

ством гель-электрофореза. Установление последовательности нуклеотидов производится по методу Максама и Гилберта (1977), идея которого была предложена еще в 1972 г. Свердловым.

Допустим, что выделенный образец ДНК содержит тождественные одонитевые фрагменты. «Начала» этих фрагментов метят, пришивая к ним  $^{32}\text{P}$ . Другой конец цепи не несет метки. Образец делят на четыре части. К первой из них добавляют вещество, рвущее нить вблизи аденина (А) с тем расчетом, чтобы в среднем в каждом фрагменте происходил один разрыв. Возникают уменьшенные субфрагменты разной длины, в том числе несущие метки  $^{32}\text{P}$ . Таким же способом определяют субфрагменты разрывами цепи вблизи Т, Г и Ц. Полученные четыре образца разделяют параллельно методом гель-электрофореза. После этого на гель накладывается фотопластинка, на которой отпечатываются те полоски в геле, которые несут радиоактивную метку. Схематически полученный результат показан на рис. 8.7. Последовательность непосредственно читается по электрофореграмме. В одном опыте удается прочесть текет длиной до 500 нуклеотидов.

## § 8.4. Транспортные РНК

Транспортные РНК (тРНК) составляют около 10% общего количества РНК в клетке. Именно с тРНК началось исследование первичной структуры нуклеиновых кислот (Холли, Баев). Сейчас известны первичные структуры около 100 молекул тРНК различного происхождения. Имеется 20 семейств тРНК в соответствии с 20-ю аминокислотами.

Вторичная структура различных тРНК в принципе однотипна. Очевидно, что это должно быть так для выполнения молекулами тРНК их функции — узнавания кодона мРНК в рибосоме и включения аминокислоты в белковую цепь. Лишь иницирующая метиониновая тРНК имеет несколько иное строение.

Можно наглядно представить вторичную структуру тРНК, исходя из возможности спаривания комплементарных оснований А с У и Г с Ц и считая, что неспаривающиеся участки представляют собой петли (с. 230). Тогда все известные тРНК могут быть изображены схемой «клеверного листа» с четырьмя или пятью двуспиральными участками (рис. 8.8).

Четыре участка являются постоянными, пятый, обычно наименьший, меняется. «Клеверный лист» изображает проекцию на плоскость молекулы тРНК и передает лишь ее топологию, т. е. расположение двуспиральных участков.

Задача нахождения вторичной структуры РНК по последовательности нуклеотидов решалась Тумаяном (1966). Алгоритм включает два этапа. Во-первых, строится треугольная матрица всех возможных пар по простому правилу: элемент  $a_{ij}$ , находящийся на пересечении  $i$ -го столбца и  $j$ -й строки, равен 1 или 0, если  $i$ -й и  $j$ -й нуклеотиды соответственно комплементарны или

некомплементарны. Для учета различия в свободных энергиях ГЦ- и АУ-пар вместо 1 ставятся соответствующие веса. Вторым этапом состоит в построении «максимальных шпилек», т. е. в нахождении вторичной структуры с одной двуспиральной областью, обладающей максимальной отрицательной свободной энергией.

