LysU, проходит через образование интермедиата – лизиладенилата (рис. 2). На первой стадии реакции к аминокислоте лизину присоединяется AMP, образуя комплекс, называемый лизиладенилат. Эта стадия реакции является обратимой, поэтому для сдвига равновесия реакции в сторону образования целевого продукта (Ар<sub>4</sub>А) необходимо удалить из реакционной смеси один из конеч-



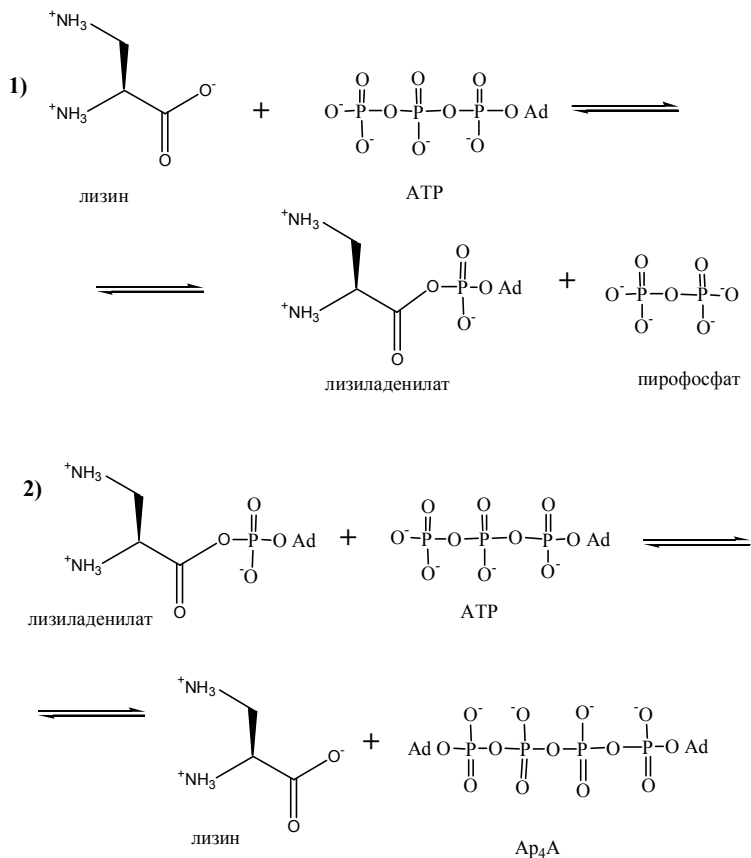


Рис. 2. Схема реакций образования  $\text{Ap}_4\text{A}$ . (Ad-остаток аденозина)

ных продуктов, например пирофосфат. Для этого в реакционную смесь добавляется фермент – неорганическая пирофосфатаза, которая расщепляет пирофосфат до ортофосфата.

На второй стадии реакции к полученному на первой стадии комплексу лизиладенилата добавляется еще одна молекула АТФ, что приводит к образованию  $\text{Ap}_4\text{A}$  и освобождению исходного лизина.

Замечено, что концентрация ионов цинка имеет определяющее значение в процессе синтеза  $\text{Ap}_4\text{A}$ . Причина столь сильной зависимости прохождения реакции от наличия  $\text{Zn}^{2+}$  до сих пор не выяснена. Имеется предположение о том, что именно цинку принадлежит главенствующая роль в определении нужной аминокислоты при связывании ее с аминокислот-тРНК-синтетазой.

Если вести реакцию без ионов цинка, то ее продуктом будет только интермедиат – лизиладенилат. Если в реакционную смесь на этой стадии внести ионы  $Zn^{2+}$ , из лизиладенилата начинается синтез  $Ar_4A$ . Ионы  $Co^{2+}$  и  $Cd^{2+}$  могут брать на себя роль  $Zn^{2+}$ , однако в этом случае кинетические постоянные ферментативной реакции на порядок ниже.

Иногда для увеличения выхода синтеза  $Ar_4A$  применяют регенеративную систему, позволяющую восстанавливать АТФ из побочных продуктов реакции (AMP и ADP). Для этого в реакционную смесь вносят аденилаткиназу (фосфорилирующую AMP до ADP), ацетаткиназу (фосфорилирующую ADP до АТФ) и ацетилфосфат (в качестве донора неорганического фосфата). Однако самым эффективным подходом к получению  $Ar_4A$  является подход, основанный на использовании LysU и неорганической пирофосфатазы, изолированных из генно-инженерных клеток-продуцентов этих ферментов.

### **Контрольные вопросы:**

1. Химическая формула диаденозинтетрафосфата ( $Ar_4A$ ).
2. Распространение и локализация  $Ar_4A$ .
3. Функции  $Ar_4A$  в клетке.
4.  $Ar_4A$  как внеклеточная сигнальная молекула.
5. Влияние различных условий роста клеток на синтез ими  $Ar_4A$ .
6. Способы синтеза  $Ar_4A$ .
7. Механизм ферментативного синтеза  $Ar_4A$ .
8. Роль ионов металлов в механизме функционирования LysU.
9. Фармакологический потенциал  $Ar_4A$ .
10. Перспективы использования  $Ar_4A$  в кардиологии.

### **Список литературы:**

1. Овчинников, Ю. А. Биоорганическая химия / Ю. А. Овчинников. – М. : Просвещение, 1987.
2. Бокуть, С. Б. Курс лекций по молекулярной биологии клетки / С. Б. Бокуть, Н. В. Герасимович, А. А. Милютин. – Минск : Вышэйш. школа, 2005.
3. Белясова, Н. А. Биохимия и молекулярная биология : учеб пособие / Н. А. Белясова. – Минск : Книжный Дом, 2004.
4. Елинов, Н. П. Основы биотехнологии / Н. П. Елинов. – СПб. : Наука, 1995.
5. Микробная биотехнология: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / под ред. Э. И. Коломиец, А. Г. Лобанка. – Минск : Изд-во «ИП Логвинов», 2007.
6. Харкевич, Д. А. Фармакология : учебник / Д. А. Харкевич. – М. : Гэотар Медицина, 1999.

7. Гончаренко, Г. Г. Основы генетической инженерии / Г. Г. Гончаренко. – Минск : Вышэйш. школа, 2005.

8. Пособие BIO (Biotechnology Industry Organization) по биотехнологии [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.cbio.ru/>. – Дата доступа: 01.01.2008.

## ХОД РАБОТЫ

1. Для получения 160 мМ раствора АТР навеску 0,088 мг растворяют в 1 мл дистиллированной воды.

2. К 250 мкл буферного раствора для проведения реакции добавляют 226,5 мкл дистиллированной воды и 13,5 мкл 160 мМ раствора АТР (до концентрации АТР 4,3 мМ).

3. Отбирают «нулевую» пробу (5 мкл) и наносят ее на пластинку для тонкослойной хроматографии (ТСХ).

4. В полученную реакционную смесь вносят 10 мкл ферментного препарата (смесь генно-инженерных LysU и неорганической пирофосфатазы *E. coli*).

5. Реакционную смесь, перемешивая на магнитной мешалке, инкубируют в термостате на 37 °С.

6. Через 30 и 60 мин. отбирают аликвоты по 5 мкл, наносят их на пластину для ТСХ.

7. Вещества подвергают восходящей хроматографии в системе растворителей диоксан–аммиак–вода (6:1:4).

8. Хроматограммы рассматривают в УФ-свете, пятна, соответствующие Ар<sub>4</sub>А и АТР, вырезают и элюируют 1,5 мл дистиллированной воды.

9. Оптическую плотность элюатов измеряют на спектрофотометре при  $\lambda = 261$  нм.

10. Выход продукта – Ар<sub>4</sub>А – рассчитывают по формуле

$$X = \frac{C_1}{C_1 + 0,5 \times C_2} \times 100 \%,$$

где  $C_1$  – молярная концентрация Ар<sub>4</sub>А в элюате;  $C_2$  – молярная концентрация АТР в элюате.

Для расчета  $C_1$  и  $C_2$  используют коэффициент молярной экстинкции Ар<sub>4</sub>А и АТР при  $\lambda = 261$  нм, равный 30 800 и 15 400 М<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> соответственно.

## Оформление работы

### К занятию:

- кратко законспектировать теоретические материалы по лабораторной работе.

### Во время занятия:

- кратко описать этапы работы;
- указать достигнутый выход реакции ферментативного синтеза  $\text{Ar}_4\text{A}$ ;
- зарисовать хроматограмму.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

### Синтез полирибонуклеотида из нуклеозид-5'-дифосфата с помощью полинуклеотидфосфорилазы бактерии *Enterobacter amnigenus*

### Цель работы:

Синтез регулярного полирибонуклеотида (поли-А) из аденозин-5'-дифосфата (АДФ) под действием полинуклеотидфосфорилазы (ПНФазы), изолированной из клеток *Enterobacter amnigenus*.

### Оборудование и материалы:

- вытяжной шкаф;
- автоматические микропипетки;
- пробирки типа «Eppendorf»;
- термостат водяной на 55 °С;
- центрифуга настольная на 3–5 тыс. g;
- камера для тонкослойной хроматографии (ТСХ);
- пластинки «Silufol-UV<sub>254</sub>» фирмы Serva (Германия);
- электрополотенце;
- ультрамикроскоп;
- колба с притертой пробкой для приготовления системы растворов;

- пробирки с притертой пробкой для элюции веществ с тонкослойных хроматографических пластинок (4 шт.);

- цилиндр на 100 мл;
- штатив для пробирок;
- ножницы, карандаш простой, линейка.

