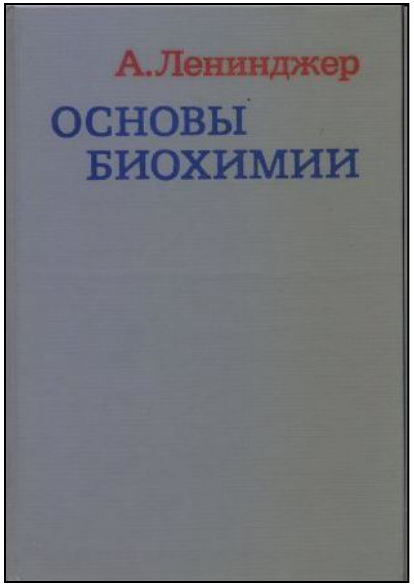
Кантор Ч., Шиммел П. Биофизическая химия: В 3-х т. Пер. с англ. - М.: Мир, 1984. - Т. 1 - 336 с.,ил.

Кантор Ч., Шиммел П. Биофизическая химия: в 3-х т. Пер. с англ. - М.: Мир, 1984. - Т. 2 - 496 с.,ил.

Кантор Ч., Шиммел П. Биофизическая химия: в 3-х т. Пер. с англ. - М.: Мир, 1985. - Т. 3 - 536 с.,ил.



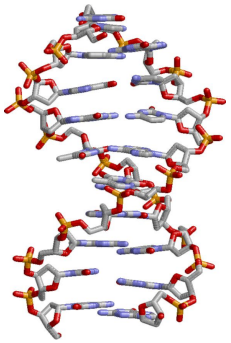
Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т. Пер. с англ. - М.: Мир, 1985. - Т. 1 - 367 с.,ил.

Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т. Пер. с англ. - М.: Мир, 1985. - Т. 2 - 368 с.,ил.

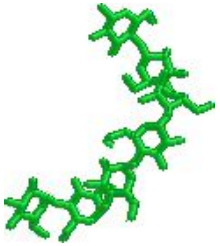
Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т. Пер. с англ. - М.: Мир, 1985. - Т. 3 - 320 с.,ил.

Биополимеры

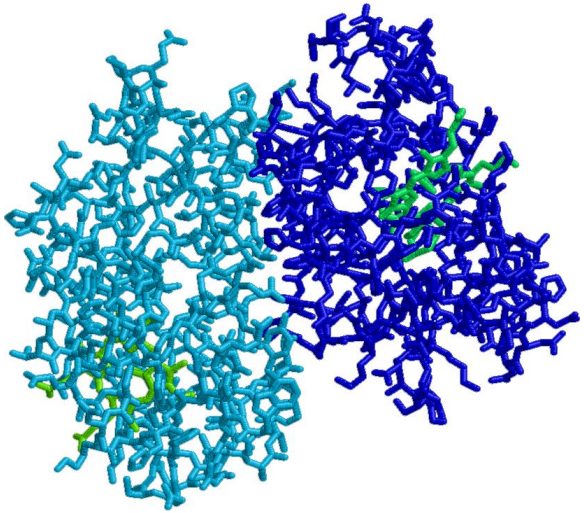
Нуклеиновые кислоты



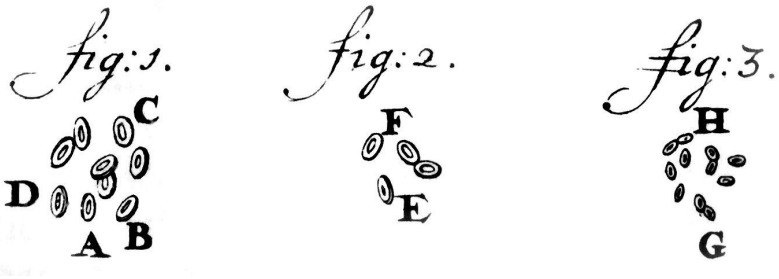
Полисахариды



Белки



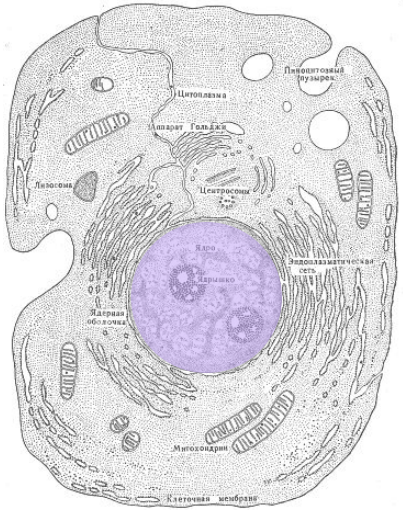
Nucleus



Первые из известных изображений клеточных ядер. А. Левенгук (1632 – 1723), 1719

Фридрих Мишер
1844—1895

Феликс Хопп-Зейлер
1825—1895



1869 (1871)

Уровни структурной организации биополимеров

Первичная структура –
полная ковалентная структура молекулы

Вторичная структура – совокупность спиральных участков молекулы (не зависящая от состава мономеров).
Белки – *водородные связи*.
Нуклеиновые кислоты – *водородные связи (уотсон-криковские пары), стэкинг-взаимодействия*.

Третичная структура – полная трехмерная структура молекулы (зависящая от состава мономеров)
Белки – *все виды связей*.
Нуклеиновые кислоты – *водородные связи (не уотсон-криковские пары)*.

Четвертичная структура – пространственное расположение не связанных ковалентно единиц третичной структуры (*нековалентные связи*).

Первичная структура

Последовательность мономеров…

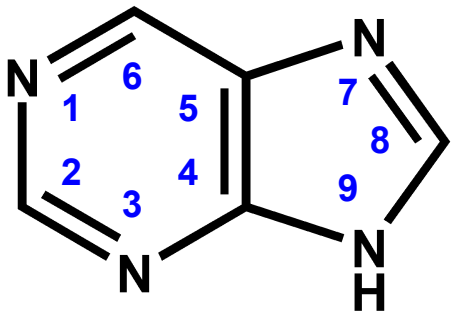
R1-R2-R3-R4-R5-…

соединенных по принципу «голова к хвосту»

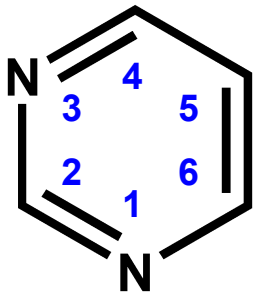
Ra-Rb $\neq$ Rb-Ra

ДНК
Первичная структура

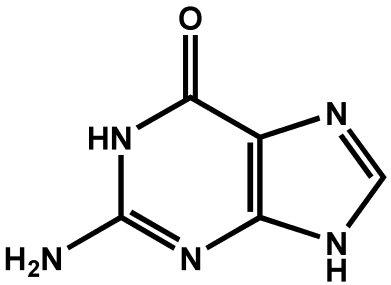
Азотистые основания



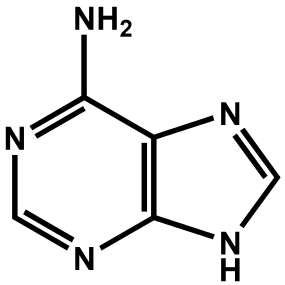
Пурин



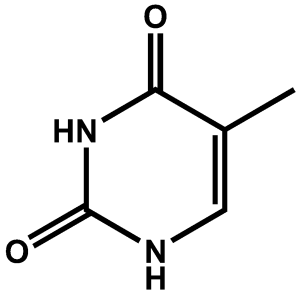
Пиримидин



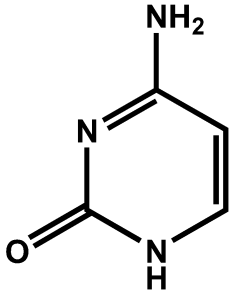
Гуанин



Аденин

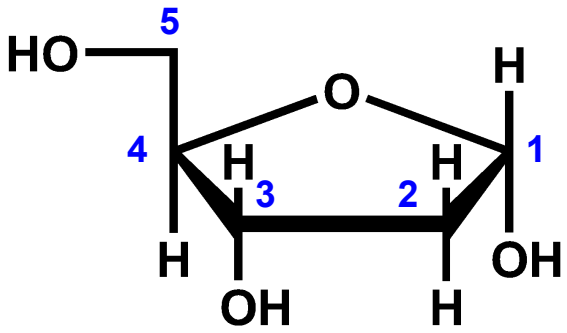


Тимин

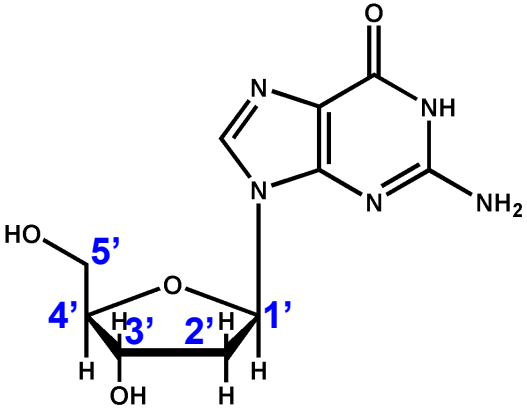


Цитозин

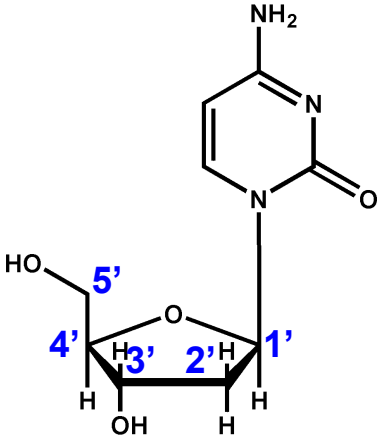
Дезоксирибоза



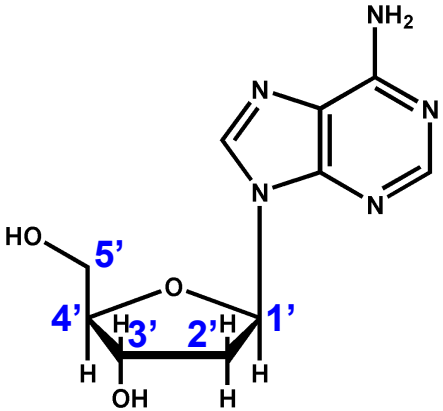
Нуклеозиды
(β-N-гликозиды)



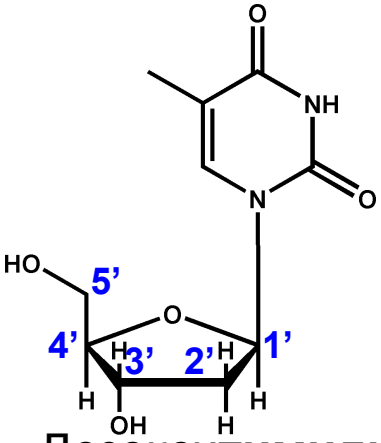
Дезокси**гуанозин**



Дезокси**цитидин**



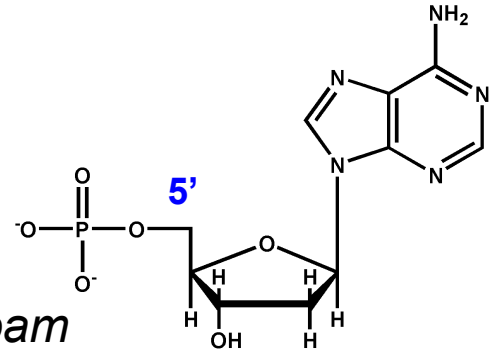
Дезокси**аденозин**



Дезокси**тимидин**

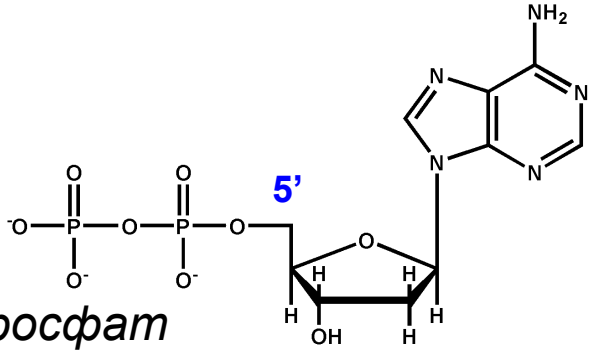
Нуклеотиды - фосфорные эфиры нуклеозидов

Эфиры ортофосфорной кислоты
нуклеозидмонофосфаты



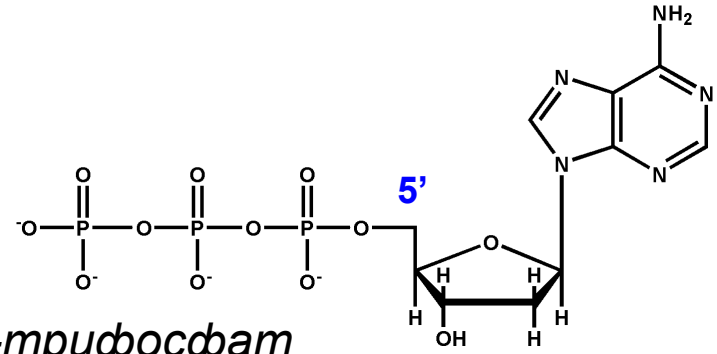
Дезоксиаденозин-5'-монофосфат

Эфиры пирофосфорной кислоты
нуклеозиддифосфаты



Дезоксиаденозин-5'-дифосфат

Эфиры триполифосфорной кислоты
нуклеозидтрифосфаты

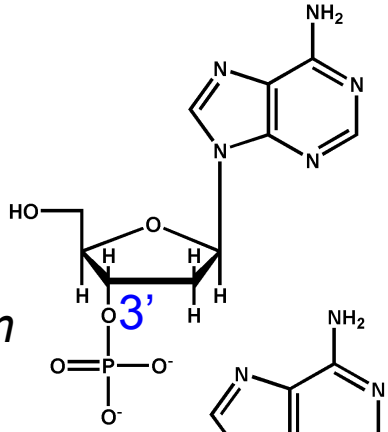


Дезоксиаденозин-5'-трифосфат

Нуклеотиды - фосфорные эфиры нуклеозидов

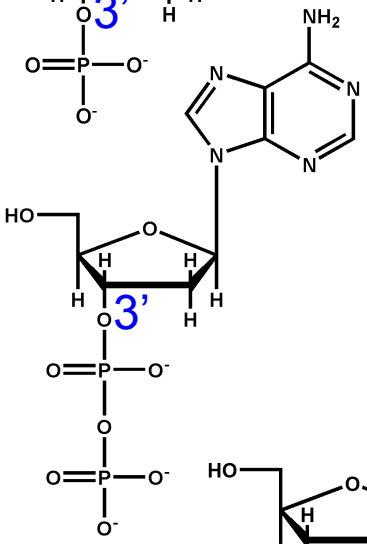
Эфиры ортофосфорной кислоты
нуклеозидмонофосфаты

Дезоксиаденозин-3’-монофосфат



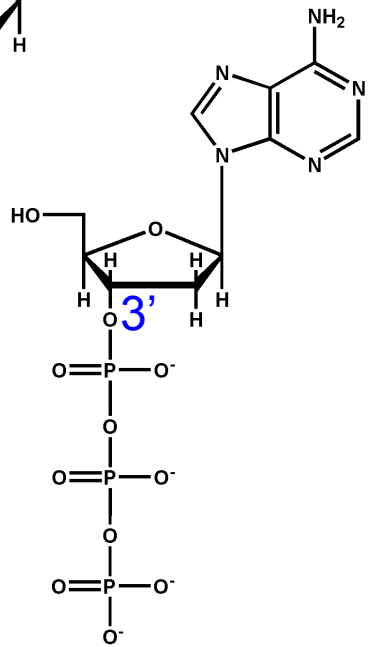
Эфиры пирофосфорной кислоты
нуклеозиддифосфаты

Дезоксиаденозин-3’-дифосфат



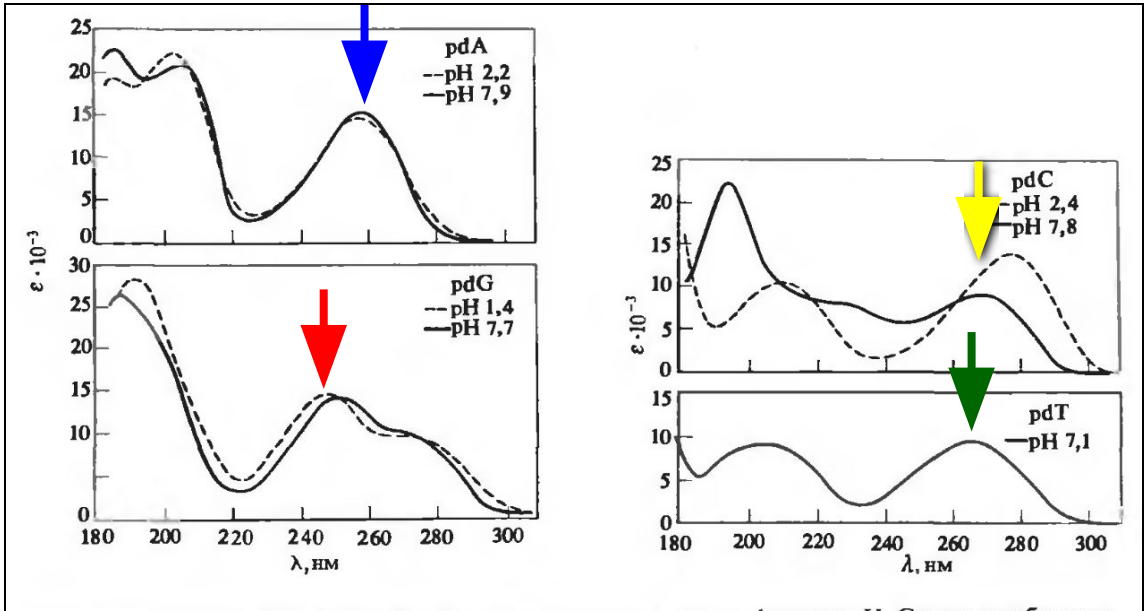
Эфиры триполифосфорной кислоты
нуклеозидтрифосфаты

Дезоксиаденозин-3’-трифосфат



Физические свойства нуклеотидов

Основание	Максисмум УФ-поглощения, нм
Аденин	260
Гуанин	245
Цитозин	268
Тимин	265



Спектры поглощения четырех дезоксинуклеотидов как функция pH. Спектры рибонуклеотидов весьма близки к ним, за исключением спектра уридина (U), у которого $\lambda_{max} = 260$, а не 268 нм, как для dT. [D.Voet, W.B.Gratzer, R.A.Cox, P.Doty, Biopolymers, 1, 193 (1963).]

