

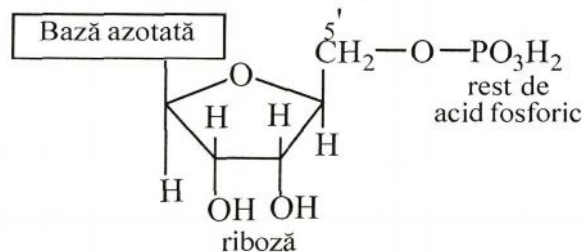
CAPITOLUL II

Nucleotidele. Structura și biosinteza acizilor nucleici. Sinteza proteinelor și reglarea ei. Biosinteza anticorpilor

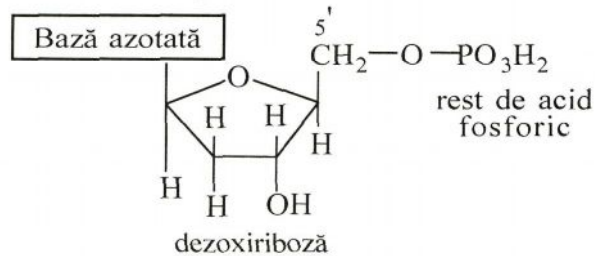
Acizii nucleici sunt produși de policondensare ale mononucleotidelor, deci sunt polinucleotide. Mononucleotidele, unitățile structurale fundamentale ale acizilor nucleici, sunt constituite din: a) o bază azotată purinică sau pirimidinică; b) o pentoză (riboza sau dezoxiriboza); c) rest de acid fosforic. Bazele purinice sau pirimidinice sunt legate covalent printr-o legătură - N-glicozidică cu atomul de carbon 1' al pentozei. Compușii rezultați se numesc nucleozide. Cele mai multe au fosfatul legat printr-o legătură esterică cu gruparea 5'-hidroxil din molecula pentozei.

În funcție de componentele structurale, deosebim: acizi ribonucleici (ARN), și acid dezoxiribonucleic (ADN).

Ribonucleotidele, unitățile monomere ale ARN, conțin ca pirimidine citozina și uracilul, ca purine – adenina și guanina, iar ca pentoză – riboza. Structura generală a ribonucleotidelor se prezintă în felul următor:



Unitățile monomere ale ADN, dezoxiribonucleotidele, conțin ca pirimidine citozina și timina, ca purine – adenina și guanina. Pentoza este reprezentată de dezoxiriboză. Structura generală a dezoxiribonucleotidelor se prezintă astfel:



Mononucleotidele se pot lega prin punți fosfodiesterice între gruparea 5'-hidroxil a unui mononucleotid și gruparea 3'-hidroxil a mononucleotidului învecinat. Astfel se formează lanțuri polinucleotidice macromoleculare. Prin legături macroergice mononucleotidele pot lega încă unul sau două resturi de acid fosforic, rezultând nucleozid 5'-difosfați și nucleotid 5'-trifosfați, compuși cu rol esențial în celulă. De exemplu, este bine cunoscut rolul de rezervor general de energie în procesele metabolice a ATP, care înmagazinează energia eliberată la etapele catabolice exogene și o furnizează în fazele anabolice endogene.

Unii nucleozid difosfați, așa ca UDP și CDP, funcționează drept activatori ai anumitor precursori metabolici. De exemplu, glucoza poate participa la biosinteza glicogenului numai după activare la UDP-glucoză. Colina intervine în procesul de biosinteză a fosfatidil-colinei după activarea la CDP-colină.

Moleculele acidului dezoxiribonucleic au drept unități structurale dezoxiribonucleotidele dAMP, dGMP, TMP și dCMP. Cea mai mare parte din ADN este localizat în nucleu, în cromozomi, unde îndeplinește funcția de depozitare și transmite informația genetică din generație în generație. ADN are masa moleculară mare, de ordinul $6 - 14 \times 10^6$. Structura primară a ADN este imprimată de succesiunea nucleotidelor în catena polinucleotidică. Structura secundară a ADN a fost descoperită de Watson și Crick, care au demonstrat că ADN are o structură bicatenară, cele două catene polinucleotidice fiind legate prin punțile de hidrogen dintre bazele complementare: adenina - timina (A-T) și guanina - citozina (G-C).