### **Реактивы:**

- раствор, содержащий 20 мМ ADP, 4 мМ  $MgCl_2$  в 0,1 М Трис-НСl буфере (рН 8,5);

- ферментный препарат (ПНФаза, изолированная из клеток *Enterobacter amnigenus*);

- раствор, содержащий вещества-«свидетели»: ADP, поли-А;
- система растворителей: изопропанол–аммиак–вода (11:7:2);
- этанол.

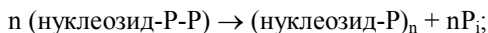
## **ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ**

### **БАКТЕРИАЛЬНАЯ ПОЛИНУКЛЕОТИДФОСФОРИЛАЗА**

#### **Реакции, катализируемые ПНФазой**

Полинуклеотидфосфорилаза (ПНФаза, КФ 2.7.7.8) была впервые обнаружена и описана в 1955 г. Как оказалось, фермент обладает способностью катализировать три типа реакций:

- реакцию нематричной полимеризации рибонуклеозид-5'-дифосфатов (НДФ) с отщеплением неорганического фосфата ( $P_i$ ). При этом образуются высокомолекулярные полинуклеотиды с химической структурой, схожей со структурой РНК (нуклеозиды связаны посредством 3'-5'-фосфодиэфирных мостиков):



- расщепление полирибонуклеотидов путем фосфоролиза в присутствии ортофосфата (реакция, обратная предыдущей);

- реакцию обмена между  $\beta$ -фосфатом НДФ и свободным  $P_i$ :



Существует несколько способов определения активности ПНФазы, суть которых сводится к проведению одной из указанных выше реакций.

## Распространение ПНФаз

Наличие ПНФазы можно считать общим признаком для бактерий. Однако данный фермент содержится и у высших организмов. Он был выделен из тканей растений, мышц, печени и других органов ряда животных, человека.

Следует отметить, что обычно бактериальные клетки бедны на ПНФазу и богаты нуклеазами и фосфатазами. В связи с этим в последние годы разработана процедура создания штаммов-суперпродуцентов ПНФазы путем амплификации генов ПНФазы *E. coli* с использованием техники рекомбинантной ДНК.

## Свойства и механизм действия бактериальных ПНФаз

Одним из условий протекания реакций фосфорилиза и синтеза полимеров, катализируемых ПНФазой, является наличие в реакционной смеси двухвалентных ионов металлов: марганца, магния, кобальта, кадмия, цинка и др. Причем в зависимости от источника получения фермента ПНФаза активируется в присутствии различных двухвалентных катионов.

Фермент термостабилен, и катализируемые им реакции могут протекать при температуре 50–60 °С. Известно, что субстраты защищают ПНФазу от термоинактивации. ПНФаза обладает относительно широкой субстратной специфичностью. Практически все природные НДФ являются субстратами в реакции их полимеризации. Но данный фермент может воспринимать в качестве субстрата и множество соединений – таких, в которых часть азотистого основания, углеводного остатка или пирофосфата видоизменена.

ПНФаза, выделенная из различных источников, имеет различную активность по отношению к одному и тому же субстрату. И один и тот же фермент проявляет различную активность по отношению к разным субстратам. Гомополимеры поли-А, поли-У, поли-Ц, а также всевозможные сополимеры с двойными и тройными комбинациями всех субстратов синтезируются со сравнимыми скоростями. Исключение составляет поли-Г: при полимеризации ГДФ лимитирующим фактором является сложная вторичная структура, которую могут образовывать цепи поли-Г.

В обычных условиях (37 °С, pH 8) полимеризация НДФ без участия праймера очищенной ПНФазой *E. coli* приводит к образованию высокомолекулярных полимеров (длина цепи около 1000 нуклеотидов). Однако некоторым препаратам ПНФазы, чтобы начать реакцию, необходимо присутствие так называемого праймера.

Принято считать, что в отсутствие праймера фермент синтезирует молекулы полимера одну за другой, путем последовательного добавления молекул мономера к 3'-концу растущей цепи («несинхронный» или процессивный механизм). При этом образуется только высокополимерный

продукт и отсутствуют сравнительно короткие олигонуклеотиды, т. е. фермент не освобождается из комплекса с продуктом в ходе синтеза. Длина гомополимеров поли-А и поли-У, синтезированных в таких условиях очищенной от нуклеаз ПНФазой *E. coli*, составляет 1000–2000 нуклеотидов.

Двухвалентные катионы принимают участие в образовании активного комплекса между молекулами мономеров и белком (стадия инициации) или между мономером и синтезируемым полимером (стадия элонгации). В случае присутствия в реакционной среде олиго- или полинуклеотидных затравок реакция полимеризации происходит таким образом, что праймер полностью включается в состав растущей цепи полимера.

## **Структура молекулы ПНФазы**

Молекулы большинства ПНФаз, выделенных из микроорганизмов, состоят из субъединиц. Количество субъединиц в молекуле фермента и их молекулярная масса варьируют в зависимости от природы микроорганизма. Молекулярная масса ПНФазы, выделенной из *E. coli*, составляет приблизительно 230 000. Нативная ПНФаза данного микроорганизма состоит из трех идентичных субъединиц. Под электронным микроскопом фермент *E. coli* представляет собой гексамер, состоящий из трех аналогичных димеров.

## **Биологическая роль ПНФазы**

Клеточная локализация ПНФазы до сих пор полностью не выяснена. Но последние данные свидетельствуют о том, что ПНФаза связана с РНКазой Е и является компонентом деградосомы. Однако ПНФаза присутствует в клетках *E. coli* в избытке относительно РНКазы Е и поэтому обнаруживается в клетках и в свободном, не связанном с РНКазой Е состоянии.

ПНФазу относят к белкам холодового шока. Известно, что *E. coli* может поддерживать сбалансированный рост на богатых питательных средах при температуре от 10 до 49 °С. При сдвиге температуры инкубации *E. coli* с 37 на 10 °С наблюдается 4-часовой лаг-период, когда синтезируются только 13 белков. Причем один из этих белков синтезируется только при пониженной температуре. Другие 12 белков синтезируются и при 37 °С (среди них и ПНФаза). Все эти белки получили наименование «белков холодового шока». У *E. coli* уже идентифицировано 23 таких белка. Понятно, что они составляют лишь мизерную часть от общего количества белков, закодированных в геноме этих бактерий (около 4–5 тысяч).

Белки холодового шока в настоящее время интенсивно изучаются. Предполагают, что они играют важную роль в адаптации бактерий к росту при низких температурах, но ни молекулярный сигнал для холодовой ин-

дукции белков, ни детальные функции их при холодовом стрессе пока не установлены. Одной из гипотез, объясняющих потребность ПНФазы для роста при низких температурах, является то, что в этих условиях рибосомы особенно нуждаются в РНК-фосфоролитической активности.

ПНФаза – компонент деградосомы. Одной из главных функций данного фермента является участие в деградации мРНК. Современная модель деградации мРНК у бактерий подразумевает последовательное участие в этом процессе эндорибонуклеаз и экзонуклеаз. Молекула мРНК атакуется сначала эндонуклеазой (например, РНКазой III), которая расщепляет ее в специфических сайтах, а затем образующиеся фрагменты РНК деградируют под действием 3'→5'-экзонуклеаз (РНКазы II и ПНФаза). Дело в том, что 3'→5'-экзонуклеазы не способны атаковать мРНК без предварительного эндонуклеазного расщепления, поскольку расположенная на 3'-конце петлевая структура, связанная с белковым фактором, блокирует экзонуклеазную активность. Характерно, что 5'→3'-экзонуклеаза, способная инициировать расщепление РНК с 5'-конца, у бактерий не найдена. Из сказанного становится понятным, почему потеря одновременно обеих экзонуклеаз приводит к полной остановке роста бактерий.

Существует предположение о том, что разрушение мРНК под действием ПНФазы представляет эффективную систему синтеза предшественников ДНК из продуктов разрушения РНК, так как известно, что синтез дезоксирибонуклеотидов происходит на уровне НДФ.

Как известно, в клетках *E. coli* значительную роль в разрушении мРНК играет ее полиаденилирование. В норме за синтез поли-А отвечает фермент поли(А)-полимераза I (ПАП). Однако у штаммов с дефектной ПАП за синтез поли-А начинает полностью отвечать ПНФаза. Даже в норме в зависимости от условий она может как деградировать поли-А, синтезированные ПАП, так и достраивать эти «хвосты» у молекул мРНК за счет различных НДФ.

## **Использование ПНФазы в биотехнологии**

Поскольку ПНФаза – внутриклеточный фермент, его трудно выделять из клеток в больших количествах. Более того, грубый, неочищенный препарат фермента также не годится для синтеза полинуклеотидов без дополнительной очистки, так как содержит interfering ферменты, которые могут деградировать НДФ или синтезированные полинуклеотиды. Для преодоления этих сложностей проводят скрининг микроорганизмов с целью отбора штаммов-продуцентов, клетки которых богаты ПНФазой и бедны РНКазами и фосфатазами.

Важной проблемой при получении ПНФазы является выбор способа разрушения клеток и условий экстракции фермента. Механическое и ферментативное разрушение клеточной стенки часто приводит к повреж-



дению микроструктур клетки, вследствие чего может произойти расщепление ПНФазы протеолитическими ферментами клетки. Метод «солевого» или «сахарного шока» с последующим диализом обработанных клеток нашел наиболее широкое применение.

## **Перспективы применения синтетических полинуклеотидов в клинической практике**

В последнее время в качестве перспективных противовирусных и противоопухолевых препаратов все большее внимание привлекают интерферон и его индукторы. В медицинской практике уже находят применение комплексы синтетических полирибонуклеотидов.

Подробное изучение синтетических полирибонуклеотидов было начато в 1967 г. после открытия того, что именно двухспиральные структуры обладают способностью индуцировать интерферон. Было показано, что препараты двухспиральных РНК в 1000–100 000 раз более активны, чем синтетические и природные РНК и ДНК, а также ДНК-РНК-гибриды.