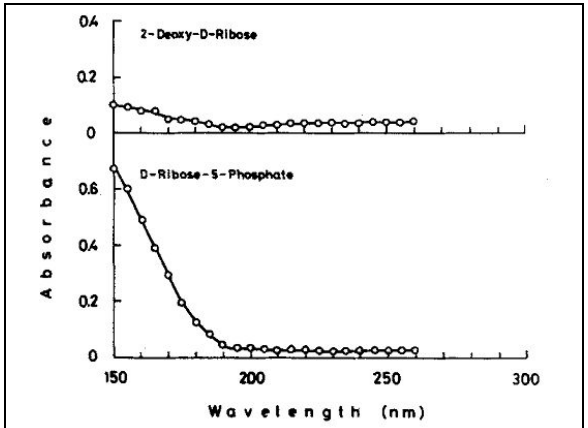
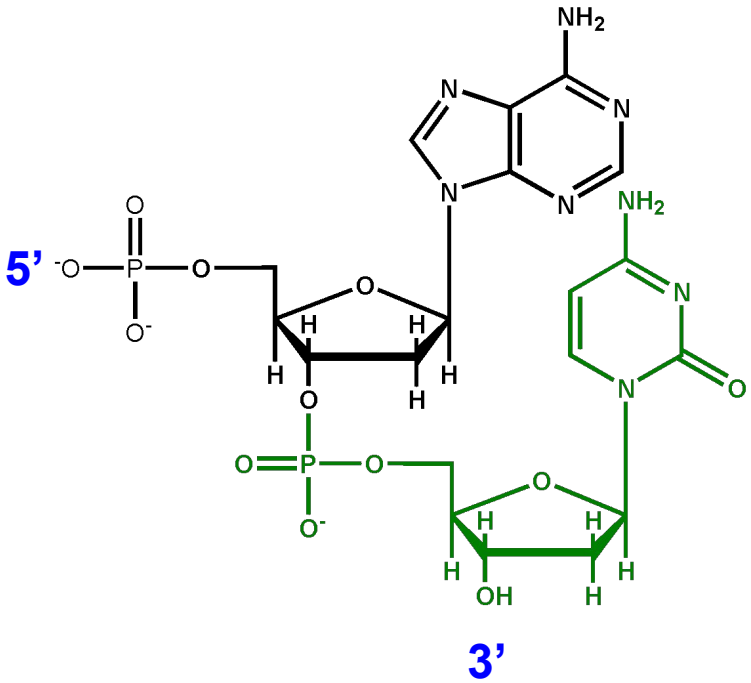


Figure 2. Absorption spectra of 2-deoxy-D-ribose and D-ribose 5-phosphate film.

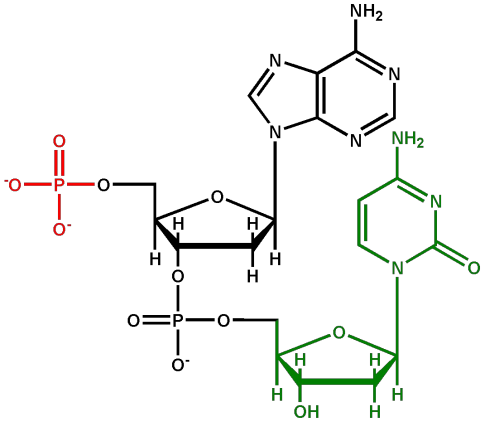
Поглощение в УФ области дезоксирибозы и дезоксирибозо-5-фосфата

Ito A., Ito T. *Photochem Photobiol*. 1986 **44**(3):355-8.

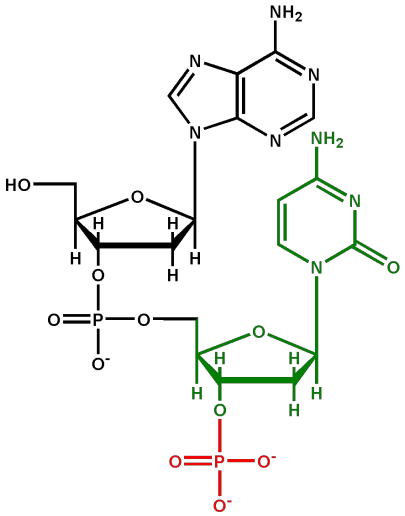
Динуклеотиды NpN



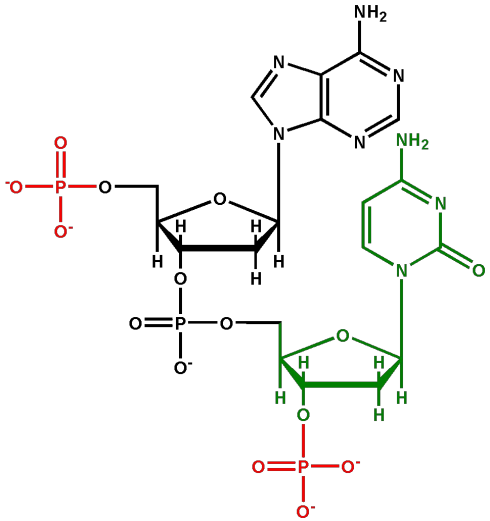
5’-pApC-3’



5’-pApC-3’

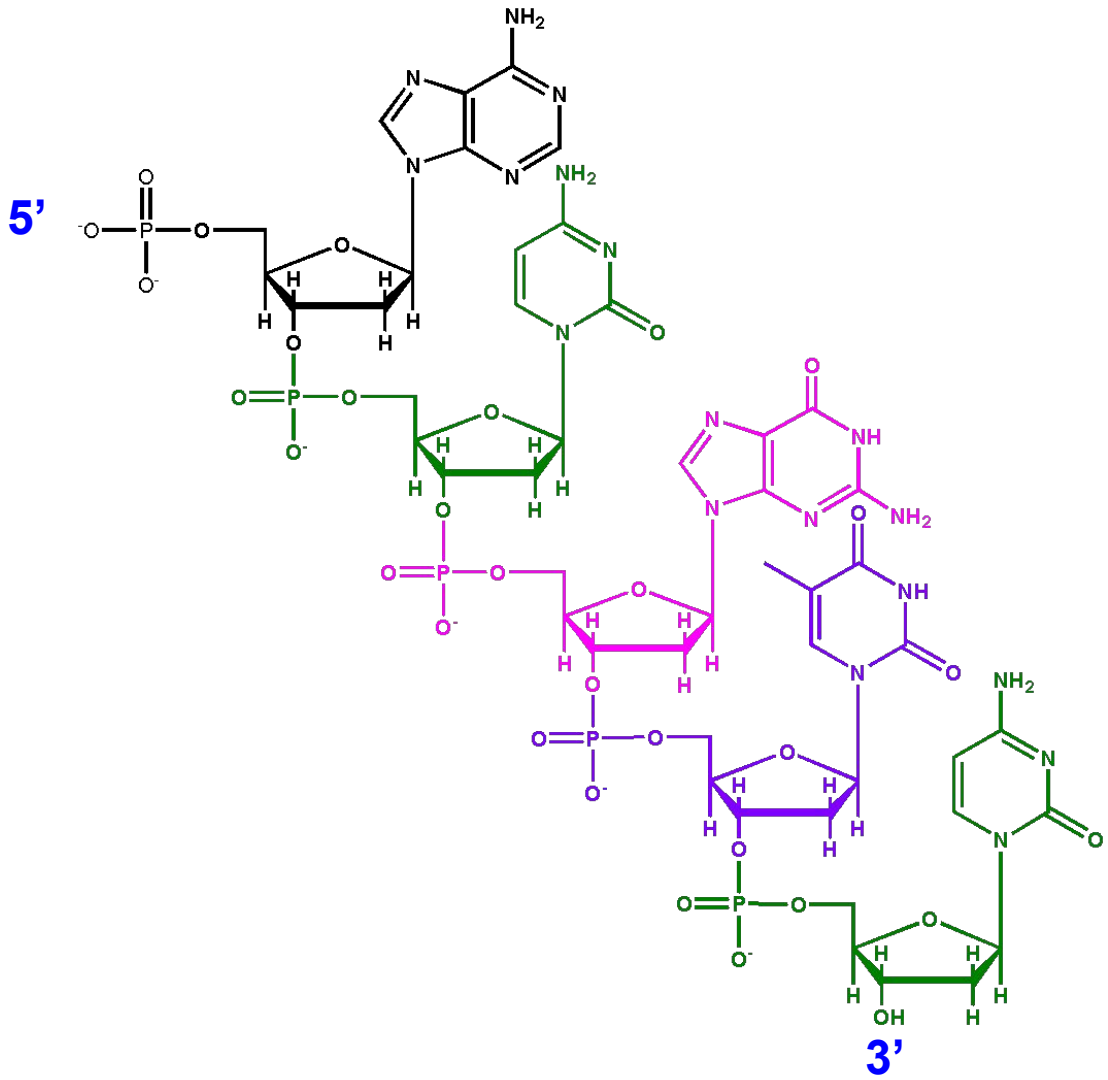


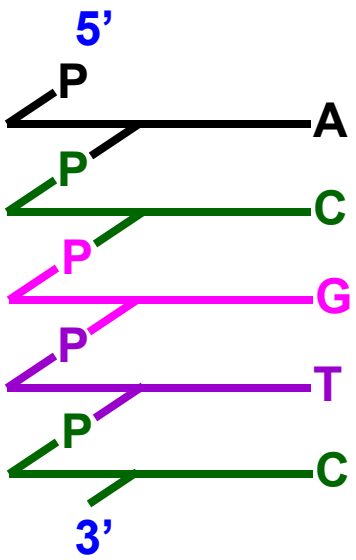
5’-ApCp-3’



5’-pApCp-3’

Олигонуклеотиды и полинуклеотиды NpNpNpNpN…

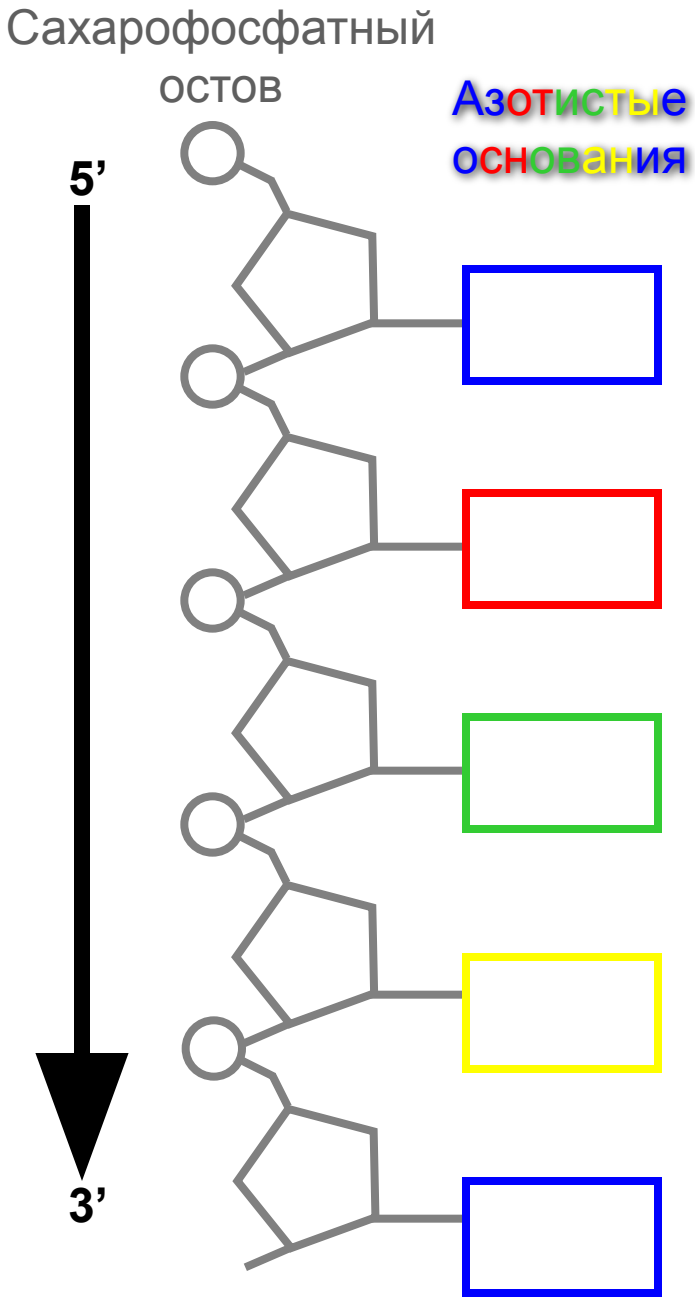




5’-pApCpGpTpC-3’

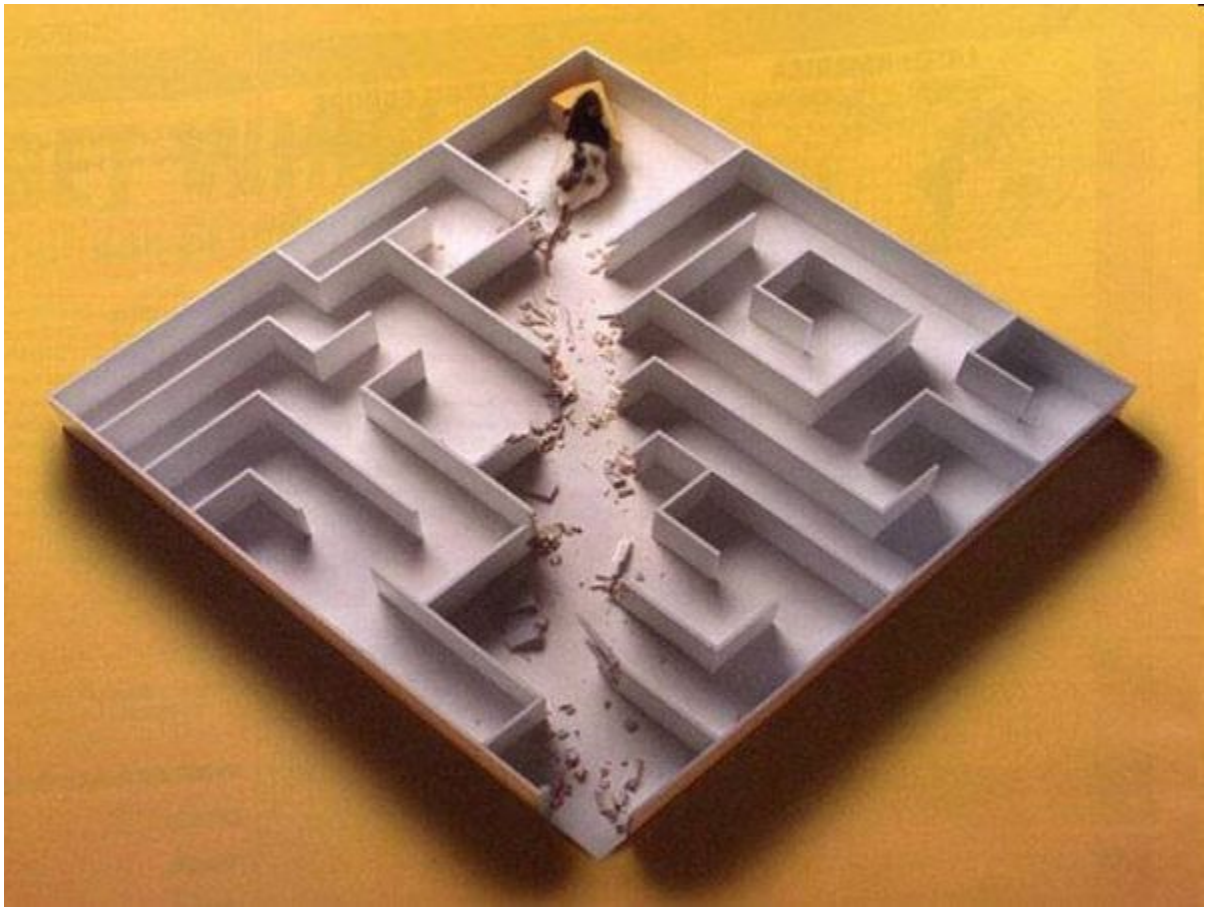
ACGTC

Первичная структура ДНК



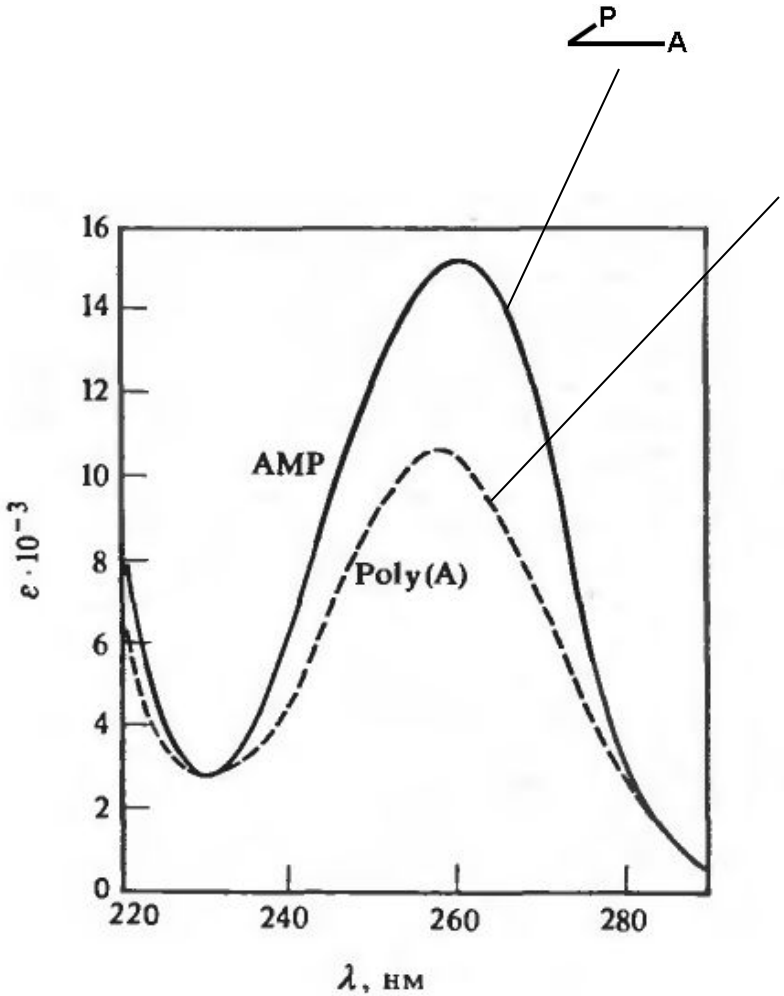
Однобуквенные обозначения

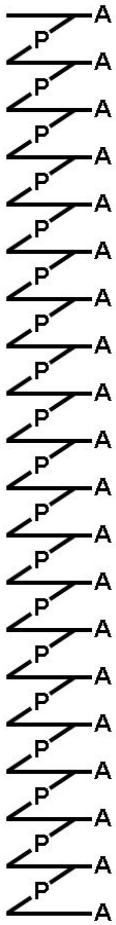
A - аденин
T - тимидин
G - гуанин
C - цитозин
R - пурин (A/G)
Y - пиримидин (T/C)
M - содержащие аминогруппу (A/C)
K - содержащие кетогруппу (G/T)
W - образующие 2 водородные связи (A/T)
S - образующие 3 водородные связи (G/C)
N - любой