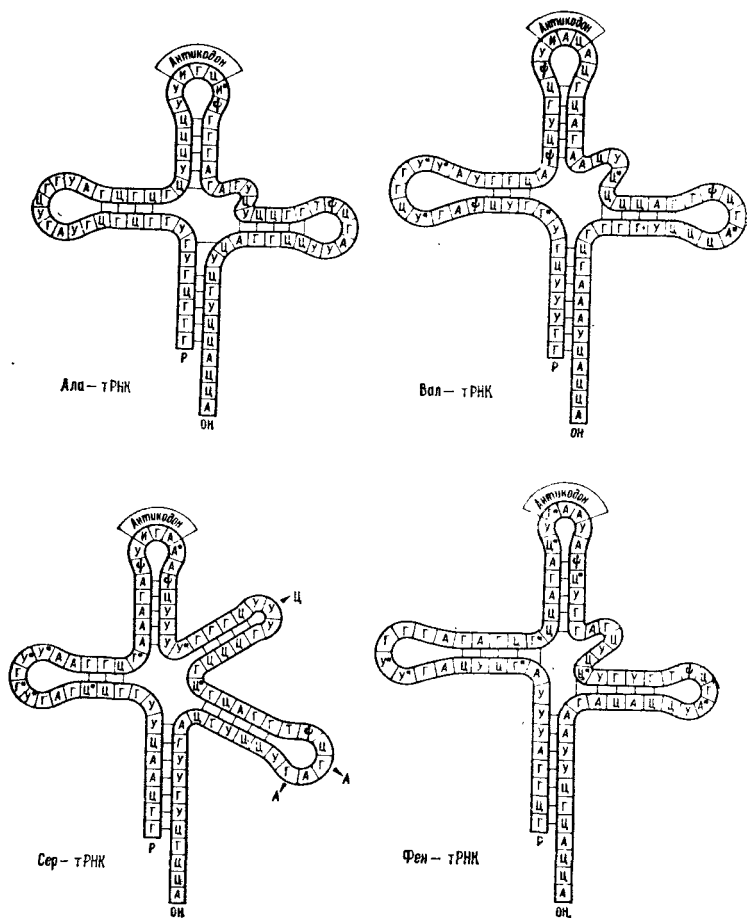


Рис. 8.8. Вторичные структуры некоторых тРНК (Ф, А\*, У\*, Г\*, И — минорные нуклеотиды)

Затем производится уже довольно ограниченный перебор вторичных структур с разными числами найденных максимальных шпилек.

Позднее (1971) Тиноко провел уточнение значений свободных энергий образования пар и петель различного типа.

Что касается вторичной структуры тРНК, то, как показал Эйген, она может быть найдена с помощью игровой модели.

«Игра в тРНК или как делать клеверные листья» выглядит следующим образом. Каждому игроку дается случайная последовательность из  $N$  единиц, принадлежащих к четырем классам — А, У, Г, Ц, и тетраэдрическая кость, каждая грань которой соответствует одной из этих букв. Игроки бросают кость по очереди и, заполняя определенное место в последовательности выпавшей буквой, каждый игрок стремится получить двухцепочечную структуру с максимальным числом пар АУ и ГЦ. Игра окончена, когда один из игроков объявляет, что он получил «полную» структуру. Побеждает игрок, набравший к этому моменту максимальное число очков. Очки засчитываются за пары; можно, например, давать два очка за пару ГЦ и одно очко за АУ. Пары можно образовывать, лишь если имеется непрерывная последовательность 2 ГЦ или ГЦ, 2 АУ или 4 АУ (правило кооперативности). Для каждой петли в структуре должны оставаться неспаренными не менее 5 положений (ср. рис. 8.8). Игрок бросает кость для любого заранее им объявленного положения в последовательности. При  $N=80$  действительно всегда получается структура типа клеверного листа с 3—4 лепестками. Шпилька, имеющая только одну петлю, содержит максимальное число оснований, которые могут спариваться. Однако клеверный лист дает возможность испытать гораздо большее число комбинаций, так как отдельные лепестки можно сдвигать независимо и с самого начала возможно гораздо большее число комбинаций. «Природа, видимо, играет в эту игру с давних времен», — пишет Эйген. Игра сходного типа может быть, по-видимому, разработана и при решении задачи о взаимосвязи первичной и пространственной структур белка (§ 4.6).

Пространственная структура нативной тРНК весьма компактна. Термически денатурированная тРНК способна к ренатурации. Рич (1972) расшифровал структуру Фен-тРНК методом рентгенографии. Эта рРНК построена из двух спиральных сегментов, соединенных под прямым углом, наподобие буквы Г. Структура показана на рис. 8.9. Компактная структура тРНК стабилизирована горизонтальными и вертикальными взаимодействиями в двухспиральных участках, которые упаковываются под действием гидрофобных и электростатических сил. Ионы  $Mg^{++}$ , необходимые для поддержания нативной структуры, компенсируют отрицательные заряды фосфатных групп.