При испытании различных искусственных двухспиральных РНК было обнаружено, что наибольшей интерфероногенной и противовирусной активностью обладает комплекс полирибоинозиновой и полирибоцитидиловой кислот (поли-И/поли-Ц), несколько менее активными оказались комплексы полирибогуаниловой и полирибоцитидиловой (поли-Г/поли-Ц), а также полирибоадениловой и полирибоуридиловой (поли-А/поли-У) кислот.

На модели экспериментального гриппа, герпетического энцефалита, бешенства и клещевого энцефалита продемонстрировано усиление защитного эффекта при совместном применении вакцин и индукторов интерферона (до 6 раз и более) по сравнению с таковым при использовании указанных препаратов в отдельности.

Предложено использовать комплекс поли-А/поли-У совместно с известными химиотерапевтическими препаратами, такими как 3'-азидо-3'-дезокситимидин (АЗТ), дидезоксиинозин (ДДИ) или дидезоксицитидин (ДДЦ), для лечения СПИДа. Совместное введение указанных соединений приводит к синергидному эффекту.

Двухспиральные полирибонуклеотиды, содержащие одну некомплементарную пару оснований в цепи полинуклеотида, представляют особый интерес. Наиболее известен поли-И/поли-(Ц12У) (амплиген), содержащий урацил в каждом 12-ом положении поли-Ц. В экспериментальных моделях амплиген способен ограничивать развитие вирусов (включая ВИЧ), злокачественных новообразований, метастазов. *In vitro* поли-И/поли-(Ц12У) демонстрирует значительный синергидный эффект с интерфероном, интерлейкином-2, АЗТ, что предполагает использование последних в значительно более низких, менее токсичных дозах в комбинации с поли-И/поли-(Ц12У).

В настоящее время есть все основания полагать, что в недалеком будущем область клинического применения индукторов интерферона будет значительно расширена и эти препараты смогут, подобно интерферонам, использоваться не только при ОРВИ, герпесе, вирусных гепатитах, ВИЧ-инфекции, но и при вирусных энцефалитах, бешенстве, медленных и смешанных инфекциях, хламидиозах и т. д.

### **Контрольные вопросы:**

1. Реакции, катализируемые ПНФазой.
2. Распространение ПНФаз.
3. Структура молекулы ПНФазы.
4. Свойства бактериальных ПНФаз.
5. Субстратная специфичность ПНФаз.
6. Механизм действия бактериальных ПНФаз.
7. Биологическая роль ПНФазы.
8. Использование ПНФазы в биотехнологии.
9. Фармакологические свойства синтетических полирибонуклеотидов.
10. Применения синтетических полинуклеотидов в качестве индукторов интерферона.

### **Список литературы:**

1. Зинченко, А. И. Основы молекулярной биологии вирусов и анти-вирусной терапии / А. И. Зинченко, Д. А. Паруль. – Минск : Вышэйш. школа, 2005.
2. Бокуть, С. Б. Курс лекций по молекулярной биологии клетки / С. Б. Бокуть, Н. В. Герасимович, А. А. Милютин. – Минск : Вышэйш. школа, 2005.
3. Белясова, Н. А. Биохимия и молекулярная биология : учеб. пособие / Н. А. Белясова. – Минск : Книжный Дом, 2004.
4. Елинов, Н. П. Основы биотехнологии / Н. П. Елинов. – СПб. : Наука, 1995.
5. Итоги научной деятельности Института микробиологии Национальной академии наук Беларуси (1975–2005): обзорные статьи. – Минск, 2005.
6. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.cbio.ru/>. – Дата доступа: 01.01.2008.
7. Мушкамбаров, Н. Н. Молекулярная биология : учеб. пособие для студ. мед. вузов / Н. Н. Мушкамбаров, С. Л. Кузнецов. – М. : ООО «Мед. информ. агентство», 2007.

## ХОД РАБОТЫ

1. К 0,45 мл раствора, содержащего 20 мМ ADP, 4 мМ  $MgCl_2$  в 0,1 М Трис-НСl буфере (рН 8,5), прибавляют 50 мкл раствора ПНФазы *Enterobacter amnigenus*.

2. Быстро отбирают «нулевую» пробу (5 мкл) и наносят ее на пластинку для тонкослойной хроматографии (ТСХ).

3. Реакционную смесь помещают в водяной термостат, в котором поддерживают температуру 55 °С.

4. Спустя 15 и 30 мин. из реакционной смеси отбирают аликвоты (5 мкл), наносят их на пластинку для ТСХ.

5. Пластинки подвергают восходящей хроматографии в системе растворителей: изо-пропанол – аммиак – вода (11:7:2).

6. Через 40–45 мин. после начала реакции пробирку с реакционной смесью извлекают из термостата и помещают на ледяную баню для остановки реакции.

7. 0,4 мл реакционной смеси переносят в стеклянную пробирку и приливают 0,5 мл охлажденного этанола.

8. Раствор инкубируют 10–15 мин. на ледяной бане для формирования осадка.

9. Образовавшийся осадок собирают центрифугированием 3–5 мин. при 3000–5000 г.

10. Из надосадочной жидкости отбирают 5 мкл и наносят их на пластинку для ТСХ.

11. После хроматографирования хромаграмму сравнивают с предыдущей и определяют, что выпало в осадок.

## Оформление работы

### К занятию:

- кратко законспектировать теоретические материалы по лабораторной работе.

### Во время занятия:

- кратко описать этапы работы;
- установить, образуется ли в реакционной смеси целевой продукт – поли-А;
- определить – что осаждается из раствора спиртом;
- зарисовать хромаграмму.

# ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7

## Биокаталитический синтез противовирусного модифицированного нуклеозида

### Цель работы:

Синтез противовирусного нуклеозида аденинарабинозида (ара-А, Ara-Ade) с использованием ферментативного трансглюкозилирования аденина. Выделение ара-А из реакционной смеси.

### Оборудование и материалы:

- биореактор с водяной рубашкой;
- суховоздушный термостат;
- вытяжной шкаф;
- автоматические микропипетки;
- пробирки типа «Eppendorf»;
- термостат водяной на 60 °С;
- магнитная мешалка;
- камера для тонкослойной хроматографии (ТСХ);
- пластинки «Silufol-UV<sub>254</sub>» фирмы Serva (Германия);
- электрополотенце;
- ультрамикроскоп;
- УФ-спектрофотометр;
- кварцевые кюветы с длиной пробега луча 1 см (2 шт.);
- колба с притертой пробкой для приготовления системы растворителей;
- пробирки с притертой пробкой для элюции веществ с тонкослойных хроматографических пластинок (4 шт.);
- цилиндр на 100 мл;
- штатив для пробирок;
- ножницы; карандаш простой; линейка.

### Реактивы:

- аденин;
- урациларабинозид (ара-У);
- ферментный препарат, содержащий рекомбинантную уридинфосфорилазу (УРФ);
- ферментный препарат, содержащий рекомбинантную пуридиннуклеозидфосфорилазу (ПНФ);
- 30 мМ К-фосфатный буфер (рН 7);

- охлажденная дистиллированная вода;
- этанол;
- раствор, содержащий вещества-«свидетели»: ара-А, ара-У, аденин, урацил.

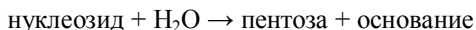
## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ТРАНСГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ

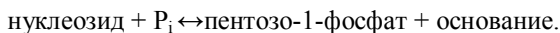
#### Катаболизм нуклеозидов у бактерий

Большинство бактерий могут расти на нуклеозидах, поскольку они способны использовать углеродный фрагмент этих соединений в качестве источника углерода, а гетероцикл утилизировать для синтеза нуклеозидов по так называемому сэлвидж-пути.

Центральной реакцией катаболизма нуклеозидов является разрыв N-гликозидной связи с образованием азотистого основания и соответствующей пентозы. У бактерий выявлены две различные реакции, приводящие к распаду нуклеозидов: необратимый гидролитический разрыв гликозидной связи, катализируемый нуклеозидазами



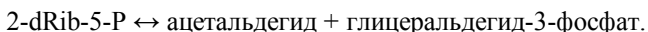
и обратимое фосфоролитическое расщепление под действием нуклеозидфосфорилаз по схеме



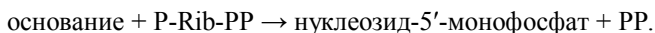
Дальнейший метаболизм углеводного фрагмента требует наличия дезоксирибомутазы (ДРМ), катализирующей реакцию



Образующийся рибозо-5-фосфат (Rib-5-P) поступает в пентозофосфатный шунт, а 2-dRib-5-P подвергается расщеплению под действием дезоксирибоальдозазы (ДРА):



Азотистые основания далее трансформируются в нуклеотиды путем сэлвидж-синтеза (этот термин происходит от английского «salvage», имеющего значение «использование утильсырья»). В клетках бактерий могут протекать два типа таких реакций. Первый катализируется ферментами, называемыми фосфорибозилтрансферазами (соответственно аденина, гуанина и гипоксантина), и характеризуется следующей общей схемой:



Для второго типа сэлвидж-синтеза необходимо последовательное действие нуклеозидфосфорилаз и нуклеозидкиназ:



В клетках *Escherichia coli* выявлено наличие генов, ответственных за синтез уридинфосфорилазы (УРФ; ген *udp*), пуриннуклеозидфосфорилазы (ПНФ; ген *pup*) и тимидинфосфорилазы (ТФ; ген *tpp*). Повреждение этих генов вызывает потерю бактериями способности расти на средах с соответствующими нуклеозидами в качестве единственных источников углерода.