ARN este constituit din ribonucleotidele: AMP, GMP, CMP, și UMP. ARN și în majoritatea cazurilor este monocatenar. Se disting trei tipuri de ARN:

1. ARN mesager (ARN_m)
2. ARN de transfer (ARN_t)
3. ARN ribozomal (ARN_r)

În conservarea și transmiterea informației genetice sunt implicate 3 procese:

1. *Replicarea sau biosinteza* ADN. Replicarea ADN implică participarea unui complex multienzimatic, denumit ADN replicaza (ADN polimeraze I, II, III, ADN ligaze și alte enzime), ADN parental, care servește ca matrită pentru biosinteza catenelor noi complementare de ADN, 4 tipuri de dezoxiribonucleozidtrifosfați TTP, dCTP, dATP, dGTP, ioni de magneziu

și alți factori, ceea ce duce la biosinteza de noi molecule de ADN identice cu molecula inițială.

2. *Transcrierea* mesajului genetic de la ADN la ARN, sau biosinteza ARN. Sinteza ARN necesită matrită de ADN și se desfășoară în sensul 5'→3'. Este necesară și prezența celor 4 tipuri de ribonucleotriofosfați (ATP, GTP, CTP, UTP), ionilor de Mg^{2+} și Mn^{2+} și ARN-polimerazei.

În procesul transcrierii mesajului genetic, ARN se sintetizează sub forma unui precursor care cuprinde în molecula sa, pe lângă fragmentele purtătoare de informație (exoni), și fragmente care nu au rol informațional (introni). În cadrul unui proces de măturare, din molecula ARN se îndepărtează intronii, iar exonii se leagă între ei și se formează ARN-biologic activ.

3. Transferarea mesajului genetic codificat în ARN la moleculele proteice în cadrul biosintezei specifice a proteinelor structurale și funcționale. În sinteza proteinelor se pot distinge 5 etape importante:

a) *Activarea aminoacizilor* care necesită următorii componenți: ATP, aminoacizi, ARNt, aminoacil-ARNt-sintetaza și Mg^{2+} ,

b) *Inițierea biosintezei* lanțului polipeptidic. Componentii necesari în această etapă sunt: aminoacil-ARNt-inițiator, ARNm cu codonul de inițiere GTP și Mg^{2+} , factorii de inițiere și subunități ribozomale 30s și 50s.

c) *Elongarea* lanțului polipeptidic suscită aminoacil-ARNt specificat de codon, Mg^{2+} , GTP, factori de elongare și peptidiltransferaza.

d) *Terminarea* lanțului polipeptidic. Această etapă necesită codonii de terminare de ARNm și factorii de eliberare a polipeptidului.

e) *Asamblarea proteinelor*. Foldingul.

Reglarea sintezei proteinelor, respectiv a enzimelor, se face prin control genetic (teorie elaborată de Jacob și Monod). Numeroase antibiotice influențează la diverse nivele procesul de biosinteză proteică.

Mutațiile reprezintă modificări ale structurii ADN. Mutațiile punctiforme pot avea loc prin înlocuirea, pierderea sau introducerea unei perechi de nucleotide în molecula de ADN. Mutațiile pot avea loc spontan sau sub influența unor agenți mutageni fizici (radiații Röntgen, UV, etc.), chimici și biologici. Mutațiile constituie sursa primordială a variabilității organismelor vii. Însă ele pot duce și la maladii ereditare, datorate unor defecte enzimatică congenitale.

Ingineria genetică reprezintă un ansamblu de metode și tehnologii efectuate in vitro cu gene în scopul transferării informației genetice de la o specie la alta, urmărindu-se realizarea unor obiective bine determinate.

TEMA 6

Nucleotidele și structura covalentă a acizilor nucleici

Experiența 1. Izolarea simultană a ADN-ului și ARN-ului.

Se cunosc mai multe procedee de izolare a ARN-ului din celule și țesuturi, variind gradul lor de complexitate. Numeroase companii oferă substanțe, reagenți, soluții pentru izolarea “nedureroasă” a ARN-ului din diferite surse biologice. A fost propusă o metodă pentru recuperarea simultană a ARN-ului, ADN-ului și proteinelor din aceeași sursă biologică. Această metodă nu necesită echipament special și are la bază fracționarea selectivă a ARN-ului și ADN-ului prin adaptarea pH-ului fenolomogenatului. ARN-ul este recoltat în faza apoasă prin extragerea probei la pH acid, iar ADN-ul în interfază și faza organică. După transferarea fazei apoase într-un tub nou, ADN-ul se extrage din interfază și faza organică prin stabilirea unui pH alcalin. Această reacție este cunoscută sub denumirea de extragere inversă. Cercetătorul poate schimba pH acid al fenolomogenatului prin adăugarea de acetat de sodiu, pH = 4,9, sau prin simpla extragere a SDS/EDTA lizat (pH = 8,7) cu un volum egal de fenol:cloroform:alcooli izoamilici (25:24:1), pH-ul total fiind aproximativ egal cu 7,6.