Спектр КД тРНК имеет интенсивные положительные максимумы при 264 нм ( $\Delta\epsilon \sim 5,5$ ) и при 188 нм ( $\Delta\epsilon \sim 18$ ), отри-

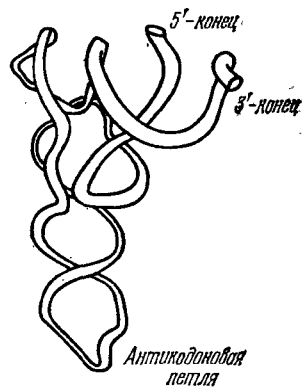


Рис. 8.9. Пространственная структура Фен-тРНК (Рич)

цательные максимумы при 296 нм ( $\Delta\epsilon = -0,35$ ), 233 нм ( $\Delta\epsilon = -1,0$ ), 210 нм ( $\Delta\epsilon \sim -5,0$ ). Полосы эти конформационно чувствительны.

Исследование миграции энергии между люминесцирующим основанием, находящимся в антикодоновой петле молекулы Фен — тРНК, и хромофорами (акридиновые красители), ковалентно присоединенными к акцепторному концу, позволило оценить расстояние между ними в согласии со структурными данными.

## § 8.5. Трансляция

Трансляция, перевод полинуклеотидного текста ДНК и мРНК в аминокислотный, белковый текст происходит в комплексах рибосом с полирибонуклеотидными цепями, т. е. в полисомах.

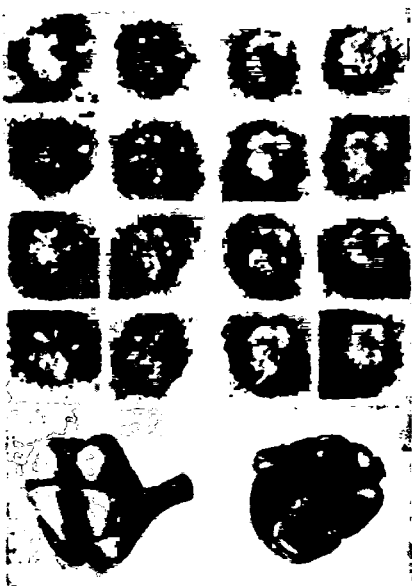


Рис. 8.10. Электронные микрофотографии прокариотических рибосом (увеличение 360 000) и соответствующая модель (Васильев)

Рибосомы наблюдаются с помощью электронного микроскопа (рис. 8.10) как округлые гранулы диаметром 15—25 нм. Характеристики рибосом приведены в табл. 8.2.

Рибосомы эукариот (клеток, содержащих ядра) характеризуются большим значением  $S_{20,w}^0$  (80S, а не 70S), м. м.  $(4,1-4,7) \cdot 10^6$  и несколько большими размерами (сухой объем  $5 \cdot 10^3$  нм<sup>3</sup>). 70S-рибосомы состоят из двух субъединиц 30S и 50S, на которые они распадаются при уменьшении концентрации двухвалентных ионов ( $Mg^{2+}$ ) или при увеличении концентрации одновалентных ионов. М. м. 50S-частиц  $1,8 \cdot 10^6$ , 30S-частиц  $(0,7-1,0) \cdot 10^6$ .

Рибосомальные РНК составляют примерно 65% сухого веса рибосом, белки — 35%. Эти РНК разделяются на 3 класса:

23—28S, м. м.  $\geq 1 \cdot 10^6$ ; 16—18S, м. м.  $< 1 \cdot 10^6$ , и низкомолекулярные РНК — 5S, м. м.  $\sim 40\,000$ . Вероятно, молекулы белка взаимодействуют с неспирализованными участками рРНК, рибонуклеотридеидный комплекс сворачивается в компактную структуру рибосомной субъединицы. В 70S-рибосоме содержится примерно 65 полипептидных цепей со средней молекулярной массой 65 000. В 30S-частицах имеется 19—20 сортов белков, в 50S-частицах их более 50.