Пентозный фрагмент нуклеозидов подвергается 1–5-мутазному превращению, которое осуществляет ДРМ (ген *drm*), причем этот фермент активен как в отношении 2-dRib-1-P, так и Rib-1-P. Действительно, мутанты *drm* не растут на средах с какими бы то ни было нуклеозидами в качестве источников углерода.

Продукт мутазной реакции Rib-5-P метаболизирует в пентозофосфатном цикле либо реутилизируется путем синтеза P-Rib-PP под действием фосфорибокиназы. 2-dRib-5-P расщепляется под действием ДРА (ген *dra*) на более простые соединения.

На рис. 1 представлена схема, отражающая механизм регуляции део-оперона *Escherichia coli*. В этом опероне собраны структурные гены (*dra*, *tpp*, *drm*, *pup*) всех ферментов, необходимых клетке для деградации нуклеозидов. Транскрипция всех четырех генов део-оперона в тетрацистронные мРНК-1 и мРНК-2 иницируется с двух промоторных участков: deoP и cytP, расположенных рядом друг с другом и слева от гена *dra*. Инициация с первого промотора ингибируется deoR-репрессором, и соответствующий сайт на ДНК, взаимодействующий с репрессором, обозначен как deoO (део-оператор). Инициация с cytP зависит от присутствия комплекса cAMP-CRP и ингибируется cytR-репрессором, если он связан с cyt-оператором (cytO). Таким образом, синтез тетрацистронных мРНК кроме двойного негативного контроля подвергается еще и позитивной регуляции.

Два дистальных гена (*drm* и *pup*), кодирующие ДРМ и ПНФ, дополнительно транскрибируются в двухцистронную мРНК-3. Синтез этой мРНК иницируется с промотора Ino/GuoP, расположенного между генами *tpp* и *drm*. Индукторами синтеза мРНК-3 являются Ino и Guo.

## **Распространение и свойства микробных нуклеозидфосфорилаз**

Нуклеозидфосфорилазы найдены у большого числа микроорганизмов. ПНФ фосфорилирует как рибо-, так и 2'-дезоксирибонуклеозиды. Ферменты из различных источников могут различаться по специфичности в от-

ношении пуринового основания. ТФ фосфорилирует 2'-дезокситимидин и 2'-дезоксигуанидин. 2'-дезоксцитидин не является субстратом этого фермента. УРФ проявляет активность по отношению к рибонуклеозидам, содержащим урацил, тимин, но не цитозин.

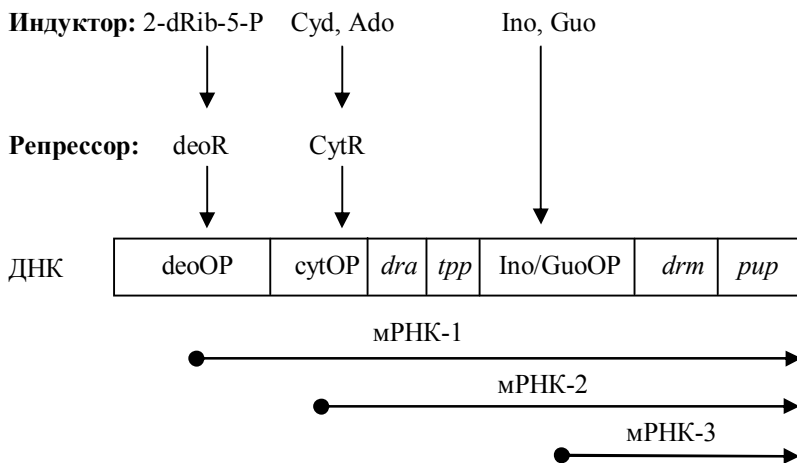


Рис. 1. Схематическое изображение модели транскрипции deo-оперона *E. coli*

В клетках некоторых микроорганизмов (*Bacillus subtilis*) активности УРФ и ТФ проявляет один белок. Он носит наименование «пиримидин-нуклеозидфосфорилаза» и фосфорилирует пиримидиновые нуклеозиды (кроме цитидина и 2'-дезоксцитидина), не взирая на природу углевода.

Микробные нуклеозидфосфорилазы являются внутриклеточными ферментами. Максимальная активность их в большинстве случаев проявляется при температуре 37 °С и в нейтральной области.

Почти все нуклеозидфосфорилазы представляют собой субъединичные белки. При этом ТФ состоит из двух идентичных субъединиц. УРФ из разных бактерий может состоять из 2, 4 или 6 одинаковых субъединиц, а ПНФ содержит от 2 до 6 субъединиц. Все нуклеозидфосфорилазы имеют по одному активному центру на субъединицу. Для этих ферментов характерен последовательный механизм связывания субстратов и освобождения продуктов из фермент-субстратного комплекса. Причем, как правило, с УРФ этот процесс идет неупорядоченно, с ТФ упорядоченно, а с ПНФ субстраты связываются неупорядоченно, но продукты диссоциируют упорядоченно.

Имеющиеся данные по субстратной специфичности нуклеозидфосфорилаз в отношении модифицированных нуклеозидов позволяют отметить некоторые закономерности.

Для всех нуклеозидфосфорилаз характерно намного более резкое падение активности при модификации у 2'- или 3'-атомов углерода углеводного фрагмента молекулы нуклеозида, чем при модификации у C5'-атома. При этом ТФ легче переносит модификации при C3', чем при C2'-атоме, а УРФ и ПНФ – наоборот.

Введение в молекулу нуклеозида атомов, усиливающих гликозидную связь (например, F), или объемных групп (например, азидо- или метил-) приводит к значительному ухудшению или полной потере субстратных свойств такими аналогами.

Замена 2'-ОН или 3'-ОН групп на группы, обладающие меньшей способностью образовывать водородные связи (например, amino-), или обращение конфигурации этих гидроксильных групп (*ara*- или *xyl*-аналоги) также существенно снижает субстратную активность таких соединений.

Наиболее легко ТФ и УРФ переносят модификации по C5-атому пиримидинового гетероцикла.

Наименее существенными для сохранения субстратных свойств пуриновых оснований или их нуклеозидов по отношению к ПНФ являются модификации при C2- или C6-атомах гетероцикла. Так, замещение протонов в экзациклических аминогруппах у C2 или C6 на незаряженные группы (даже такие объемные, как бензил-) или их замена на галогены, метил-, метилтио-, меркапто-, азидо- и нитрогруппы не приводят к значительному снижению субстратных свойств у полученных аналогов. В то же время большинство модификаций по 8 атому углерода приводит к полной потере субстратных свойств у таких пуриновых аналогов.

## **Применение нуклеозидфосфорилаз для синтеза модифицированных нуклеозидов**

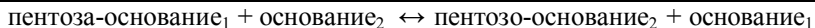
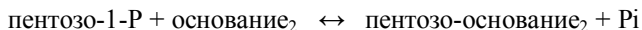
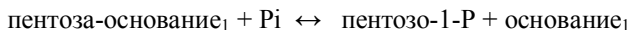
В последние годы нуклеозидфосфорилазы нашли применение для ферментативного синтеза различных аналогов природных нуклеозидов, основанного на эффекте трансгликозилирования.

Преимуществом такого подхода перед химическим является простота и то, что в качестве продуктов образуются только биологически активные β-аномеры, а не трудноразделяемая смесь α- и β-аномеров, как это обычно имеет место при химическом синтезе.

Предпосылкой, определяющей возможность использования нуклеозидфосфорилаз для осуществления трансгликозилирования – переноса углеводного фрагмента нуклеозида с одного азотистого основания на другое, служит равновесный характер реакций, катализируемых этими ферментами. Так, при внесении в среду, где протекает реакция фосфорилирования нуклеозида (пентоза-основание<sub>1</sub>), свободного азотистого основания (основание<sub>2</sub>) начинается протекать реакция синтеза нового нуклеозида (пентоза-основание<sub>2</sub>), который и является продуктом трансгликозилирования.

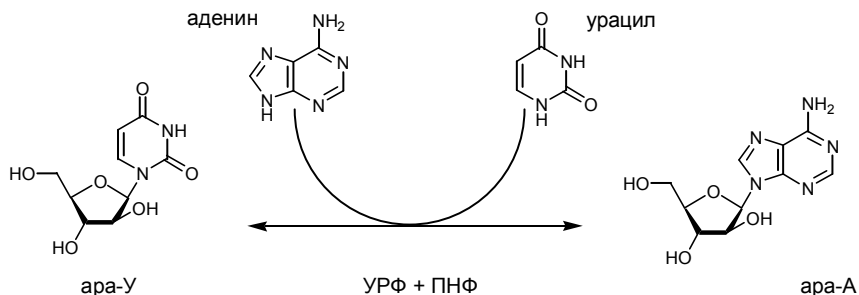


Данную последовательность событий и их результат можно представить в виде следующей схемы:



В качестве биокатализаторов применяются нуклеозидфосфорилазы либо в очищенном состоянии, либо в составе целых бактериальных клеток. Оба вида биокатализаторов имеют как преимущества, так и недостатки. К преимуществу чистых ферментов относится возможность создания их очень высоких концентраций в реакционной среде, что позволяет синтезировать целевые продукты с приемлемыми выходами, исходя из так называемых “плохих” субстратов. Основным недостатком чистых ферментов до последнего времени являлась большая сложность их получения, что приводило к значительно более высокой их стоимости по сравнению с целыми клетками. Кроме того, нуклеозидфосфорилазы в чистом виде более термолабильны, чем в составе целых клеток. В связи с этим реакции с их участием приходится проводить при более низких температурах, чем с целыми клетками, что увеличивает продолжительность процесса. В некоторых случаях температуру реакции с очищенными нуклеозидфосфорилазами удается поднимать до 50 °С за счет их сорбции на ионообменных смолах.

