**Основные вопросы, выносимые на обсуждение семинара.**

1. Денатурация и ренатурация ДНК.
2. Термодинамика ДНК.
3. Использование гибридизации нуклеиновых кислот в молекулярно-генетических экспериментах.

**Краткое содержание темы:**

Гибридизация нуклеиновых кислот — соединение комплементарных одноцепочечных нуклеиновых кислот в одну молекулу. При полной комплементарности объединение происходит легко и быстро, а в случае частичной некомплементарности слияние цепочек замедляется, что позволяет оценить степень комплементарности. Возможна гибридизация ДНК-ДНК и ДНК-РНК.

Вторичная структура ДНК играет важную роль в биологии, генетической диагностике и других методах молекулярной биологии и нанотехнологии. Поэтому, точное определение температуры плавления ДНК или РНК молекул играет самую главную роль во всех молекулярно-биологических методах, например, как подбор проб или олигонуклеотидов для микрочипов или для подбора ПЦР праймеров. Существует несколько простых формул вычисления температуры плавления для коротких олигонуклеотидов. Грубое вычисление температуры плавления (Tm) короткого олигонуклеотида (<20 нуклеотидов) проводят по прямому подсчету количества нуклеотидов (G+C — сумма всех гуанинов и цитозинов, L — длина олигонуклеотида):

T_m =2(L+G+C)

Усредненная формула подсчета Tm для короткого олигонуклеотида (и для длинных ДНК фрагментов), с учетом концентрации ионов K+ и DMSO:

T_m = 77.1+11.7\lg[K^+]+\frac{41(G+C)- 528}{L}-0.75[%DMSO]

Однако эти уравнения не учитывают инициацию связывания при гибридизации олигонуклеотида, не учитывают особенности самой последовательности и концевого эффекта, характерного для олигонуклеотидных дуплексов. Поэтому, данная формула пригодна в большей степени, где последовательность ДНК усредненная и длина дуплексов свыше 40 нуклеотидов.

**Вычисление температуры плавления**

Термодинамические параметры dG, dH и dS рассчитываются на основе модели ближайших соседей (nearest neighbour). Для точного прогнозирования вторичной структуры ДНК при гибридизации с использованием динамических алгоритмов программирования требуется база данных по всем возможным термодинамическим параметрам для каждой комплементарной пары оснований, а также для для всех вариантов при не совпадающих нуклеотидов, для свободных концов, шпилек и петель. Термодинамическая формула вычисления короткого олигонуклеотида основывается на термодинамических параметрах — энтропии dS и энтальпии dH, для каждой из 10 вариантов сочетаний четырех нуклеотидов. В таблице ниже представлены термодинамические параметры для ближайших соседей (NN) для пар нуклеотидов при концентрации 1М NaCl.

Для подсчета Tm (°С) осуществляется суммирование всех значений свободной энергии Гиббса для каждой пары с шагом один нуклеотид:

dGобщая = dGначальное + dGсиметрия +∑dG + dGATконец

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 5’-CGTTGA-3’ | = dGначальное + dGсиметрия + | CG + GT + TT + TG + GA + ATконец |
| 3’-GCAACT-5’ |  | GC    CA    AA    AC     CT |

dGтеоретическая = 1.96 + 0 - 2.17 – 1.44 – 1.44 – 1.00 – 1.45 – 1.30 +0.05

dGтеоретическая = -5.35 kcal/mol

Аналогично подсчитываются значения энтропии (dH = -43.5 kcal/mol) и энтальпии (dS = -122.5):

T_m =\frac{-43.5\cdot1000}{-122.5+1.9872\ln(\frac{0.0004}{4})}-273.15=35.8

Многие ДНК дуплексы имеют конкурирующие однонитевые структуры, и это сдвигает равновесии системы и как результат снижение значения Tm от предсказуемой формулой значения.

Общая формула для вычисления Tm с коррекцией на соль в растворе:

T_m =\frac{dH\cdot1000}{dS+R\ln(\frac{C}{4})+0.386(L-1)\ln([K^+])}-273.15

где L - длина олигонуклеотида, R — газовая постоянная (1.987cal/K mol), c — концентрация олигонуклеотида в (обычно 2x10−7 M), [K+] — концентрация ионов калия в молях (обычно 5x10−2M).

Одиночная ошибка внутри дуплекса

Модель ближайших соседей для комплементарных нуклеотидных пар может быть расширена для пары, включающие некомплементарные нуклеотиды. Было показано, что существует тенденция уменьшающая стабильность не комплементарных пар оснований в порядке убывания:

**G-C** > **A-T** > G·G > G·T ≥ G·A > T·T ≥ A·A > T·C ≥ A·C ≥ C·C

Гуанин G является наиболее «неразборчивым» основанием, поскольку он образует как самые «сильные» пары оснований так и стабильные пары с некомплементарными основаниями (G·G, G·T и G·A). С другой стороны, цитозин C является наиболее дискриминационным основанием, поскольку он образует самые стабильные комплементарные пары и неустойчивые пары с некомплементарными основаниями (T·C ≥ A·C ≥ C·C).