Celulele pot fi distruse direct în țesut, sau după recoltare. Celulele se dispersează cu precauție înaintea distrugerii. ADN-ul genomic trebuie să fie purificat, deoarece forțele moleculare mari vor denatura ADN-ul într-un timp foarte scurt. Fracționarea fragmentelor poate fi foarte joasă.

Mod de lucru.

1. Preparați soluție de fenol : cloroform : alcool izoamilic, saturând în prealabil fenolul de 2–3 ori cu apă.

2. Pentru recoltarea țesuturilor îndepărtați creșterea medie prin aspirație și spălați stratul mediu de 2 ori cu 5 ml de PBS rece (pentru prepararea 1 l de PBS se iau 8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄, 0,24 g de KH₂PO₄). Vasele pentru recoltare se țin la rece. Îndepărtați prin aspirație cât mai mult PBS.

Opțional: prepararea celulelor pentru lizare prin răcirea lor directă pe gheață timp de 30 min.

Notă: răcirea reagenților și celulelor pe gheață este o metodă excelentă de a controla activitatea RNA-azelor. Responsabilitatea cercetătorului este de a determina dacă o incubare timp de 30 min pe gheață înainte de liză influențează biochimia celulară.

3. Adăugați 2 ml de reactiv de lizare rece (10 mM EDTA, pH=8,0; 0,5% SDS) la 100 mm de țesut recoltat ($4-5 \times 10^6$ celule). Înclinați atent vasul pentru a observa liza celulelor. Incubați conținutul vasului pe gheață timp de 3 min. Produsul de liză se poate trece pentru incubare în alt vas. O agitare ușoară este binevenită. Nu utilizați o cantitate de lizat pentru mai mult de 2 vase de 100 mm de țesut recoltat. Celulele care au fost recoltate din țesut trebuie lizate, utilizând 200 de μ l de lizat pentru 10^6 celule.

Pentru țesut, se taie țesut proaspăt izolat (până la 100 mg) pe gheață. Pentru fiecare mg de țesut se adaugă 250 μ l (10 mM EDTA, pH=8,0; 0,5% SDS) lizat și se omogenează ușor la temperatura camerei. Nu utilizați la omogenizare un politron, căci va cauza replicarea inacceptabilă a ADN-ului genomic.

4. Transferați omogenatul într-un tub cu 15 ml de polipropilenă racită în prealabil pe gheață.

Notă: datorită consistenței vâscoase a cromatinei eliberate, recoltatorul steril este folosit pentru obținerea cantitativă a omogenatului.

Opțional. Recoltarea celulelor lizate prin transferul din vas în vas, poate fi substituită prin spălarea fiecărui vas cu 2 ml soluție de 10 mM EDTA, 100 mM de acetat de Na, pH=4,9, sau păstrarea omogenatului mai concentrat cu 1 ml de soluție de 10 mM EDTA, 0,15 M de acetat de Na la pH 4,9.

4. Adăugați un volum egal de tampon organic rece, preparat în prealabil. Verificați compatibilitatea tubului de la centrifugă cu fenol și cloroform.

5. Amestecați atent tuburile rotindu-le atent de câteva ori. Nu le agitați! Recolta va fi mai bună atunci când va fi menținută mereu pe gheață și nu se va agita.

6. Probele se centrifughează pentru a separa materialul apos de cel organic.

Atenție! Nu depășiți viteza rotațiilor recomandată sau forța g maximă recomandată pentru orice tub folosit în experiență.

Extragerea ARN-ului

7. Colectați stratul apos și transferați-l într-un tub nou, răcit în prealabil. Aveți grijă să nu întrerupeți interfaza proteinelor. Extragerea ARN-ului se face din interfază (sau faza organică) și poate fi amânată pînă la îndeplinirea tuturor cerințelor pentru extragerea ARN-ului, ținînd tuburile pe gheață.

8. Adăugați în eprubetă un volum egal de amestec organic proaspăt descris anterior.

9. Centrifugați eprubeta. Transferați stratul lichid format într-un tub nou.

10. Adăugați 500 μl de 1 M de Tris-Cl rece, pH=8,0 și 200 μl de 5 M de NaCl pentru fiecare 4 ml de ARN ce conține material apos. Amestecați atent. Adăugați apoi 12 ml (sau 2,5 volume) de etanol de 95% rece și amestecați. Păstrați conținutul eprubetei pentru cel puțin 1 oră la temperatura de 20°C.

11. Colectați ARN-ul precipitat prin centrifugare la 10000g timp de 10 min. Este recomandată centrifugarea la 4°C. Filtrați și separați supernatantul.