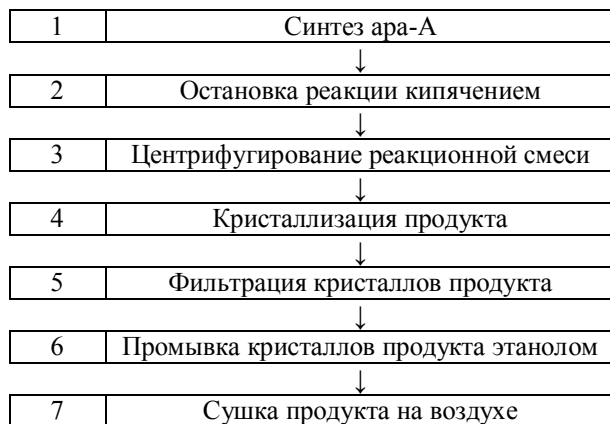
При синтезе аденинарабинозида (ара-А) – арабинозного аналога 2'-дезоксиаданозина процесс протекает с участием двух ферментов: УРФ, катализирующей фосфорилиз урациларабинозида (ара-У), и ПНФ, фосфорилирующей ара-А, согласно суммарной схеме реакции:



В качестве биокатализаторов могут служить целые клетки специально отселектированных штаммов *E. coli* – продуцентов УРФ и ПНФ, а так-

же препараты индивидуальных ферментов, выделенных из клеток генно-инженерных штаммов-продуцентов.

Получение ара-А осуществляют согласно следующей технологической схеме:



### Контрольные вопросы:

1. Катаболизм нуклеозидов у бактерий.
2. Сэлвидж-синтез нуклеозидов и нуклеотидов.
3. Распространение микробных нуклеозидфосфорилаз.
4. Транскрипция deo-оперона *E. coli*.
5. Механизм регуляции deo-оперона *E. coli*.
6. Свойства микробных нуклеозидфосфорилаз.
7. Ферментативное трансликозилирование нуклеозидов.
8. Применение нуклеозидфосфорилаз для синтеза модифицированных нуклеозидов.
9. Схема реакции синтеза ара-А.
10. Технологическая схема получения ара-А.

### Список литературы:

1. Харкевич, Д. А. Фармакология: учебник / Д. А. Харкевич. – М. : Гэотар Медицина, 1999.
2. Зинченко, А. И. Основы молекулярной биологии вирусов и анти-вирусной терапии / А. И. Зинченко, Д. А. Паруль. – Минск : Вышэйш. школа, 2005.
3. Бокуть, С. Б. Курс лекций по молекулярной биологии клетки / С. Б. Бокуть, Н. В. Герасимович, А. А. Милютин. – Минск : Вышэйш. школа, 2005.

4. Белясова, Н. А. Биохимия и молекулярная биология : учеб. пособие / Н. А. Белясова. – Минск : Книжный Дом, 2004.

5. Мушамбаров, Н. Н. Молекулярная биология : учеб. пособие для студ. мед. вузов / Н. Н. Мушамбаров, С. Л. Кузнецов. – М. : ООО «Мед. информ. агентство», 2007.

6. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия : учеб.-справ. пособие / С. Н. Щелкунов. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2004.

7. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А. П. Ермишин [и др.] ; под ред. А. П. Ермишина. – Минск : Тэхналогія, 2005.

8. Пособие BIO (Biotechnology Industry Organization) по биотехнологии [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.cbio.ru/>. – Дата доступа: 01.01.2008.

9. Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.cbio.ru/>. – Дата доступа: 01.01.2008.

## ХОД РАБОТЫ

1. Реакционную смесь (16 мл), содержащую 468,5 мг ара-У, 86,4 мг аденина, 30 мМ К-фосфатный буфер (рН 7), 15 ед. активности УРФ и 25 ед. активности ПНФ, помещают в реакционный сосуд биореактора.

2. После смешения компонентов реакционной смеси быстро отбирают «нулевую пробу» (50 мкл), разводят в 2 раза водой и наносят 5 мкл на хроматографическую пластинку.

3. Реакционную смесь выдерживают, перемешивая, 12 ч при 60 °С.

4. Реакцию останавливают кипячением в течение 5 мин.

5. Суспензию разводят водой в 2 раза и для определения выхода реакции 5 мкл супернатанта наносят на пластинку для ТСХ полоской.

6. Пластинку подвергают хроматографии в воде.

7. Пятна аденина и ара-А вырезают, элюируют 5 мл воды при 60 °С в течение 20 мин.

8. Замеряют оптическую плотность элюатов при 260 нм.

9. Выход реакции рассчитывают по формуле

$$X = \frac{C1}{C1 + C2} \cdot 100\%,$$

где C1 – молярная концентрация ара-А в элюате; C2 – молярная концентрация аденина в элюате.

10. Для расчета C1 и C2 используют коэффициенты молярной экстинкции при 260 нм: для аденина – 13 320 и для ара-А – 14910.

11. Рассчитывают выход изолированного целевого продукта. Для расчета изолированного ара-А используют значения ММ: аденина = 135,11 и ара-А = 267,24.

12. Для выделения ара-А супернатант выдерживают 0,5–1 ч на холоде. Сформировавший осадок продукта собирают фильтрованием.

13. Промывают осадок 10 мл холодной воды и 5–10 мл этанола и высушивают в сузовоздушном термостате при 60 °С в течение 20–30 мин.

14. Полученный осадок взвешивают.

15. Для определения хроматографической чистоты полученного препарата ара-А 10 мг препарата растворяют в 10 мл воды при нагревании.

16. Полученный раствор (10 мкл) наносят полоской на хроматографическую пластинку.

17. После проведения хроматографии в воде пластину просматривают в УФ-свете на наличие примесей.

## **Оформление работы**

### **К занятию:**

- кратко законспектировать теоретические материалы по лабораторной работе.

### **Во время занятия:**

- кратко описать этапы работы;
- указать выход реакции ферментативного синтеза ара-А;
- указать выход изолированного ара-А;
- зарисовать хроматограммы;
- сделать заключение о чистоте полученного препарата ара-А.

# **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8**

## **Характеристика первичной и вторичной структуры двухспиральной ДНК**

### **Цель работы:**

Охарактеризовать конформационный переход «спираль-клубок» ДНК при ее нагревании путем измерения гиперхромного эффекта. Определить содержание (Г+Ц)-пар, исходя из температуры плавления ДНК.

## Оборудование и материалы:

- водяной термостат;
- УФ-спектрофотометр;
- кварцевые кюветы с длиной пробега луча 1 см (2 шт.);
- автоматические микропипетки на 5000 и 125 мкл;
- пробирки на 20 мл (15 шт.);
- штатив для пробирок;
- ледяная баня;
- чашки Петри (15 шт.).

## Реактивы:

- препарат высокополимерной двухспиральной ДНК;
- раствор формальдегида (40 %);
- раствор 0,015 M NaCl-0,0015 M цитрат натрия, pH 7,0 (0,1xSSC);
- карандаш простой;
- линейка;
- бумага миллиметровая.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### СТРУКТУРА ДНК

#### Терминология

Нуклеозиды, нуклеотиды и азотистые основания объединяют понятием компоненты нуклеиновых кислот. Все эти соединения можно условно разделить на две группы – природные компоненты нуклеиновых кислот и модифицированные. Природные составляют основную массу нуклеиновых кислот (ДНК и РНК). Кроме того, они присутствуют в клетках в качестве кофакторов различных ферментов.



Модифицированные компоненты нуклеиновых кислот отличаются от природных тем, что их молекулы тем или иным образом изменены. Изменения могут касаться добавления каких-либо радикалов или удаления их, замены одних атомов или атомных групп на другие. Наконец, может изменяться пространственная ориентация частей молекулы относительно друг друга.

Как известно, нуклеиновые кислоты состоят из нуклеозидов, соединенных между собой фосфодиэфирной связью. В свою очередь нуклеози-

ды состоят из углеводного компонента (пентозы) и какого-либо пуринового или пиримидинового основания.

В качестве углеводного компонента нуклеозидов природных ДНК во всех без исключения случаях присутствует пентоза – 2-дезоксид-Д-рибоза в  $\beta$ -фуранозной форме.

В 2'-дезоксирибонуклеозидах гликозидный гидроксил (гидроксил при 1-м атоме углерода) пентозы замещен пуриновым или пиримидиновым основанием.

В качестве оснований в подавляющем большинстве нуклеозидов ДНК (иначе нуклеозидов 2'-дезоксид-ряда) присутствуют четыре универсально распространенные соединения: аденин (Ade) и гуанин (Gua) – производные пурина, цитозин (Cyt) и тимин (Thy) – производные пиримидина (рис. 1).

Во всех случаях в природных ДНК азотистые основания связаны с гликозидным гидроксидом пентозы через атом азота в положении 9-го пуринового кольца или в положении 1-го пиримидинового кольца. Соответствующие нуклеозиды обозначают как 2'-дезоксидаденозин (2'-dAdo), 2'-дезоксигуанозин (2'-dGuo), 2'-дезоксидцитидин (2'-dCyd) и 2'-дезоксидтимидин (2'-dThd). В последнем случае иногда применяют не строго химическое, а традиционно сложившееся название тимидин.

Присоединение фосфатного остатка к 3-му или 5-му гидроксиду пентозного компонента 2'-дезоксирибонуклеозида дает соответствующий 2'-дезоксирибонуклеотид, иначе – 2'-дезоксидрибо-3'(или 5')-монофосфат.

В отличие от ДНК все природные РНК имеют в качестве универсального углеводного компонента их нуклеозидов Д-рибозу в  $\beta$ -фуранозной форме.

