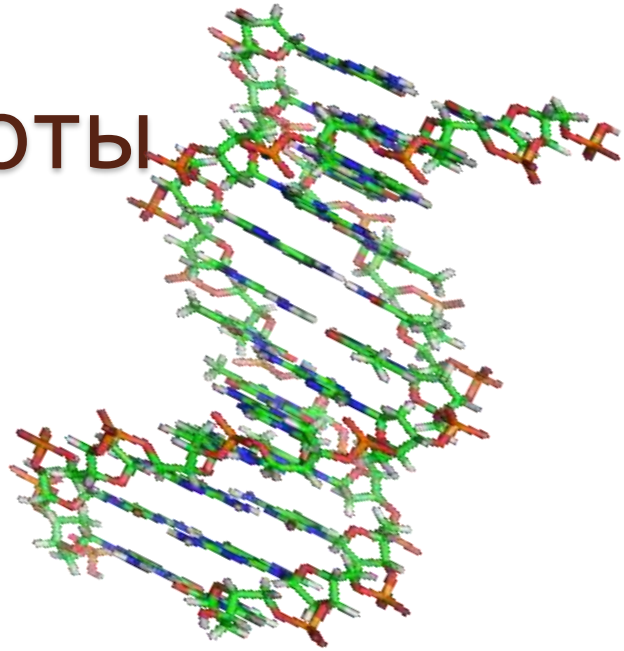
Химия и биологическая функция нуклеозидов и нуклеотидов

1.Общая характеристика нуклеиновых кислот

2. Нуклеотиды и нуклеозиды

Нуклеиновые кислоты



НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

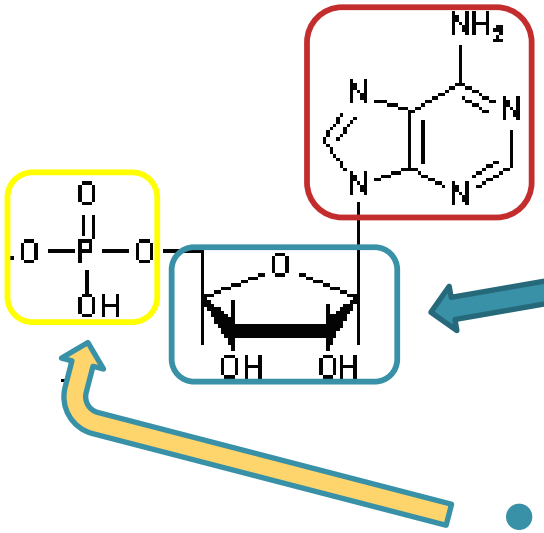
- Полимеры из нуклеотидов
- ДНК –дезоксирибнуклеиновая кислота, содержится в ядре клеток. Функция ДНК – это хранение и передача наследственной информации.
- РНК- рибонуклеиновая кислота участвует в с реализации наследственной информации –синтезе белка
- Различают несколько видов РНК – информационную, рибосомальную и транспортную.

Функции нуклеотидов

- ДНК построена из дезоксирибонуклеотидов, является хранителем наследственной информации, принимает участие в реализации этой информации – в биосинтезе белка.
- РНК построена из рибонуклеотидов, участвует в синтезе белка, является носителем генетической информации у РНК-содержащих вирусов.
- Пуриновые рибонуклеотиды выполняют функции универсальных источников энергии (АТФ).
- Выполняют роль регуляторных сигналов – вторичных переносчиков (мессенджеров) – ц-АМФ, ц-ГМФ, аллостерических регуляторов.
- Входят в состав коферментов ФАД, ФМН, НАД, НАДФ, служат переносчиком метильных групп (S-аденозинметионин). Пиримидиновые нуклеотиды функционируют в качестве макроэргических посредников в углеводном обмене (УДФ-глюкоза, УДФ-галактоза), в синтезе липидов – ЦДФ-ацилглицерол.

Строение нуклеотида

Нуклеотид состоит из трех компонентов:

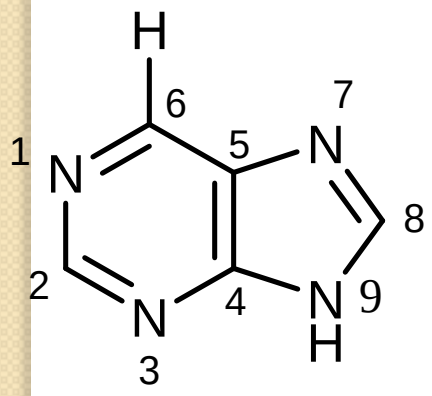


- азотистого основания
- Углевода
- остатка фосфорной кислоты

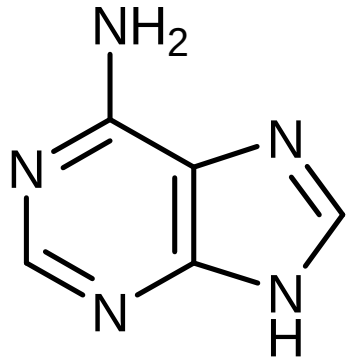
Азотистые основания, входящие в состав нуклеиновых кислот:

Производные Пурина : **Аденин и Гуанин**

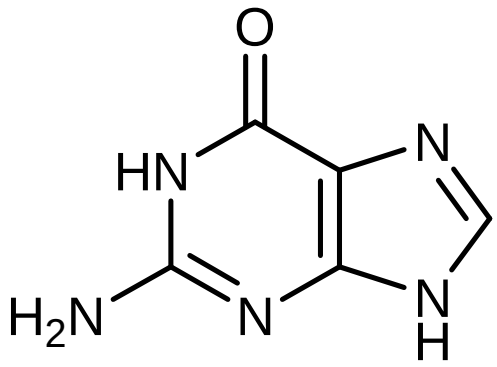
Пурин



Аденин

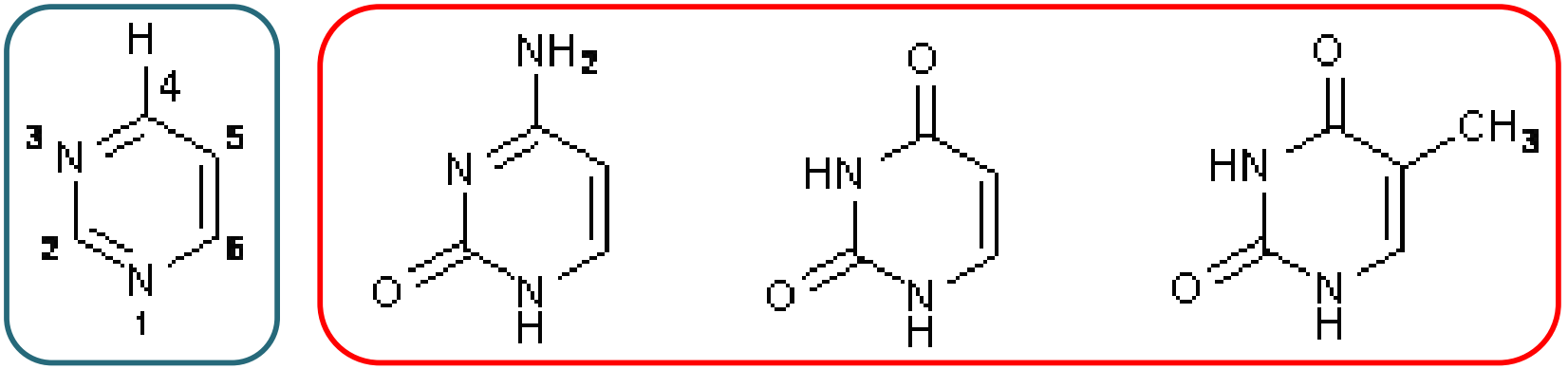


Гуанин



Азотистые основания, входящие в состав нуклеиновых кислот:

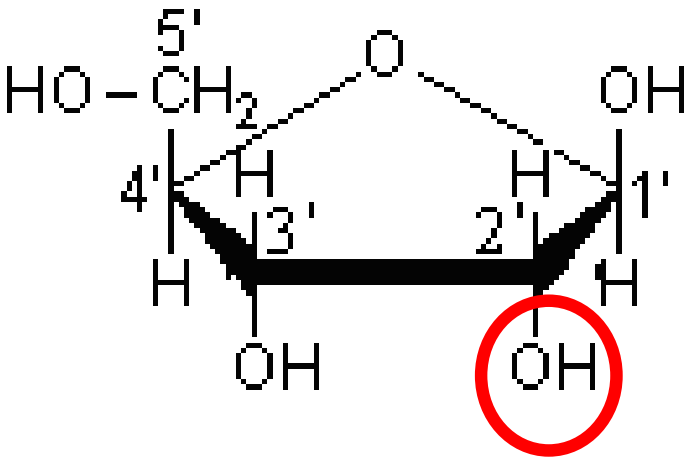
Производные Пиримидина : **Цитозин, Урацил, Тимин**



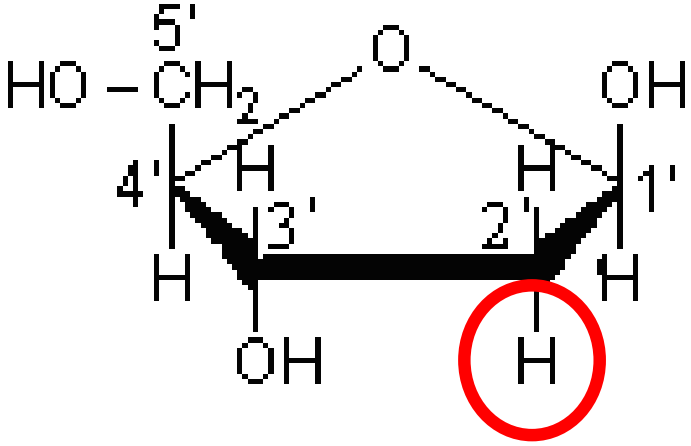
Пиримидин Цитозин (2-окси-4-амино-пиримидин) Урацил (2,4-диокси-пиримидин) Тимин 5-метил,2,4-диокси-пиримидин

Углеводные компоненты нуклеотидов

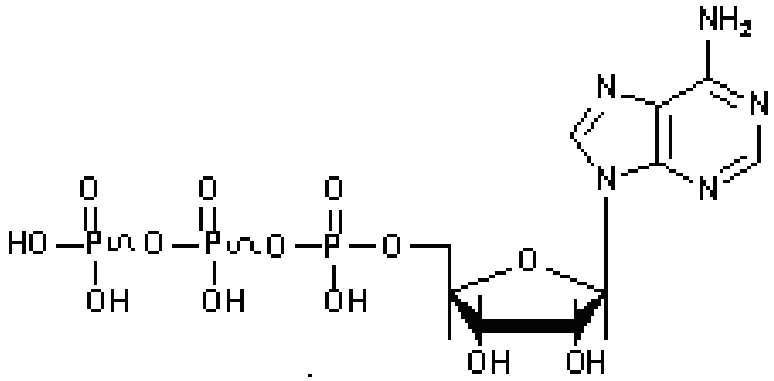
β-D-рибофураноза (рибоза)

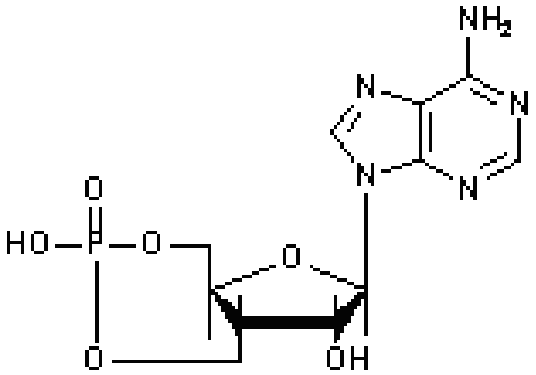


β-2'-дезокси-D-рибофураноза (дезоксирибоза)



Нуклеотиды – фосфаты





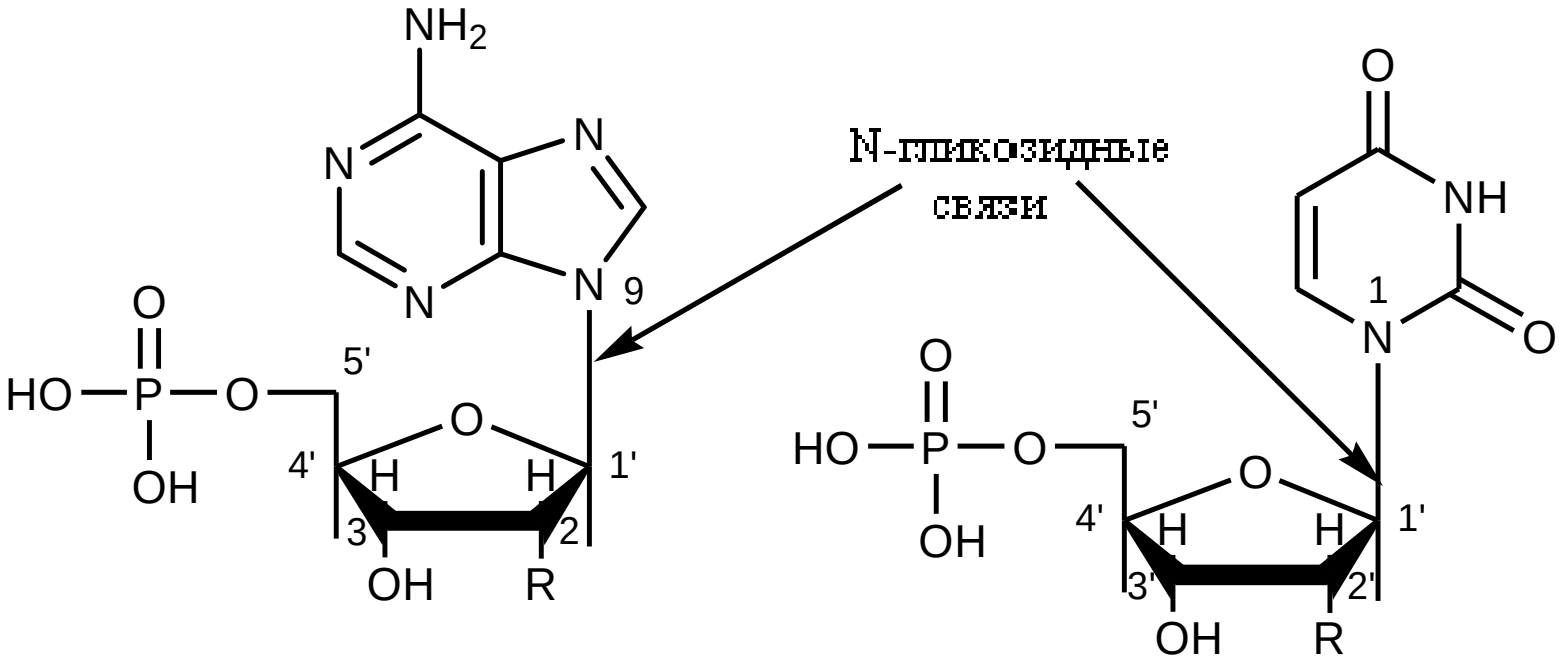
Циклический АМФ

Аденозин-монофосфат (АМФ)

Аденозин-дифосфат (АДФ)

Аденозин-трифосфат (АТФ)

Образование N-гликозидной связи между азотистым основанием и углеводным компонентом



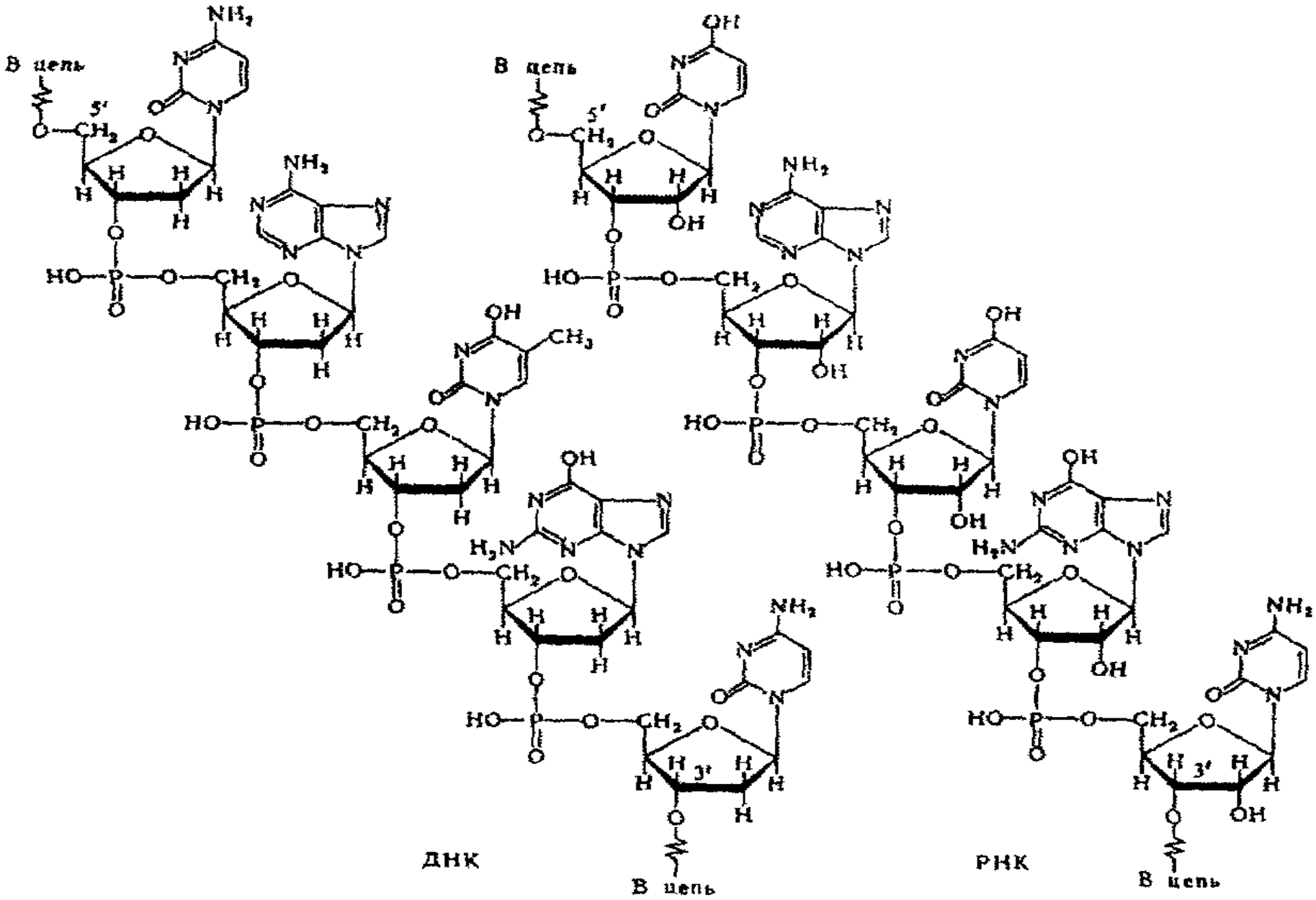
Нуклеозидмоно-, ди- и трифосфаты

Нуклеозид	**букв. обозн.**	**монофосфаты**	дифосфаты	трифосфаты
Аденозин	А	АМФ	АДФ	АТФ
Гуанозин	Г	ГМФ	ГДФ	ГТФ
Цитидин	Ц	ЦМФ	ЦДФ	ЦТФ
Уридин	У	УМФ	УДФ	УТФ
Тимидин	Т	ТМФ	ТДФ	ТТФ

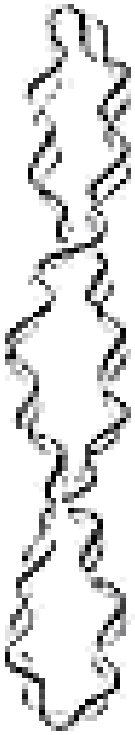
Правила Чаргаффа для ДНК

- Сумма пуриновых нуклеотидов равна сумме пиримидиновых нуклеотидов: А+Г=Т+Ц.
- Молярное содержание аденина равно молярному содержанию тимина (А=Т или А/Т=1).
- Молярное содержание гуанина равно молярному содержанию цитозина (Г=Ц или Г/Ц=1).
- Количество аденина и цитозина равно количеству гуанина и тимина (А+Ц=Г+Т или А+Ц/Г+Т=1).
- В ДНК из различных источников неодинаково соотношение нуклеотидов