12. Spălați corpii celulari de 2-3 ori cu etanol 70%. Centrifugați din nou pentru a separa precipitatul. Filtrați și separați supernatantul.

13. Lăsați proba să se usuce. La dorință, se poate spăla cu etanol de 95%, ceea ce va accelera uscarea.

14. Dizolvați corpii celulari de ARN în 200 de μl de TE tampon rece (10 mM Tris-clor, pH=8,0, 1 mM EDTA). Incubați conținutul eprubetei pe gheață timp de 1 oră, apoi transferați-l într-un tub de centrifugare. O altă cantitate de TE tampon se folosește la spălarea tubului de centrifugare și se adaugă la prima soluție.

15. Adăugați 6 μl de 5 M NaCl și 0,98 ml de etanol rece pentru fiecare 300 μl de soluție de ARN. Incubați conținutul pe gheață timp de 5-10 min. Soluția se va tulbura ca urmare a formării precipitatului de ARN. Proba se va păstra fără a scurge etanolul la - 80°C sau va fi procesată imediat.

16. Colectați ARN precipitat la centrifugare într-o microcentrifugă timp de 10 min la 2-4 °C. Filtrați supernatantul și uscați-l pentru a înlătura excesul de etanol (14).

17. Resuspendați corpii celulari ai ARN-ului în volumul minim al soluției-tampon (DEPC-tratată cu apă, de exemplu) și lăsați-i 15 min pe gheață pentru a redizolva proba. În dependență de gradul de uscare a probei, poate fi necesară o incubație mai de lungă durată pentru a redizolva complet proba.

18. Calculați concentrația ARN-ului, păstrați probele hidratate în soluțiile adecvate la - 80°C.

Extragerea ADN-ului

19. Folosiți tuburile cu material organic din punctul (6). Îndepărtați orice material apos. Dacă doriți, înlăturați și o mică cantitate de interfață pentru a facilita înlăturarea oricărei urme de ARN. Aceasta de obicei nu e necesar, deoarece ARN rezidual va fi hidrolizat în următoarele etape. De altfel, ADN-ul purificat poate fi incubat cu ARN-aze pentru a înlătura toate urmele de ARN.

20. La materialul organic/interfață rămas adăugați un volum egal de 1 M de Tris bază. Soluția se va aduce la un pH-ul de 10,5. Amestecați atent fără a agita.

Notă: această etapă se numește extragere inversă; crearea unui mediu puternic alcalin va aduce ADN-ul în faza apoasă.

21. Se centrifughează probele la 2000 g timp de 15 min la 4°C, dacă e posibil, pentru a separa materialul apos de cel organic. Transferați atent faza apoasă într-un alt tub.

Atenție! Nu depășiți viteza rotațiilor recomandată sau forța g maximă recomandată pentru orice tub folosit în experiență.

22. Repetați extragerea, dar nu amestecați cele 2 faze apoase. Păstrați-le în tuburi de centrifugare separate.

23. La fiecare Tris:ADN probă apoasă, adăugați un volum egal de cloroform:alcohol izoamilic (24:1). Amestecați bine și centrifugați. La centrifugare se separă fazele (cloroformul în absența fenolului se sedimentează repede). Treceți faza apoasă într-un alt tub.

24. Precipitați ADN-ul cu 0,1 volum de 3 M de acetat de Na, pH=7,0 și 2,5 volume de etanol 95%. Amestecați bine.

Notă: adăugarea etanolului va cauza precipitarea imediată a materialului genomic. ADN-ul precipitat poate fi colectat prin centrifugarea la viteză mică (500g) timp de 2-3 min. De altfel, ADN-ul genomic poate fi pescuit din soluția de etanol, utilizând pipeta Pasteur astfel încât lipirea ADN-ului de sticlă să fie minimă.

25. Transferați ADN-ul precipitat într-un tub de microcentrifugă nou. Spălați ADN-ul cu 500 μl soluție de etanol de 70% pentru a înlătura excesul

de sare. Dizolvați ADN-ul precipitat într-o soluție-tampon adecvată (TE bufer, pH=8,0) și determinați concentrația de ADN.

Notă: Purificarea ARN-ului din celulele țesutului se poate face prin mai multe metode. Majoritatea lor se bazează pe sodiumdodecilsulfat (SDS) (1) sau guanidiumtiocianat (2,3), care lizează simultan celulele și inactivează ribonucleazele endogene. În aceste procedee ARN este separat din ADN-ul celular și proteine prin centrifugare.

Experiența 2. Hidroliza nucleoproteidelor din drojii și reacțiile calitative pentru componentele nucleoproteidelor.