ДНК
Вторичная структура

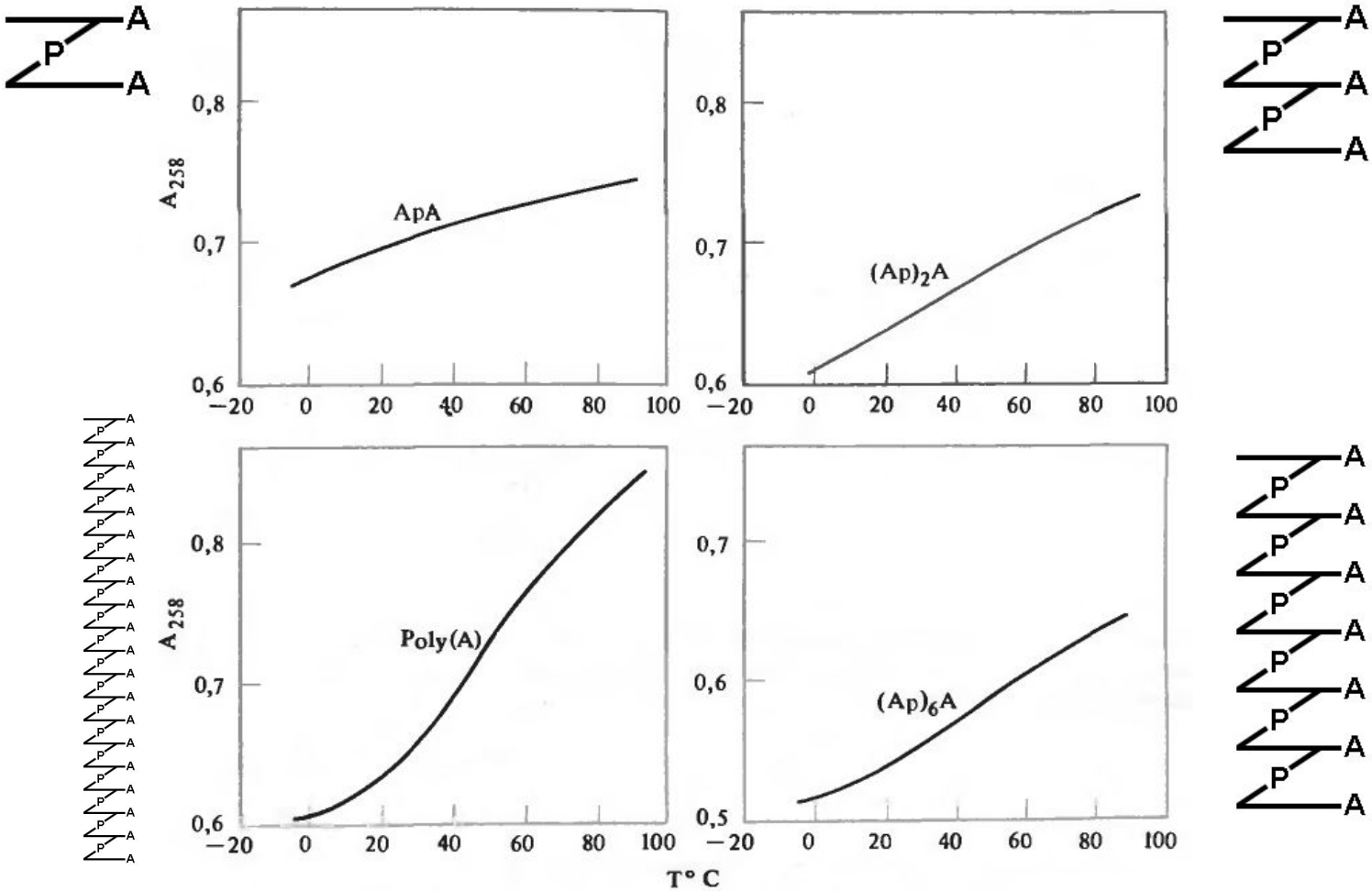
Стэкинг-взаимодействия



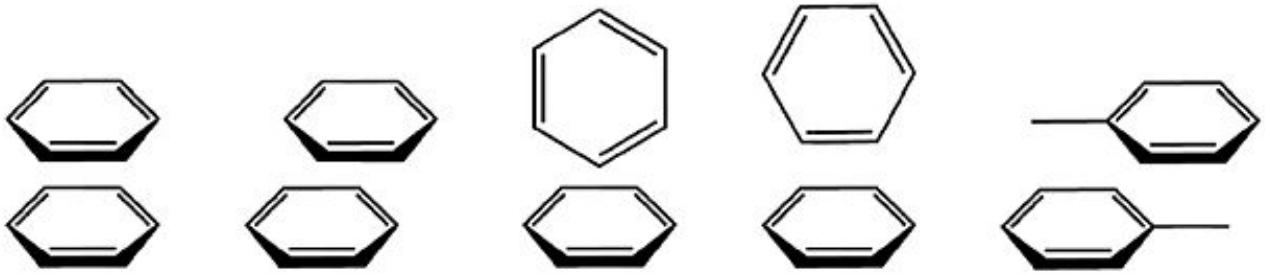


Спектры поглощения AMP и poly (A); отчетливо выражен гипохромизм. [K.E. Van Holde, Physical Biochemistry (Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall, 1971), p. 168.]

Стэкинг-взаимодействия


A
P
A
A
P
A
P
A
A
P
A
P
A
P

Стэкинг-взаимодействия



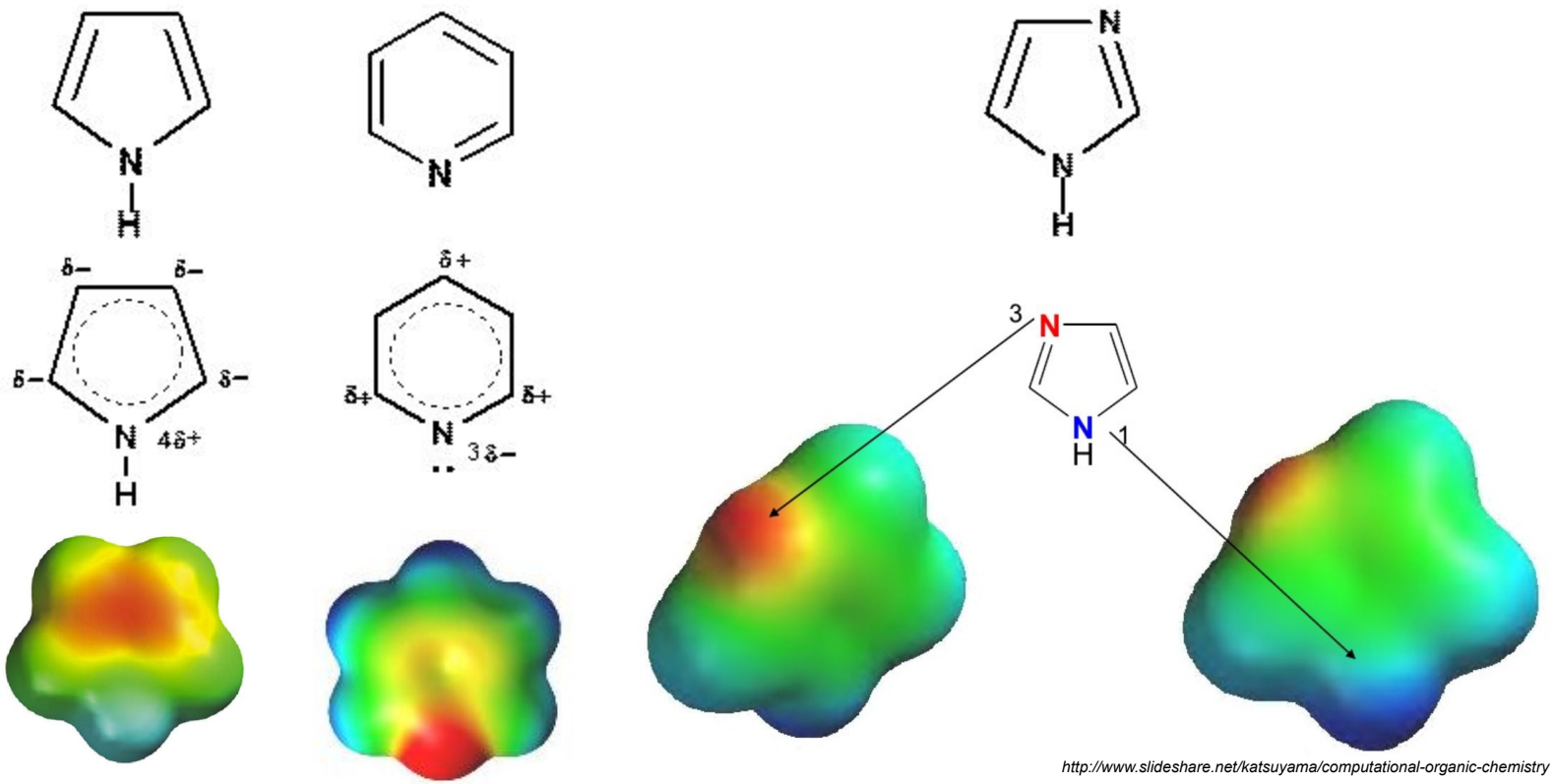
Ориентационное взаимодействие
взаимодействие между
постоянными диполями (сила Кеезома [r^3])

Индукционное взаимодействие
взаимодействие между
постоянным и индуцированным диполем (сила Дебая [r^6])

Дисперсионное взаимодействие
взаимодействие между
мгновенными индуцированными диполями (сила Лондона [r^6])

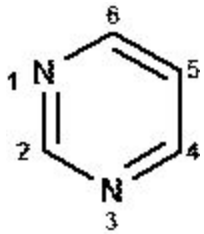
Межмолекулярное отталкивание ([r^{12}])