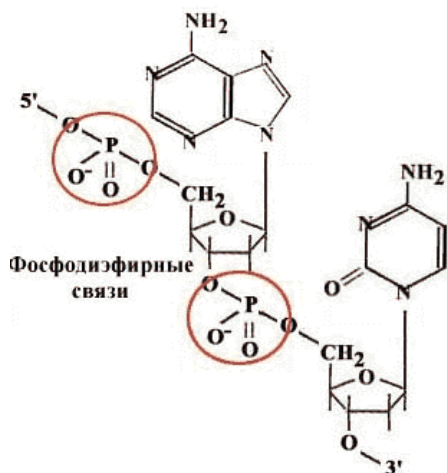
В остальном строение рибонуклеозидов и рибонуклеотидов подобно строению 2'-дезоксирибонуклеозидов и 2'-дезоксирибонуклеотидов: гликозидный гидроксил замещен одним из пуриновых или пиримидиновых оснований, а гидроксиды при 3-м или при 5-м атоме углерода рибозы эстерифицированы фосфатом.

Азотистый компонент нуклеозидов и нуклеотидов РНК всюду представлен одним из четырех обязательных для каждой РНК оснований: Ade, Gua, Cyt или урацилом (Ura). Три первых из них идентичны таковым в ДНК, а урацил представляет собой деметилированное производное Thy.

Так же как и в 2'-дезоксирибонуклеозидах, азотистые основания РНК связаны с гликозидным гидроксидом рибозы через свой азот в положении 9 пуринового кольца или через азот в положении 1 пиримидинового кольца, образуя соответствующий рибонуклеозид, обозначаемый соответственно как аденозин (Ado), гуанозин (Guo), цитидин (Cyd) и уридин (Urd).

Фосфат, эстерифицируя один из свободных гидроксидов рибозного компонента рибонуклеозида, дает соответствующий рибонуклеотид. В зависимости от положения фосфата различают 2'-, 3'- и 5'-монофосфаты соответствующих рибонуклеозидов.

Полимеры, в которых несколько нуклеозидов (обычно до 20) соединены друг с другом фосфодиэфирными связями, называют олигонуклеотидами. Более длинные цепи носят название «полинуклеотиды».

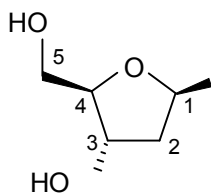


В обычных нуклеиновых кислотах 5'-гидроксильная группа одного нуклеозида связана с 3'-гидроксильной группой другого посредством остатка фосфорной кислоты, образующей с этими группами сложноэфирные связи.

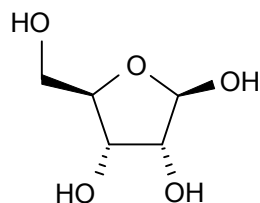
Для упрощения описания химических и ферментативных процессов с участием олиго- и полинуклеотидов допустимо применять условные обозначения полимерных цепей (см. рис. 1), где остатки сахара изображаются прямыми линиями, а 2'-, 3'- и 5'-гидроксилы символизируются отрезками, исходящими из прямой.

## Принципы строения ДНК

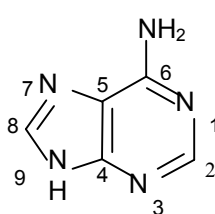
В 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик выдвинули гипотезу о строении ДНК. Согласно их модели (рис. 2), так называемая В-форма ДНК (основная форма ДНК, в которой большая часть ее молекул существует в клетке) представляет собой правильную спираль. Эта спираль образована двумя полинуклеотидными цепями, закрученными друг относительно друга и вокруг общей оси. При этом углеводно-фосфатная цепь располагается снаружи, а азотистые основания – внутри спирали. Пуриновые и пиримидиновые основания, принадлежащие разным цепочкам, соединяются водородными связями, образуя специфические пары. Так, аденин связывается с тиминном, а гуанин – с цитозином. Диаметр спирали постоянен вдоль всей длины молекулы ДНК. Такая регулярность спирали возможна только в том случае, если аденин образует стабилизированную водородными связями пару с тиминном, а гуанин – с цитозином. Строение этих комплементарных пар также показано на рис. 2. Видно, что обе пары близки по форме и имеют одинаковые размеры. Они связаны осью симметрии второго порядка, но при этом псевдосимметричны: при повороте на 180° вокруг оси, лежащей в плоскости рисунка (с выходом оснований из его плоскости), совпадают только С1'-атомы.



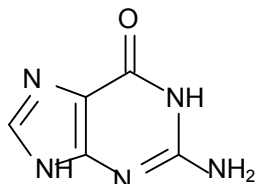
β-D-2-деоксирибофураноза



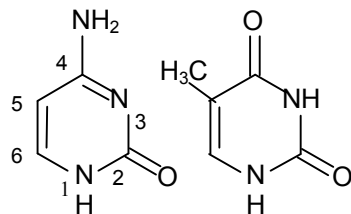
β-D-рибофураноза



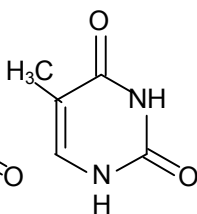
Аденин  
(Ade)



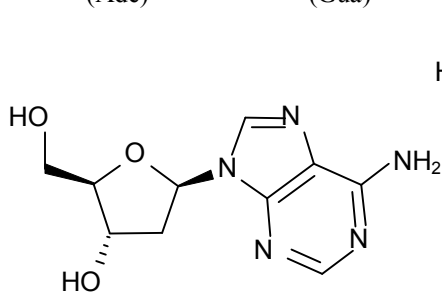
Гуанин  
(Gua)



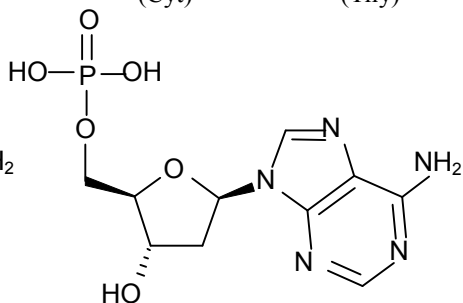
Цитозин  
(Cyt)



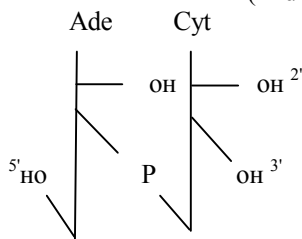
Тимин  
(Thy)



2'-Дезоксиаденозин  
(2'-dAdo)



2'-Дезоксиаденозин-5'-монофосфат  
(2'-dAMP)



Аденилил-(3'-5')-цитидин

Рис. 1. Структуры молекул компонентов нуклеиновых кислот



Комплементарные основания в двойной спирали ДНК лежат в одной плоскости, причем эта плоскость практически перпендикулярна главной оси спирали. Спираль – правозакрученная, а полинуклеотидные цепи в ней антипараллельны. Это означает, что, если двигаться вдоль оси спирали от одного ее конца к другому, в одной цепи будут встречаться фосфодиэфирные связи в направлении  $3' \rightarrow 5'$ , а в другой – в направлении  $5' \rightarrow 3'$ . Иными словами, на каждом из концов линейной молекулы ДНК расположены  $5'$ -конец одной и  $3'$ -конец другой цепи.

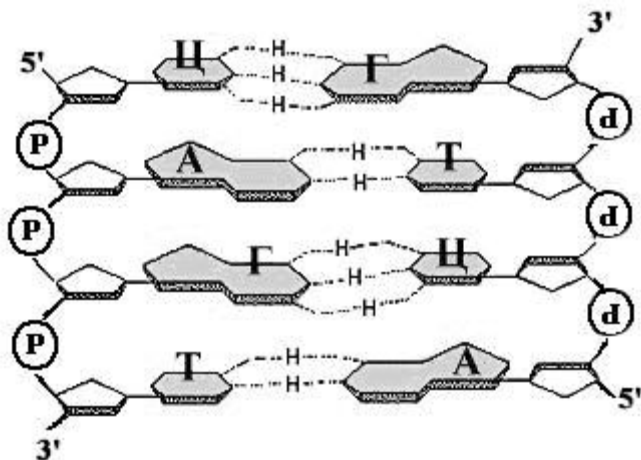


Рис. 2. Схема строения двойной спирали ДНК

Специфическая вторичная структура ДНК определяется двумя типами взаимодействий между гетероциклическими основаниями нуклеотидных остатков: а) взаимодействиями между основаниями в комплементарных парах; б) межплоскостными взаимодействиями оснований, расположенных друг над другом, или так называемым стэкинг-взаимодействиями (от англ. *stacking* – укладываться в стопку).

Следует отметить, что кроме рассмотренных уотсон-криковских пар гетероциклические основания нуклеиновых кислот в принципе способны образовывать множество связанных водородными связями пар другой структуры. Однако квантово-механические расчеты показывают, что уотсон-криковские пары энергетически наиболее выгодны, поскольку в этих парах центры с повышенной и пониженной электронной плотностью оснований расположены оптимально друг относительно друга. Таким образом, комплементарные пары оснований в ДНК стабилизированы преимущественно электростатическими взаимодействиями (такую комплементарность называют электронной). При этом пары G-C существенно более стабильны, чем A-T пары.

Иную природу имеют межплоскостные взаимодействия оснований. Гетероциклические основания нуклеиновых кислот достаточно гидрофобны, поэтому в водном растворе им энергетически выгоднее расположиться друг над другом с тем, чтобы уменьшить контакт с молекулами воды.

### **Полиморфизм двойной спирали ДНК**

Существует несколько форм двойной спирали ДНК в зависимости от содержания воды в препарате и солевого состава среды.

