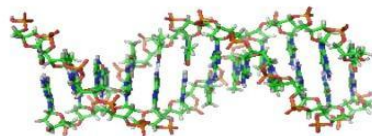


# НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ. (ОТРАБОТКА)

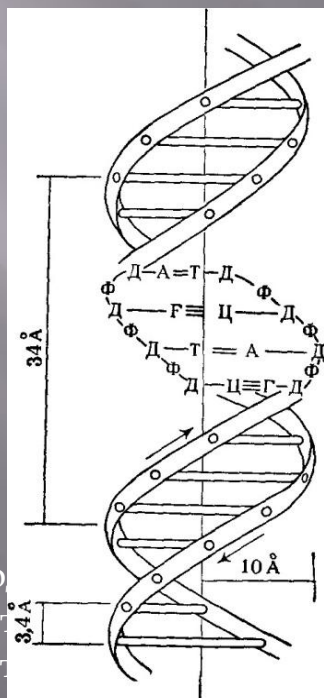
студентки группы С-105  
Юсуповой Дианы  
Руководитель  
Елена Михайловна

Открытие нуклеиновых кислот связано с именем молодого врача из города Базеля (Швейцария) Фридриха Мишера. После окончания медицинского факультета Мишер был послан для усовершенствования и работы над диссертацией в Тюбинген (Германия) в физиолого-химическую лабораторию, возглавляемую Ф. Гоппе-Зейлером. Тюбингенская лаборатория в то время была известна ученому миру. Пройдя практику по органической химии, Мишер приступил к работе в биохимической лаборатории. Ему было поручено заняться изучением химического состава гноя. Молодой ученый не возражал против предложенной темы, так как считал лейкоциты, присутствующие в гное, одними из самых простых клеток.

## Нуклеиновые кислоты



Нуклеиновые кислоты в природе встречаются во всех живых клетках. Живые клетки, за исключением сперматозоидов, в норме содержат значительно больше рибонуклеиновой, чем дезоксирибонуклеиновой кислоты.



На метод исследования влияния температуры на процесс денатурации дезоксирибонуклеиновых кислот оказало большое влияние то обстоятельство, что в присутствии хлорида натрия, а также когда как рибонуклеопротеиды и рибонуклеиновые кислоты растают в кипящем (0,15 М) растворе хлористого натрия, дезоксирибонуклеопротеидные комплексы фактически в нем нерастворимы.

Поэтому гомогенизированный орган или организм тщательно промывают разбавленным

В клетках эукариот (например, животных или растений) ДНК находится в ядре клетки в составе хромосом, а также в некоторых клеточных органоидах (митохондриях и пластидах). В клетках прокариотических организмов (бактерий и архей) кольцевая или линейная молекула ДНК, так называемый нуклеотид, прикреплена изнутри к клеточной мембране. У них и у низших эукариот (например, дрожжей) встречаются также небольшие автономные, преимущественно кольцевые молекулы ДНК, называемые плазмидами. Кроме того, одно- или двухцепочечные молекулы ДНК могут образовывать геном ДНК-содержащих вирусов.

# ПОЛУЧЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В клетках нуклеиновые кислоты связаны с белками, образуя нуклеопротеиды. Выделение нуклеиновых кислот сводится к очистке их от белков. Для этого препараты, содержащие нуклеиновые кислоты, обрабатывают ПАВ и экстрагируют белки фенолом. Послед, очистка и фракционирование нуклеиновых кислот проводятся с помощью ультрацентрифугирования, различных видов жидкостной хроматографии и гель - электрофореза. Для получения индивидуальных нуклеиновых кислот обычно используют различные варианты последнего метода.

Современные методы химического синтеза нуклеиновых кислот позволяют получать крупные фрагменты ДНК, в том числе целые гены. Методические основы химически - ферментативных методов синтеза ДНК разработаны Х. Кораной.