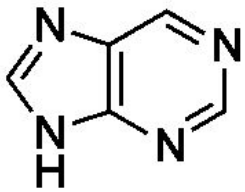
Стэкинг-взаимодействия

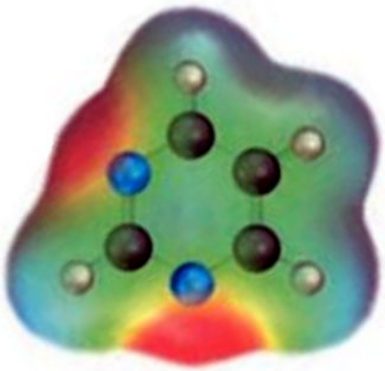


Пиррол Пиридин Имидазол

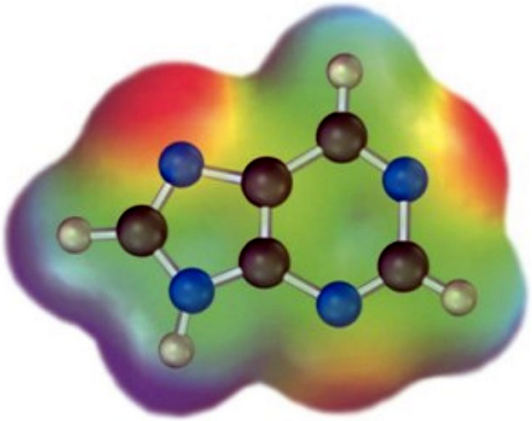
Стэкинг-взаимодействия







http://slideplayer.com/slide/9396582/

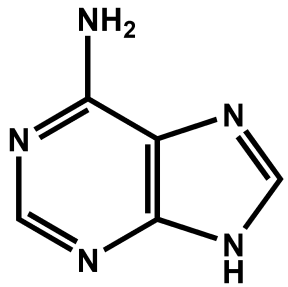


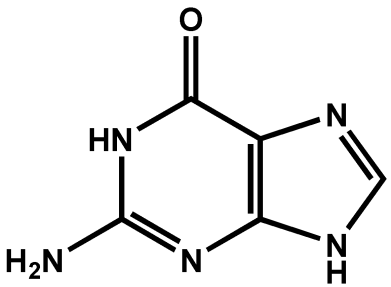
http://slideplayer.com/slide/8380330/

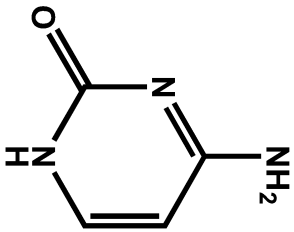
Пиримидин

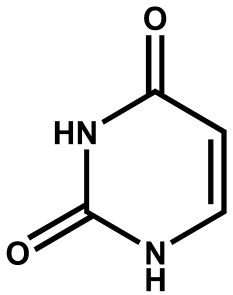
Пурин

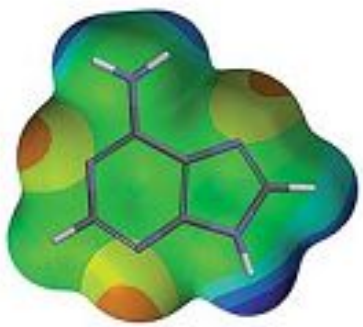
Стэкинг-взаимодействия

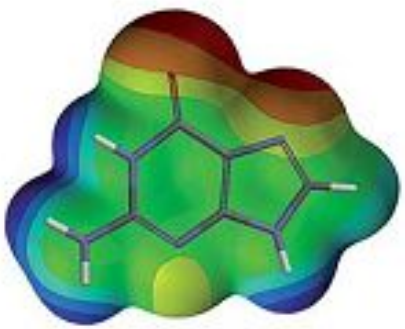


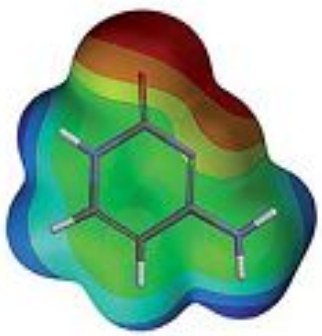


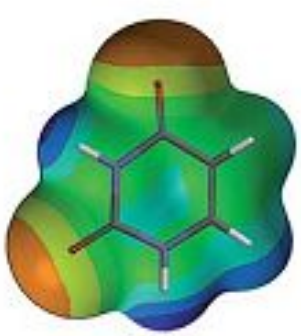








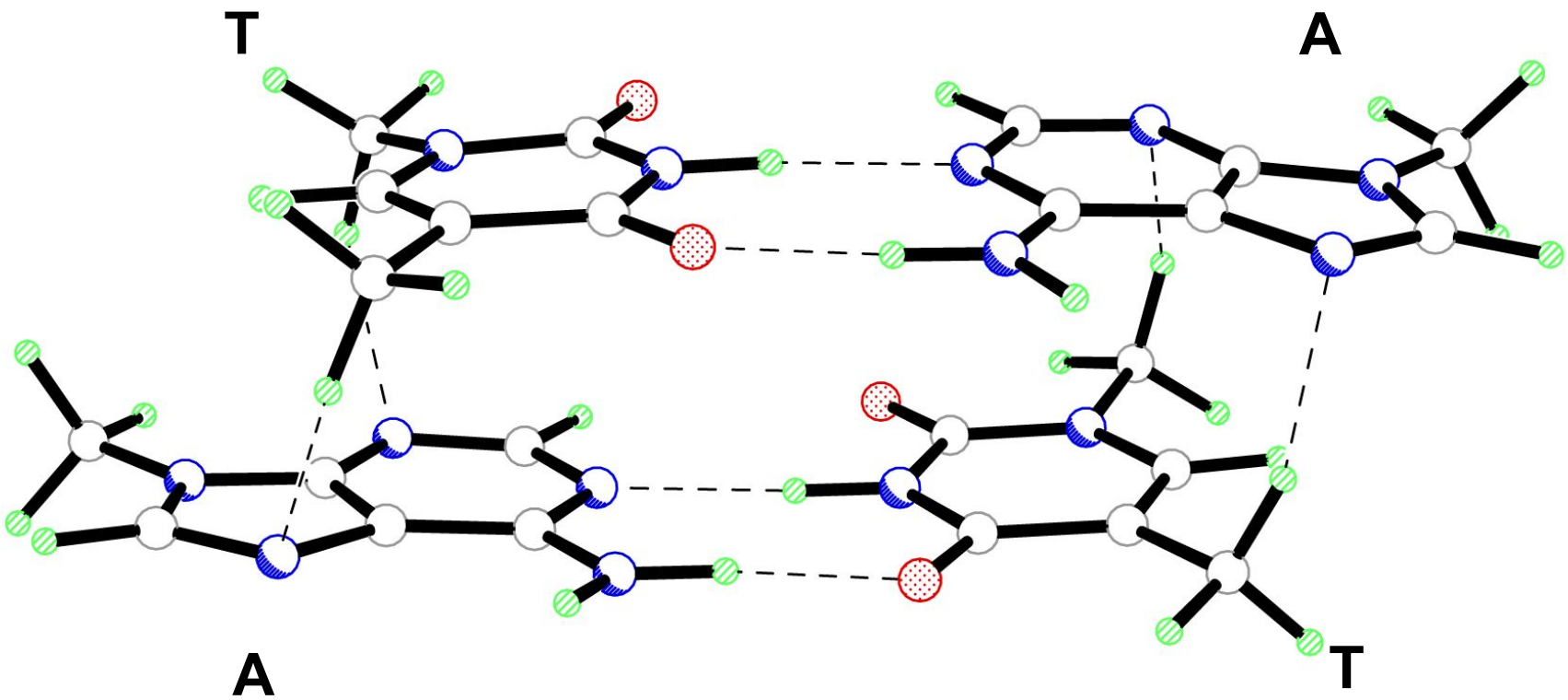




Lucas X. et al. *Chemical Science* 2015, **7**, 1038

Аденин Гуанин Цитозин Урацил

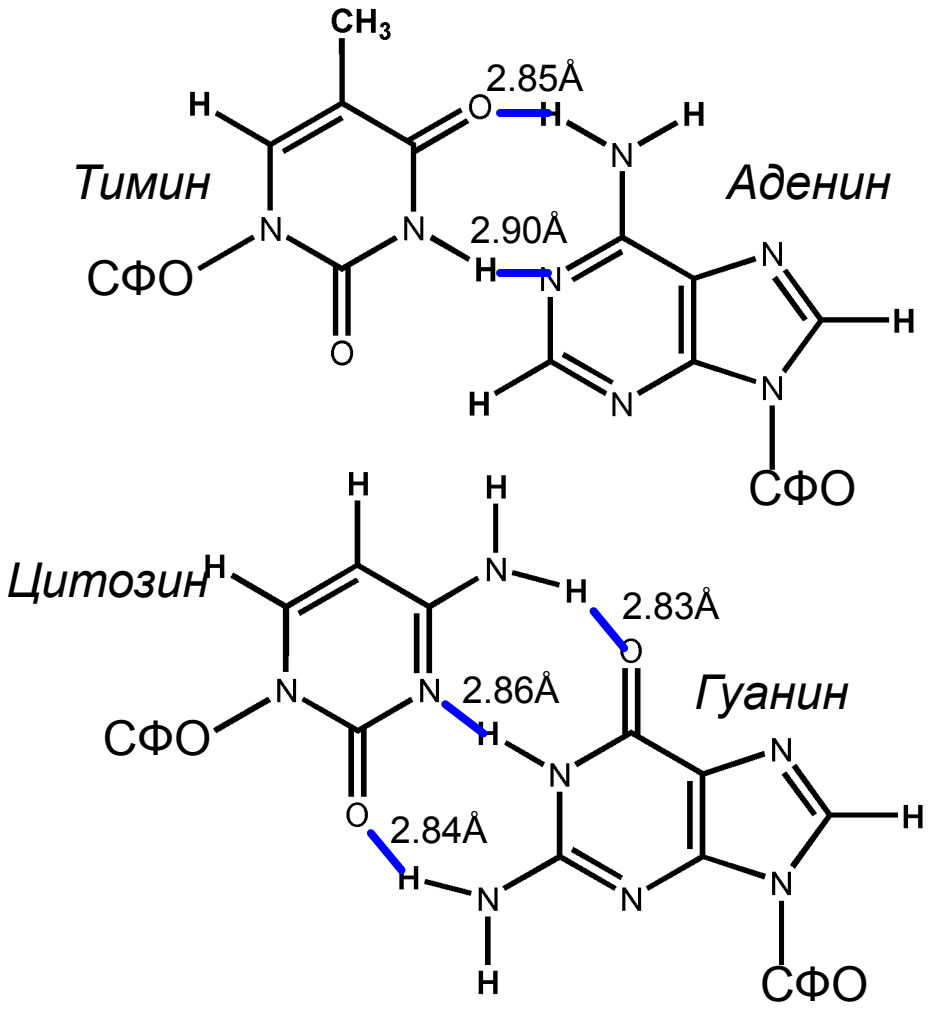
Водородные связи



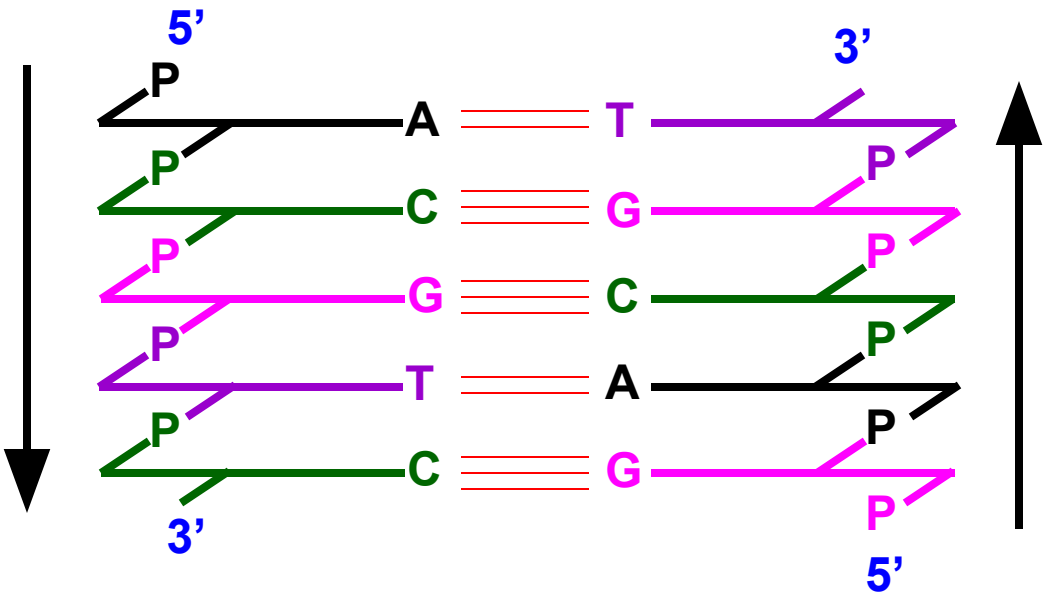
Shishkin O.V. et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2003, **4**(10), 537-547

Водородные связи

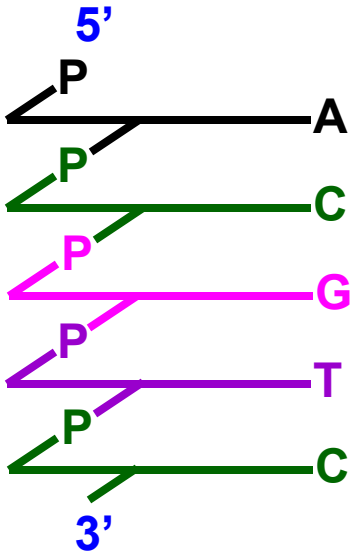
Пары оснований

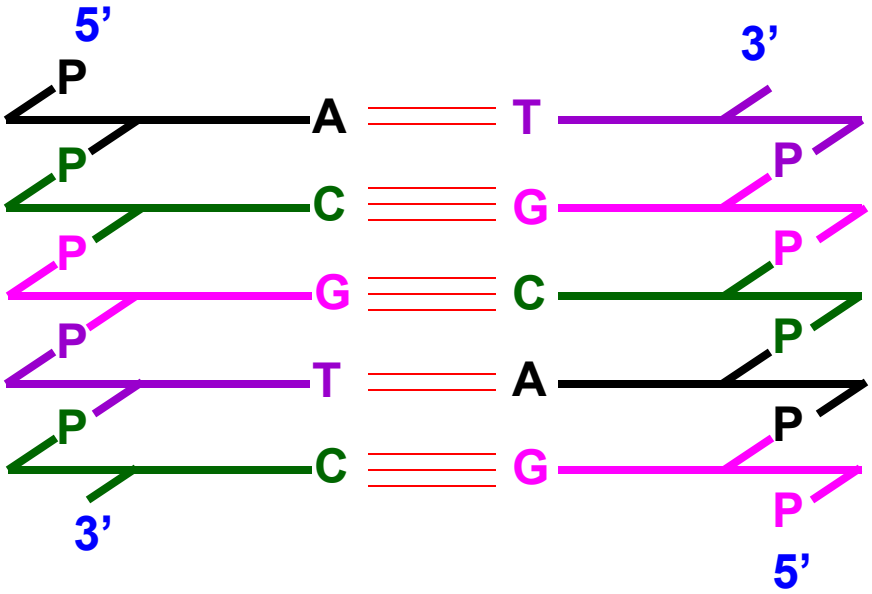


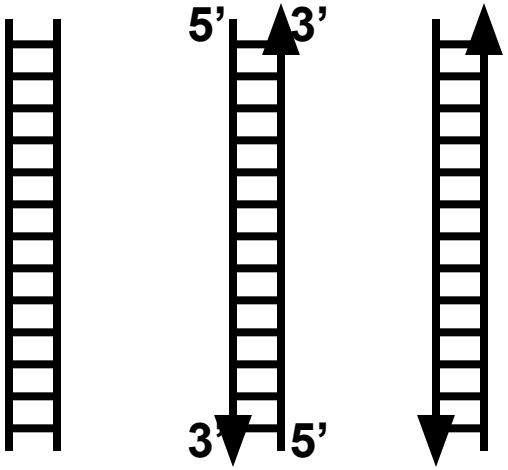
Две антипараллельные нити, стабилизированные водородными связями



