**Тема: Термодинамика ДНК.**

**Цель:** Вычисление температуры плавления фрагментов ДНК. Анализ фактического материала, оформление полученных данных.

**Краткое содержание темы.**

Гибридизация ДНК, гибридизация нуклеиновых кислот — соединение *in vitro* 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.

Протокол эксперимента

1. Двухцепочечную ДНК разогревают в соответствующем буфере. Из-за изменения внешних условий водородные связи между комплементарными азотистыми основаниями становятся термодинамически невыгодными и цепочки расходятся.

2. Препарат денатурированных ДНК смешивают с другой денатурированной ДНК.

3. Препараты медленно охлаждают, при этом одноцепочечные ДНК гибридизуются друг на друга (образуются водородные связи между комплементарными основаниями), при этом образуется «гибридная» молекула ДНК.

Анализ скорости отжига (= гибридизации) одноцепочечных ДНК позволяет оценивать сходства и различия в последовательностях ДНК между видами или особями одного вида.

**Вычисление температуры плавления ДНК**

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 (<20нуклеотидов) 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, характерный для олигонуклеотидных дуплексов. Поэтому, данная формула пригодна в большей степени, где последовательность ДНК усредненная и длина дуплексов свыше 40 нуклеотидов.

ДНК термодинамика

Наиболее распространенный метод используемый сегодня для расчета температуры плавления двухцепочечной или одноцепочечной ДНК, основан на двухступенчатой термодинамической модели. Две комплементарные ДНК молекулы А и В, либо они связаны друг с другом либо свободны в растворе («random coil state»). Обычно считается, что обе молекулы А и В полностью комплементарны, поэтому очевидна их гибридизация, а также разрешены одна или несколько ошибок комплементарности в дуплекс, в том числе допустимы и некомплементарные G-G, G-T и G-A пары. В случае же только одной молекулы предполагается упаковка её в петлевую структуру. Процесс гибридизации в дуплекс описывается формулой:

A + B \longleftrightarrow  AB

где А и В разные цепи в растворе («random coil state»), и АВ образованный дуплекс. Данная реакция обратима. Константа равновесия k, для этой реакции определяется как: k=\frac{[AB]}{[A][B]}.

Константа равновесия зависит от концентрации цепей, от температуры, концентрации солей, рН и других компонентов в реакции (например, глицерин или DMSO). Константа К меняется в ответ на изменение концентрации одной или обоих цепей ([At] и/или [Bt]), тогда вся система отвечает на изменения, и тогда индивидуальные концентрации [A], [B] и [AB] тоже изменятся.