Строение фрагментов молекул ДНК и РНК



Строение молекул ДНК и РНК



Сверхспиральная кольцевая ДНК

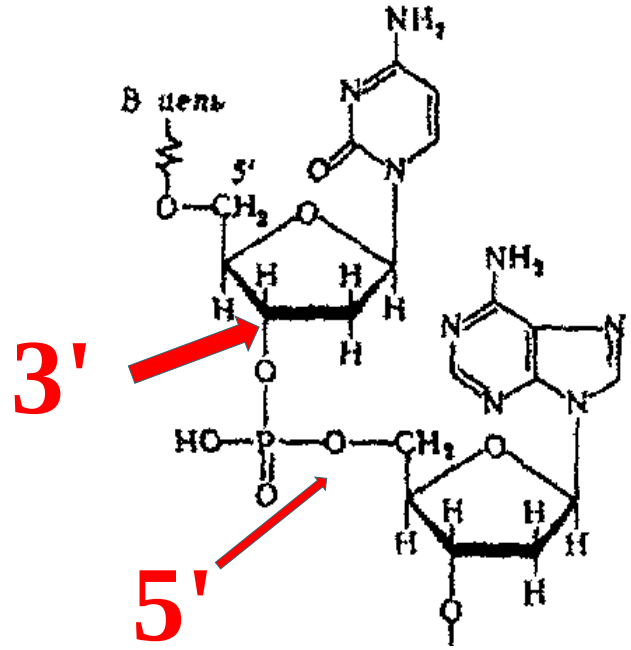


Релаксированная кольцевая ДНК

Структура ДНК

- **<u>Первичная структура ДНК:</u>**

  последовательность нуклеотидов

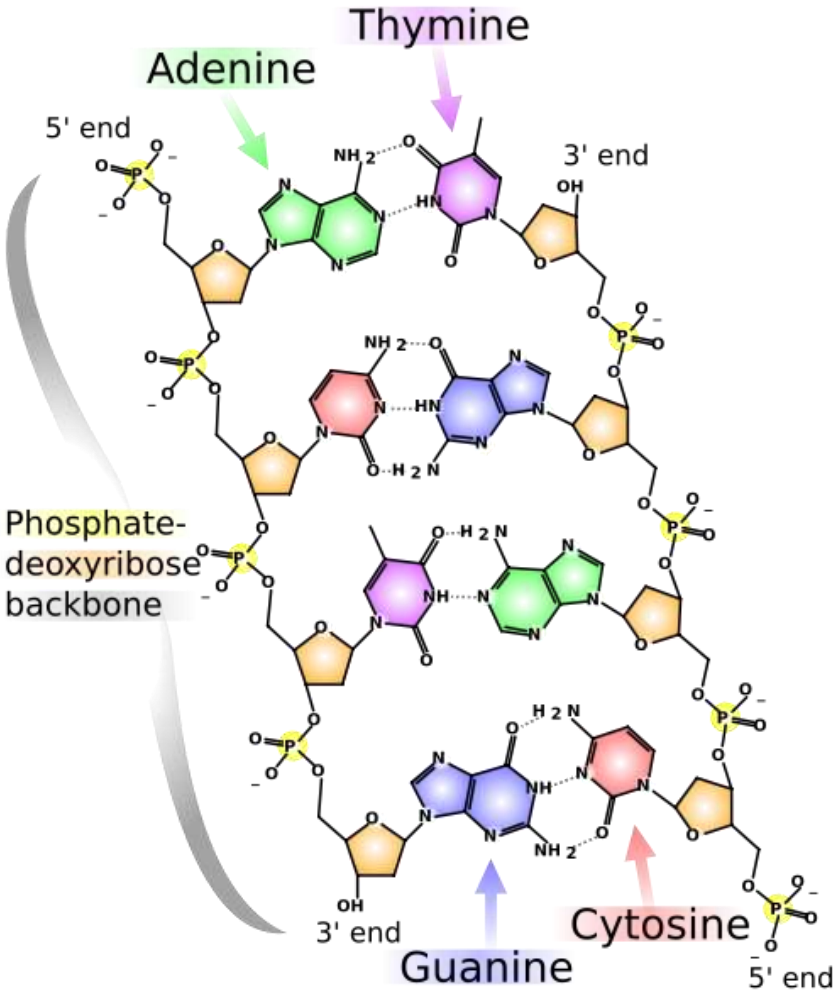


Первичная структура ДНК -

последовательность нуклеотидов, образуется благодаря сложноэфирной связи, возникающей между остатками фосфорной кислоты у 3' углерода дезоксирибозы одного мононуклеотида с 5'углеродом дезоксирибозы другого мононуклеотида

Вторичная структура ДНК

В 1953 году Уотсон и Крик установили, что ДНК представляет собой двойную спираль, состоящую из двух антипараллельных полинуклеотидных цепей.

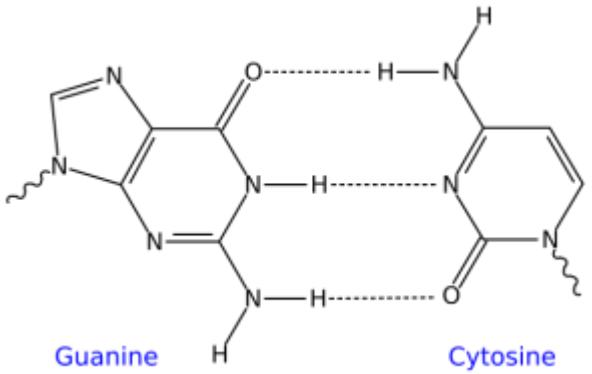


Вторичная структура -

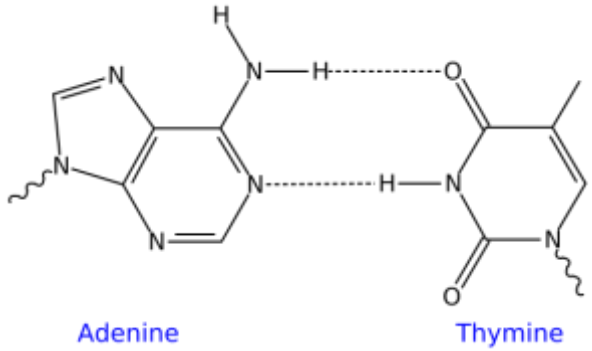
спирализация полидезоксирибо-нуклеотидной цепи, вернее двух цепей.

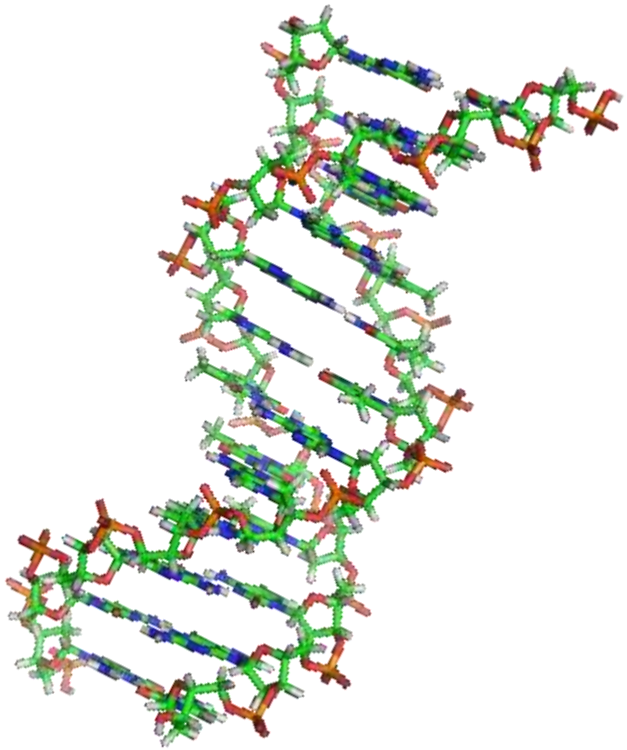
Водородные связи между комплементарными нуклеотидами

Г ≡ Ц

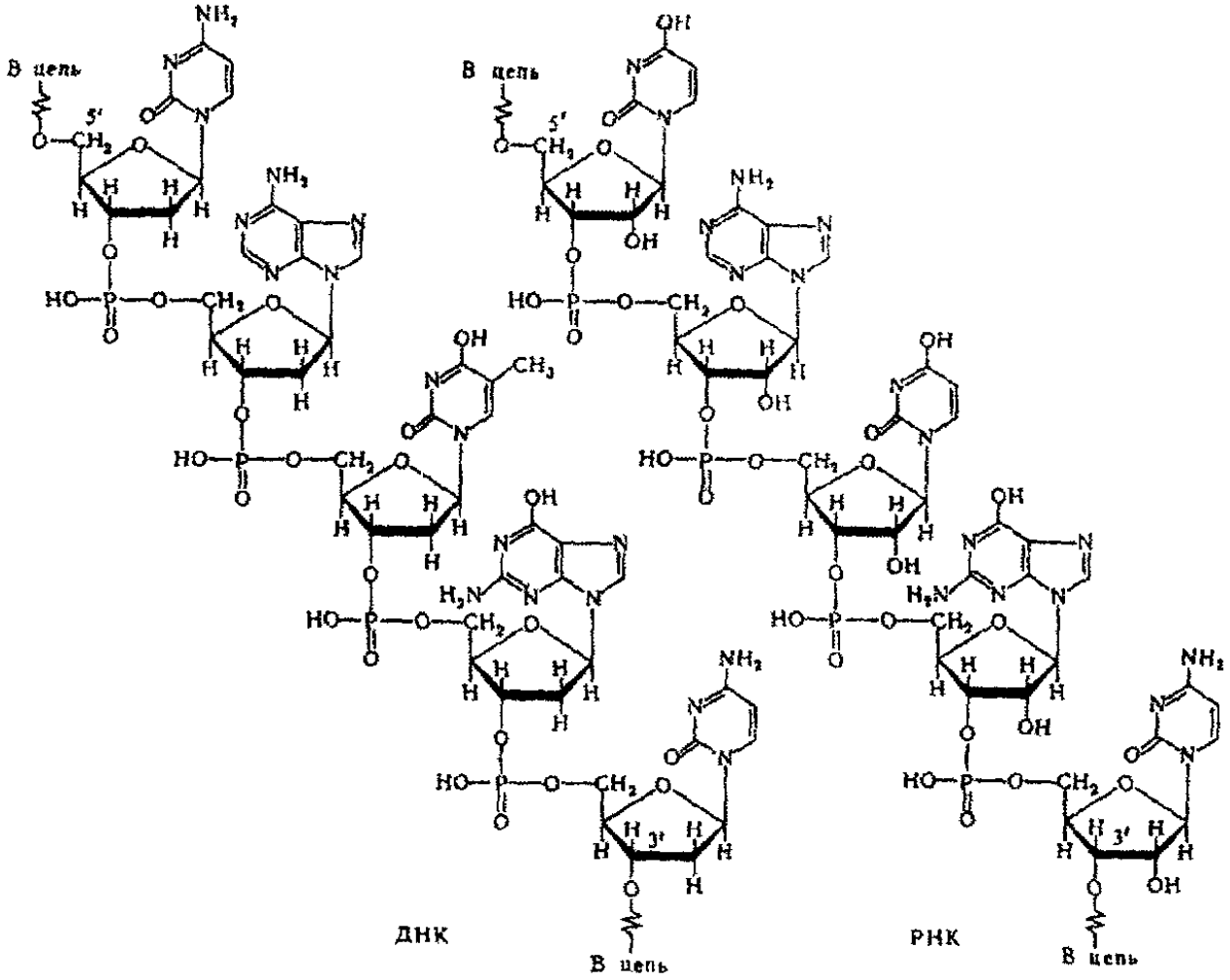


А = Т





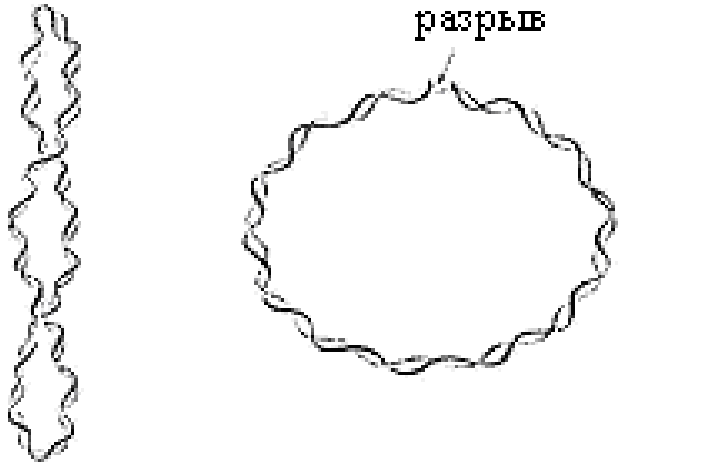
Строение фрагментов молекул ДНК и РНК

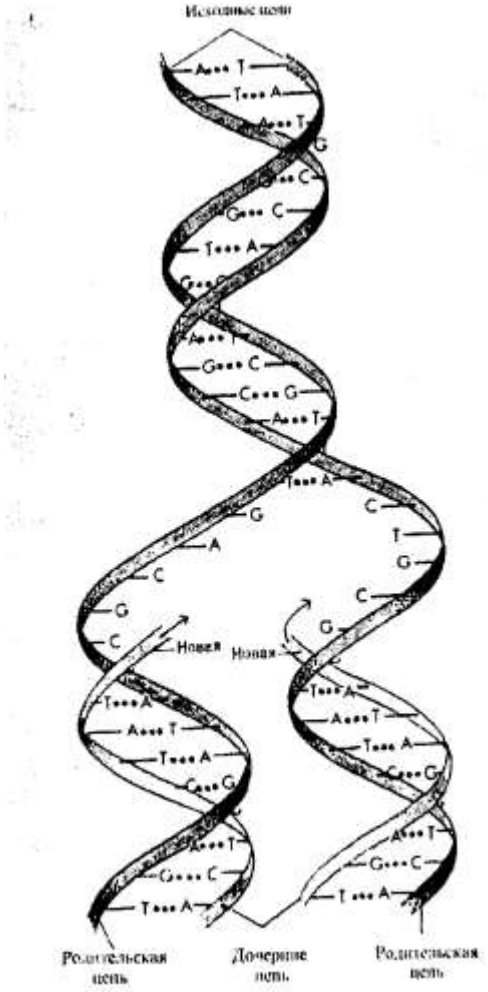


Кольцевидная ДНК

- Сверхспиральная кольцевая ДНК

Релаксированная кольцевая ДНК




Исходные цепи
Новая
Новая
Родительская цепь
Дочерние цепь
Родительская цепь

а)


Двухцепочечная ДНК, обвитая вокруг структуры, содержащая 8 молекул гистонов - по 2 молекулы H2A, H2B, H3 и H4
Гистон H1
Спейсерный участок ДНК
Б

б)

Транспортная РНК (т-РНК) - самые мелкие молекулы РНК, построены из 75-90 нуклеотидов, Мм 23000-30000 Да. т-РНК составляет 10-20% от общего количества РНК клетки. Функция их состоит в транспортировании аминокислот в рибосомы - к месту синтеза белка и обеспечении включения аминокислот в определенные участки полипептидной цепи в соответствии с генетическим кодом. т-РНК участвуют в синтезе белка, являясь адаптерами – своеобразными переводчиками – переводят последовательность нуклеотидов в последовательность аминокислотных остатков в молекуле белка

Информационная РНК (и-РНК) – синтезируется в процессе транскрипции, является точной копией отдельного гена

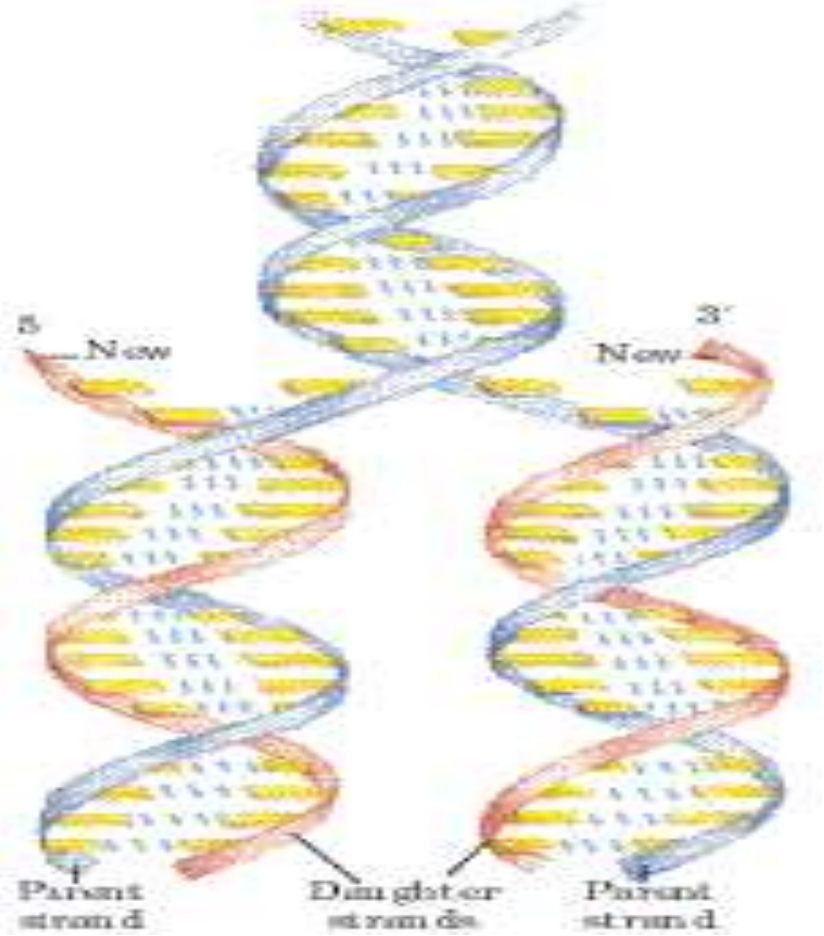
Рибосомная РНК (рРНК) – синтезируется в ядрышке. В клетках животных различают несколько видов рРНК. В большой субчастице рибосом (60S) содержится 28S, 5S и 5,8S РНК, состоящие соответственно из 5000, 155 и 121 нуклеотидов