Условные обозначения



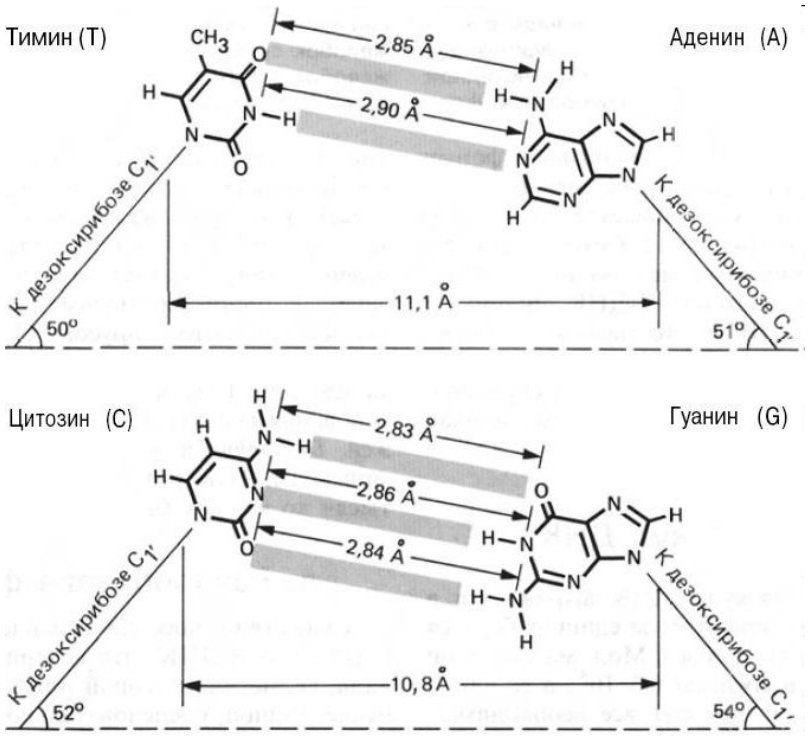




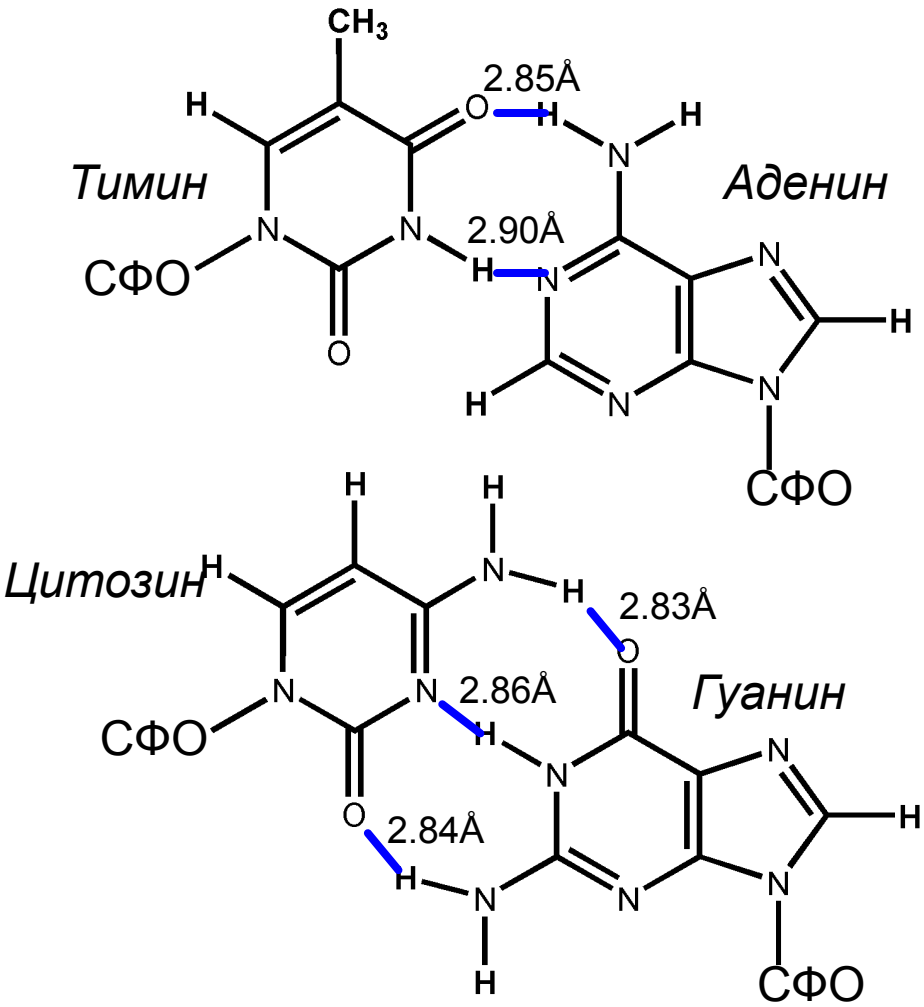
Принцип комплементарности

Правила Чаргаффа

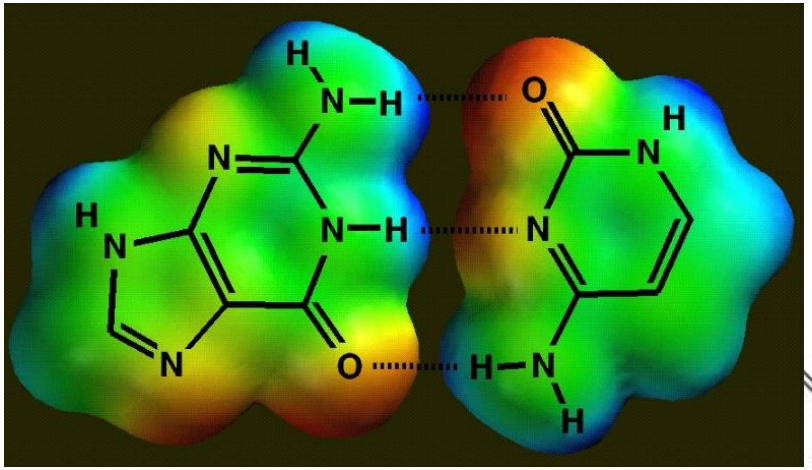
1. A=T, Г=Ц
2. R=Y
3. M=K

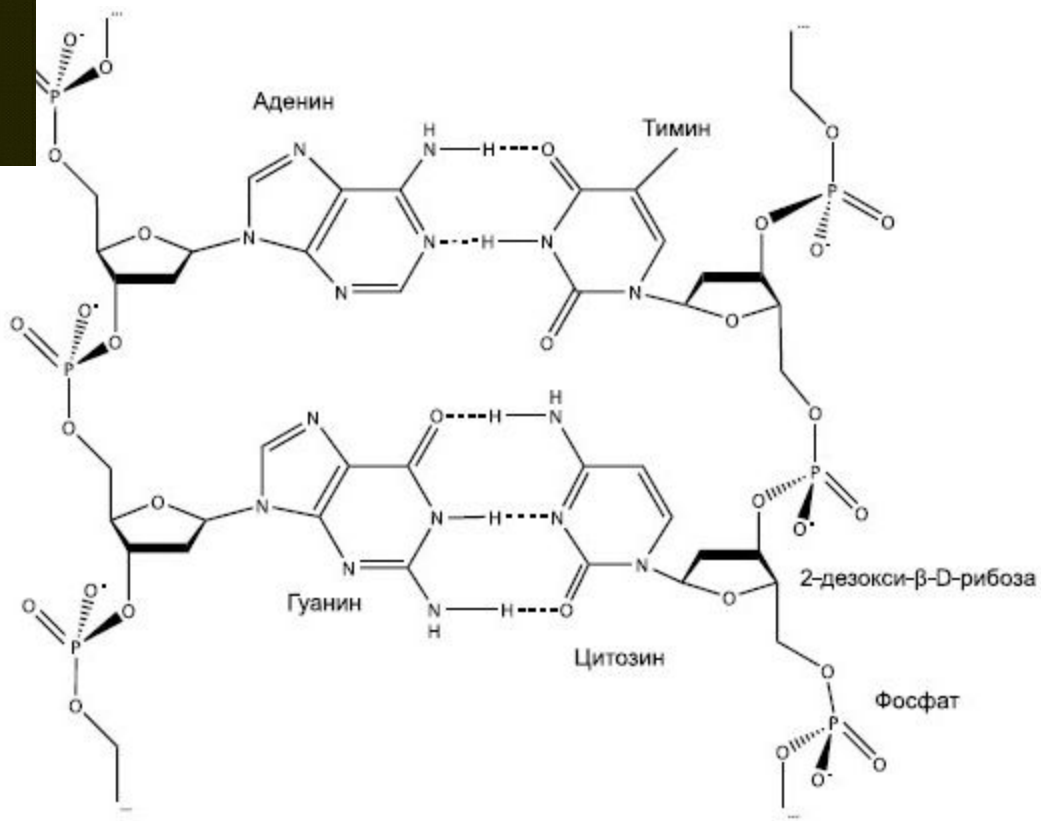


Пары оснований

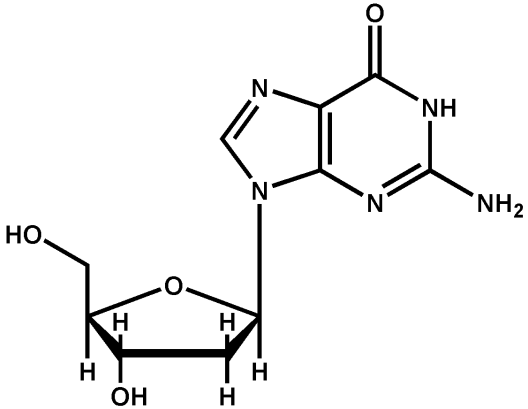


Принцип комплементарности

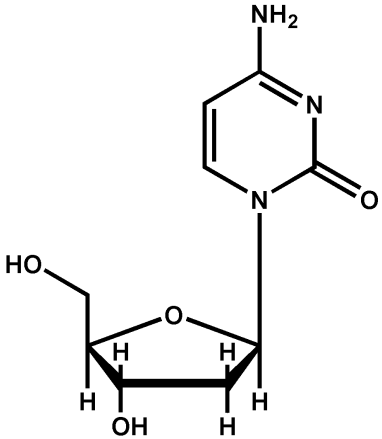




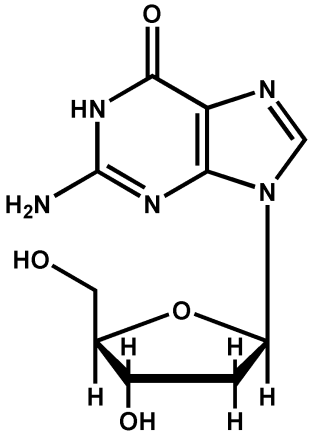
Конформации нуклеозидов



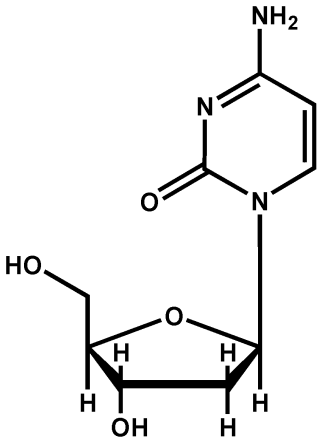
Анти



Анти

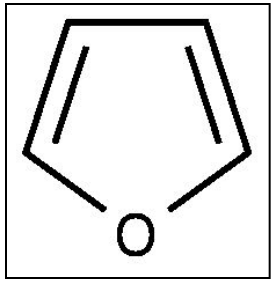


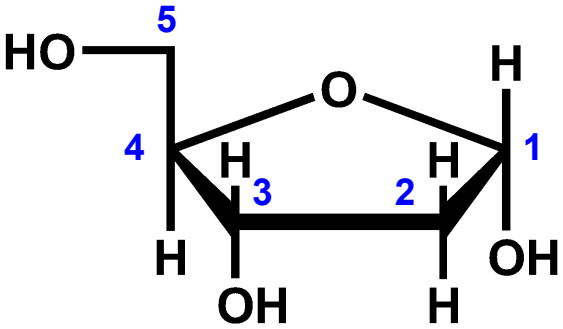
Син

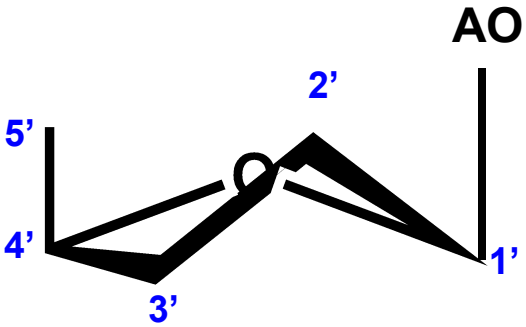


Син

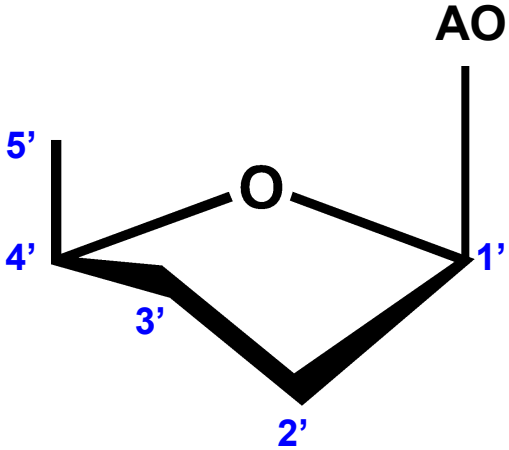
Конформации фуранозного кольца



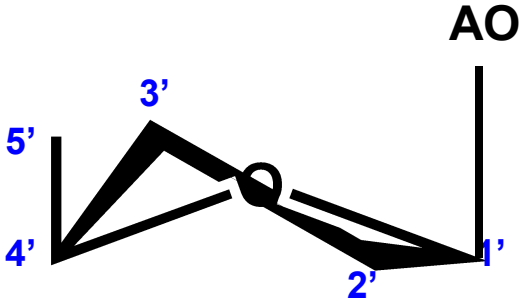




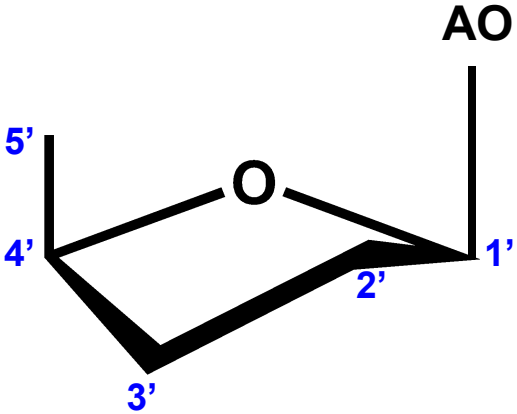
C2’-эндо
(B-ДНК)



C2’-экзо



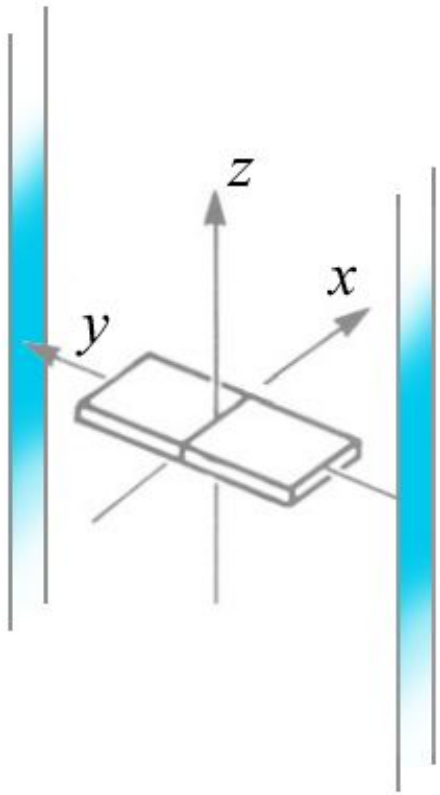
C3’-эндо
(A-ДНК)

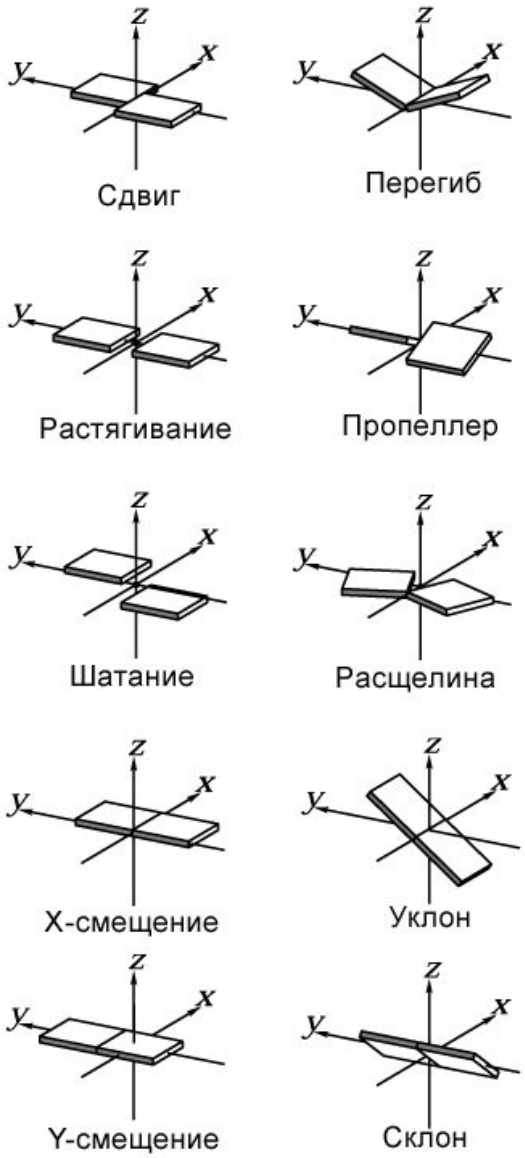


C3’-экзо

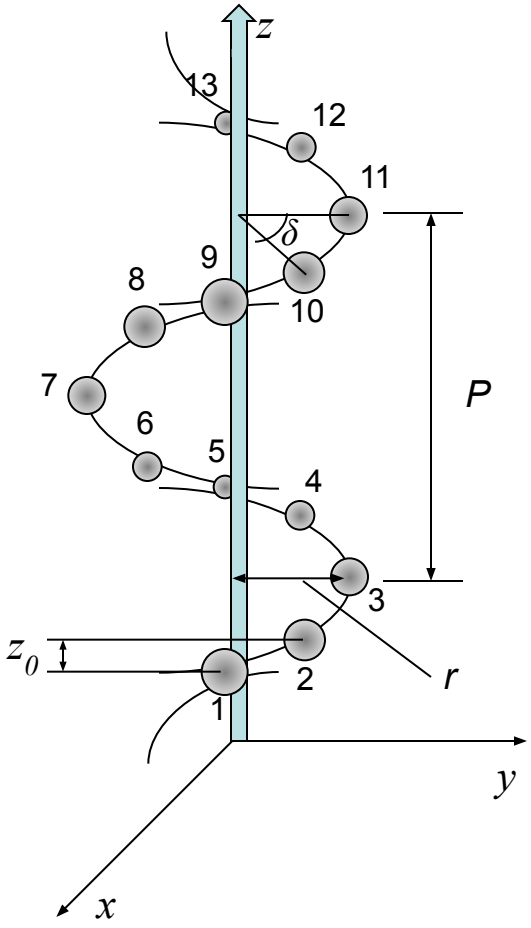
Конформации пары оснований

Геометрия пары оснований





Спираль



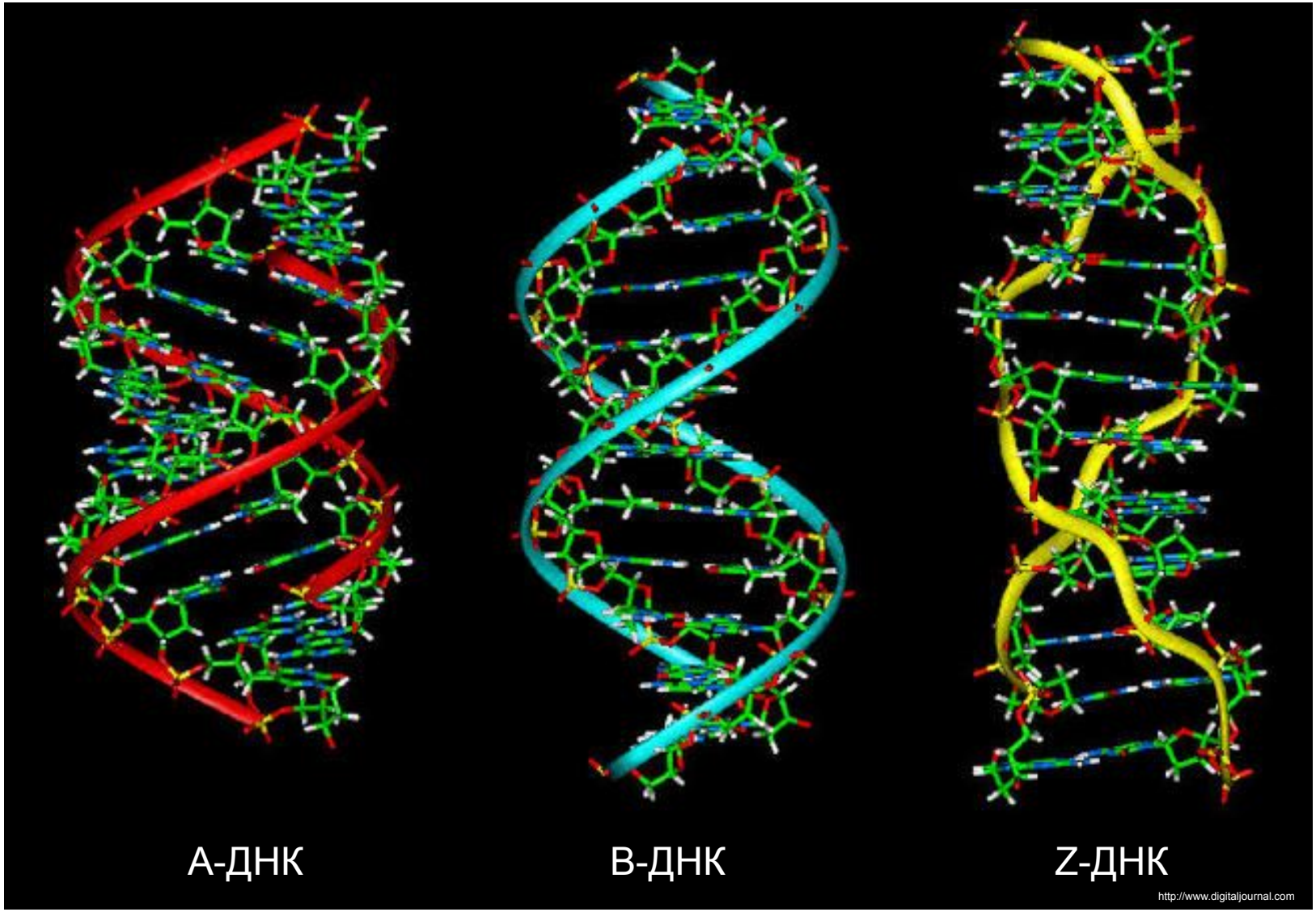
P – шаг спирали

r – радиус спирали (диаметр d = r • 2)

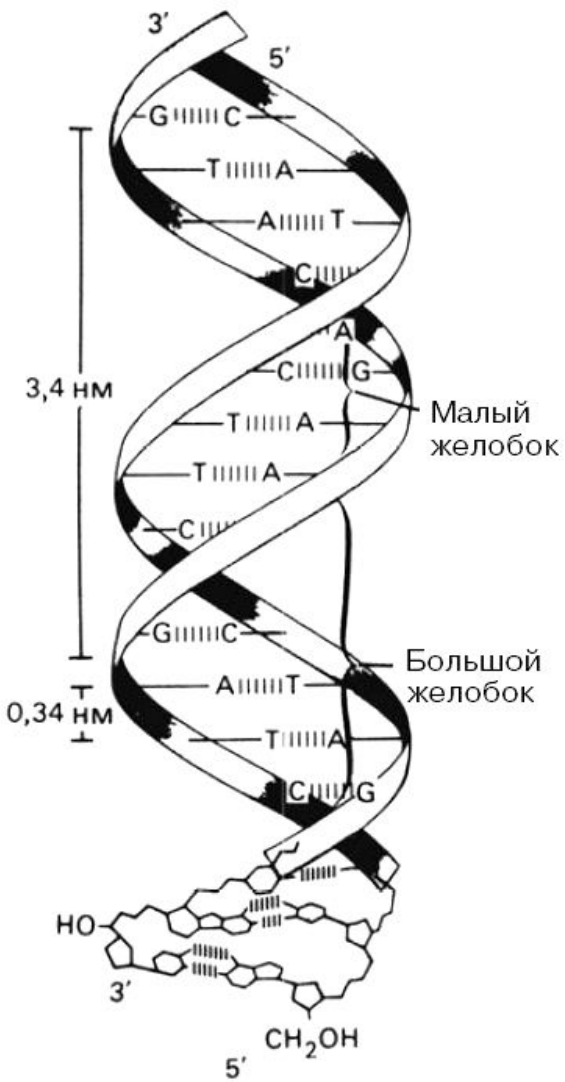
δ – угол спирального вращения

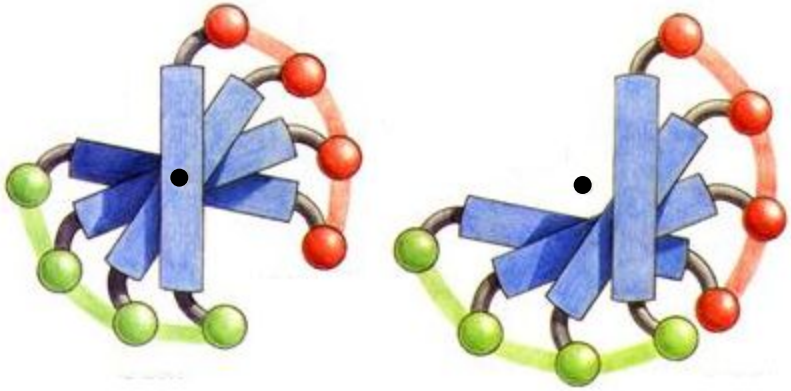
z_0 – расстояние между звеньями вдоль оси Z