Drojdia de bere este foarte bogată în nucleoproteide. Pentru studierea compoziției chimice a acestora se realizează hidroliza acidă a drojdiilor. Prin reacții specifice se identifică produsele de hidroliză – polipeptidele, bazele purinice, glucidele și acidul fosforic.

Mod de lucru. Într-un balon Kjeldahl cu capacitatea de 100 ml se introduc 2,5 g de drojdie, se adaugă 20 ml soluție de acid sulfuric de 10%. Balonul se astupă cu un dop prevăzut cu un tub lung de sticlă ce îndeplinește rolul de refrigerent cu curent de aer. Hidroliza drojdiei se efectuează la încălzire timp de 60 min. După răcire într-un curent de apă de robinet, hidrolizatul se filtrează și este utilizat pentru reacțiile calitative ale componentelor nucleoproteidelor.

Reacția biuretului (identificarea polipeptidelor)

La 5 picături de hidrolizat se adaugă 10 picături soluție de hidroxid de sodiu de 10% și 2 picături soluție de sulfat de cupru de 1%. Eprubeta se agită; apare o colorație roză, roz-violetă.

Reacția de argint (identificarea bazelor purinice)

La 10 picături de hidrolizat se adaugă picătură cu picătură soluție concentrată de NH_3 (circa 10 picături) și 10 picături de soluție amoniacală de nitrat de argint de 2%. După 3-5 minute se formează un precipitat brun deschis de săruri de Ag ale bazelor purinice.

Reacția Molisch (identificarea pentozelor)

La 10 picături de hidrolizat se adaugă 3 picături soluție alcoolică de timol

de 1%. Conținutul se agită și se adaugă cu precauție pe pereții eprubetei 20-30 picături de acid sulfuric concentrat. La fundul eprubetei se formează un produs de condensare a furfuroolului cu timolul de culoare roșie (sub influența acidului sulfuric concentrat riboza pierde 3 molecule de apă, transformându-se în furfurool).

Reacția molibdenică (identificarea acidului fosforic)

La 10 picături de hidrolizat se adaugă 20 picături de reactiv molibdenic. Amestecul fiind încălzit imediat pe o baie de apă timp de câteva minute, se colorează în galben deschis. După răcirea soluției într-un curent de apă rece, apare un precipitat cristalin galben-deschis de fosfomolibdat de amoniu.

Reacția difenil-aminică (identificarea ribozei și dezoxiribozei)

Difenilamina reacționează cu dezoxiriboza dând o colorație albastră, iar cu riboza – verde. La 5 picături de hidrolizat se adaugă 20 picături soluție de difenilamină de 1%. Conținutul eprubetei se fierbe timp de 15 minute pe o baie de apă. Se observă culoarea apărută și se trag concluzii.

Teme pentru autopregătire

1. Principiul reacției de identificare a componentelor nucleoproteidelor.
2. Tipurile de acizi nucleici, funcțiile și repartizarea lor în celulă.
3. Constituienții acizilor nucleici: bazele azotate, pentozele, acidul fosforic.
4. Nucleozidele și nucleotidele 3', 5' - cAMP.
5. Structura primară, secundară și terțiară a acidului dezoxiribonucleic. Cromatina. Nucleosomul.
6. Structura acizilor ribonucleici (ARNt, ARNm, ARNr).
7. Denaturarea și hibridizarea acizilor nucleici.

Întrebări pentru autocontrol și situații de problemă

1. Scrieți formula generală a nucleotidelor.
2. Scrieți formula ATP.
3. Scrieți formula cAMP.
4. Scrieți formula dezoxiguanilatului.
5. Scrieți formula timidilatului.
6. Scrieți formula adenozei.

7. Scrieți formula uridilatului.
8. Scrieți formula citidilatului.
9. Scrieți formula GDP.
10. Scrieți formula tetradezoxiribonucleotidului 5'-ATGC 3'.
11. Scrieți formula tetraribonucleotidului 5'-UGCA- 3'.
12. Ce deosebire există în structura dinucleotidelor ce se întîlnesc în acizii nucleici și structura dinucleotidelor care prezintă coenzimele dehidrogenazelor?
13. Numiți toate tipurile de legături ce există în structura acizilor nucleici.
14. Combinația din imaginea alăturată prezintă:

- a) Uracil;
- b) Uridină;
- c) Nucleozid;
- d) Nucleotid;
- e) Dezoxiribonucleotid.