# Они включают:

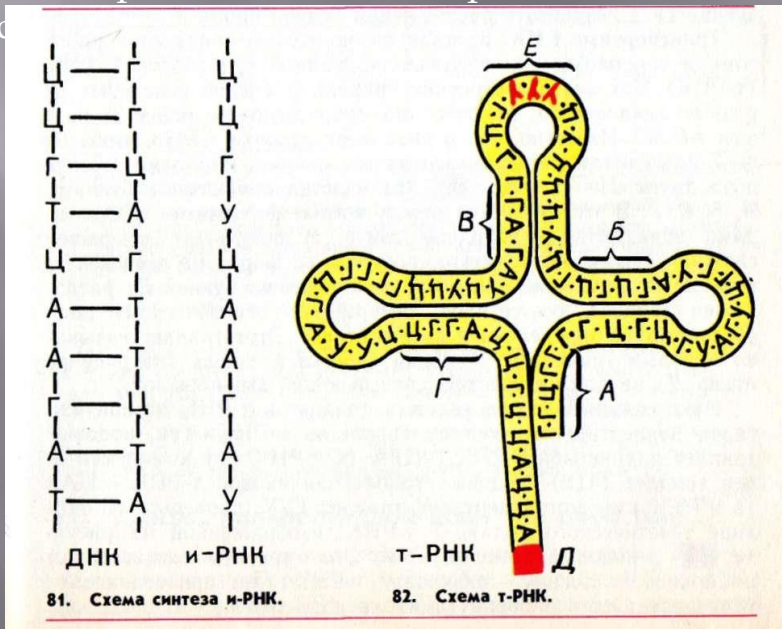
химический синтез комплементарных, взаимоперекрывающихся олигонуклеотидов, из которых затем в результате комплементационных взаимодействий выстраиваются дуплексы - фрагменты молекулы синтезируемой ДНК с несовпадающими разрывами в обеих цепях;

соединение (лигирование) таких олигонуклеотидов в составе дуплекса с помощью фермента T4 ДНК-лигазы. Сборку протяженных ДНК из синтетически однотяжевых олигонуклеотидов проводят в несколько этапов. Сначала собирают небольшие дуплексы с "липкими" концами (однотяжевыми комплементарными участками), из которых затем последовательно формируют более протяженные структуры. Таким образом могут быть получены искусственные фрагменты ДНК большой длины и с любой нуклеотидной последовательностью. С помощью генетической инженерии возможно клонирование (получение в индивидуальном виде и размножение) искусственных ДНК.



## Стандартность операций в твердофазном синтезе олигонуклеотидов явилась основой для автоматизации процесса.

Принцип работы автомата-синтезатора основан на подаче в реактор с помощью насоса (под контролем микропроцессора) защищенных нуклеотидных компонентов реагентов и растворителей по заданной программе в колонку, содержащую полимерный носитель с закрепленным на нем первым нуклеозидом. После окончания синтеза и отделения полностью защищенного олигонуклеотида от полимерного носителя проводят деблокирование, очистку и анализ синтезированных фрагментов ДНК. Так, с помощью гидрофосфорильного метода в автомате - синтезаторе за несколько часов получают 30-40-звенные олигонуклеотиды; возможен синтез более чем 100-звенных фрагментов ДНК. Разработаны синтезаторы, позволяющие проводить одновременно синтез неск



# ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

## Нуклеиновые кислоты:

- хорошо растворимы в воде
- практически не растворимы в органических растворителях.
- очень чувствительны к действию температуры и критических значений уровня рН.
- молекулы ДНК с высокой молекулярной массой, выделенные из природных источников, способны фрагментироваться под действием механических сил, например при перемешивании раствора.
- нуклеиновые кислоты фрагментируются ферментами -- нуклеазами.



# Химические свойства РНК.

Напоминают свойства ДНК, однако наличие дополнительных групп ОН в рибозе и меньшее (в сравнении с ДНК) содержание стабилизированных спиральных участков делает молекулы РНК химически более уязвимыми. При действии кислот или щелочей основные фрагменты полимерной цепи  $P(O)-O-CH_2$  легко гидролизуются, группировки А, У, Г и Ц отщепляются легче. Если нужно получить мономерные фрагменты, сохранив при этом химически связанные гетероциклы, используют деликатно действующие ферменты, называемые рибонкулеазами

# Химические свойства ДНК

В воде ДНК образует вязкие растворы, при нагревании таких растворов до  $60^{\circ}\text{C}$  или при действии щелочей двойная спираль распадается на две составляющие цепи, которые вновь могут объединиться, если вернуться к исходным условиям. В слабокислых условиях происходит гидролиз, в результате частично расщепляются фрагменты - P-O-CH<sub>2</sub>- с образованием фрагментов - P-OH и HO-CH<sub>2</sub>, соответственно образуются мономерные, димерные (сдвоенные) или полимерные (утроенные) кислоты, представляющие собой звенья, из которых была собрана цепь ДНК.

Участие ДНК и РНК в синтезе белков - одна из основных функций нуклеиновых кислот. Белки - важнейшие компоненты каждого живого организма. Мышцы, внутренние органы, костная ткань, кожный и волосяной покров млекопитающих состоят из белков. Это полимерные соединения, которые собираются в живом организме из различных аминокислот. В такой сборке управляющую роль играют нуклеиновые кислоты, процесс проходит в две стадии, причем на каждой из них определяющий фактор - **взаимоориентация азотсодержащих гетероциклов ДНК и РНК.**

Основная задача ДНК - хранить записанную информацию и предоставлять в тот момент, когда начинается синтез белков. В связи с этим понятна повышенная химическая устойчивость ДНК в сравнении с РНК.