Двойная спираль ДНК

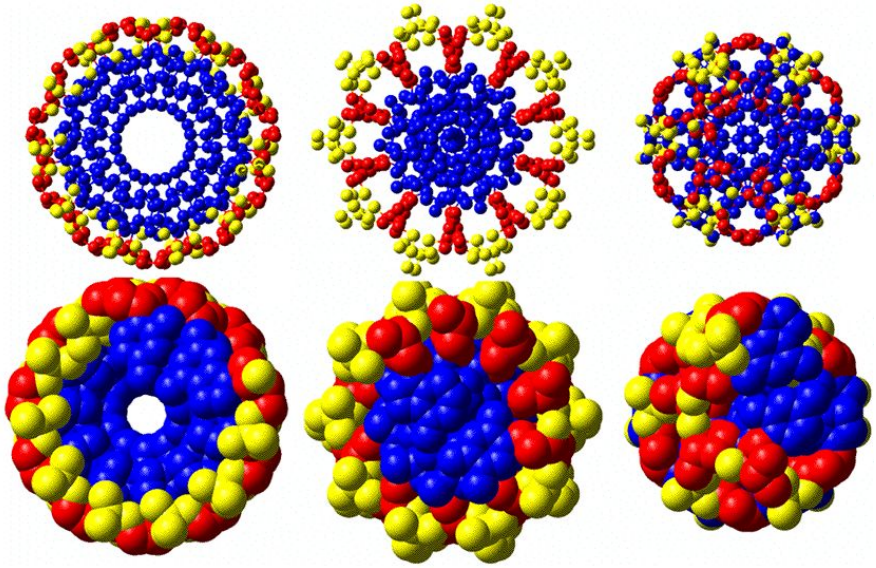


Двойная спираль ДНК





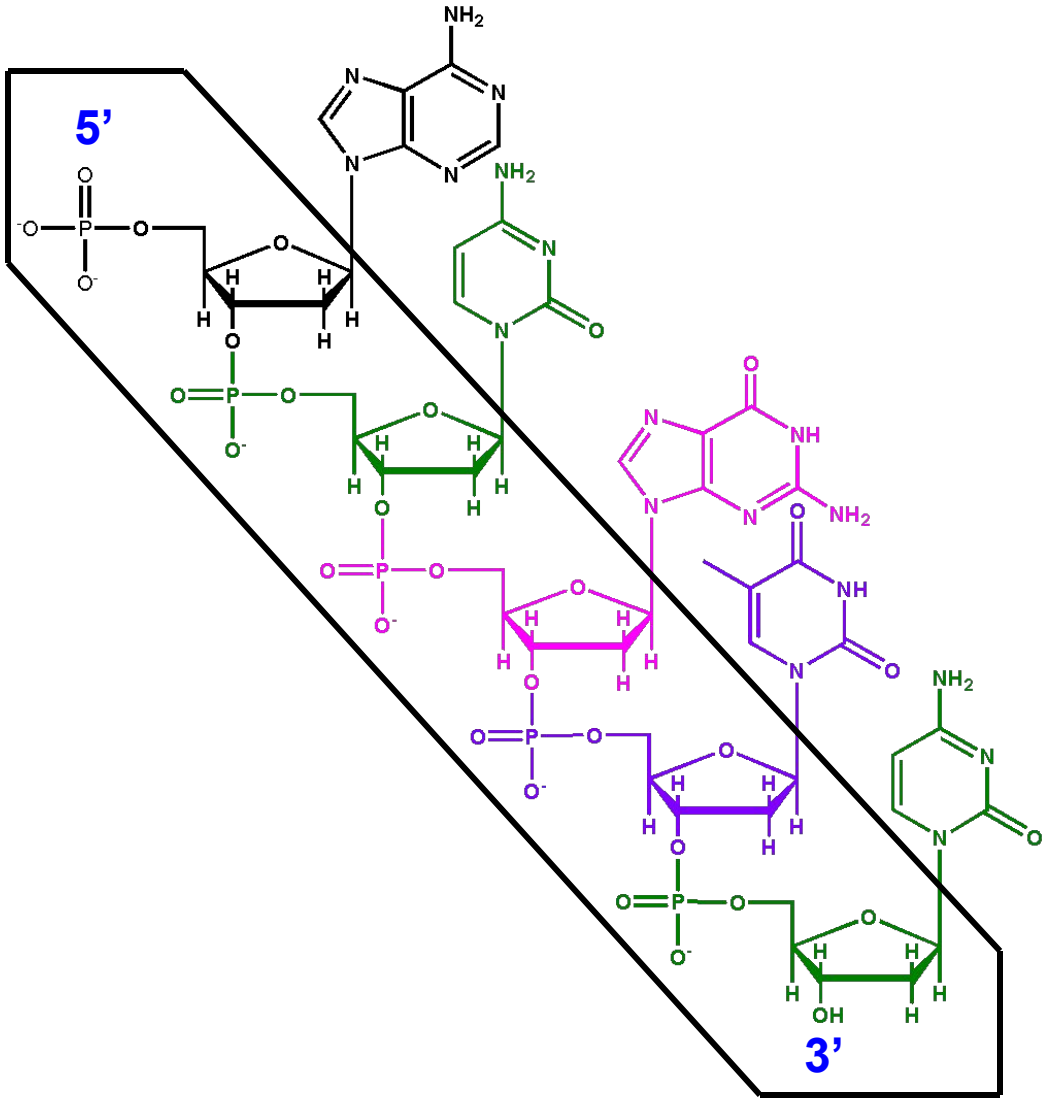
В-ДНК А-ДНК

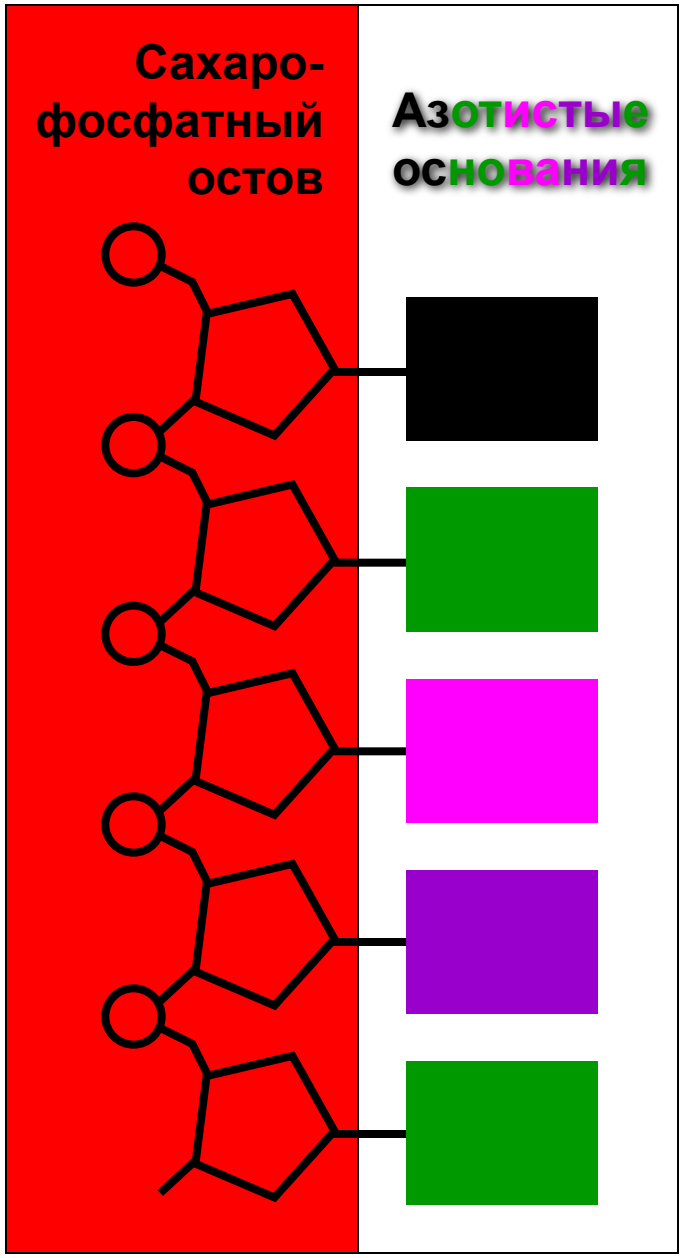


А-ДНК В-ДНК Z-ДНК

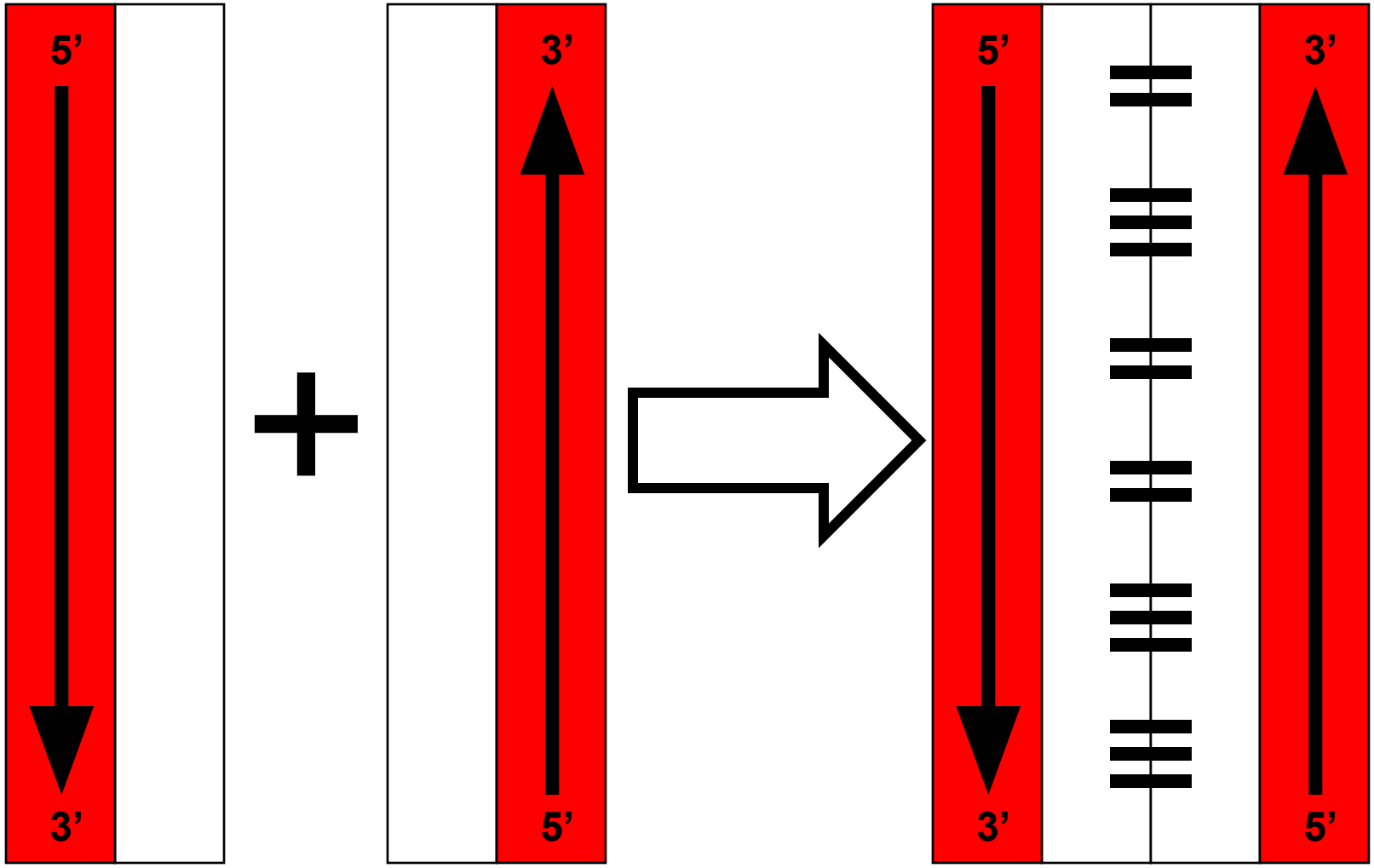
Вторичная структура ДНК

Двойная спираль ДНК

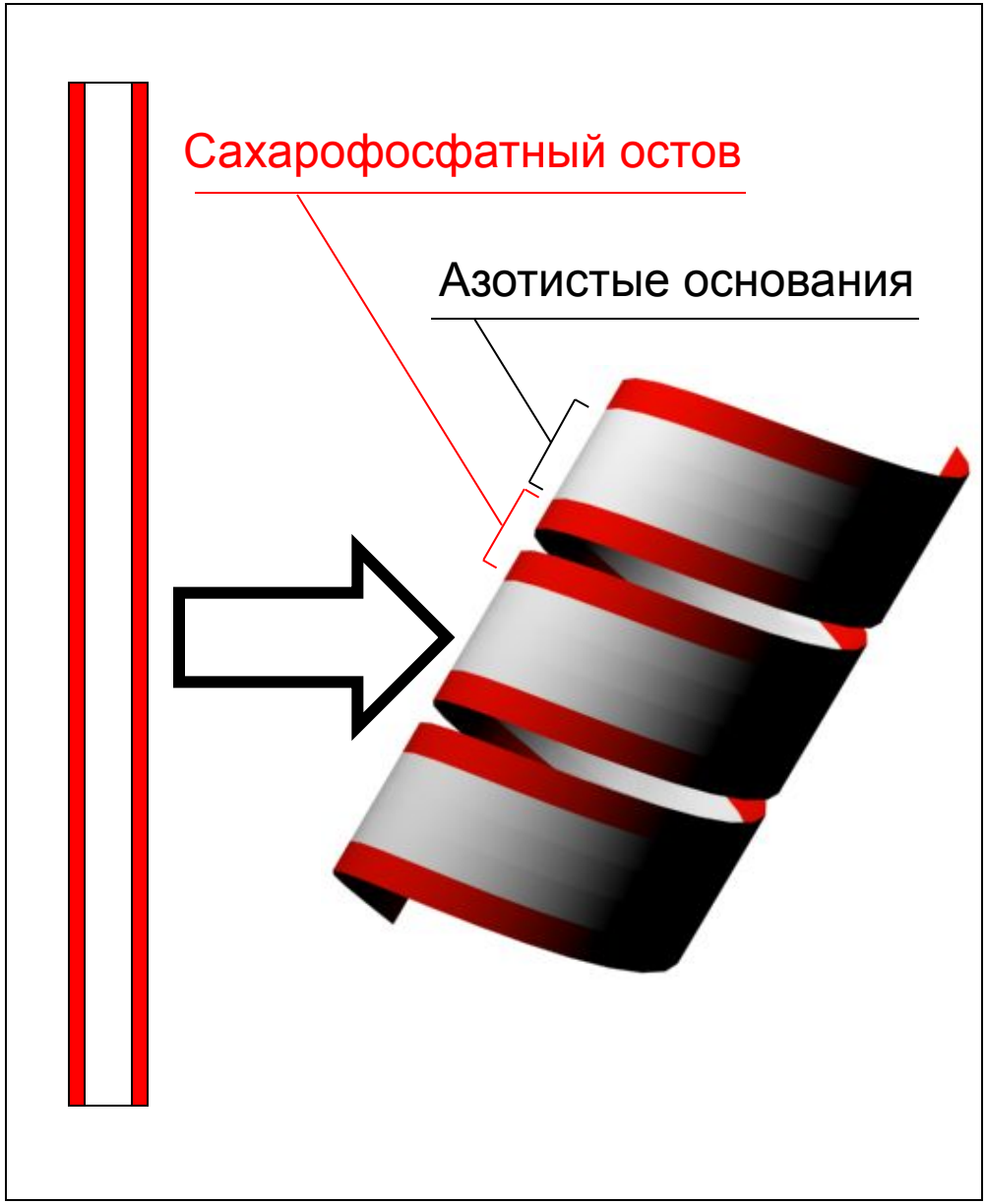


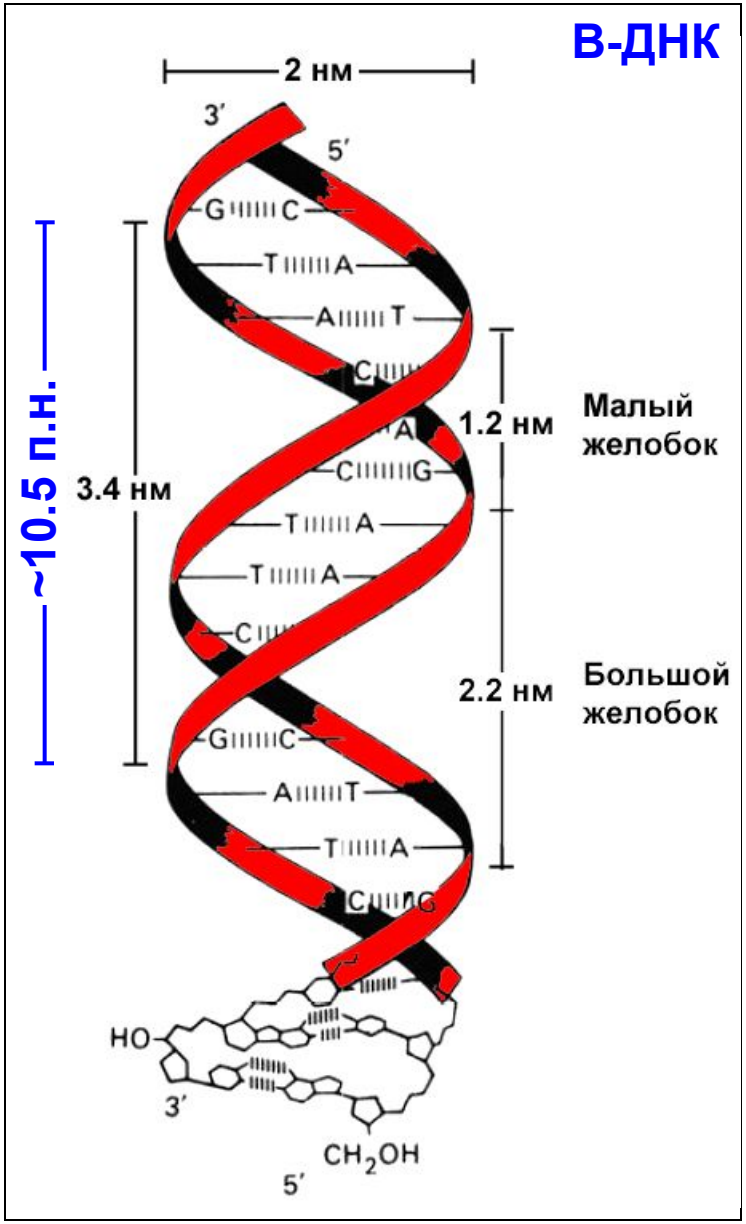


Двойная спираль ДНК

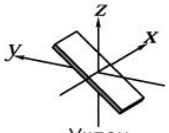
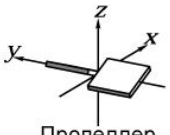


Двойная спираль ДНК

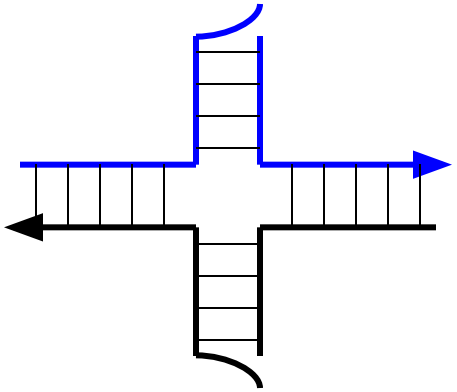




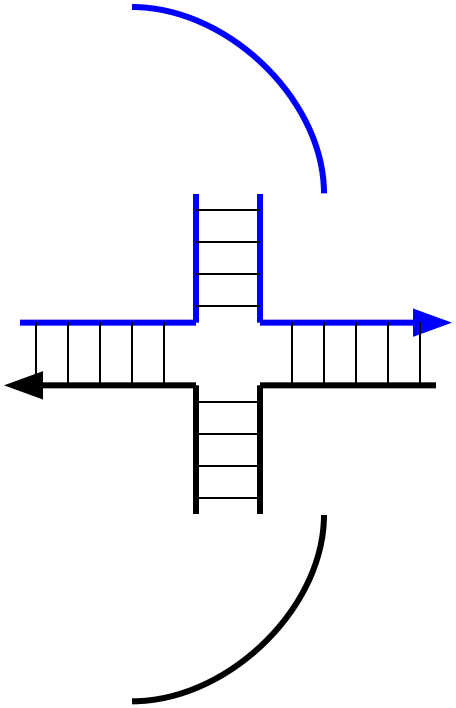
Параметры двойных спиралей ДНК

Параметр	А-ДНК	В-ДНК	Z-ДНК
Спираль	Правая	Правая	Левая
Форма	Широкая, сплюснутая	Релаксированная	Удлиненная, утонченная
Повторяющаяся единица	1 пара нуклеотидов	1 пара нуклеотидов	2 пары нуклеотидов
Количество нуклеотидов на шаг спирали	11	10.4	12
Угол спирального вращения (δ)	+33.6°	+35.9°	-30°
Уклон  Уклон	+19°	~ 0°	-9°
Пропеллер  Пропеллер	+18°	+16°	0°
Расстояние между звеньями вдоль оси (z_0)	0.24 нм	0.34 нм	0.37 нм
Шаг спирали (P)	2.5 нм	3.5 нм	4.6 нм
Конформация нуклеозида	Анти	Анти	Ц – анти Г - син
Конформация фуранозного кольца	C3’-эндо	C2’-эндо	Ц - C2’- эндо Г - C3’- эндо
Диаметр спирали (d)	~ 2.6 нм	~ 2.0 нм	~ 1.8 нм
Большой желобок	Узкий глубокий	Широкий глубокий	Плоский неглубокий
Малый желобок	Широкий неглубокий	Узкий глубокий	Очень узкий глубокий
Примеры	Поли-А, шпильки ДНК, гибрид ДНК-РНК, спираль РНК-РНК	Основная форма ДНК	Поли-ГЦ