15. În spirala dublă a ADN-ului (subliniați răspunsurile corecte):

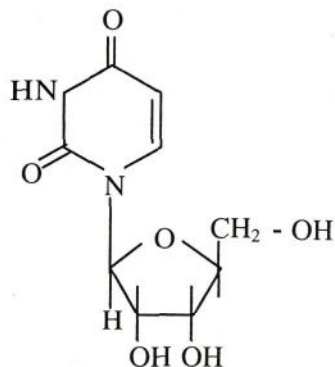
- a) cele 2 lanțuri nucleotidice sunt paralele;
- b) adenina unei catene se împerechează cu citozina celeilaltei catene, iar guanina cu timina;
- c) bazele hidrofobe sunt aranjate în interiorul spiralei, iar scheletele hidrofile – în afara ei;
- d) o spirală include cca 10 perechi de nucleotide;
- e) ambele lanțuri de ADN sunt identice în ceea ce privește succesiunea bazelor azotate și compoziția nucleotidică.

16. Calculați cifra medie a perechilor de nucleotide ce revin unui micron al spiralei duble de ADN.

17. ADN-ul bacteriofagului M_{13} are următoarea compoziție nucleotidică A-23%; T-36; G-21%; C-20%. Ce indică aceste cifre?

18. Calculați numărul perechilor de nucleotide ce se conțin într-un milion de daltoni din masa spiralei duble de ADN.

19. În preparatele de ADN, separate din 2 specii de bacterii neidentificate, conținutul de adenină constituie 32% și 17%. Care este ponderea de guanină, timină și citozină în aceste 2 preparate? Una din aceste bacterii a fost izolată dintr-un izvor hidrotermal (64°C). Care ADN aparține bacteriei termofile?



TEMA 7

Genele: reparația, mutațiile și clonarea. Replicarea (biosinteza acizilor dezoxiribonucleici)

Experiența 1. Identificarea ADN-ului.

Principiul metodei. Metoda se bazează pe proprietatea dezoxiribozei din componența ADN de a da cu reactivul difenilaminic o colorație albastră. Intensitatea culorii este direct proporțională cu cantitatea de ADN.

Mod de lucru. În eprubeta de cercetat se pun cu pipeta 1 ml de hidrolizat de drojdie obținut în lucrarea precedentă și 2 ml de reactiv difenilaminic. În eprubeta martor se iau 1 ml de apă distilată și 2 ml de reactiv difenilaminic. Probele se introduc într-o baie de apă la 100°C timp de 10 min. După răcire se efectuează colorimetrarea probei de analizat la FEC, contra probei de control (filtrul de lumină roșie și cuva de 5 mm grosime). Conținutul de ADN în proba de cercetat se determină după curba etalon.

Teme pentru autopregătire

1. Structura genelor: dimensiunile lor, intronii și exonii, genele structurale și reglatoare.
2. Codul genetic și proprietățile lui.
3. Mutațiile moleculare: prin substituție, suprimare și inserțiile de nucleotide. Rolul mutațiilor
4. Replicarea ADN-ului – mecanismul, substratele, matricea, enzimele și factorii proteici, etapele biosintezei ADN. Telomeraza. Rolul și structura.
5. Reparația ADN-ului.

Întrebări pentru autocontrol

1. Întocmiți lista precursorilor și enzimelor necesare sintezei lanțurilor principale și întârziate în procesul de replicare a ADN-ului.
2. Care va fi compoziția nucleotidică a lanțului ADN sintetizat de ADN-polimeraza pe matricea care prezintă molecula inelară monocatenară de ADN al fagului Ø174 cu următoarea compoziție nucleotidică G- 24,1%; C- 18,5%; A-24,6%; T-32,8%.
3. Scrieți compoziția nucleotidică a ADN-ului sintetizat de ADN – polimeraza în sistemul format din amestecul de inele (+) și (-) de ADN ale fagului Ø174.

4. Exactitatea replicării ADN-ului:

- a) care factori asigură exactitatea replicării lanțului principal de ADN?
- b) lanțul întârziat se sintetizează cu aceeași exactitate ca și lanțul principal?

TEMA 8

Transcripția. Sinteza anticorpilor

Experiența 1. Determinarea ARN-ului.

Principiul metodei se bazează pe reacția de culoare a reactivului orcinic cu riboza (soluția se colorează în verde). Intensitatea colorației este direct proporțională cu concentrația ribozei în soluția de analizat și se determină prin fotocolorimetrie.

Mod de lucru. În 2 eprubete se pun cu pipeta câte 1 ml de reactiv orcinic. În prima eprubeta se adaugă 1 ml de hidrolizat de drojdie (proba de analizat), iar în a doua - 1 ml de apă distilată (proba martor). Conținutul lor se încălzește pe o baie de apă la 100°C timp de 20 min. După răcirea probelor într-un jet de apă de robinet se determină extincția probei de analizat la FEC contra probei de control, folosindu-se cuva de 5 mm și filtrul de lumină roșie.