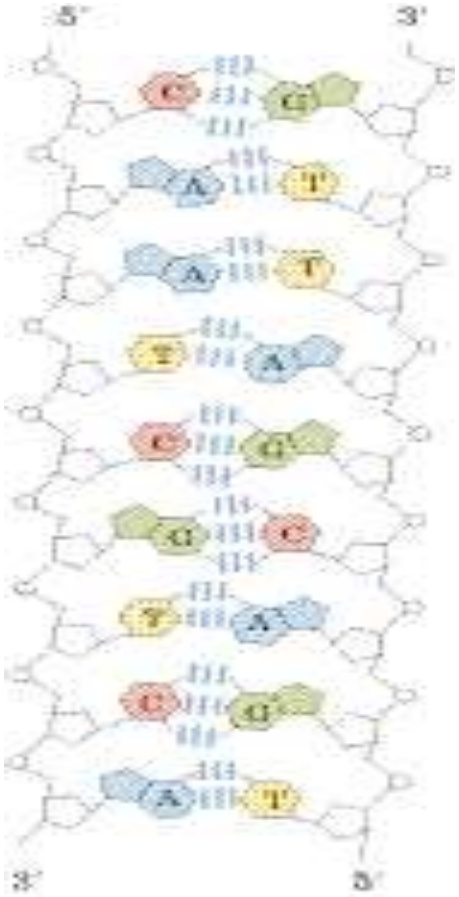


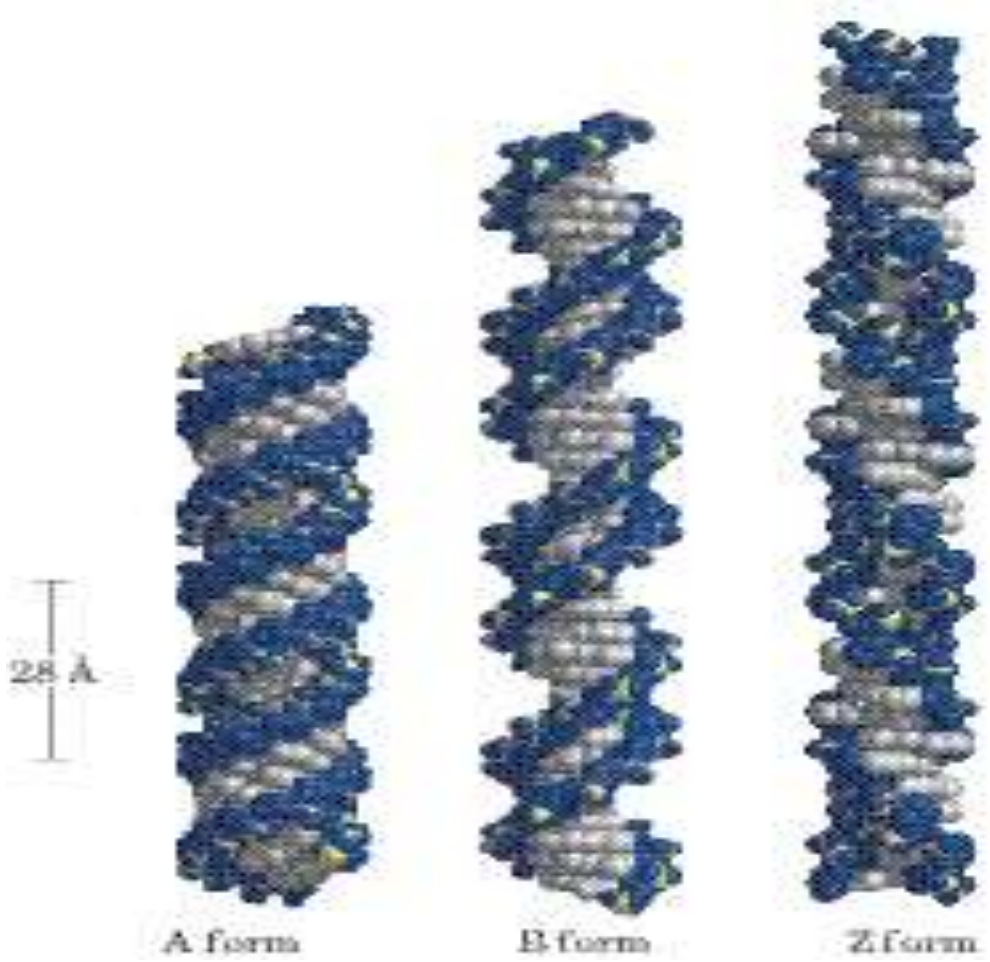
Джеймс Уотсон

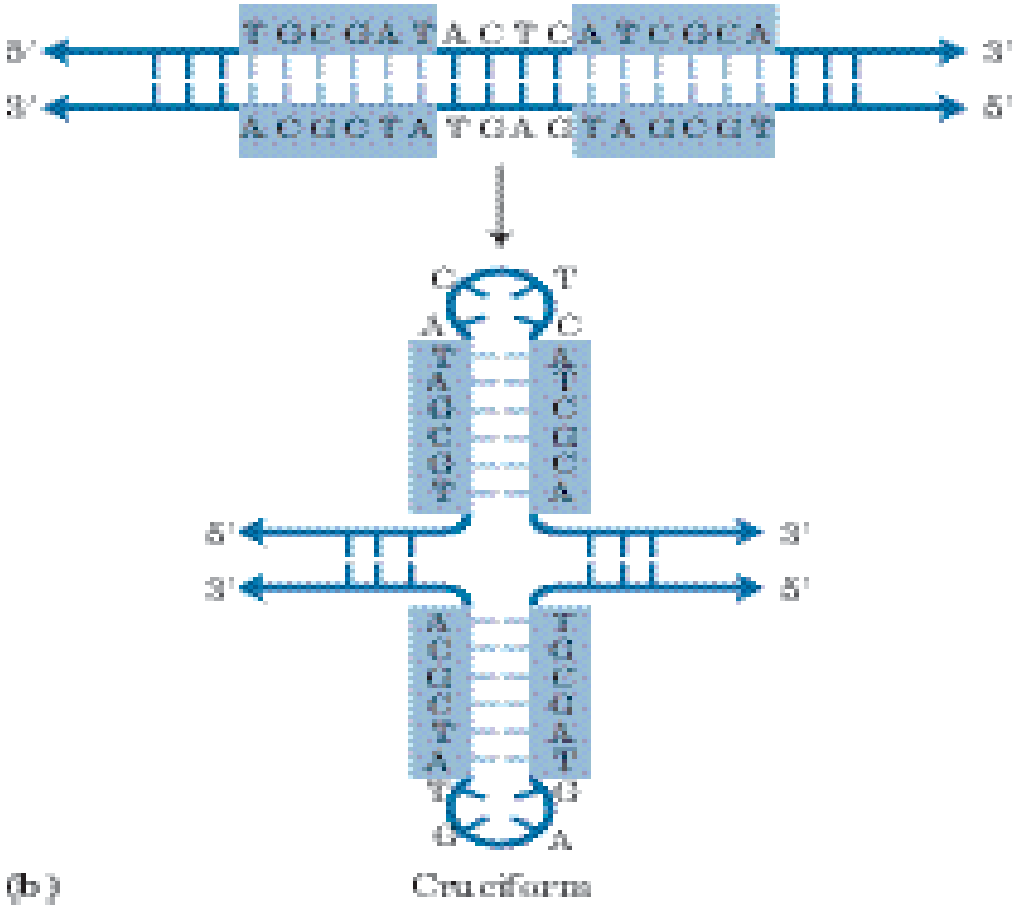


Фрэнсис Крик

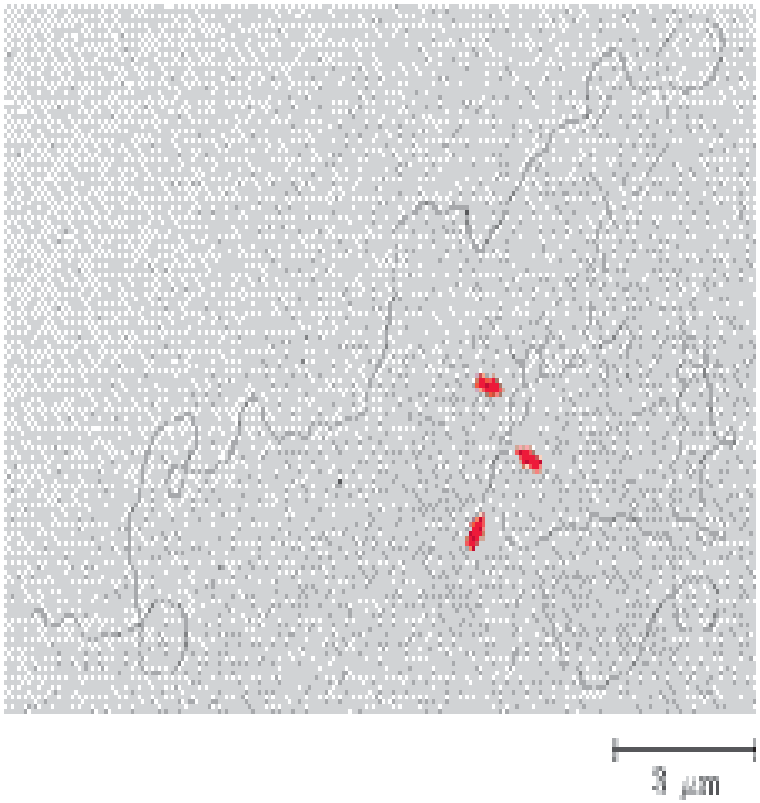

5'
New
3'
New
Parent strand
Daughter strands
Parent strand

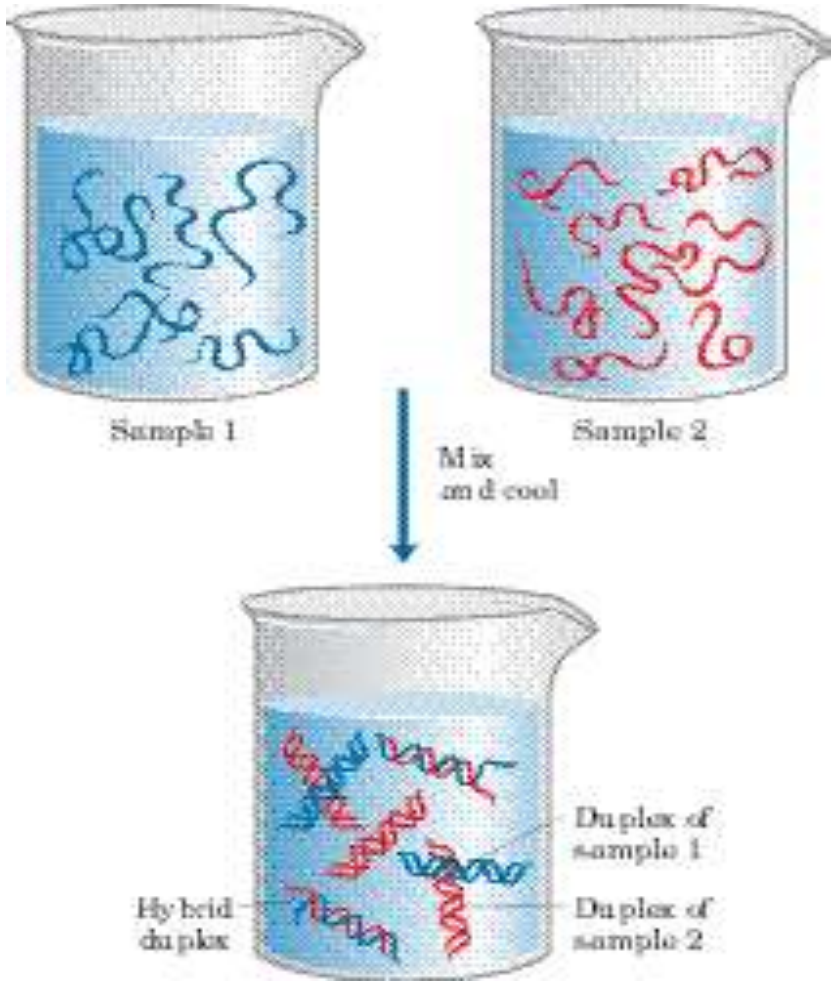

5'
3'
C
G
A
T
A
T
T
A
C
G
G
C
T
A
C
G
A
T
3'
5'

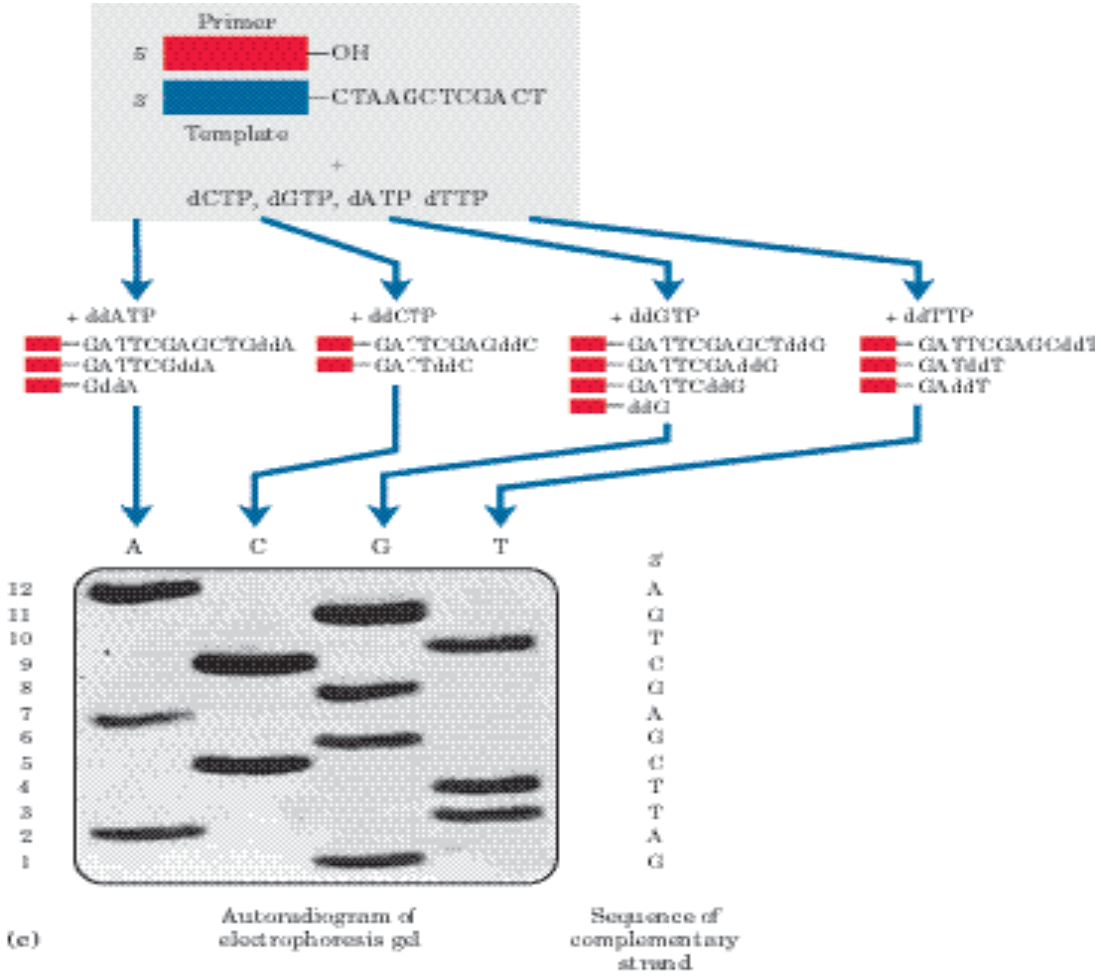

28 Å
A form
B form
Z form

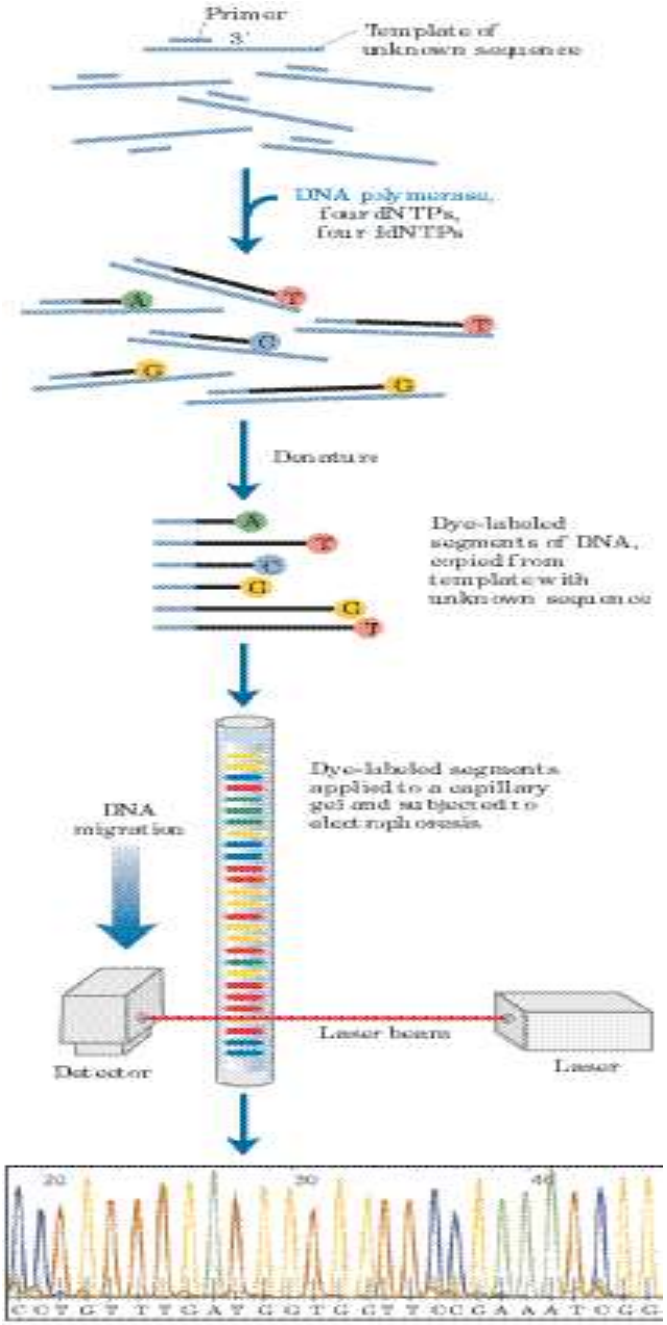

5'
3'
TGCGATACTCATCGCA
ACGCTATGAGTAGCGT
3'
5'
C
T
A
C
TAGCGT
ATCGCA
5'
3'
3'
5'
ACGCTA
TGCGAT
T
G
A

(b) Cruciform


3 μm


Sample 1
Sample 2
Mix
and cool
Duplex of
sample 1
Hybrid
duplex
Duplex of
sample 2


Primer
5′
OH
3′
CTAAGCTCGACT
Template
+
dCTP, dGTP, dATP dTTP
+ ddATP
GATTCGAGCTCGddA
GATTCGddA
GddA
+ ddCTP
GATCGAGddC
GATddC
+ ddGTP
GATTCGAGCTddG
GATTCGAddG
GATTCddG
ddG
+ ddTTP
GATTCGAGCddT
GATddT
GAddT
A
C
G
T
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
5′
A
G
T
C
G
A
G
C
T
T
A
G
(c)
Autoradiogram of electrophoresis gel
Sequence of complementary strand



Computer-generated result after bands migrate past detector



Paul Berg



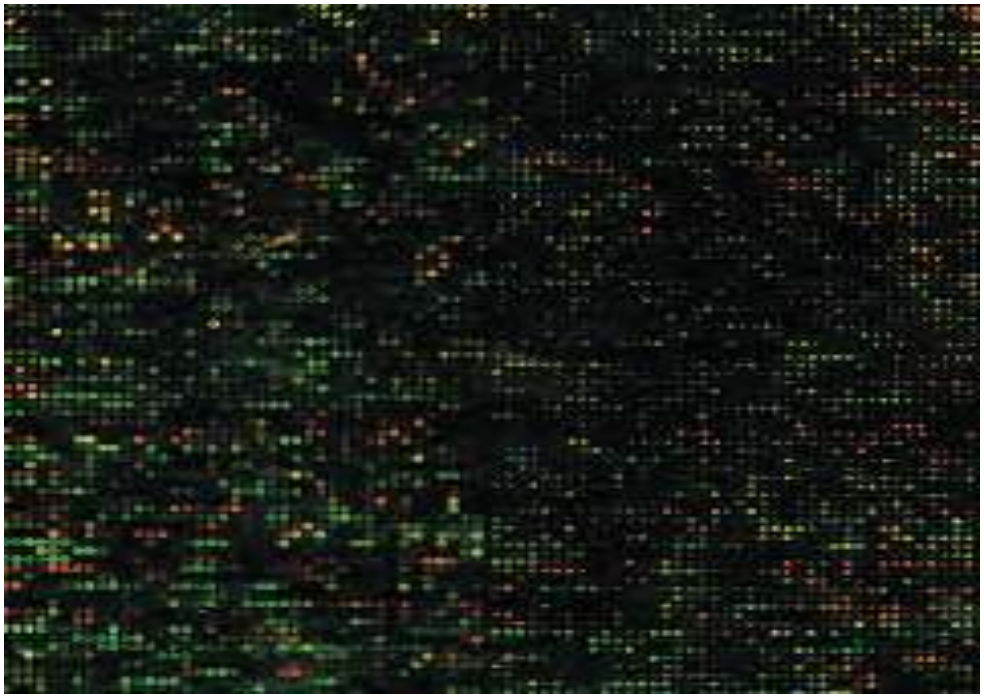
Herbert Boyer



Stanley N. Cohen



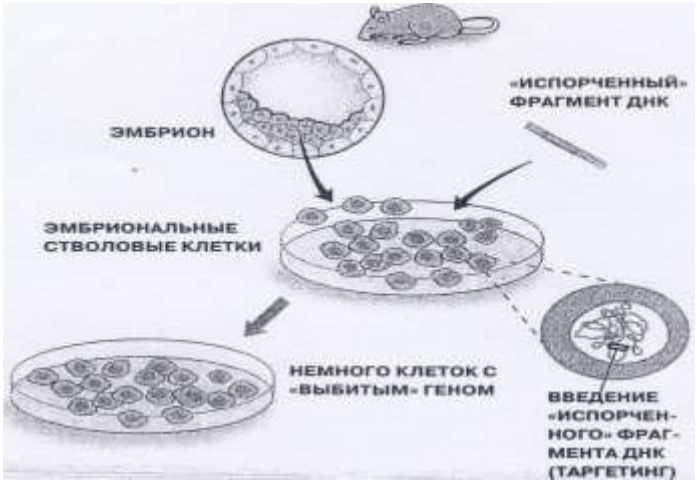
Francis S. Collins J. Craig Venter



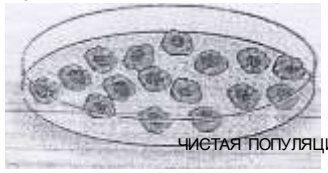


Cloning in mice. The gene for human growth hormone
was introduced into the genome of the mouse on the right. Expression of the gene resulted in the unusually large size of this mouse.