В основной – *B-форме* – на виток приходится 10 комплементарных пар. Плоскости азотистых оснований перпендикулярны оси спирали. Соседние комплементарные пары повернуты друг относительно друга на  $36^\circ$ . Диаметр спирали  $20\text{\AA}$ , причем пуриновый нуклеотид занимает  $12\text{\AA}$ , а пиримидиновый –  $8\text{\AA}$ . *A-форма* – 11 пар азотистых оснований на виток. Плоскости азотистых оснований отклонены от нормали к оси спирали на  $20^\circ$ . Отсюда следует наличие внутренней пустоты диаметром  $5\text{\AA}$ . Высота витка  $28\text{\AA}$ . Такие же параметры у гибрида из одной цепи ДНК и одной цепи РНК.

*C-форма* – шаг спирали  $31\text{\AA}$ ; 9,3 пар оснований на виток; угол наклона  $6^\circ$ .

Все три формы – правозакрученные спирали.

Есть еще несколько форм правых спиралей и всего одна левая спираль (*Z-форма*). Высота витка в *Z-форме* –  $44,5\text{\AA}$ ; на виток приходится 12 пар нуклеотидов. У этой формы линия, соединяющая фосфатные группы, через каждые две пары имеет излом и принимает зигзагообразный вид (отсюда название *Z-формы*).

Ни *A*-, ни *Z*-формы не могут существовать в водном растворе без дополнительных воздействий (белки или суперспирализация).

### **Оптические свойства ДНК**

Спектры поглощения всех высокополимерных природных ДНК характеризуются полосой поглощения с максимумом при  $260\text{ нм}$  (рис. 3). Такое же положение максимума поглощения имеют все нуклеозиды, кроме цитидина, у которого максимум поглощения при  $270\text{ нм}$ . Величина оптической плотности нативной ДНК при  $260\text{ нм}$  на 40–50 % ниже, чем суммарное поглощение составляющих мононуклеотидов. Это явление называется гипохромизмом. Оно объясняется изменением взаимного расположения хромофорных групп нуклеотидов. Распад ДНК до нуклеотидов или ее денатурация сопровождается увеличением поглощения – гиперхромным эффектом.

## Денатурация ДНК

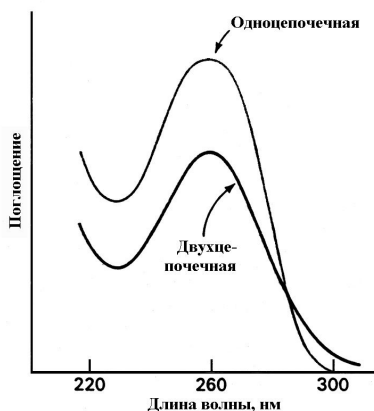


Рис. 3. Спектры поглощения нативной и денатурированной ДНК

структуры нативной ДНК в беспорядочно свернутый клубок — конфигурацию, характерную для денатурированной ДНК. Устойчивость нативной спиральной структуры к воздействию различных денатурирующих агентов у ДНК из самых разнообразных источников коррелирует с содержанием в них GC-пар. Установлено, что с повышением содержания GC-пар термостабильность ДНК возрастает линейно.

Денатурацию ДНК вызывают такие факторы, как нагревание, повышение и понижение pH, действие органических растворителей. Поскольку измерение температуры растворов ДНК — задача совсем простая, наиболее удобным методом наблюдения за превращением

Важной особенностью внутримолекулярных взаимодействий, стабилизирующих вторичную структуру ДНК, является их кооперативность. Это означает, что при денатурации ДНК все звенья спиральной структуры разрушаются одновременно.

Денатурация ДНК сопровождается резким изменением таких ее характеристик, как вязкость, оптическое вращение, плавающая плотность, светорассеяние, а также (см. рис. 3) коэффициент экстинкции. Эти изменения соответствуют превращению упорядоченной спиральной

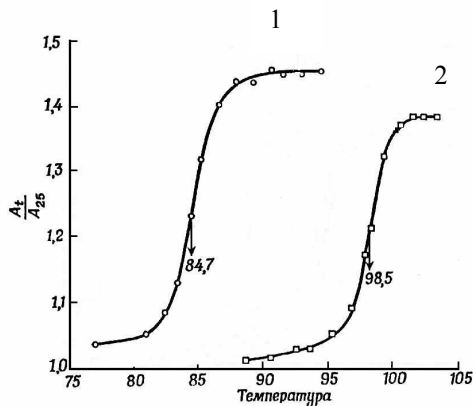


Рис. 4. Кривые плавления различных ДНК в буфере SSC. Стрелками обозначены  $T_{пл}$ . ДНК выделены из *Proteus vulgaris* (1) и *Sarcina lutea* (2)

нативной ДНК в денатурированную (так называемый переход спираль-клубок) может служить тепловая денатурация, которая сопровождается легко измеряемым гиперхромным эффектом в области максимума поглощения (260 нм). Переход спираль-клубок происходит не постепенно, а сразу и осуществляется в узком температурном интервале (оптическое поглощение увеличивается при этом на 40 %). Среднюю точку кривой тепловой денатурации принимают за температуру перехода, или температуру плавления, и обозначают  $T_{пл}$  (рис. 4). Обычно  $T_{пл}$  измеряют в одном и том же растворителе, поскольку ее величина зависит от ионной силы раствора и природы противоионов.

### Определение температуры плавления ДНК

Для экспериментов используют высокополимерные очищенные препараты ДНК. Для растворения ДНК применяют стандартный солевой цитратный буфер SSC следующего состава: 0,15 М NaCl, 0,015 М цитрат натрия (рН 7,0). Если желательно получить более низкую  $T_{пл}$ , то можно воспользоваться растворителями, например 7,2 М NaClO<sub>4</sub> или 50%-ным метанолом. В указанных растворителях денатурация ДНК происходит при более низких температурах (на 30–50 °С ниже), чем в SSC. Концентрацию ДНК доводят растворителем до 20 мкг/мл. Величина  $E_{260}$  для 1%-ного раствора нативной ДНК равна около 200. Таким образом, поглощение раствора ДНК при 260 нм будет равно 0,4. Эта величина лежит в той области оптической плотности, где результаты измерения оказываются наиболее точными, поскольку этой области соответствуют такие значения концентраций, при которых еще не происходит агрегации. Препараты не должны содержать ни белка, ни РНК, ни каких бы то ни было других соединений, способных поглощать в ультрафиолете (например, фенола). Для обеспечения постоянства ионной силы растворы ДНК с необходимой конечной концентрацией подвергают диализу (в тщательно промытых диализных трубках) против 500 объемов соответствующего растворителя.

Исходное поглощение образцов ДНК измеряют при температуре 25 °С. Это значение должно быть определено особенно тщательно, так как с ним сравнивают результаты всех последующих измерений. Далее определяют поглощение при температурах от 25 до 100 °С с интервалом не более 5 °С и выдержкой при определенной температуре в течение 5–10 мин. Обычно нагрев и термостатирование кювет обеспечиваются специальным приспособлением к спектрофотометру.

По результатам измерений строят кривую гиперхромного эффекта или кривую «плавления» спирали. Для этого по оси ординат откладывают отношения оптической плотности раствора при измеряемой температуре к оптической плотности при 25 °С (относительная абсорбция), а по оси абсцисс – температуру.  $T_{пл}$ , или температуру денатурации ДНК, находят по

кривой плавления. Она соответствует середине зоны подъема относительной экстинкции.

### **Расчет нуклеотидного состава по величине $T_{пл}$**

Установлено, что для образцов ДНК, выделенных из нескольких десятков различных бактериальных, растительных и животных клеток, а также двух синтетических полимеров  $T_{пл}$  линейно зависит от содержания GC-пар (последнее определяли химическими методами). Эта зависимость для растворов ДНК в SSC определяется уравнением

$$ГЦ = (T_{пл} - 69,3) \cdot 2,44,$$

где 69,3 и 2,44 – постоянные коэффициенты.

Таким образом, в препаратах (1 и 2) ДНК, представленных на рис. 4, содержание GC-пар должно составлять 37,6 и 71,2 моль.% соответственно.

Приведенное соотношение идеально соблюдается для ДНК, содержащих от 30 до 70 % GC-пар. В редких случаях, когда ДНК содержит менее 30 или более 70 % GC-пар, наблюдаются отклонения от этого соотношения.

Тепловую денатурацию ДНК с высоким содержанием GC-пар удобнее проводить в буфере, в котором концентрация солей в 10 раз меньше, чем в SSC (0,1xSSC). В таком случае содержание GC-пар в ДНК рассчитывается по формуле

$$ГЦ = (T_{пл} - 53,9) \cdot 2,44.$$

Из приведенного уравнения можно вычислить, что разбавление растворителя в 10 раз приводит к понижению  $T_{пл}$  на 16,6 °С.

Таким образом, исходя из  $T_{пл}$  ДНК можно определить содержание в ней GC-пар. Для этого требуется всего 10–40 мкг ДНК. Метод прост и не требует сложной аппаратуры.

### **Контрольные вопросы:**

1. Строение молекул природных компонентов нуклеиновых кислот.
2. Модифицированные компоненты нуклеиновых кислот.
3. Принципы строения ДНК.
4. Антипараллельность.
5. Комплементарность.
6. Конформация молекул ДНК в растворе.
7. Денатурация ДНК и методы ее тестирования.
8. Оптические свойства нуклеиновых кислот.
9. Физико-химические методы анализа состава ДНК.
10. Расчет нуклеотидного состава по величине  $T_{пл}$ .