După curba etalon se calculează conținutul de ARN în proba de analizat utilizând valoarea E, găsită la fotocolorimetrie.

Teme pentru autopregătire

1. Transcripția sau biosinteza ARN-ului: matricea, substratele, enzimele, mecanismul.
2. Biosinteza ARN pe matrice de ADN.
3. Modificările posttranscripționale (processing).
4. Dogma centrală a geneticii moleculare. Concepția: o genă - un polipeptid.
5. Inhibitorii sintezei acizilor nucleici.
6. Ingineria genetică și semnificația ei practică. Sinteza anticorpilor.
7. Transcripția inversă.

Întrebări pentru autocontrol

1. Care sunt deosebirile de acțiune a ARN polimerazei și polinucleotid-fosforilazei?
2. Lanțul (+) singular de ADN (A- 21%; G- 29%; T 21% și C-29%) este

replicat de ADN- polimerază cu formarea lanțului (-) complementar. ADN-ul rezultat bicatenar este apoi utilizat ca matriță pentru ARN-polimerază, care transcrie lanțul (-). Scrieți compoziția nucleotidică a ARN sintetizat.

3. ADN-ul bacteriofagului ϕ 174 este constituit din 5386 de nucleotide; această cantitate de nucleotide este insuficientă pentru codificarea celor 9 proteine sintetizate de acest virus. Explicați acest fenomen.

TEMA 9

Sinteza proteinelor și reglarea ei

Experiența 1. Determinarea proteinelor. Metoda biuretică (Construcția curbei etalon).

Principiul metodei. Proteinele, în mediul alcalin și în prezența sulfatului de Cu, formează un complex de culoare roșie-purpurie (reacția biuretilui). Intensitatea colorației este direct proporțională cu concentrația proteinei în soluție.

Mod de lucru. În 3 eprubete se pune cu pipeta câte 1 ml soluție standard de proteină în care concentrația proteinei este respectiv de 0,5; 1 și 1,5% (probele etalon). Aceste probe servesc pentru construirea curbei-etalon. În eprubeta a 4-a se ia 1 ml de soluție de proteină în care concentrația proteinei trebuie să se cunoască (proba de analizat).

1. În toate eprubetele se adaugă câte 4 ml de reactiv biuretic. Conținutul eprubetelor se agită și se lasă în repaos la temperatura camerei timp de 20 de minute pentru dezvoltarea colorației. Probele sunt citite la FEC, folosindu-se cuva de 10 mm grosime și filtrul care corespunde lungimii de undă 540 nm (filtrul verde). Reactivul biuretic este folosit ca probă-martor sau de control.

2. Construirea curbei-etalon se realizează în modul următor: pe ordonată sunt înscrise valorile extincției E, iar pe abscisă – concentrația în ordine crescândă a probelor-etalon. Unind punctele corespunzătoare tuturor probelor se obține o linie dreaptă care și se numește curba-etalon.

3. Calcularea cantității de proteină în proba de analizat se face după curba-etalon, deoarece se cunoaște extincția acestei probe din punctul nr.2.

Experiența 2. Determinarea proteinelor totale din serul sanguin prin metoda biuretică.

Mod de lucru. La 0,1 ml de ser sanguin se adaugă 5 ml de reactiv biuretic, evitându-se agitare intensă și formarea de emulsii. După 30 min proba se citește la FEC, folosindu-se cuva de 1 cm și lungimea de undă 540-560 nm (filtrul verde). Ca martor (soluție de comparare) se folosește reactivul biuretic. Calculul se realizează după curba-etalon.

Valoarea diagnostică. În serul sanguin, cantitatea de proteine totale în normă variază între 6,5 și 8,5 gr/100 ml sau 65-85 gr/l. Proteinele din serul sanguin scad pînă la 4-5 gr/l (hipoproteinemie) în nefroze, inaniție, ciroze, la pierderea proteinei în urma hemoragiilor și formării exsudatelor. Hiperproteinemie se poate întîlni la pacienții cu mielom, diabet insipid, vomitări frecvente, diaree, în cazurile de deshidratare a organismului.

Experiența 3. Identificarea acidului fenilpiruvic din urină.

Principiul reacției. Acidul fenilpiruvic formează cu Fe^{3+} o combinație complexă, colorată în verde-albastru.