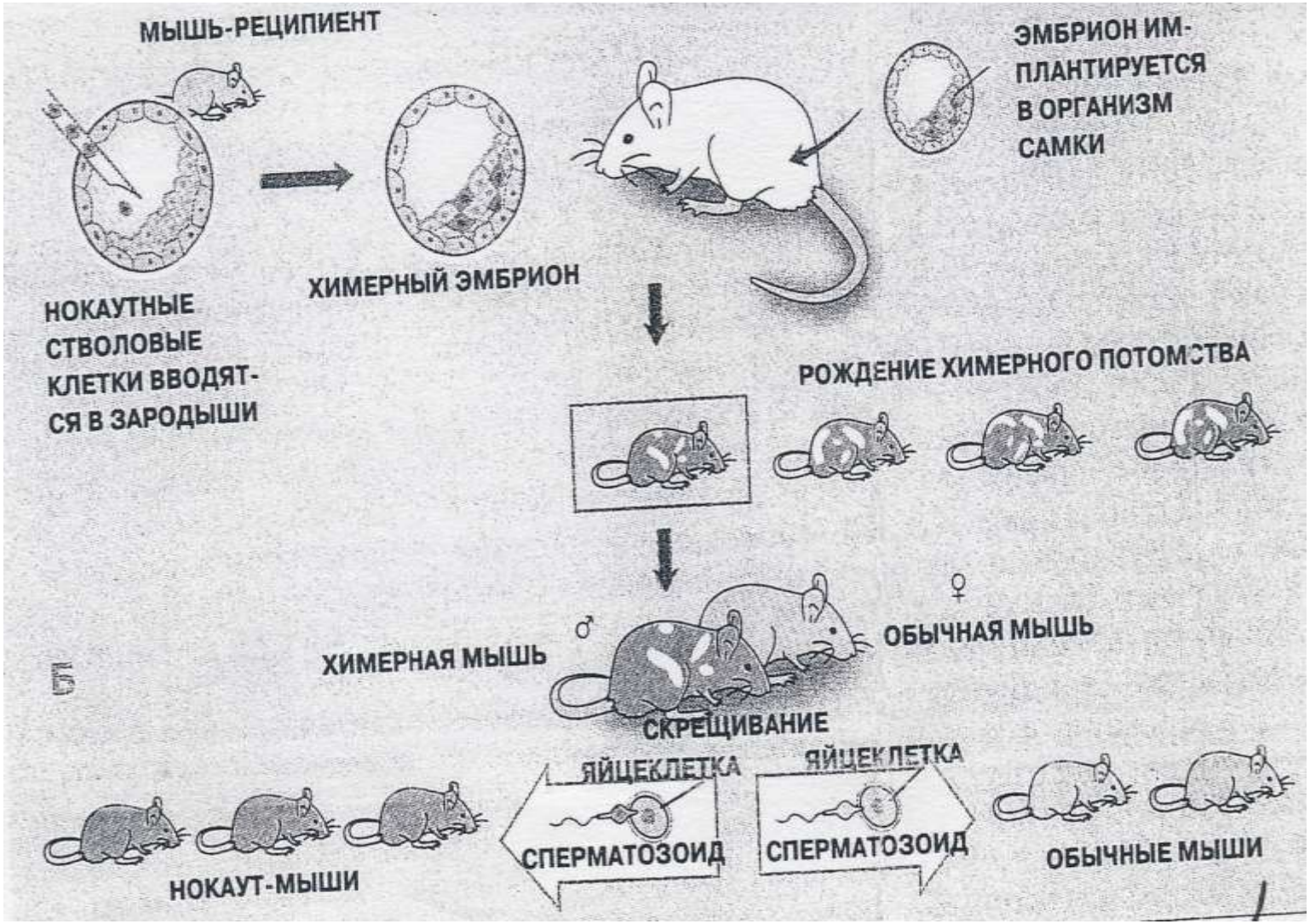
МЫШЬ-ДОНОР

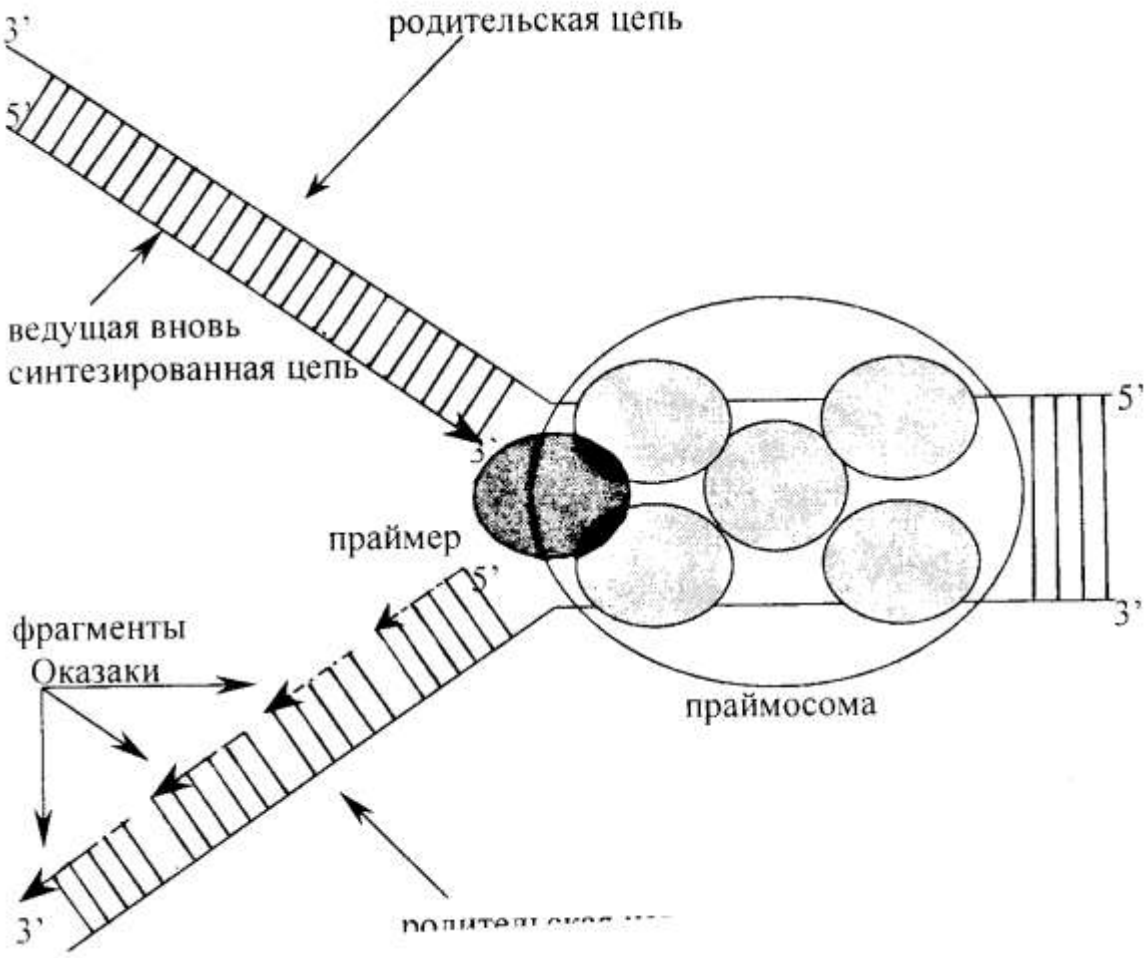


СЕЛЕКЦИЯ НОКАУТНЫХ КЛЕТОК



ЧИСТАЯ ПОПУЛЯЦИЯ НОКАУТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК


МЫШЬ-РЕЦИПИЕНТ
ЭМБРИОН ИМ-
ПЛАНТИРУЕТСЯ
В ОРГАНИЗМ
САМКИ
НОКАУТНЫЕ
СТВОЛОВЫЕ
КЛЕТКИ ВВОДЯТ-
СЯ В ЗАРОДЫШИ
ХИМЕРНЫЙ ЭМБРИОН
РОЖДЕНИЕ ХИМЕРНОГО ПОТОМСТВА
♂
ХИМЕРНАЯ МЫШЬ
♀
ОБЫЧНАЯ МЫШЬ
СКРЕЩИВАНИЕ
ЯЙЦЕКЛЕТКА
ЯЙЦЕКЛЕТКА
СПЕРМАТОЗОИД
СПЕРМАТОЗОИД
НОКАУТ-МЫШИ
ОБЫЧНЫЕ МЫШИ


3'
родительская цепь
5'
ведущая вновь
синтезированная цепь
3'
праймер
5'
5'
3'
фрагменты
Оказаки
праймосома
3'

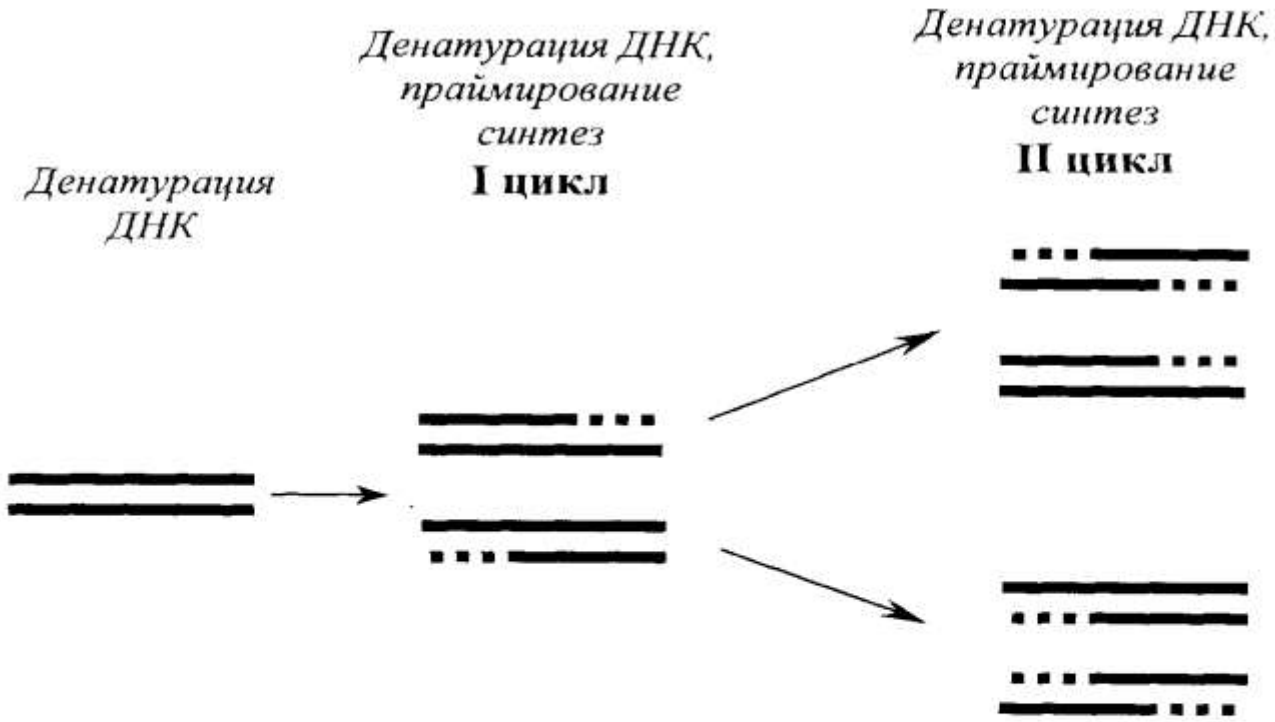


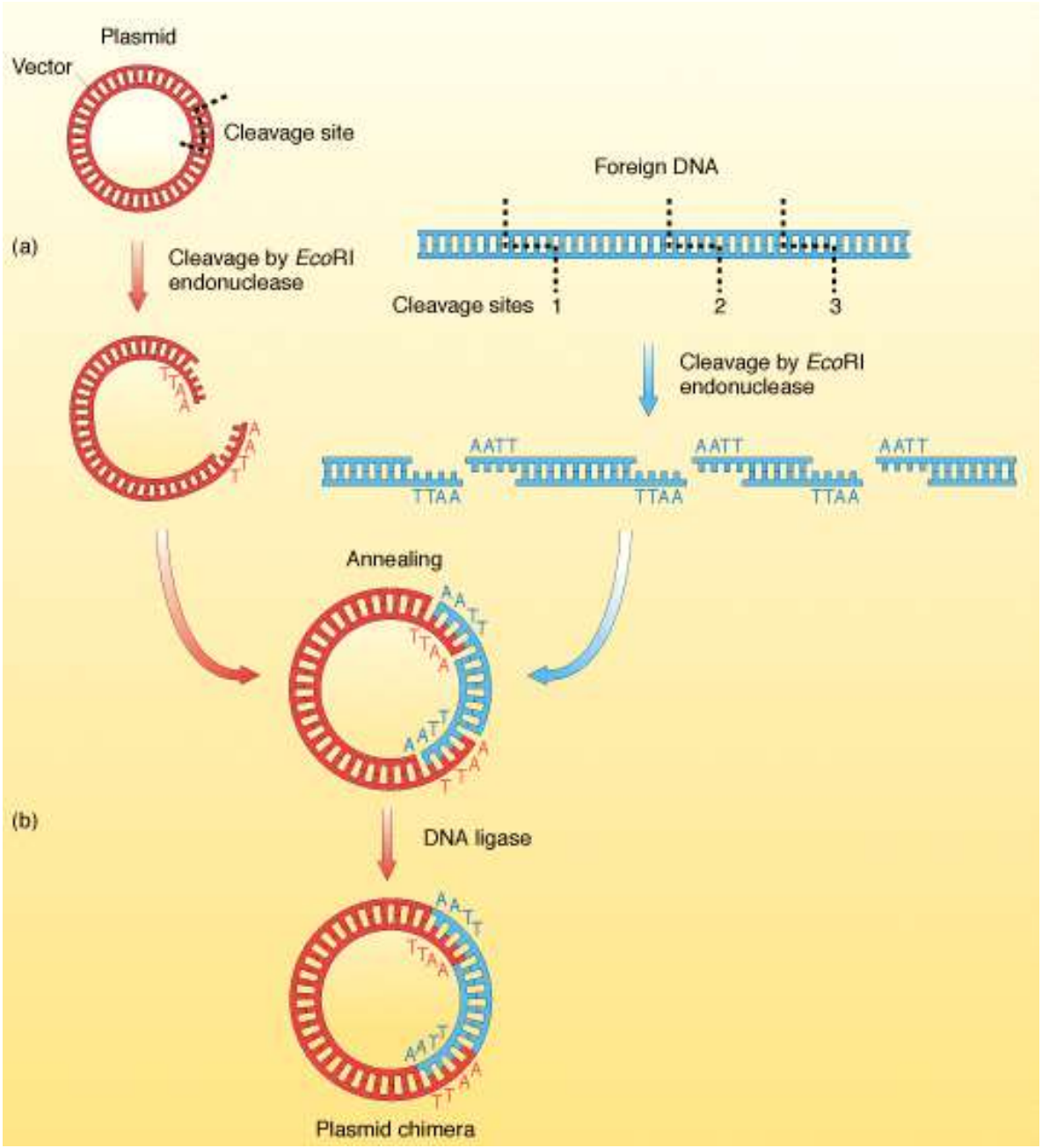
Рис. 12.6 Схематическое изображение амплификации молекулы ДНК при плавлении (денатурации) и отжиге (синтезе) новой молекулы ДНК в присутствии затравки (праймера), фермента ДНК-полимеразы и трифосфатов.