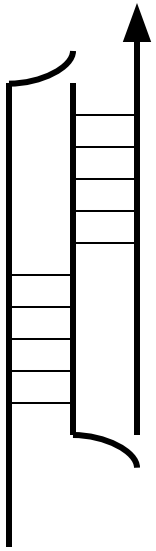
Шпильки, стебельки, узелки



Шпилька

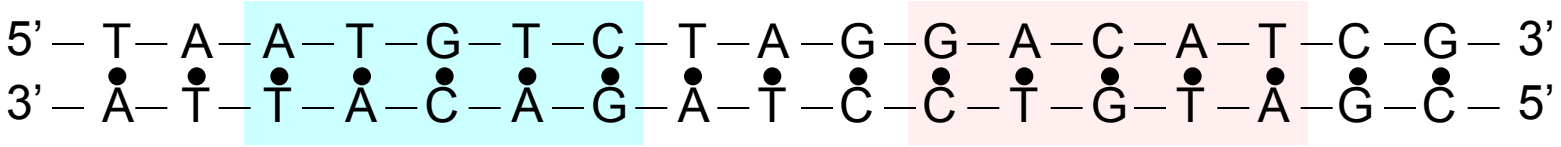


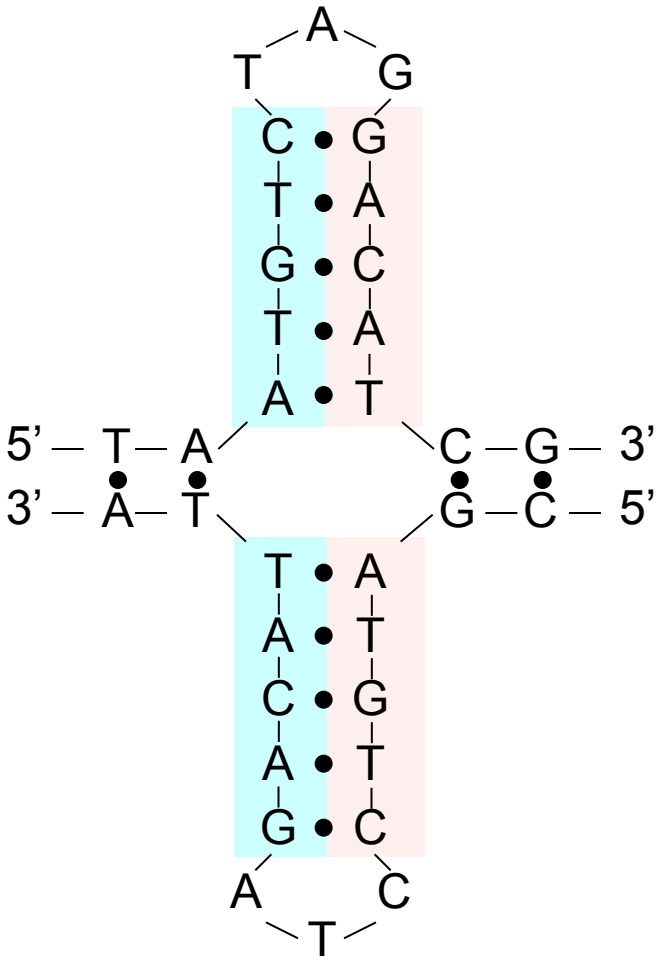
Петля на стебле
(стебель-петля)



Псевдоузел

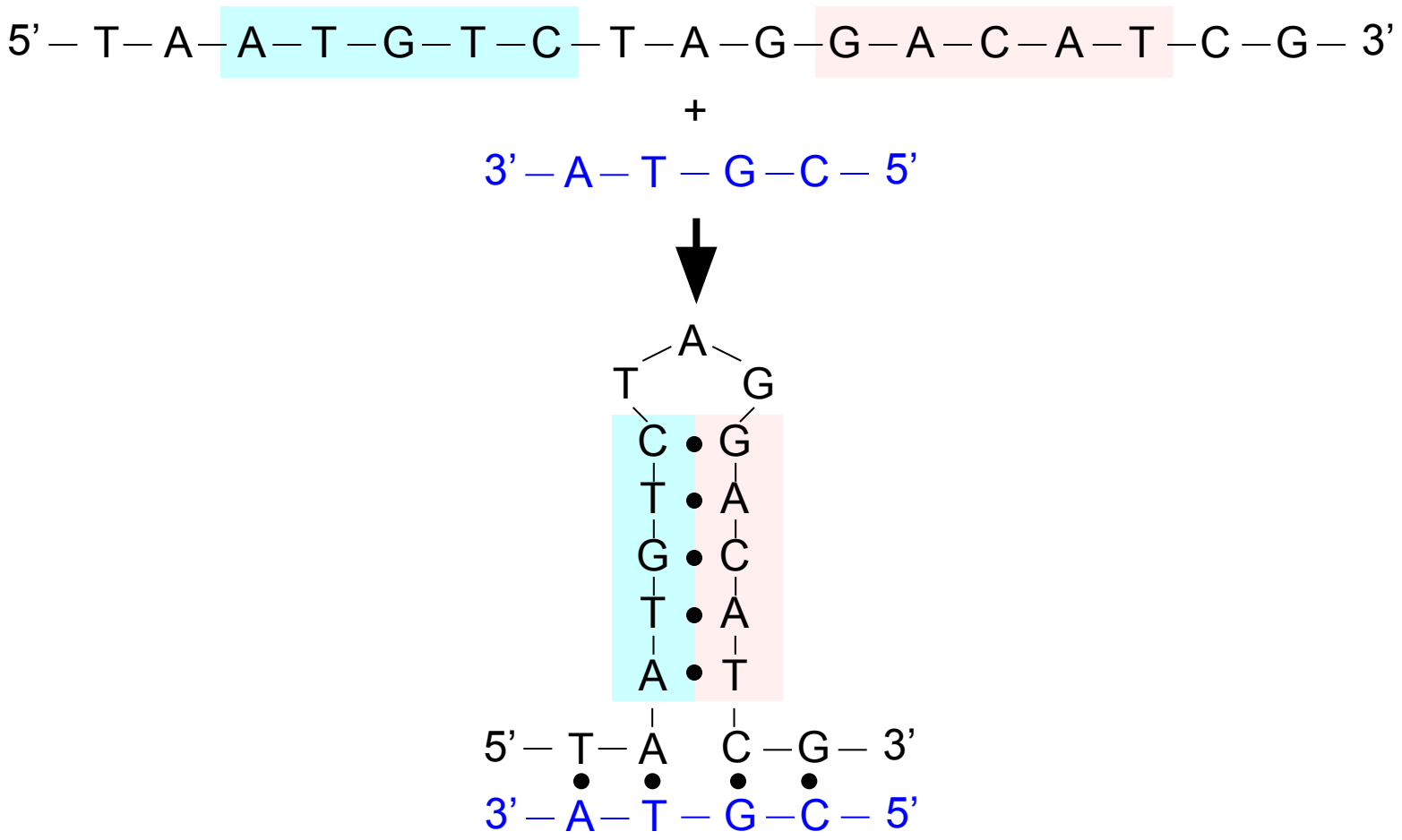
Палиндромы (АРГЕНТИНАМАНИТНЕГРА)

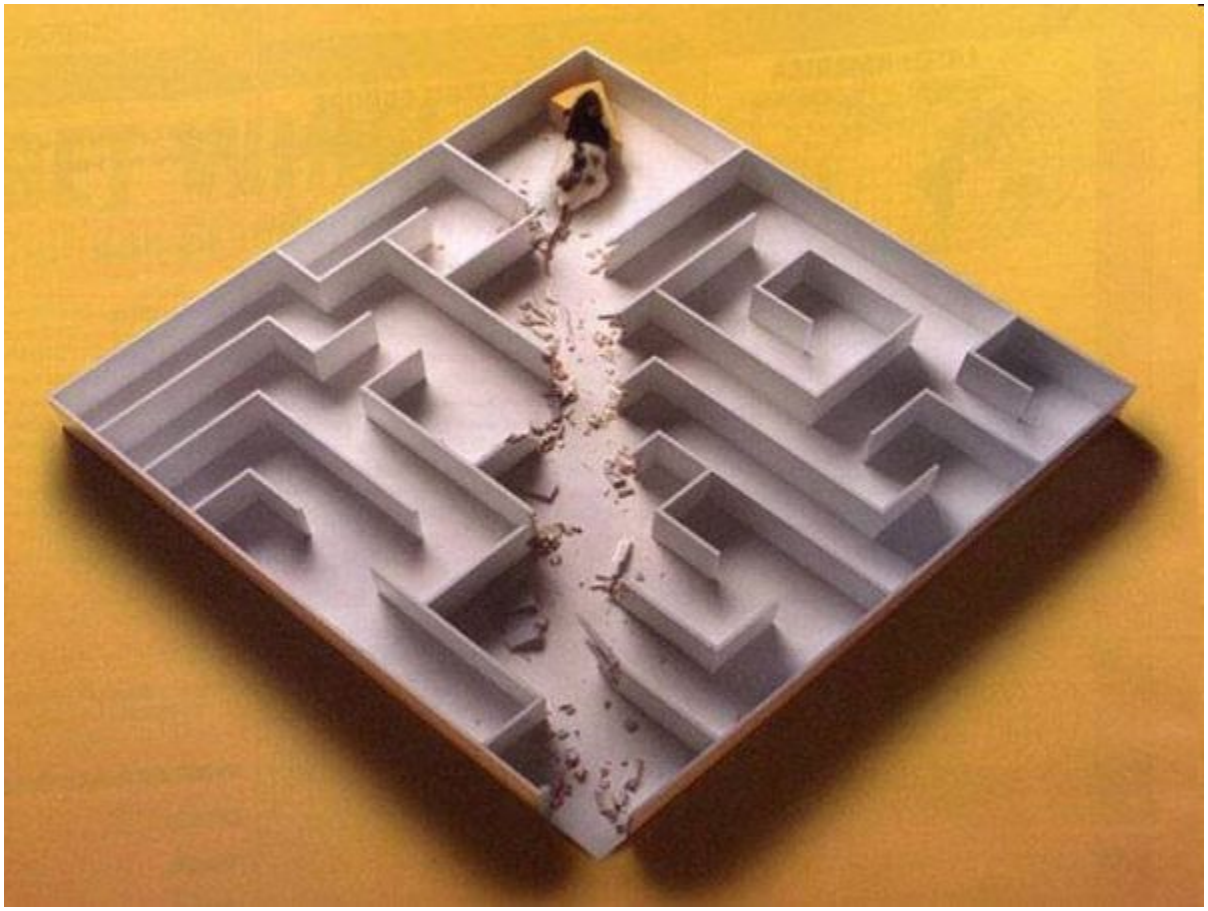




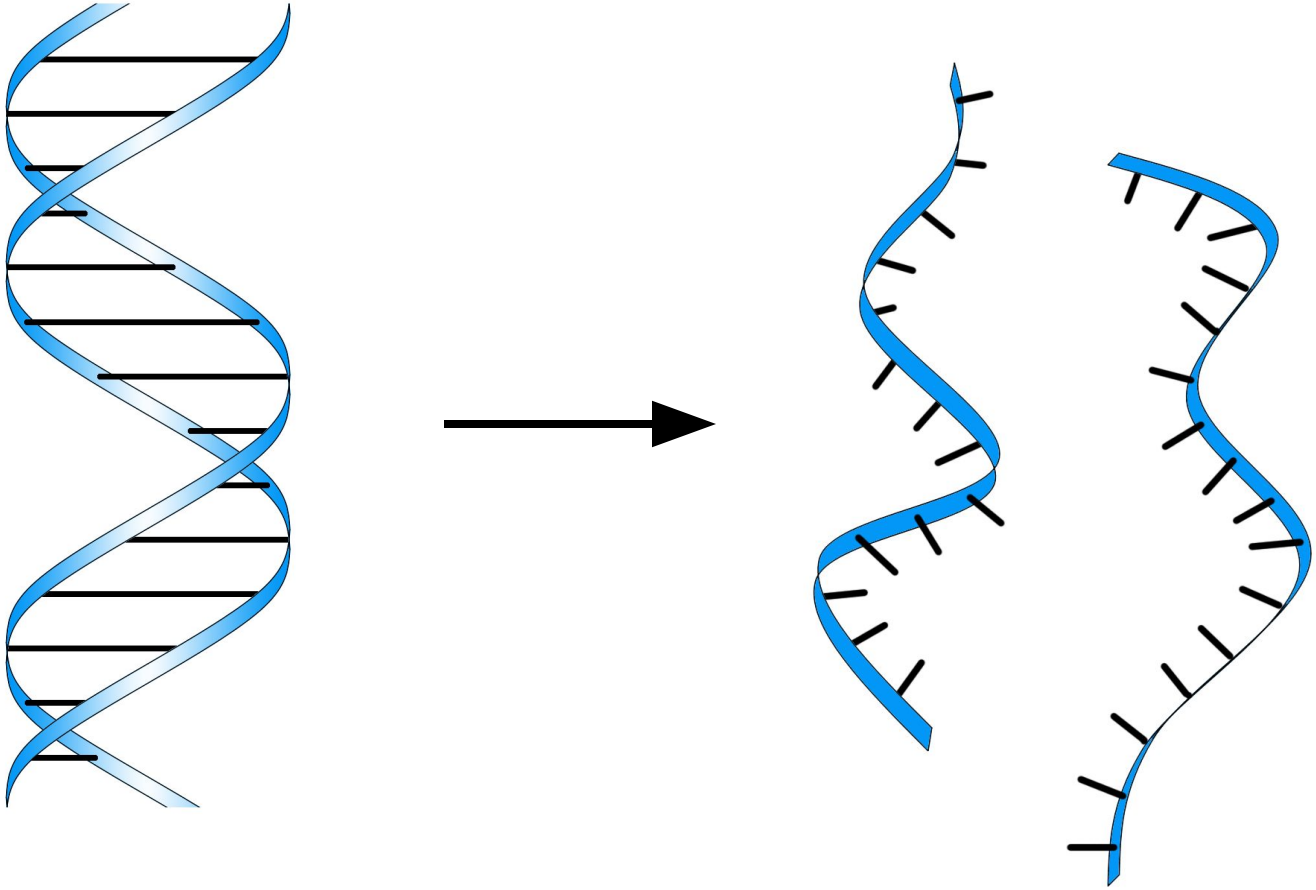
Палиндромы

Неправильное спаривание

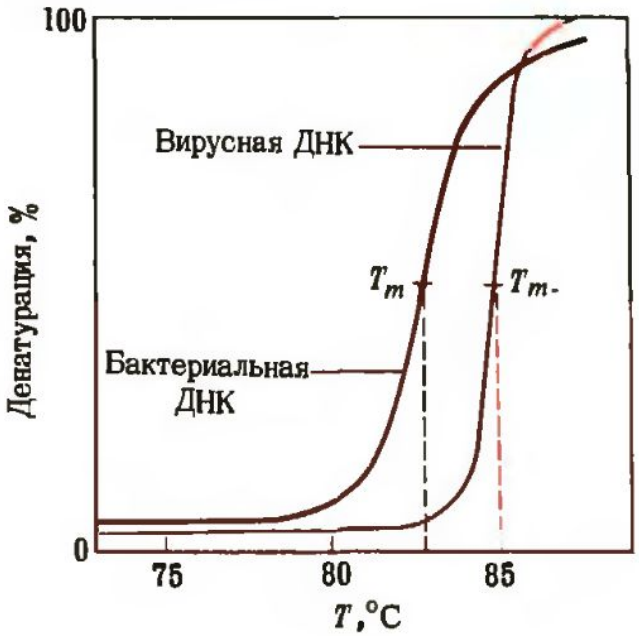




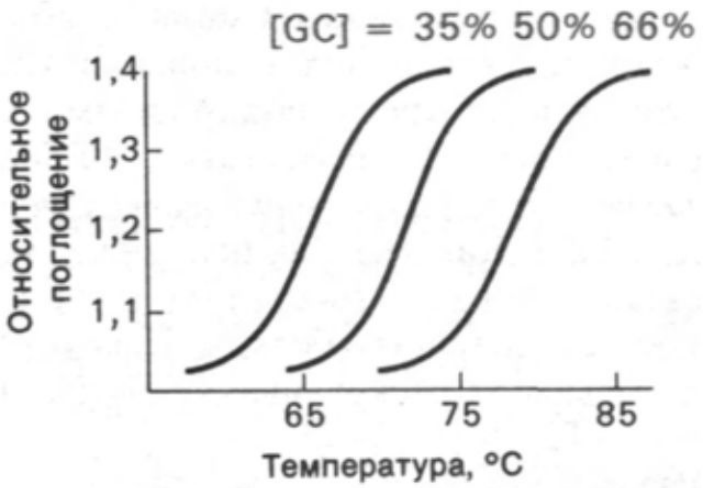
Плавление (денатурация) ДНК



Плавление ДНК



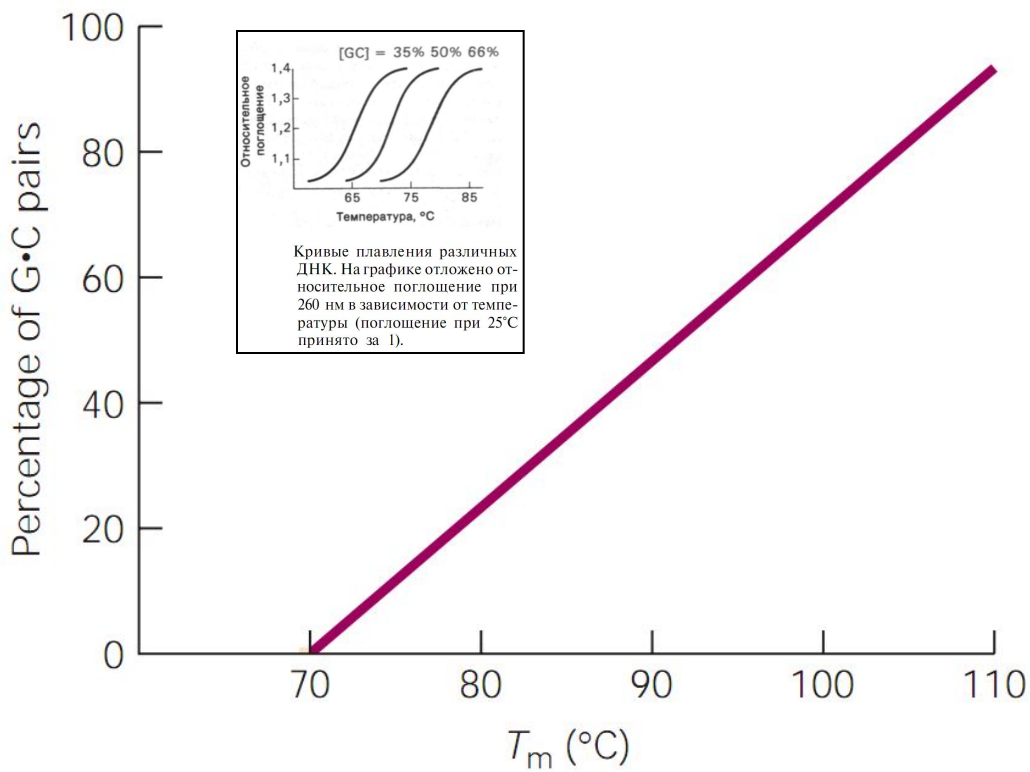
Кривая денатурации (плавлеиия) двух препаратов ДНК. Температура, соответствующая средией точке перехода (T_m), называется точкой плавления.