Mod de lucru. La 2 ml de urină se adaugă 8-10 picături de triclorură de Fe de 10%. După 30-60 sec, urina se va colora în verde-albastru dacă ea conține acidul fenilpiruvic.

Valoarea diagnostică. Prezența acidului fenilpiruvic în urină indică la copii maladia congenitală – oligofrenia fenilpiruvică; în sînge este ridicată concentrația de fenilalanină.

Teme pentru autopregătire

1. Ribozomii – sediul sintezei proteinelor, structura lor.
2. Biosinteza proteinelor. Etapele:
 - a) Activarea aminoacizilor;
 - b) Inițierea sintezei lanțului polipeptidic;
 - c) Elongarea lanțului polipeptidic;
 - d) Terminarea sintezei proteinei;
 - e) Modificările posttranslaționare ale proteinelor. Asamblarea proteinelor-foldingul.
3. Reglarea biosintezei proteinelor. Inducția și represia enzimelor.
4. Inhibitorii sintezei proteice.
5. Polimorfismul proteinelor (variantele hemoglobinei, enzimelor, grupelor sanguine).
6. Bolile ereditare și diagnosticul lor biochimic.

Întrebări pentru autocontrol și situații de problemă

1. ADN setului haploid de cromozomi ai celulei omului este alcătuit din $2,3 \times 10^9$ perechi de nucleotide. Calculați numărul de proteine codificate de această cantitate de ADN. Într-adevar în organismul uman se sintetizează această cantitate de proteine?

2. Metionina are un singur codon. Acesta codifică atât restul de inițiere cât și resturile interne de metionină în polipeptidele sintetizate de E. coli. Explicați acest fenomen.

3. Pornind de la succesiunea aminoacizilor din proteină, putem prezice succesiunea nucleotidelor din unicul ARNm care codifică această proteină?

4. Calculați lungimea medie (în Å) și masa medie (în Da) a genelor care codifică:

- a) ARNt (90 mononucleotide);
- b) ribonucleaza (124 resturi de aminoacizi);
- c) Miozina (1800 resturi de aminoacizi).

5. ARNt-cis este convertit în ARNt-ala. t-ARN-ala rezultat este utilizat în sistemul de sinteză al proteinei unde poli-UG servește ca matrice. Ce polipeptidă se sintetizează?

6. Calculați cheltuielile energetice (sub formă de legături fosfat-macroergice) necesare la sinteza lanțului β al hemoglobinei (constituit din 146 resturi de aminoacizi).

7. Scrieți toate secvențele posibile al ARNm capabile să codifice tripeptidul Leu-Met-Tir.

8. Enzima constituită din 192 resturi de aminoacizi este codificată de o genă ce conține 1440 perechi de baze. Explicați legătura reciprocă dintre aceste două cifre.

9. Preziceți succesiunea aminoacizilor în polipeptidele sintetizate în ribozomi după următoarele matrici:

- a). GGUCAGUCGCUCCUGAUU;
- b). UUGGAUGCGCCAUAUUUGCU;
- c). AUGGACGAA.

10. Care din substituțiile aminoacizilor enumerate mai jos, apărute în urma mutațiilor punctiforme, se împacă cu codul genetic? Dacă unele sunt incompatibile, atunci explicați cauza incompatibilității. 1. Fen-Leu; 2. Ile-Leu; 3. Ala-Tre; 4. Pro-Ser; 5. Liz-Ala; 6. His-Glu.

11. Pe una din catenele ADN-ului se înregistrează următoarea succesiune a nucleotidelor:

5'-.....ATCGTCGACGATGATCATCGGCTACTCGA.....-3'

Această succesiune este descifrată în direcția 5' → 3'. Scrieți:

- a) Succesiunea bazelor în catena complementară în direcția 5' → 3';
- b) Succesiunea bazelor din ARNm;
- c) Succesiunea aminoacizilor din lanțul polipeptidic.

12. Comparați lungimea genei cu lungimea lanțului polipeptidic codificat de această genă dacă proteina este constituită din 150 resturi de aminoacizi și se găsește sub formă de α -spirală.

13. În timpul translației ARNm următorii aminoacizi se includ direct în lanțul polipeptidic: a) asparagina; b) 4-hidroxiprolina; c) parahidroxifenilalanina; d) homoserina; e) fosfoserina.

14. Care din următoarele poliribonucleotide sintetice pot fi utilizate la sinteza polipeptidului -Ile-Tir-Ile-Tir-..... :

- a) poli-(AUUA);
- b) poli-(AUAU);
- c) poli-(UAU);
- d) poli-(AUA);
- e) poli-(UA).

TEMA 10

Colocviu la teme:

Proteine. Enzime. Acizi nucleici