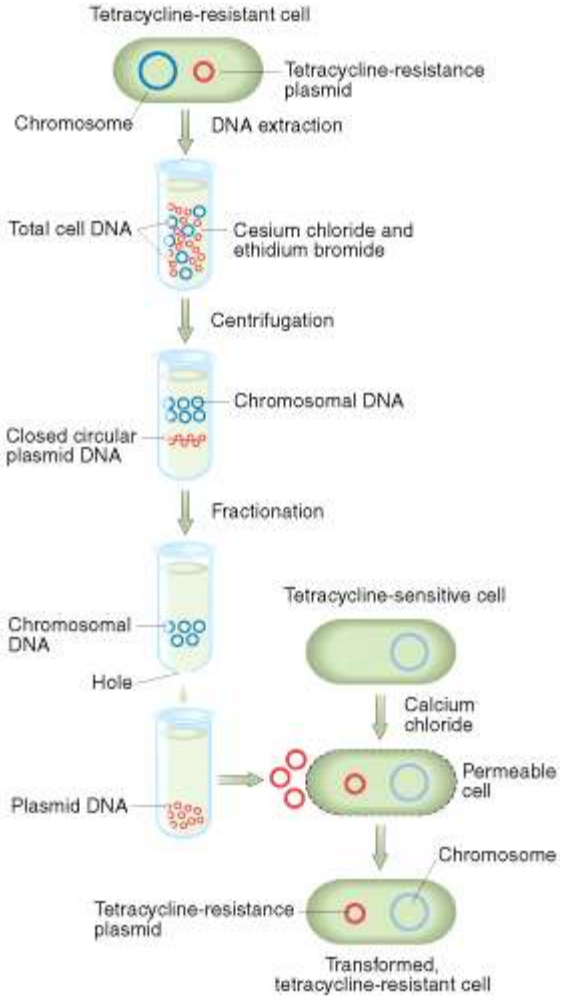
праймер

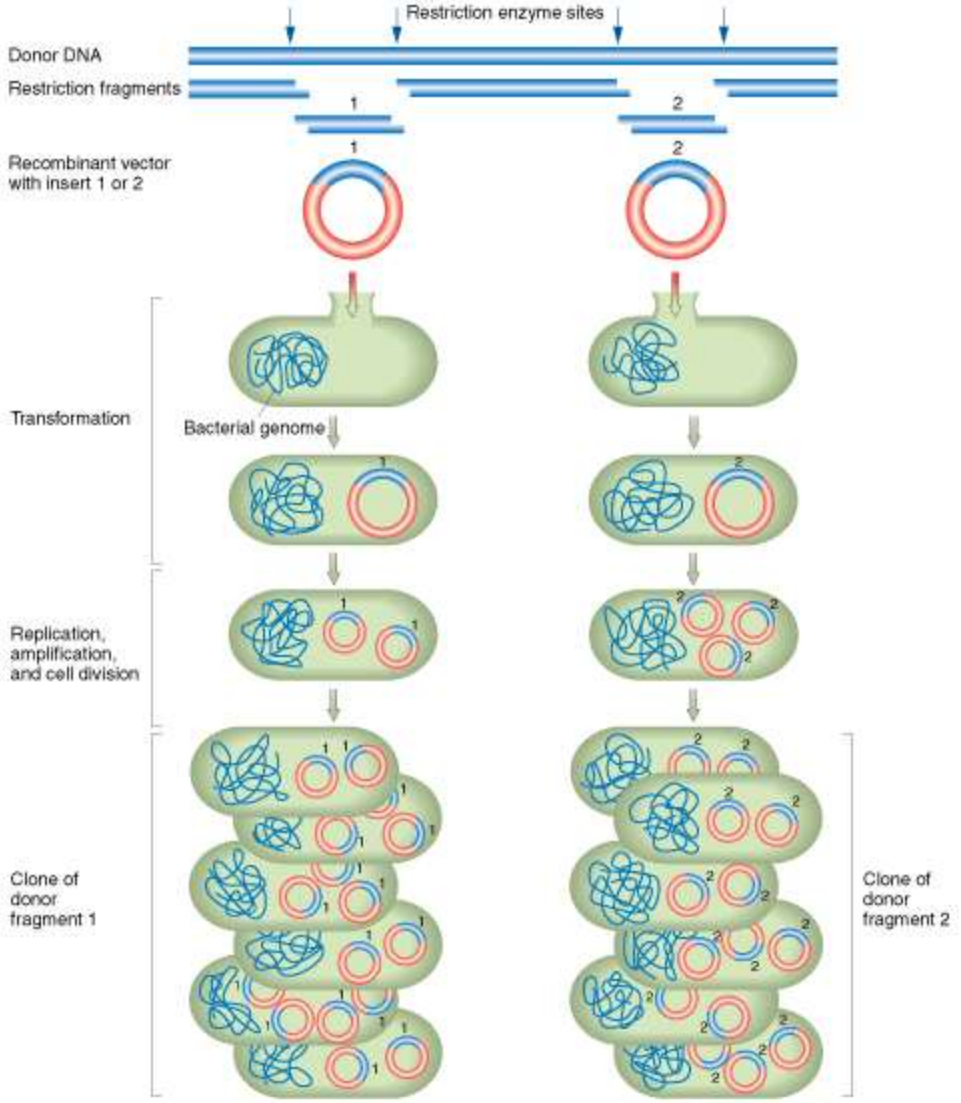
новосинтезированная молекула ДНК

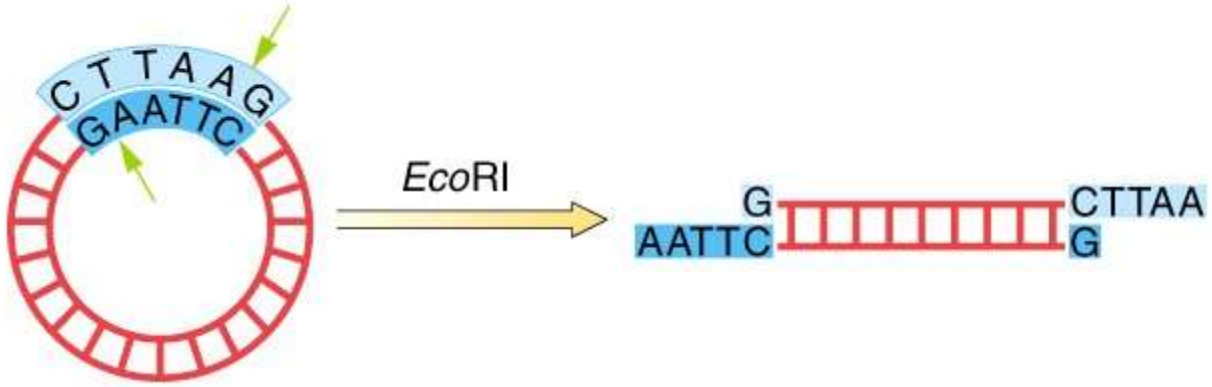
Принцип работы биологического микрочипа

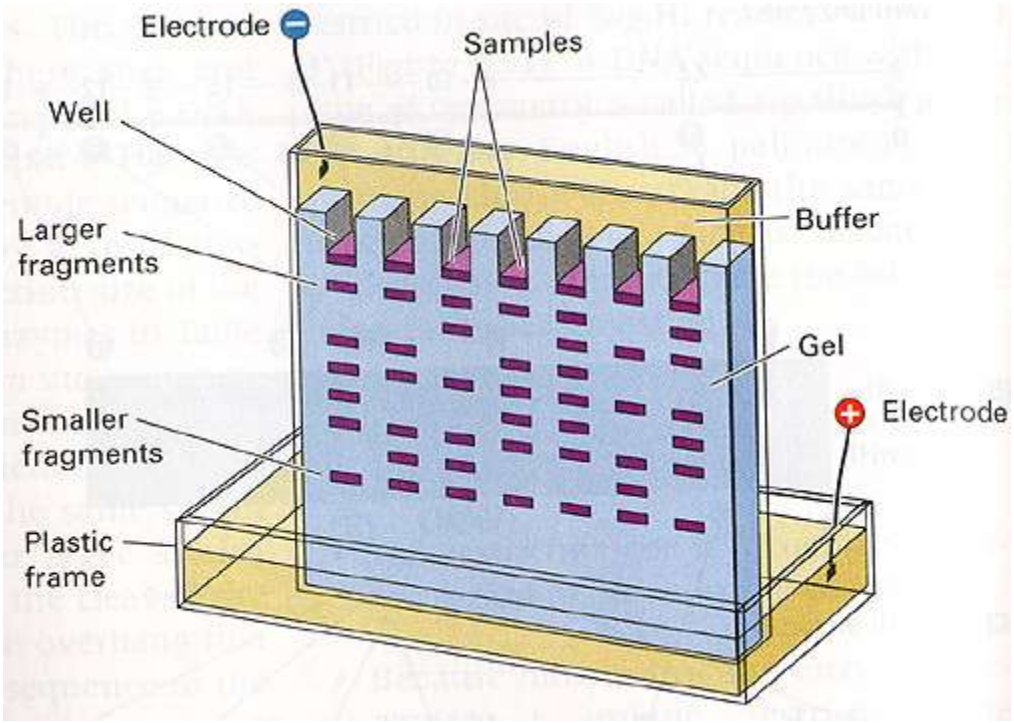


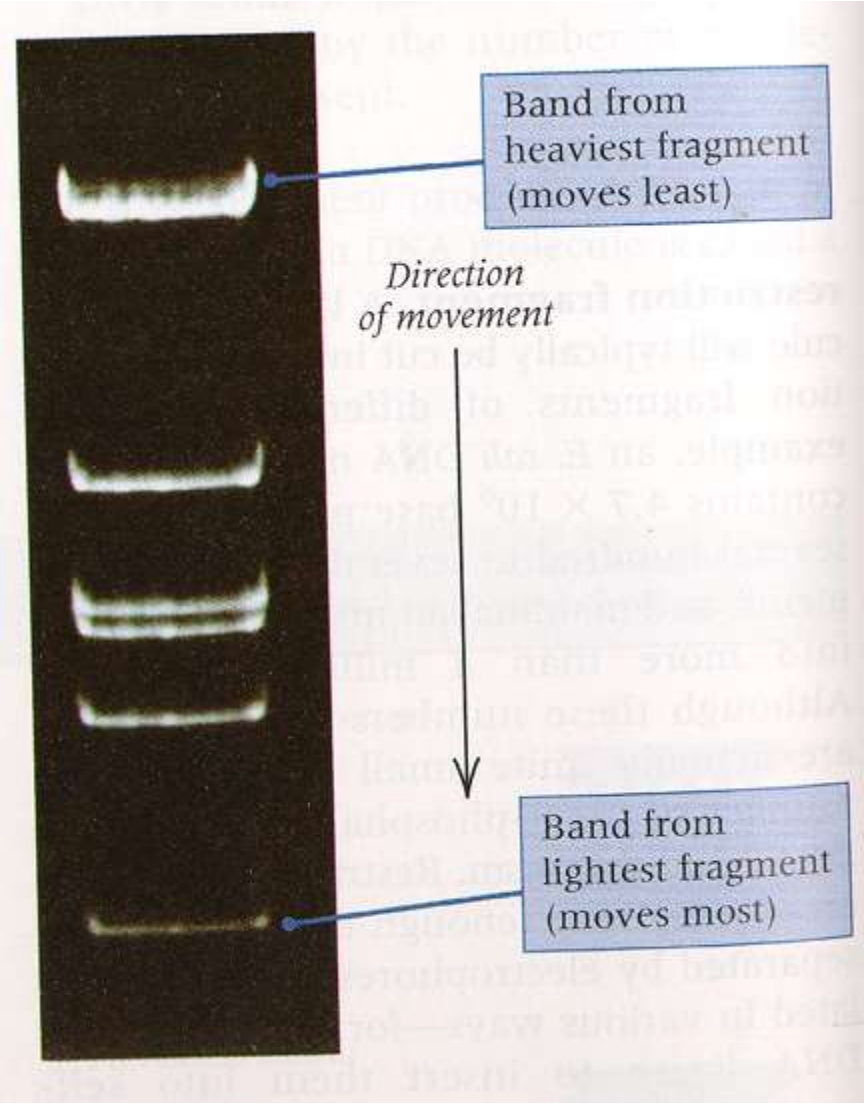

Plasmid
Vector
Cleavage site
(a)
Cleavage by EcoRI endonuclease
Foreign DNA
Cleavage sites 1 2 3
Cleavage by EcoRI endonuclease
AATT
TTAA
Annealing
(b)
DNA ligase
Plasmid chimera

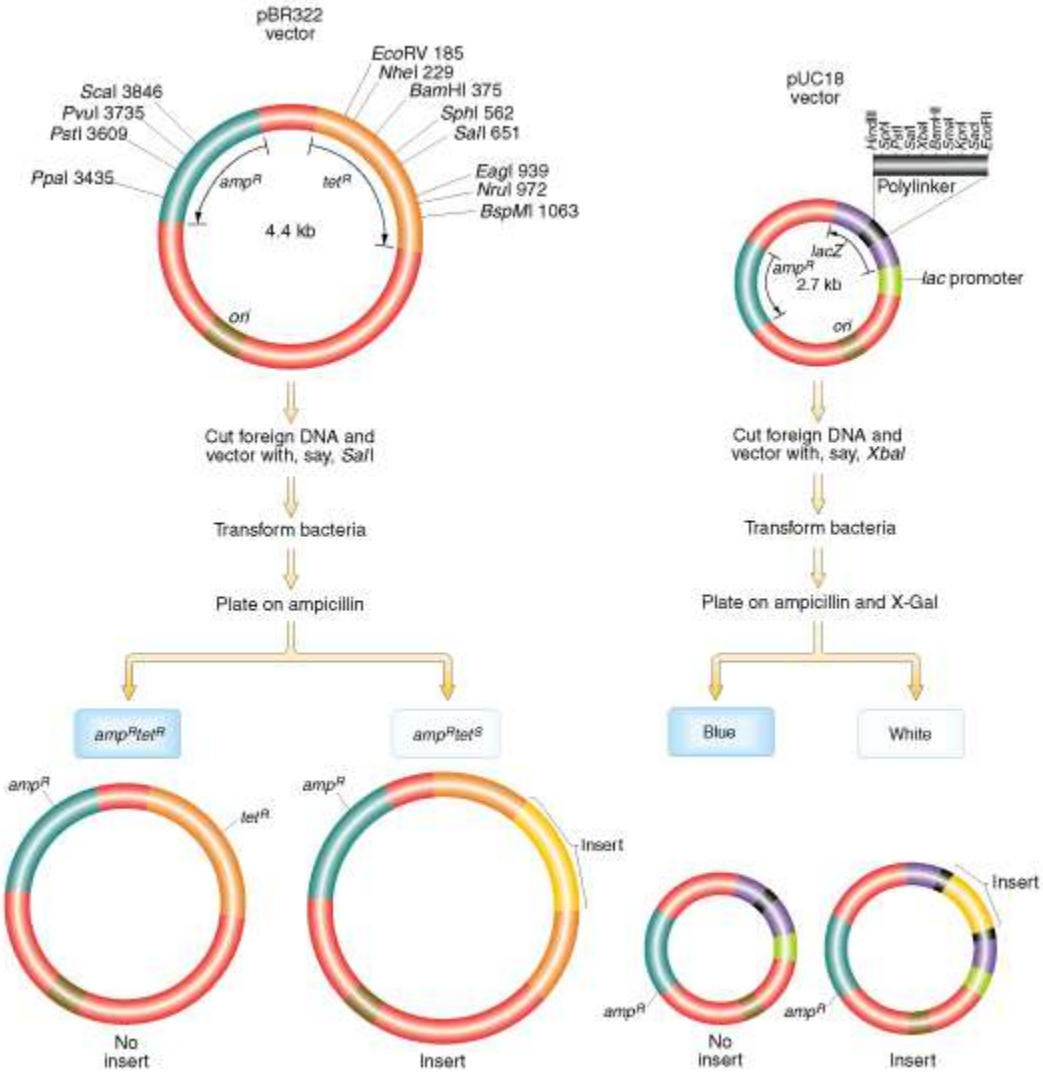

Tetracycline-resistant cell
Tetracycline-resistance plasmid
Chromosome
DNA extraction
Total cell DNA
Cesium chloride and ethidium bromide
Centrifugation
Chromosomal DNA
Closed circular plasmid DNA
Fractionation
Chromosomal DNA
Hole
Tetracycline-sensitive cell
Calcium chloride
Plasmid DNA
Permeable cell
Chromosome
Tetracycline-resistance plasmid
Transformed, tetracycline-resistant cell

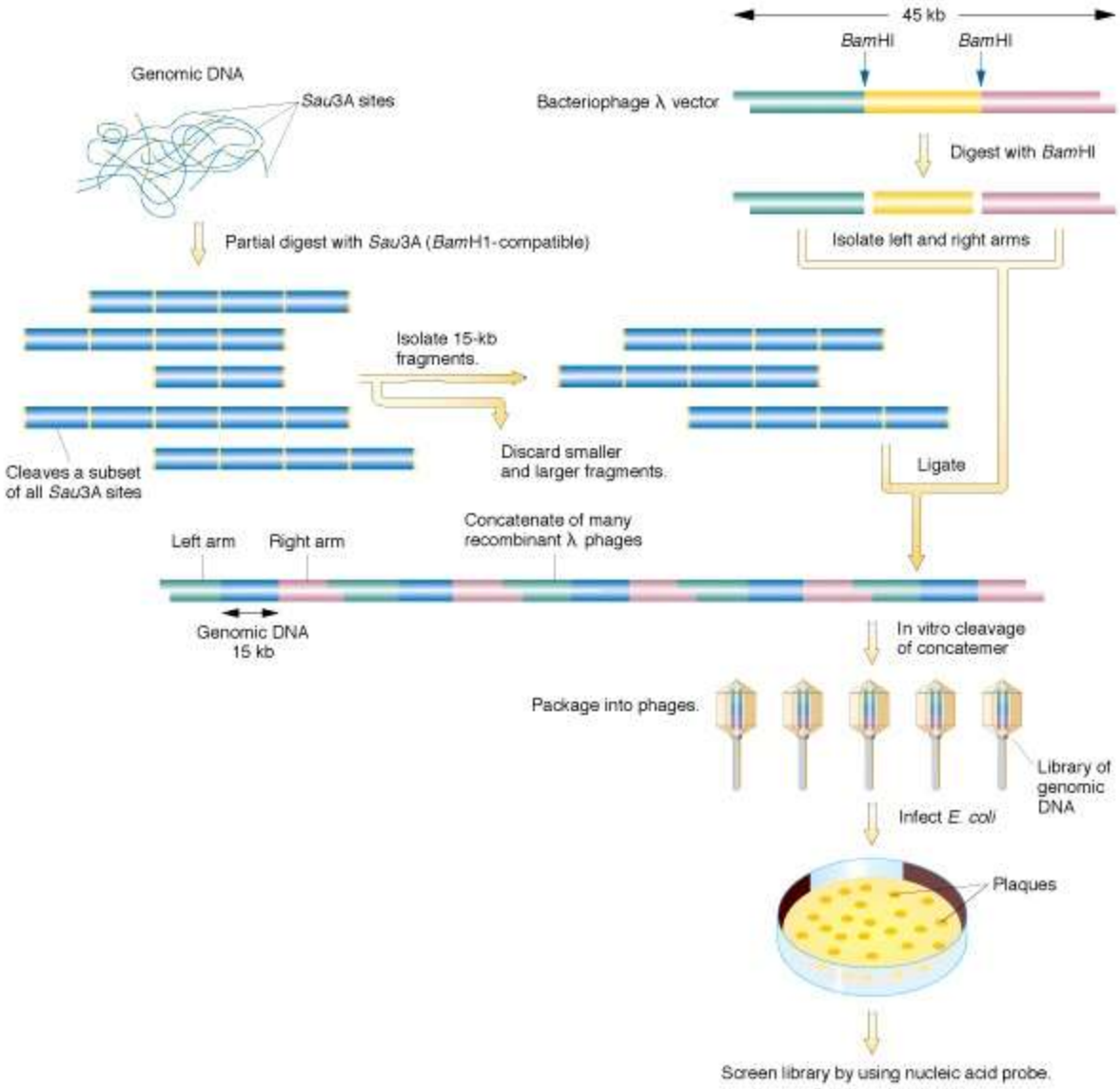

Restriction enzyme sites
Donor DNA
Restriction fragments
1
2
Recombinant vector with insert 1 or 2
Transformation
Bacterial genome
Replication, amplification, and cell division
Clone of donor fragment 1
Clone of donor fragment 2

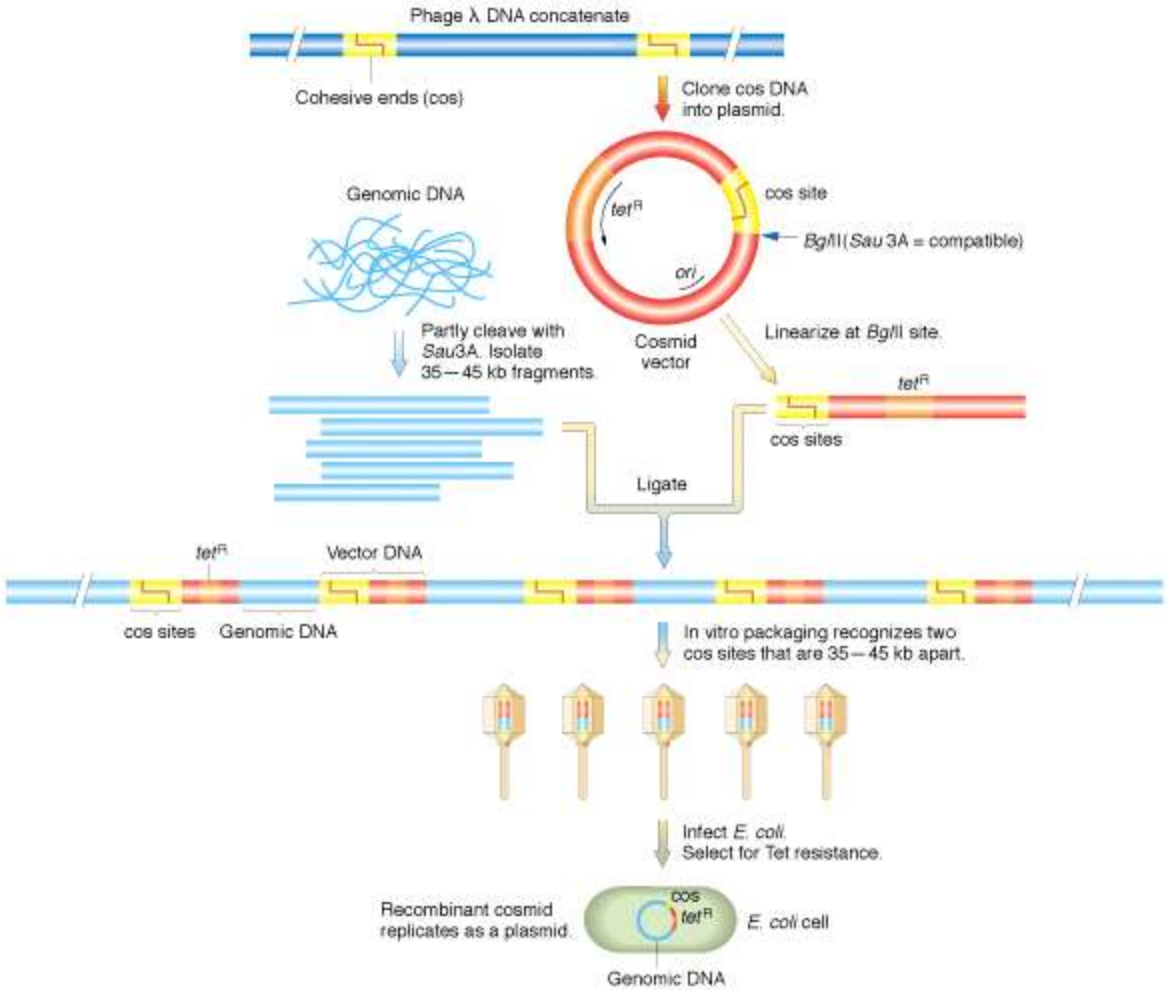

C T T A A G
G A A T T C
*Eco*RI
G
CTTAA
AATTC
G

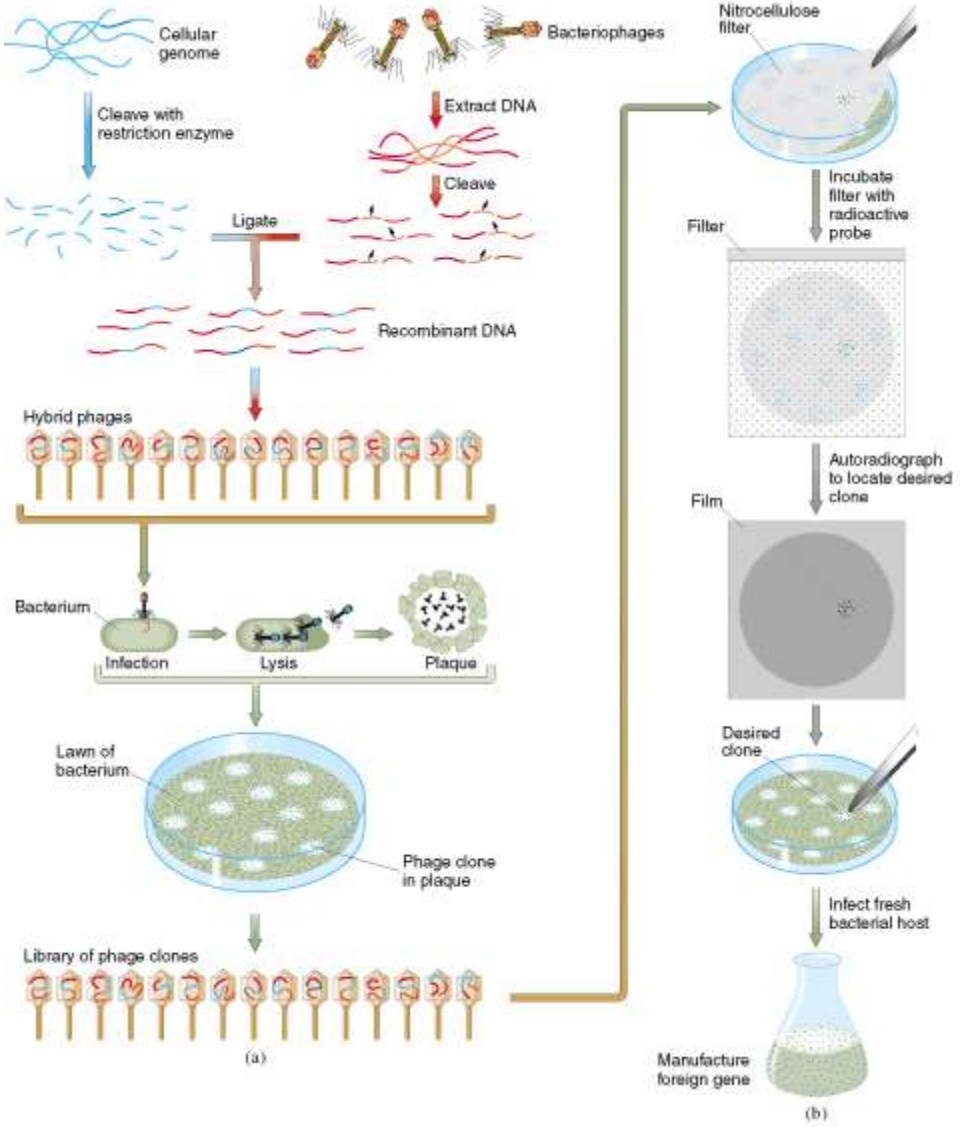

Electrode
Samples
Well
Larger fragments
Buffer
Gel
Electrode
Smaller fragments
Plastic frame