## Список литературы:

1. Овчинников, Ю. А. Биоорганическая химия / Ю. А. Овчинников. – М. : Просвещение, 1987.
2. Бокуть, С. Б. Курс лекций по молекулярной биологии клетки / С. Б. Бокуть, Н. В. Герасимович, А. А. Милютин. – Минск : Вышэйш. школа, 2005.
3. Белясова, Н. А. Биохимия и молекулярная биология : учеб. пособие / Н. А. Белясова. – Минск : Книжный Дом, 2004.
4. Мушкамбаров, Н. Н. Молекулярная биология : учеб. пособие для студ. мед. вузов / Н. Н. Мушкамбаров, С. Л. Кузнецов. – М. : ООО «Мед. информ. агентство», 2007.
5. Строение ДНК и положение организмов в системе / под ред. А. Н. Белозерского, А. С. Антонова. – М. : Изд-во МГУ, 1972.

## ХОД РАБОТЫ

1. Препарат высокополимерной двухспиральной ДНК растворяют в  $0,1 \times \text{SSC}$  (из расчета 10–20 мкл в 1 мл).
2. Раствор ДНК наливают по 5 мл в 15 пробирок.
3. Содержимое пробирок прогревают при температурах от 40 до 80 °С с интервалом 5 °С и выдержкой при определенной температуре в течение 5–10 мин.
4. После прогрева к раствору ДНК (не допуская его охлаждения!) прибавляют водный раствор формальдегида (125 мкл).
5. Раствор ДНК с формальдегидом тщательно перемешивают, извлекают из термостата и оставляют охлаждаться при комнатной температуре.
6. В качестве альтернативного варианта прогретый раствор ДНК быстро охлаждают, выливая его в чашку Петри, охлажденную во льду.
7. С помощью спектрофотометра определяют экстинкции ( $E_{260}$ ) всех растворов.
8. По результатам измерений строят кривую «плавления» двойной спирали ДНК. С этой целью по оси ординат откладывают отношения оптической плотности раствора, прогретого при той или иной температуре, к оптической плотности при комнатной температуре, а по оси абсцисс – температуру.
9. Находят по кривой плавления точку плавления ( $T_{пл.}$ ), или температуру денатурации ДНК. Она соответствует середине зоны подъема «кривой плавления» ДНК.
10. Рассчитывают гиперхромный эффект.
11. Определяют содержание (Г+Ц)-пар, исходя из температуры плавления ДНК.

## Оформление работы

### К занятию:

- кратко законспектировать теоретические материалы по лабораторной работе.

### Во время занятия:

- кратко описать этапы работы, указав, удалось ли обнаружить гиперхромный эффект, свидетельствующий о наличии в молекуле ДНК спиральной структуры;
- представить расчет величины гиперхромного эффекта;
- представить расчет содержания (Г+Ц)-пар в моль.%;
- построить кривую плавления ДНК.

# ПРИЛОЖЕНИЯ

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### АРИФМЕТИКА ПРИБЛИЖЕННЫХ ЧИСЕЛ

Многие числа, используемые в вычислениях, получают в результате неточных измерений, поэтому они могут рассматриваться лишь как приближенные. Очевидно, что результатом вычислений, производимых с такими числами, может быть только приближенное число.

Рассмотрим некоторые правила, полезные при работе с приближенными числами. Существуют различные способы округления чисел. Один из них состоит в отбрасывании младших разрядов числа. При этом если первая отбрасываемая цифра больше пяти, то последний оставшийся знак надо увеличить на единицу, если меньше, то последний знак оставляемой части сохраняется неизменным. Если же первая отбрасываемая цифра в точности равна пяти, то последняя сохраняемая цифра увеличивается на единицу в случае, если она нечетная, и остается без изменений, если она четная. Например, при округлении до сотых числа 3,14159; 17,7682; 28,999; 0,00234; 7,235 и 7,325 переходят в числа 3,14; 17,77; 29,00; 0,00; 7,24 и 7,32.

При сложении и вычитании приближенных чисел в результате необходимо оставлять столько десятичных знаков, сколько их имеет наименьшее точное число.

#### **Например:**

$$3,73 + 52,1 + 0,28 = 56,11 \approx 56,1.$$

При умножении и делении приближенных чисел в результате надо сохранять столько цифр, сколько их имеет число с наименьшим количеством значащих цифр. Значащими цифрами приближенного числа называются цифры в его десятичной записи, кроме нулей перед первой цифрой, отличной от нуля и нулей справа, заменивших отброшенные при округлении цифры.

#### **Например:**

$$2,143 \times 0,45 = 0,96435 \approx 0,96.$$



При извлечении корня в результате следует оставлять столько значащих цифр, сколько их имеет подкоренное число.

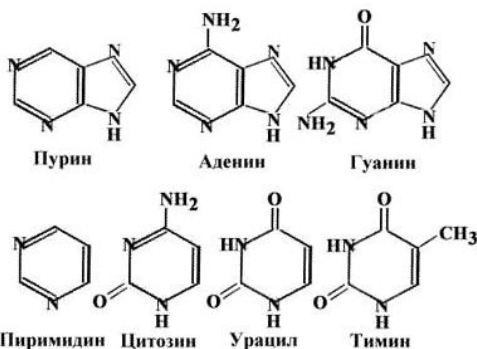
**Например:**

$$\sqrt{40,5} = \pm 6,363961 \approx \pm 6,36.$$

В промежуточных результатах допускается оставлять на одну цифру больше, чем следует из указанных правил.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

### АЗОТИСТЫЕ ОСНОВАНИЯ

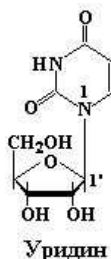


### НУКЛЕОЗИДЫ (НА ПРИМЕРЕ РИБОНУКЛЕОЗИДОВ)

Пуриновые нуклеозиды

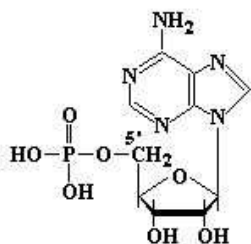


Пиримидиновые нуклеозиды

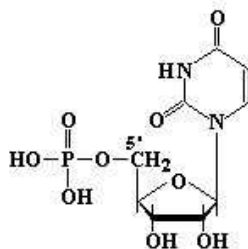


# НУКЛЕОТИДЫ (НА ПРИМЕРЕ РИБОНУКЛЕОТИДОВ)

## Нуклеозид-5'-монофосфаты

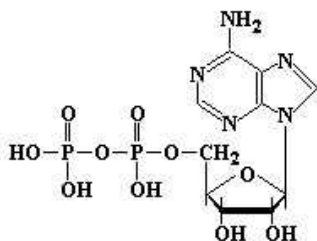


Аденозин-5'-монофосфат

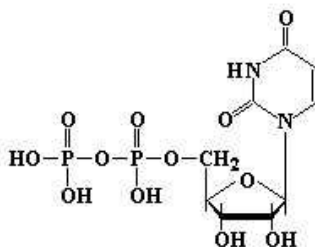


Уридин-5'-монофосфат

## Нуклеозид-5'-дифосфаты

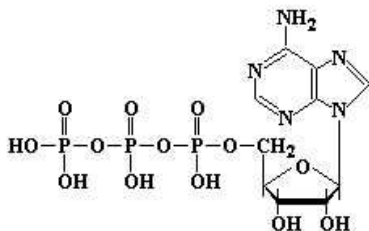


Аденозин-5'-дифосфат

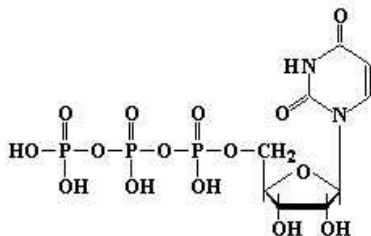


Уридин-5'-дифосфат

## Нуклеозид-5'-трифосфаты



Аденозин-5'-трифосфат



Уридин-5'-трифосфат

## Номенклатура азотистых оснований, рибонуклеозидов и рибонуклеотидов

Азотистое основание	Нуклеозид	Нуклеотиды
Аденин (Ade)	Аденозин (Ado)	Аденозин-5'-монофосфат (AMP) Аденозин-5'-дифосфат (ADP) Аденозин-5'-трифосфат (ATP)
Гуанин (Gua)	Гуанозин (Guo)	Гуанозин-5'-монофосфат (GMP) Гуанозин-5'-дифосфат (GDP) Гуанозин-5'-трифосфат (GTP)
Тимин (Thy)	Тимидин (Thd)	Тимидин-5'-монофосфат (TMP) Тимидин-5'-дифосфат (TDP) Тимидин-5'-трифосфат (TTP)
Цитозин (Cyt)	Цитидин (Cyd)	Цитидин-5'-монофосфат (CMP) Цитидин-5'-дифосфат (CDP) Цитидин-5'-трифосфат (CTP)
Урацил (Ura)	Уридин (Urd)	Уридин-5'-монофосфат (UMP) Уридин-5'-дифосфат (UDP) Уридин-5'-трифосфат (UTP)

Учебное издание

**Зинченко** Анатолий Иванович

**ПРАКТИКУМ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ  
СОЕДИНЕНИЯ НУКЛЕИНОВОЙ ПРИРОДЫ**

**Учебно-методическое пособие**

Редакторы *М. И. Авхимович, О. А. Кучинский*

Корректор *С. О. Сараева*

Компьютерная верстка *А. Н. Мишиц*

Подписано в печать 02.03.2009. Формат 60×90 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>.

Бумага офсетная. Гарнитура Times. Ризография.

Усл. печ. л. 5, 25. Уч.-изд. л. 3, 7.

Тираж 60 экз. Заказ № 81.

Издатель и полиграфическое исполнение  
учреждение образования «Международный государственный  
экологический университет имени А. Д. Сахарова»

ЛИ № 02330/0131580 от 28.07.2005 г.

Республика Беларусь, 220070, г. Минск, ул. Долгобродская, 23

E-mail: [info@iseu.by](mailto:info@iseu.by)

<http://www.iseu.by>