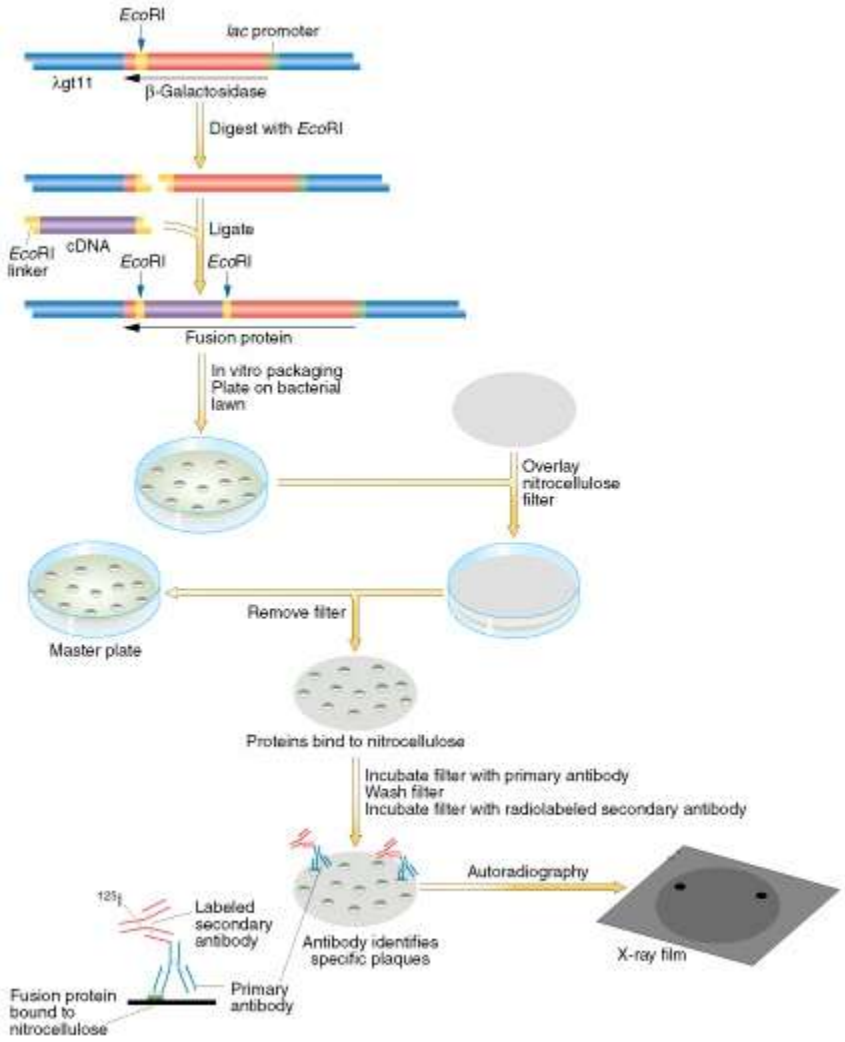

Band from heaviest fragment (moves least)
Direction of movement
Band from lightest fragment (moves most)


pBR322
vector
EcoRV 185
NheI 229
BamHI 375
SphI 562
SalI 651
EagI 939
NruI 972
BspMI 1063
ScaI 3846
PvuI 3735
PstI 3609
PpaI 3435
ampR
tetR
4.4 kb
ori
Cut foreign DNA and
vector with, say, SalI
Transform bacteria
Plate on ampicillin
ampRtetR
ampRtetS
ampR
tetR
No
insert
ampR
Insert
Insert
pUC18
vector
Polylinker
lacZ
ampR
2.7 kb
lac promoter
ori
Cut foreign DNA and
vector with, say, XbaI
Transform bacteria
Plate on ampicillin and X-Gal
Blue
White
ampR
No
insert
ampR
Insert
Insert


45 kb
BamHI
BamHI
Genomic DNA
Sau3A sites
Bacteriophage λ vector
Digest with BamHI
Isolate left and right arms
Partial digest with Sau3A (BamH1-compatible)
Isolate 15-kb fragments.
Discard smaller and larger fragments.
Cleaves a subset of all Sau3A sites
Ligate
Left arm
Right arm
Concatenate of many recombinant λ phages
Genomic DNA 15 kb
In vitro cleavage of concatemer
Package into phages.
Library of genomic DNA
Infect E. coli
Plaques
Screen library by using nucleic acid probe.


Phage λ DNA concatenate
Cohesive ends (cos)
Clone cos DNA into plasmid.
Genomic DNA
cos site
tetR
ori
BglII (Sau 3A = compatible)
Partly cleave with Sau3A. Isolate 35—45 kb fragments.
Cosmid vector
Linearize at BglII site.
tetR
cos sites
Ligate
tetR
Vector DNA
cos sites
Genomic DNA
In vitro packaging recognizes two cos sites that are 35—45 kb apart.
Infect E. coli. Select for Tet resistance.
Recombinant cosmid replicates as a plasmid.
cos
tetR
E. coli cell
Genomic DNA


Cellular genome
Bacteriophages
Cleave with restriction enzyme
Extract DNA
Cleave
Ligate
Recombinant DNA
Hybrid phages
Bacterium
Infection
Lysis
Plaque
Lawn of bacterium
Phage clone in plaque
Library of phage clones
(a)
Nitrocellulose filter
Incubate filter with radioactive probe
Filter
Autoradiograph to locate desired clone
Film
Desired clone
Infect fresh bacterial host
Manufacture foreign gene
(b)


EcoRI
lac promoter
λgt11
β-Galactosidase
Digest with EcoRI
Ligate
EcoRI linker
cDNA
EcoRI
EcoRI
Fusion protein
In vitro packaging
Plate on bacterial lawn
Overlay nitrocellulose filter
Remove filter
Master plate
Proteins bind to nitrocellulose
Incubate filter with primary antibody
Wash filter
Incubate filter with radiolabeled secondary antibody
Autoradiography
125I
Labeled secondary antibody
Antibody identifies specific plaques
X-ray film
Primary antibody
Fusion protein bound to nitrocellulose

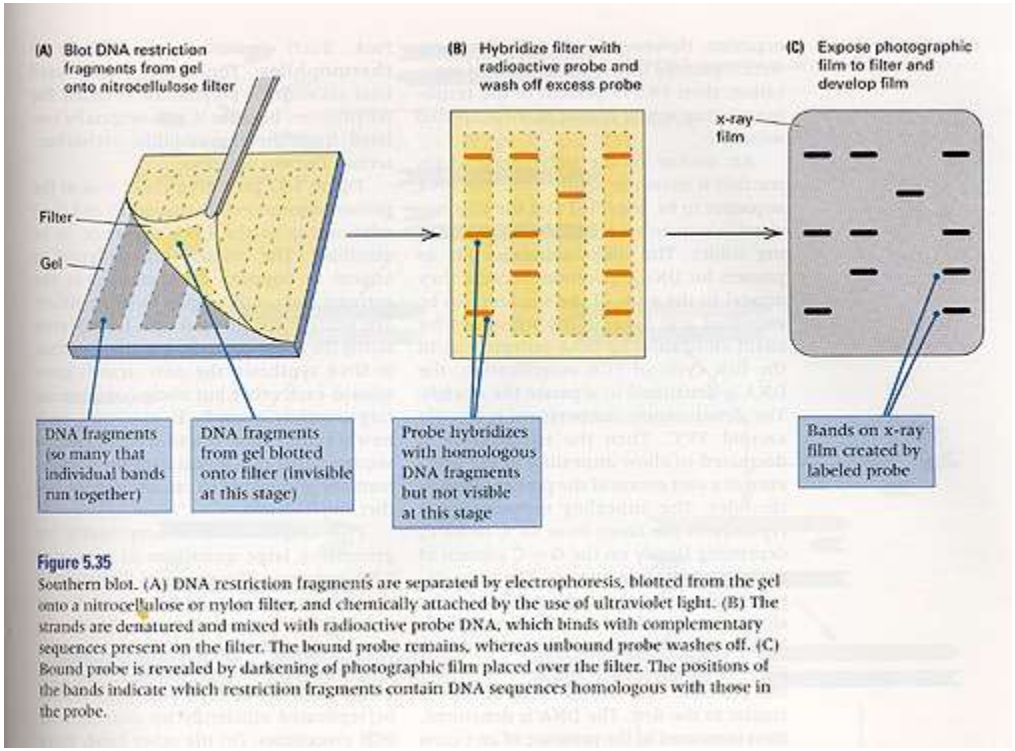
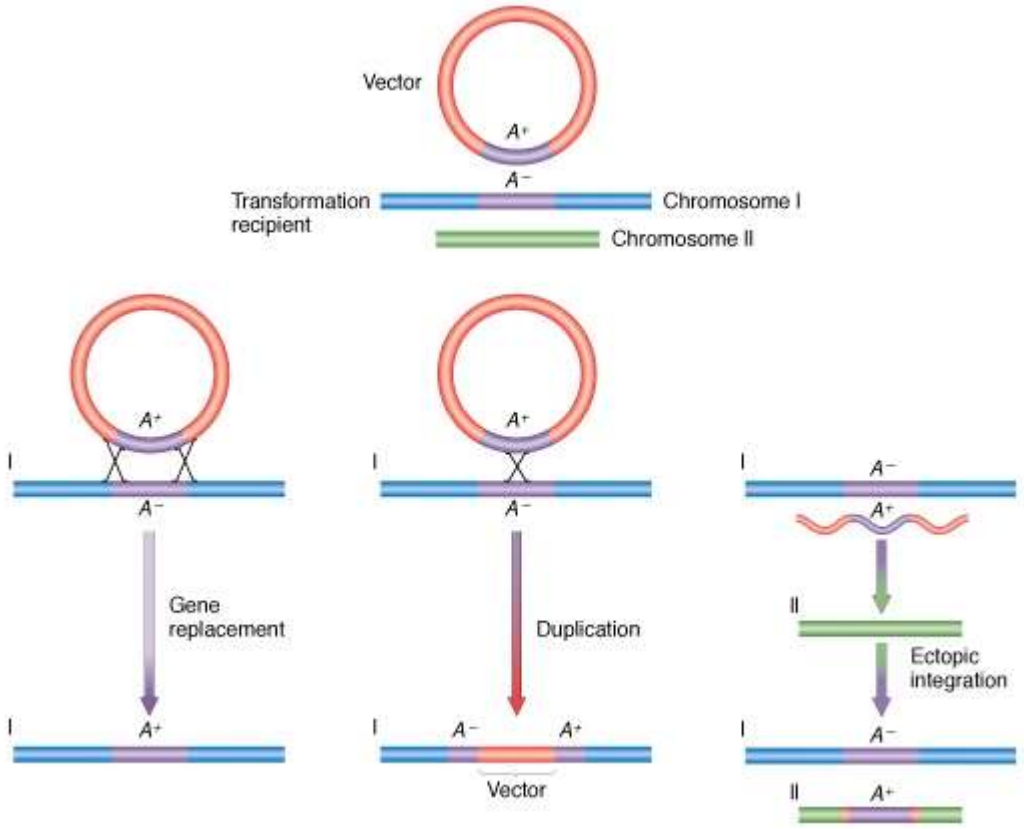
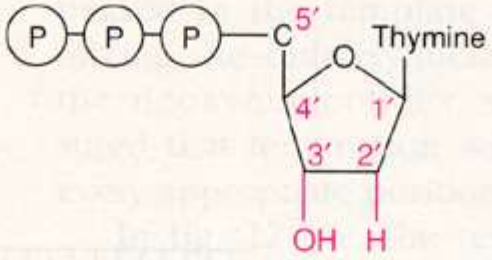
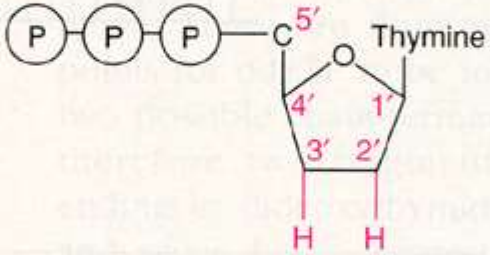


Figure 5.35
Southern blot. (A) DNA restriction fragments are separated by electrophoresis, blotted from the gel onto a nitrocellulose or nylon filter, and chemically attached by the use of ultraviolet light. (B) The strands are denatured and mixed with radioactive probe DNA, which binds with complementary sequences present on the filter. The bound probe remains, whereas unbound probe washes off. (C) Bound probe is revealed by darkening of photographic film placed over the filter. The positions of the bands indicate which restriction fragments contain DNA sequences homologous with those in the probe.


Vector
A+
A−
Transformation recipient
Chromosome I
Chromosome II
I
A+
A−
Gene replacement
I
A+
I
A+
A−
Duplication
I
A−
A+
Vector
I
A−
A+
II
Ectopic integration
I
A−
II
A+

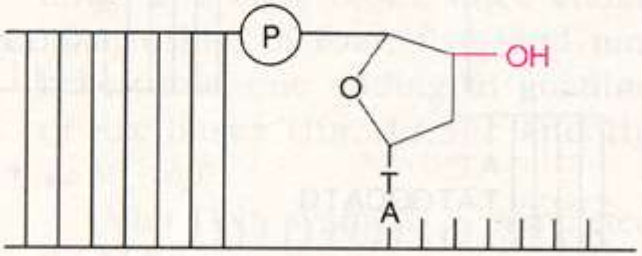


Deoxythymidine triphosphate (dTTP)



Dideoxythymidine triphosphate (ddTTP)

Normal primer



Dideoxy configuration (not a primer)

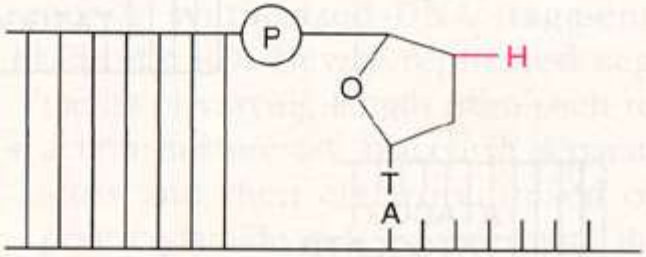
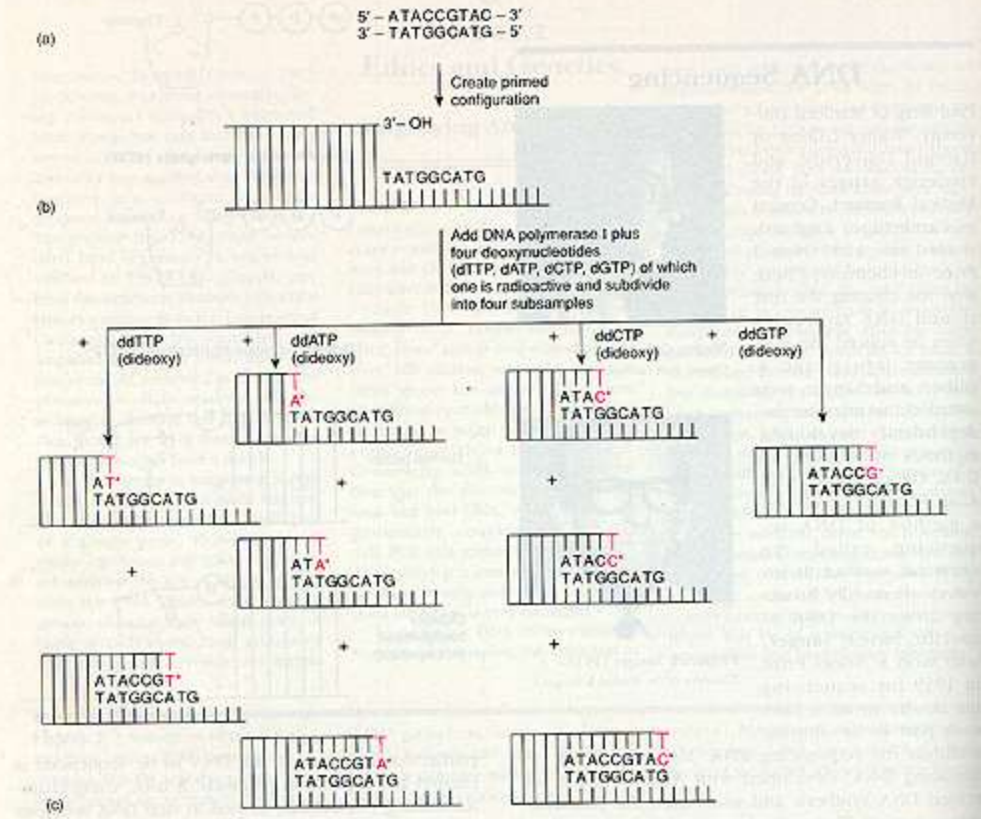
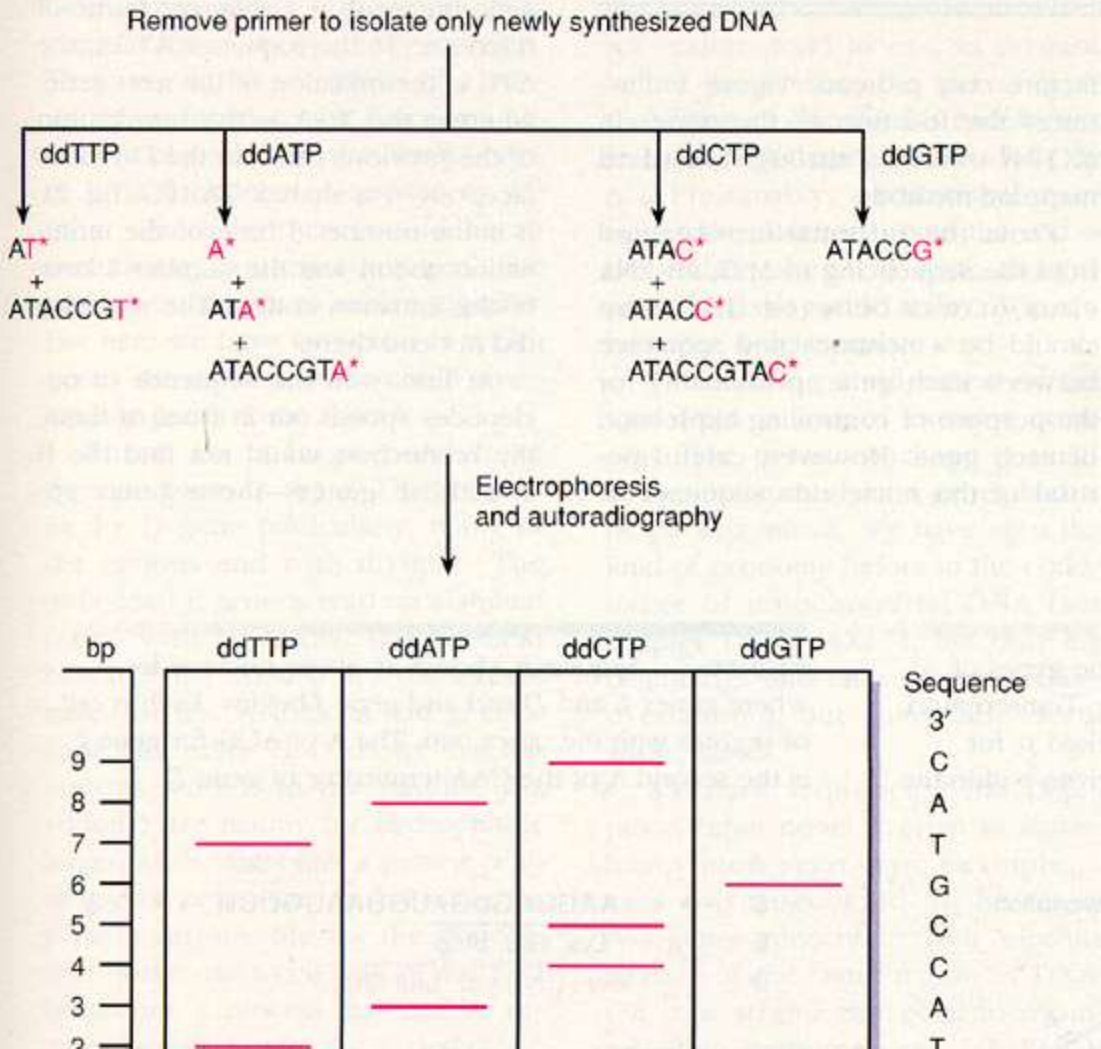
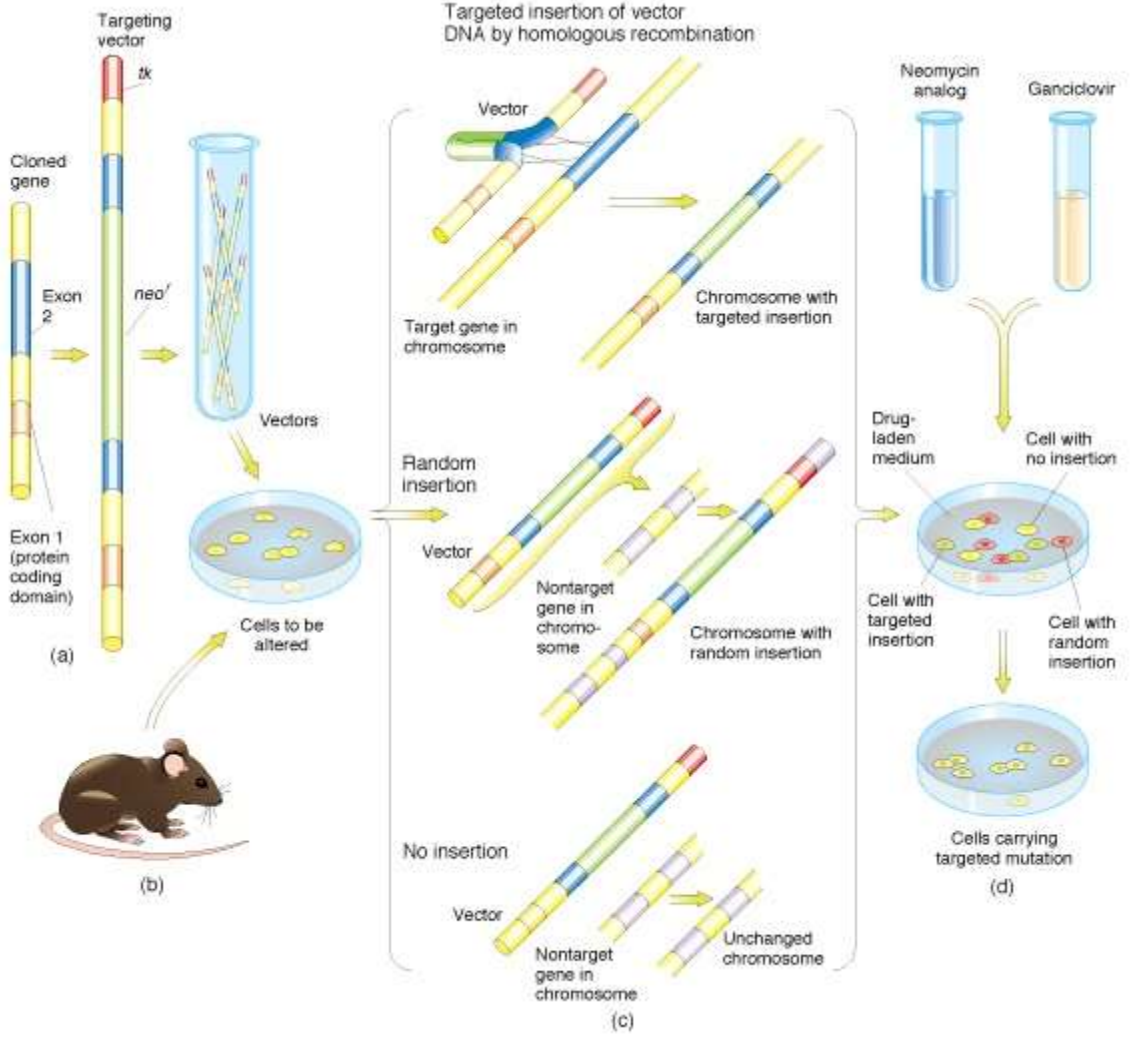


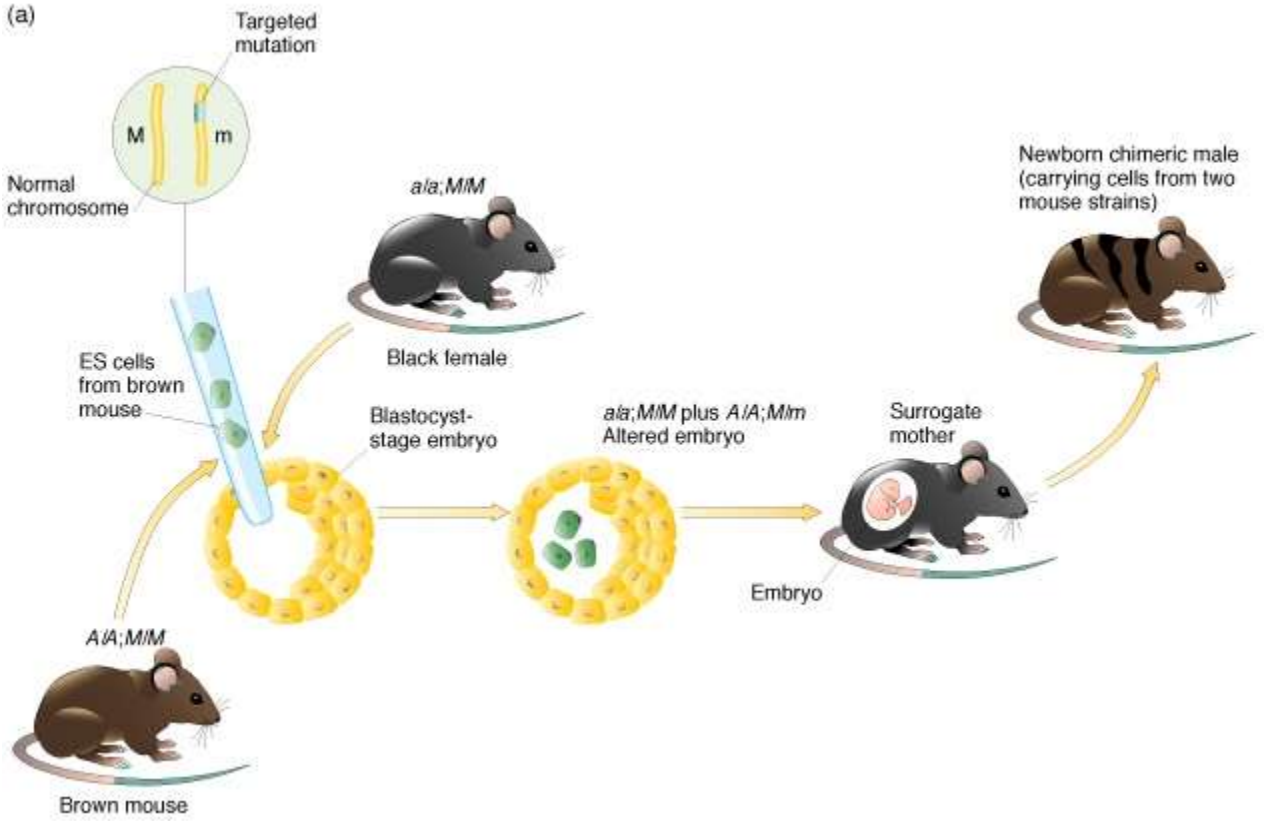
Figure 12.35 Initial steps in the dideoxy method of DNA sequencing. The *asterisks* indicate the dideoxynucleotides. The DNA to be sequenced is placed into a primer configuration (*a*,*b*). Four reaction mixtures are created, each with all four normal nucleotides plus one of the dideoxynucleotides. Thus DNA synthesis in each reaction mixture is stopped a percentage of the time when the complement to the dideoxynucleotide appears in the template (*c*).

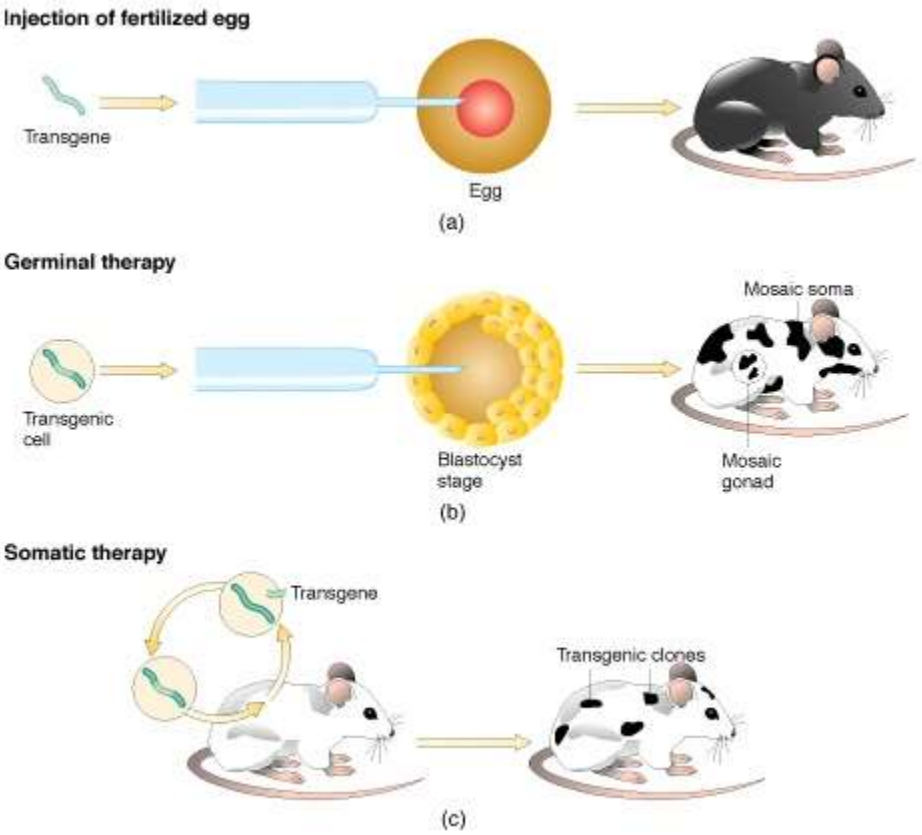


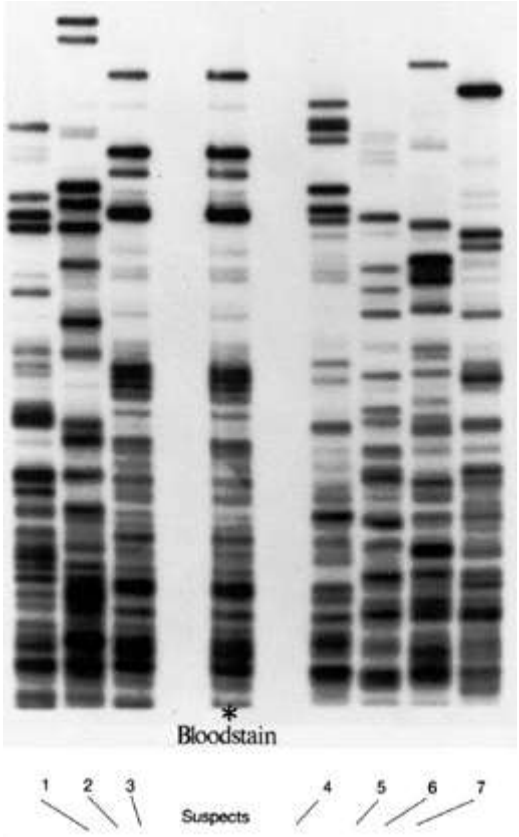
reaction mixture (e.g., ddTTP is the mixture containing dideoxythymines) produces specific products of specific lengths that can be determined by electrophoresis. In the case of the ddTTP mixture, two fragments ending in thymine are possible; one is two bases long, the other seven bases long. Thus, the complement of thymine, adenine, appears in positions 2 and 7 of the original piece of DNA. However, either the original strand or its complement (new synthesis) gives the original sequence since DNA is a double helix in which the sequence in one strand is defined by the complementary sequence in the other strand.

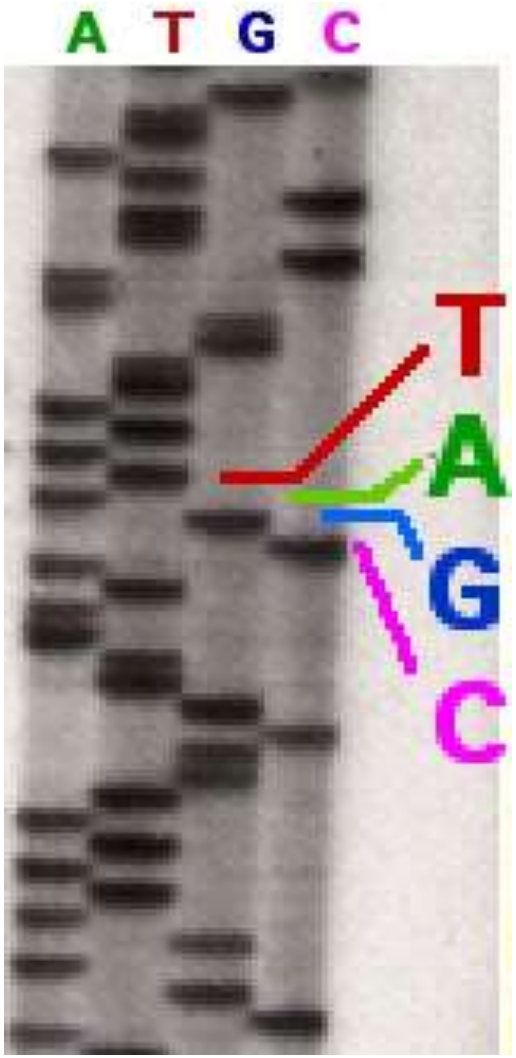


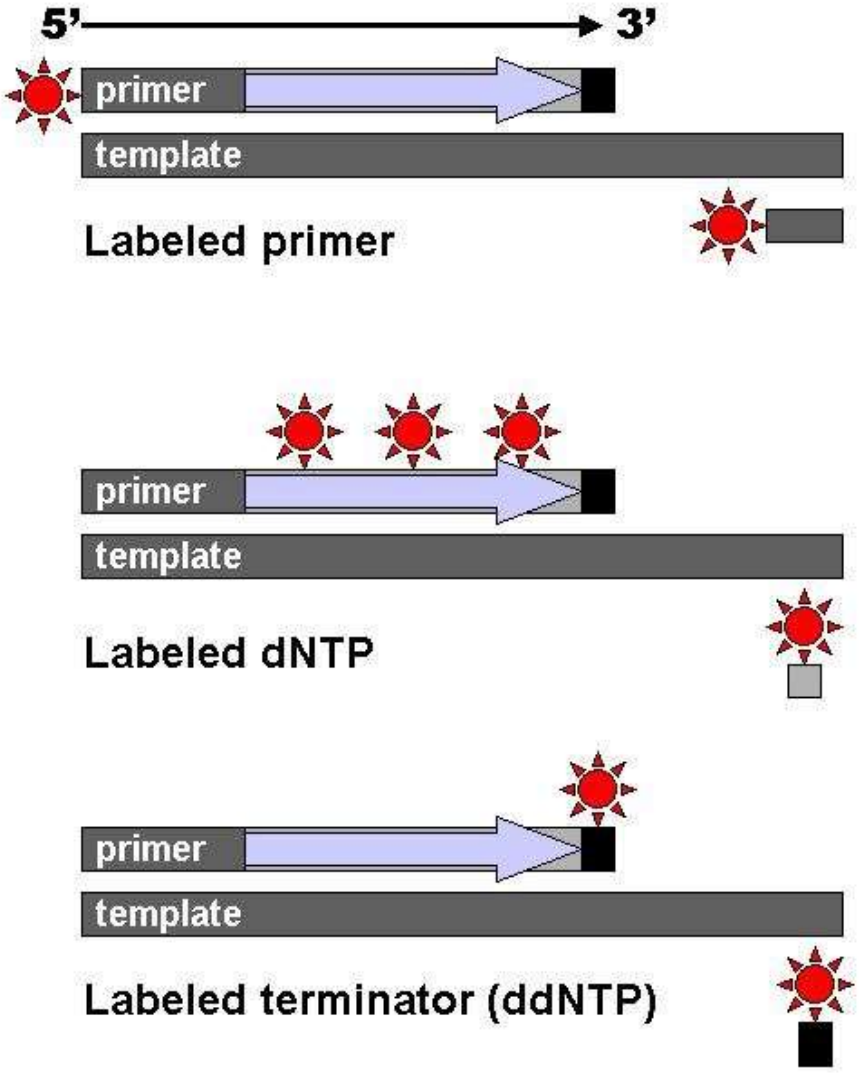

Targeting vector
tk
Cloned gene
Exon 2
neo'
Exon 1 (protein coding domain)
(a)
Vectors
Cells to be altered
(b)
Targeted insertion of vector DNA by homologous recombination
Vector
Target gene in chromosome
Chromosome with targeted insertion
Random insertion
Vector
Nontarget gene in chromo-some
Chromosome with random insertion
No insertion
Vector
Nontarget gene in chromosome
Unchanged chromosome
(c)
Neomycin analog
Ganciclovir
Drug-laden medium
Cell with no insertion
Cell with targeted insertion
Cell with random insertion
Cells carrying targeted mutation
(d)

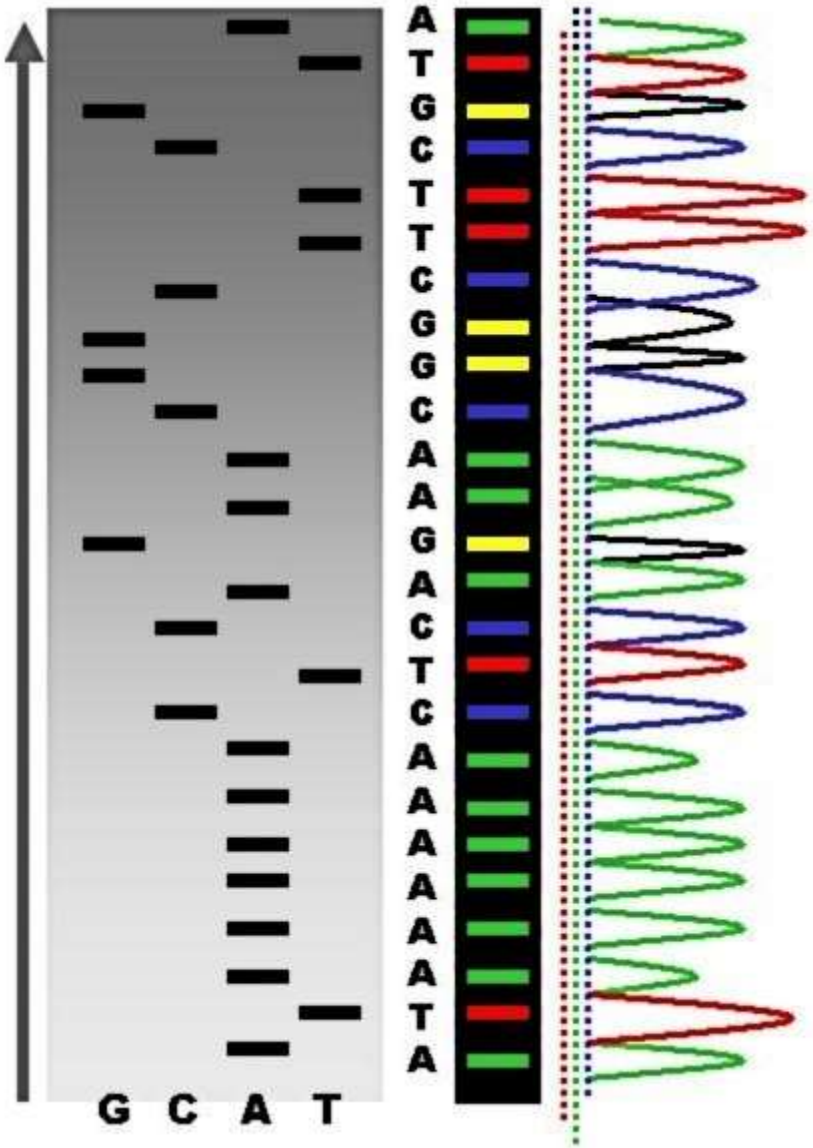

(a)
Targeted mutation
M
m
Normal chromosome
a/a;M/M
Black female
Newborn chimeric male (carrying cells from two mouse strains)
ES cells from brown mouse
Blastocyst-stage embryo
a/a;M/M plus A/A;M/m Altered embryo
Surrogate mother
Embryo
A/A;M/M
Brown mouse

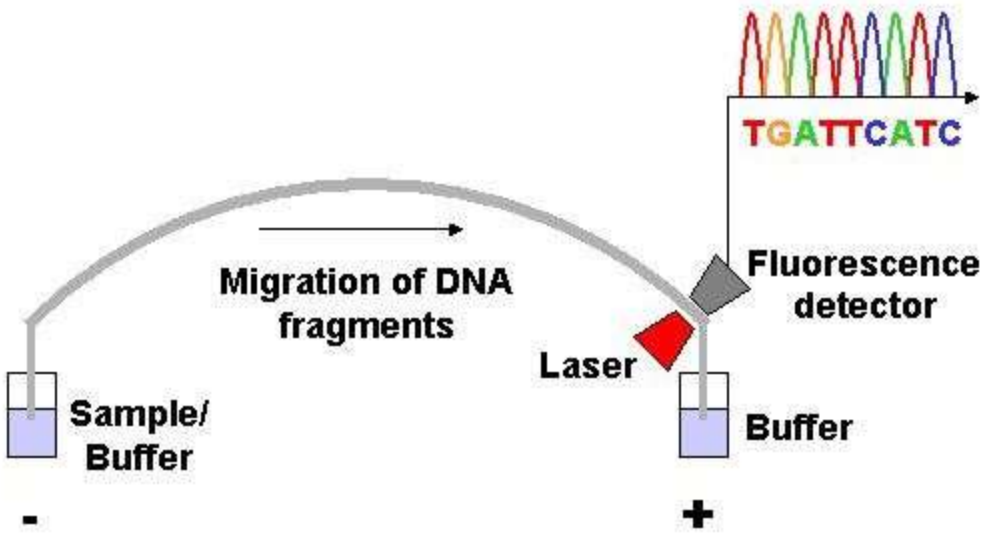

Injection of fertilized egg
Transgene
Egg
(a)
Germinal therapy
Transgenic cell
Blastocyst stage
Mosaic soma
Mosaic gonad
(b)
Somatic therapy
Transgene
Transgenic clones
(c)

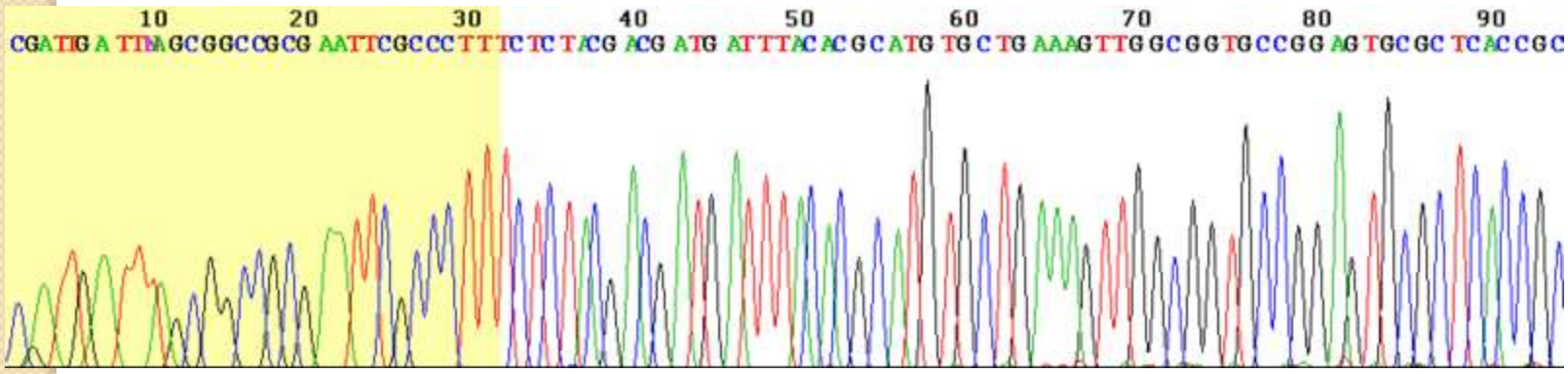

*
Bloodstain
1
2
3
Suspects
4
5
6
7

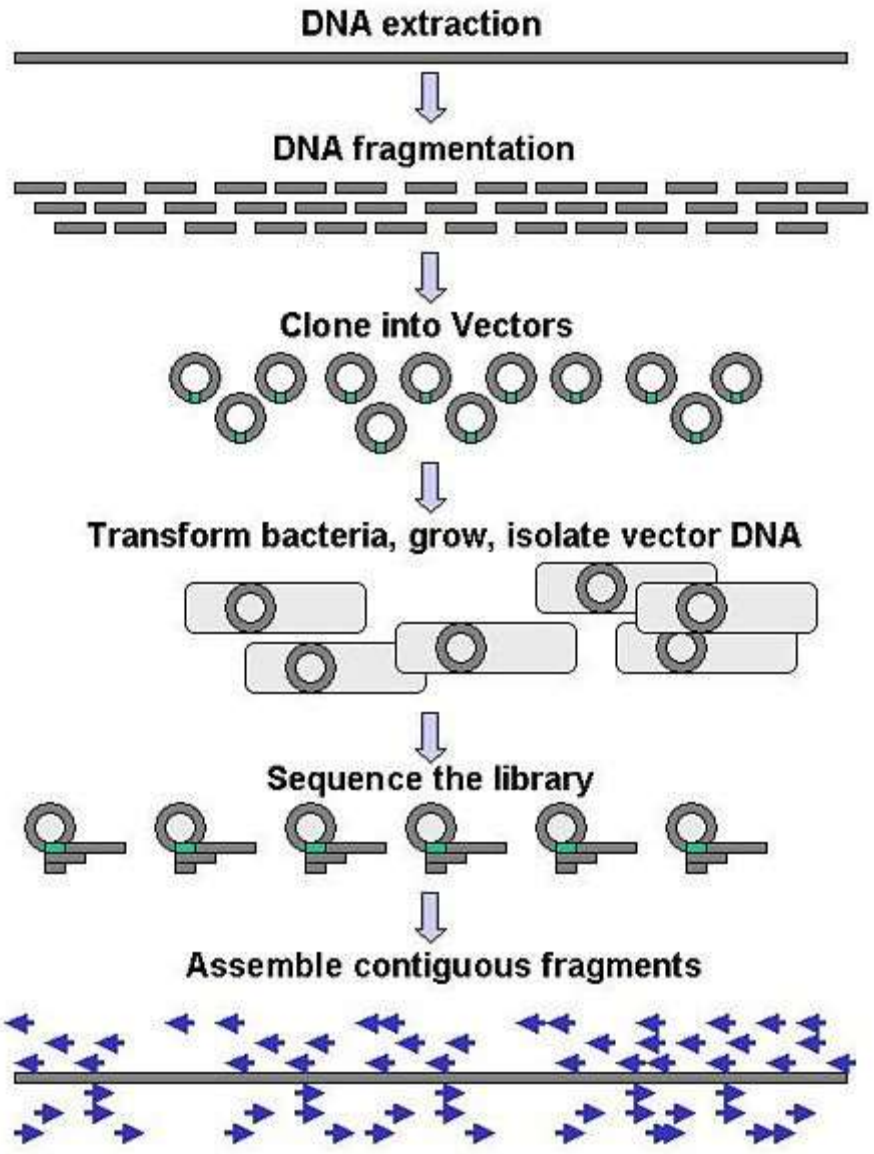

A T G C
T
A
G
C


5'
3'
primer
template
Labeled primer
primer
template
Labeled dNTP
primer
template
Labeled terminator (ddNTP)

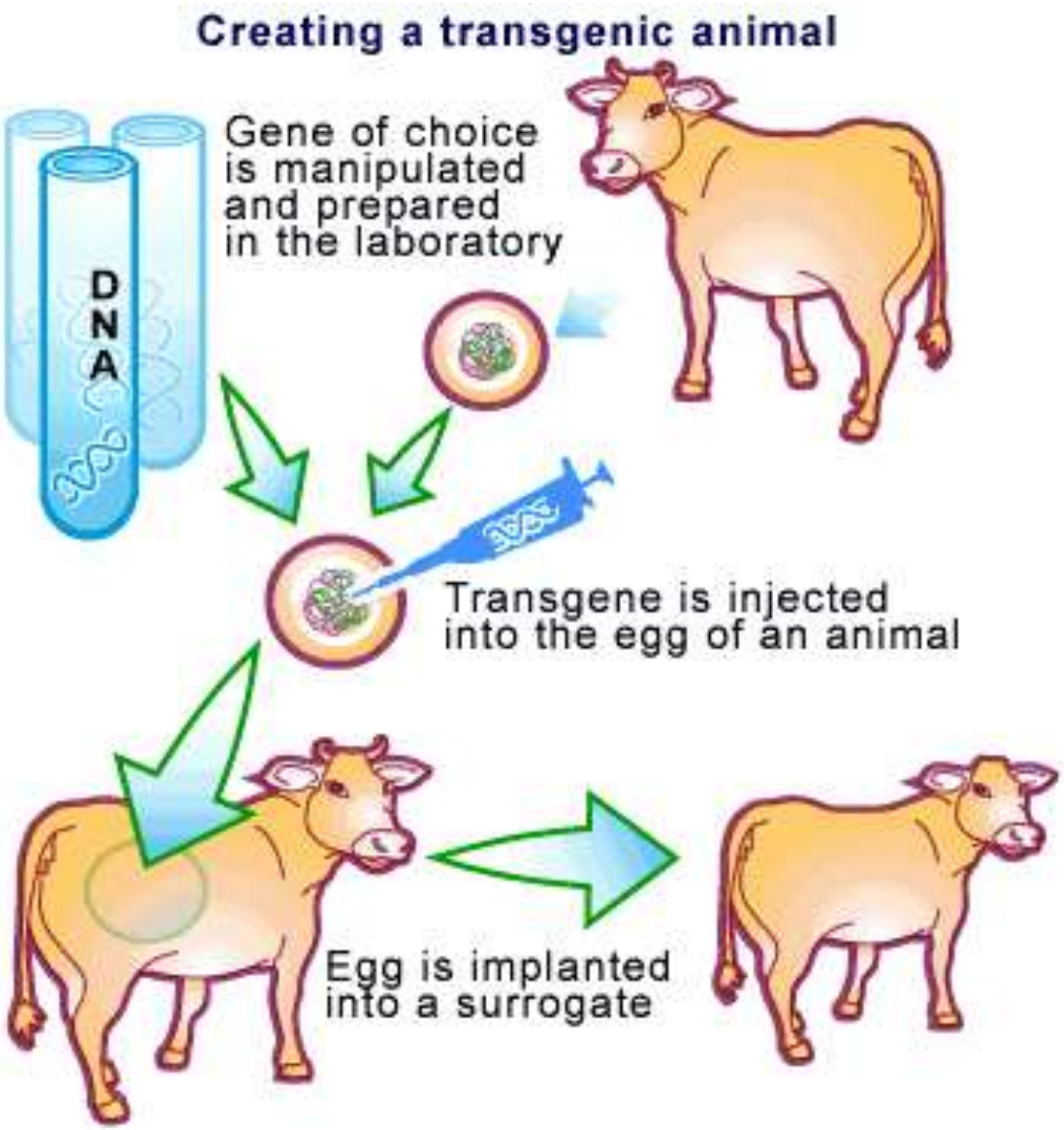

G C A T
A T G C T T C G G C A A G A C T C A A A A A A T A

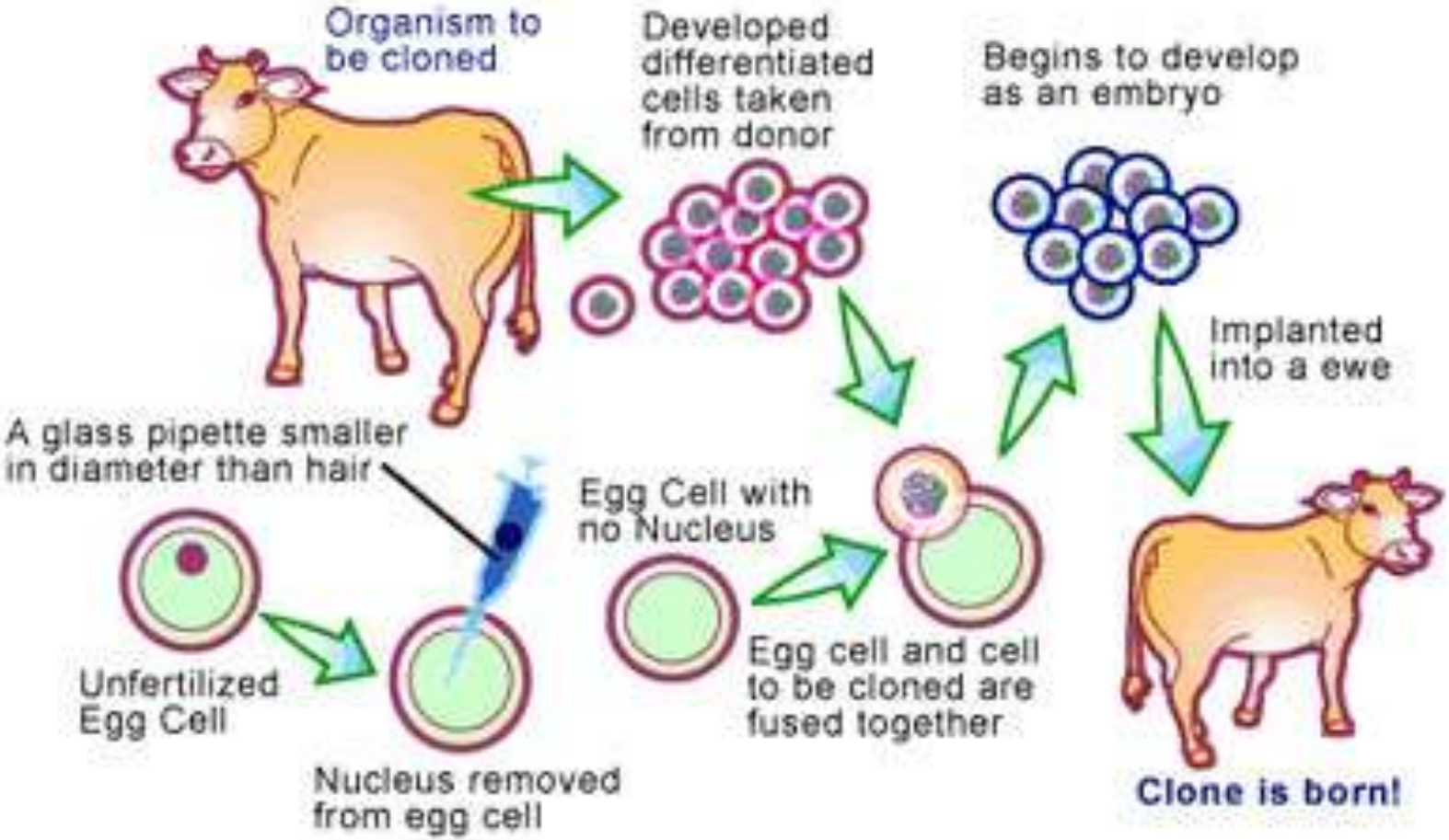

TGATTCATC
Migration of DNA fragments
Fluorescence detector
Laser
Sample/ Buffer
Buffer
-
+

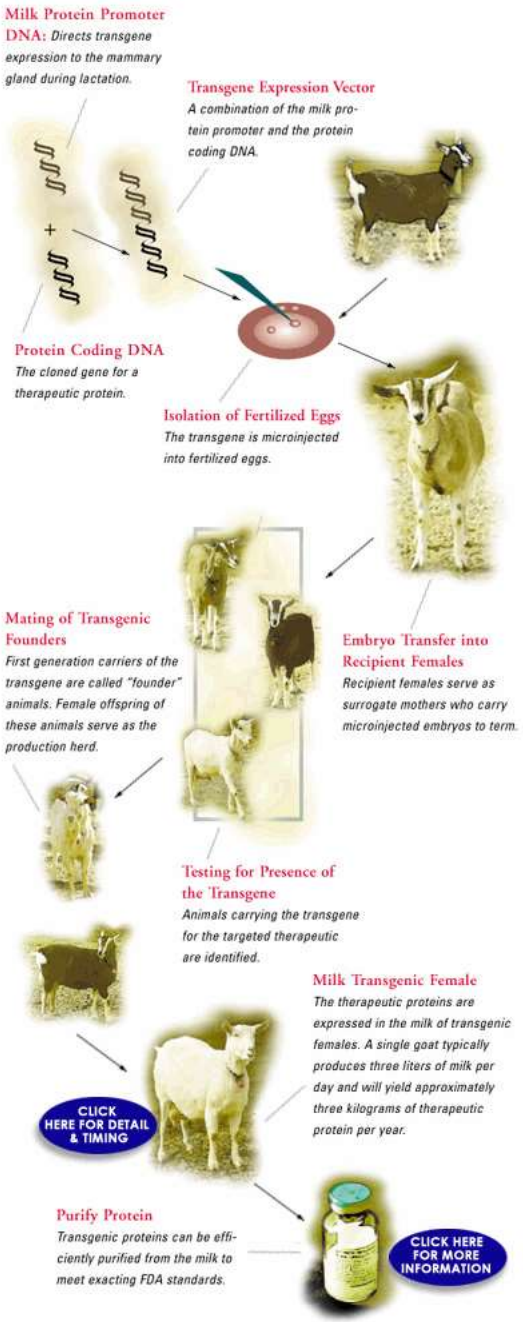

10
20
30
40
50
60
70
80
90
CGATTGA TTNAGCGGCCGCG AATTCGCCCTTTCTCTACG ACG ATG ATTTACACGCATG TGCTG AAAGTTGGCGGTGCCGG AGTGCGC TCACCGC


DNA extraction
DNA fragmentation
Clone into Vectors
Transform bacteria, grow, isolate vector DNA
Sequence the library
Assemble contiguous fragments




Creating a transgenic animal
DNA
Gene of choice is manipulated and prepared in the laboratory
Transgene is injected into the egg of an animal
Egg is implanted into a surrogate


Organism to be cloned
Developed differentiated cells taken from donor
Begins to develop as an embryo
Implanted into a ewe
A glass pipette smaller in diameter than hair
Egg Cell with no Nucleus
Unfertilized Egg Cell
Nucleus removed from egg cell
Egg cell and cell to be cloned are fused together
Clone is born!


Milk Protein Promoter DNA: Directs transgene expression to the mammary gland during lactation.
Transgene Expression Vector
A combination of the milk protein promoter and the protein coding DNA.
Protein Coding DNA
The cloned gene for a therapeutic protein.
Isolation of Fertilized Eggs
The transgene is microinjected into fertilized eggs.
Mating of Transgenic Founders
First generation carriers of the transgene are called "founder" animals. Female offspring of these animals serve as the production herd.
Embryo Transfer into Recipient Females
Recipient females serve as surrogate mothers who carry microinjected embryos to term.
Testing for Presence of the Transgene
Animals carrying the transgene for the targeted therapeutic are identified.
Milk Transgenic Female
The therapeutic proteins are expressed in the milk of transgenic females. A single goat typically produces three liters of milk per day and will yield approximately three kilograms of therapeutic protein per year.
CLICK HERE FOR DETAIL & TIMING
Purify Protein
Transgenic proteins can be efficiently purified from the milk to meet exacting FDA standards.
CLICK HERE FOR MORE INFORMATION