Кривые плавления различных ДНК. На графике отложено относительное поглощение при 260 нм в зависимости от температуры (поглощение при 25°C принято за 1).

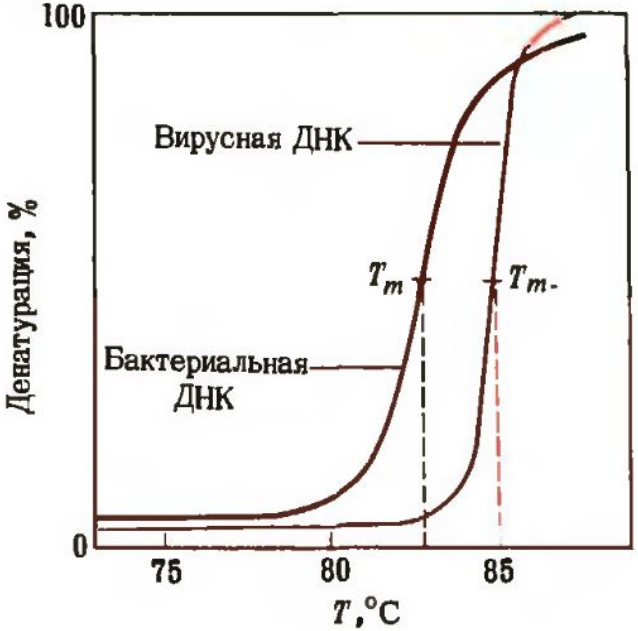
Плавление (денатурация) ДНК

Tm – температура плавления (*m* = *“melting”*)



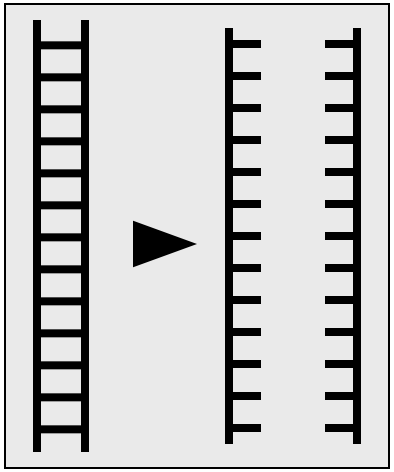
Кривые плавления различных ДНК. На графике отложено относительное поглощение при 260 нм в зависимости от температуры (поглощение при 25°C принято за 1).

Зависимость температуры плавления от GC состава ДНК

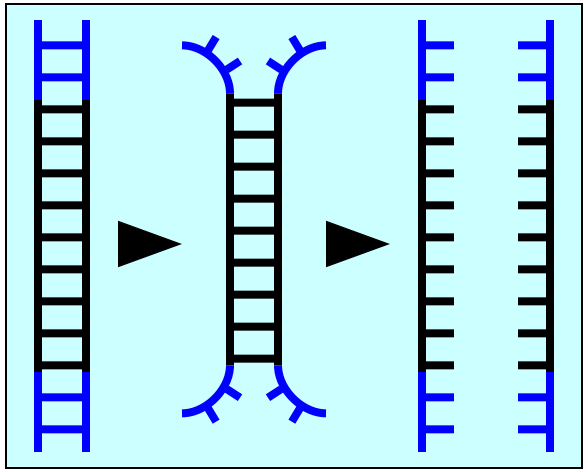


Кривая денатурации (плавлеиия) двух препаратов ДНК. Температура, соответствующая средией точке перехода (T_m), называется точкой плавления.

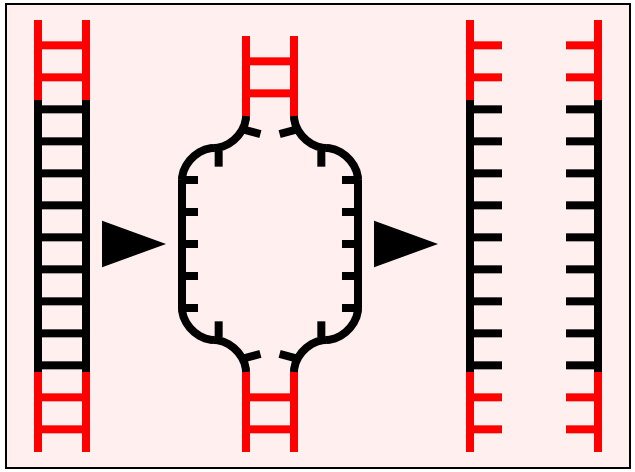
Плавление (денатурация) ДНК



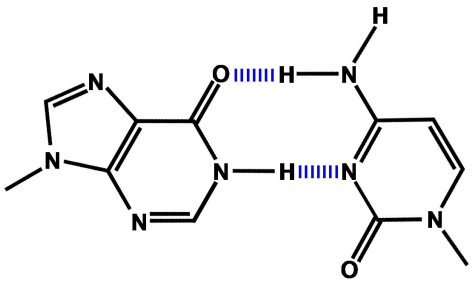
Олигонуклеотид



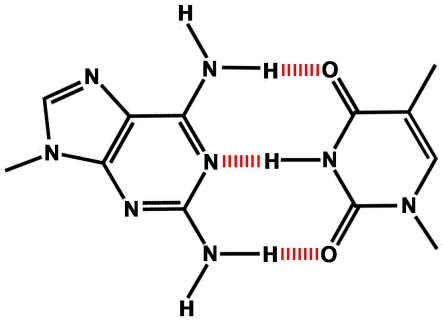
Синтетический олигонуклеотид с нестабильными концами



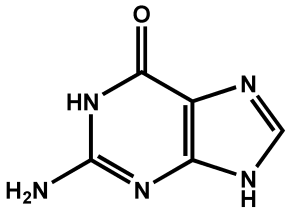
Синтетический олигонуклеотид со стабильными концами

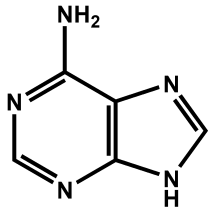


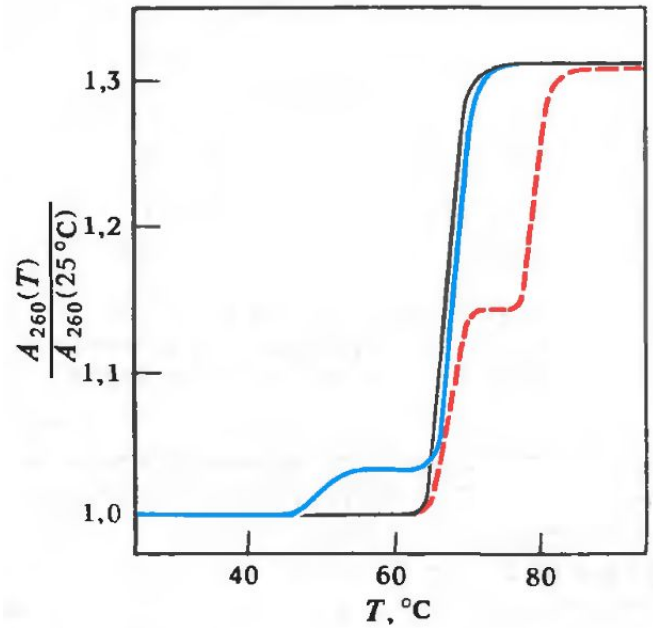
Инозин Цитозин



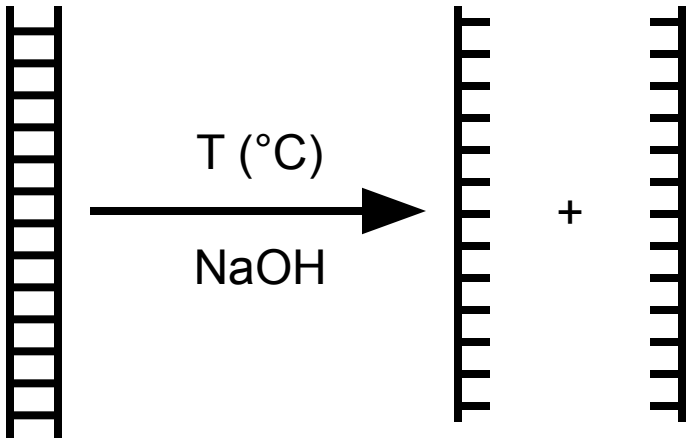
2-Аминоаденин Тимин

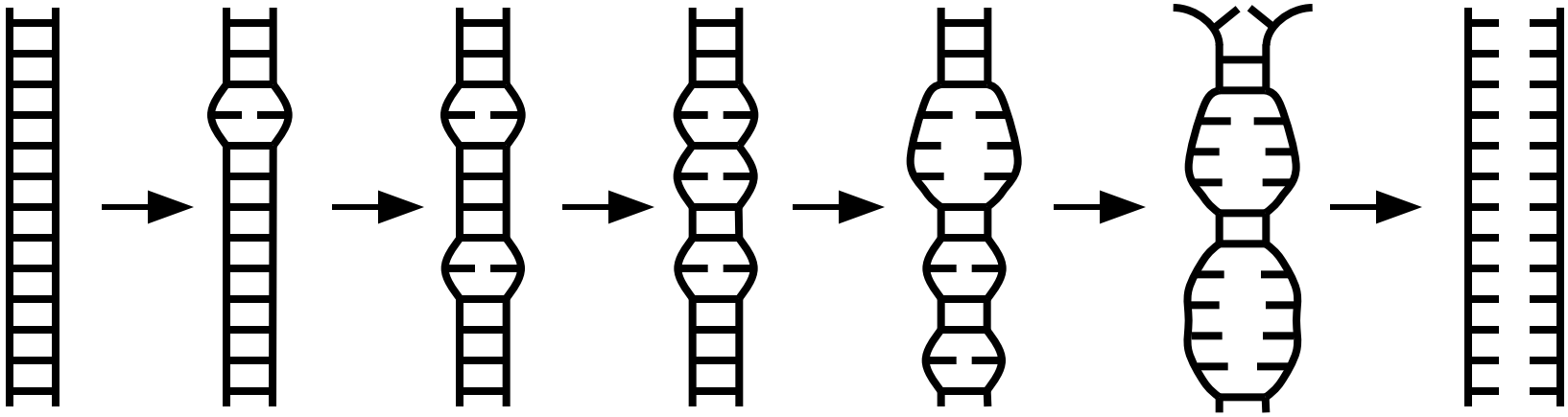






Плавление (денатурация) ДНК





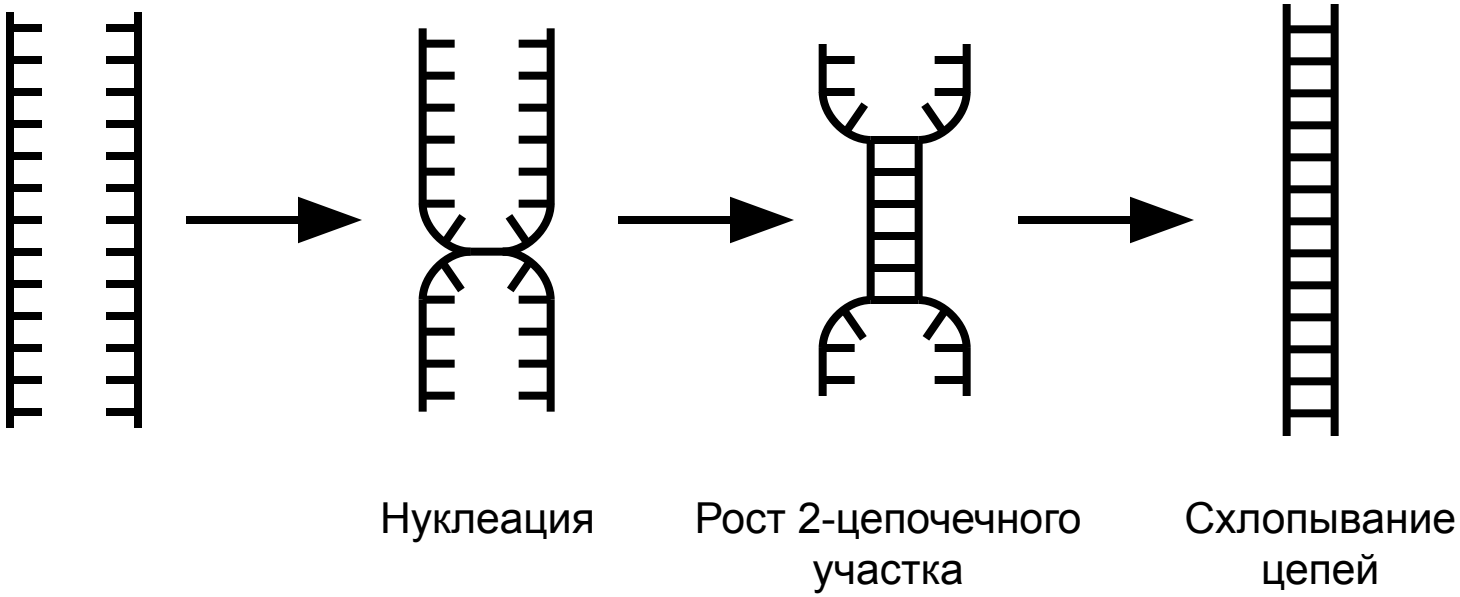
Локальное плавление

Разделение цепей

Плавление (денатурация) ДНК

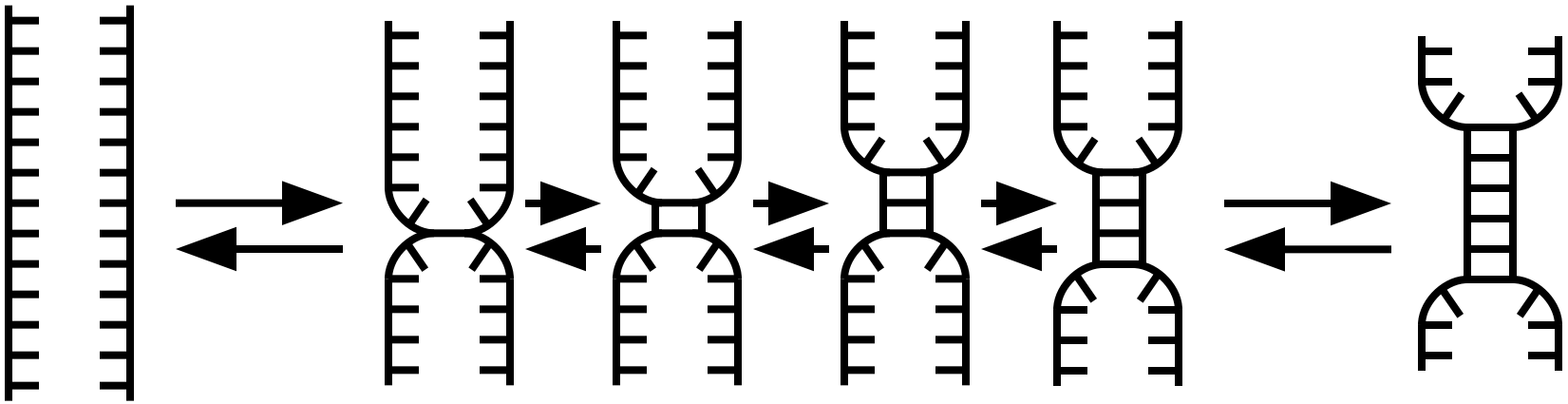
ДНК из локуса рибосомных генов, частично денатурированная щелочью
(очищенная электронная микрофотография)

Реассоциация (ренатурация) ДНК



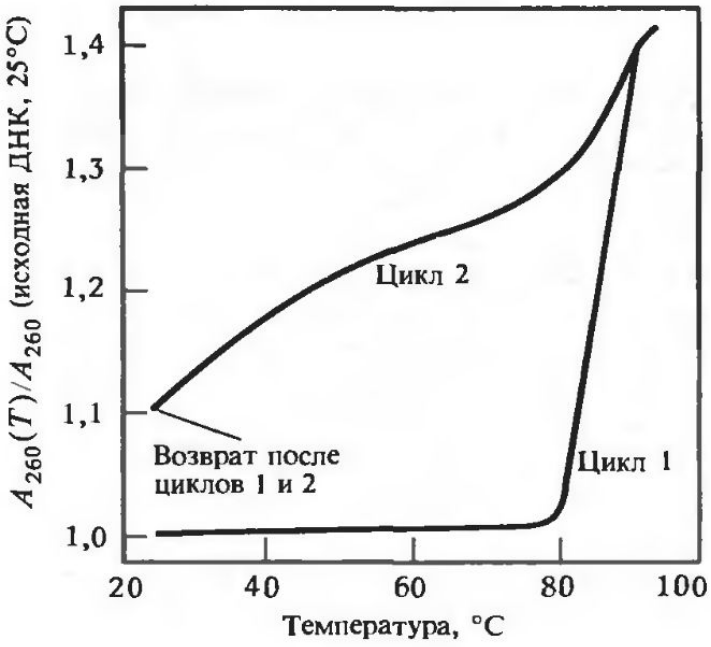
Реассоциация (ренатурация) ДНК

Нуклеация



Рост 2-цепочечного участка

Реассоциация (ренатурация) ДНК



Результат быстрого охлаждения ДНК после денатурации

Реассоциация (ренатурация) ДНК

ATTGCGGTCATGTAGCG
+
TAACGCCAGTACATCGC

```
ATTGCGGTCATGTAGCG
TAACGCCAGTACATCGC

ATTGCGGTCATGTAGCG
TAACGCCAGTACATCGC

ATTGCGGTCATGTAGCG
TAACGCCAGTACATCGC

ATTGCGGTCATGTAGCG
TAACGCCAGTACATCGC

ATTGCGGTCATGTAGCG
TAACGCCAGTACATCGC
```

```
ATTGCGGTCATGTAGCG
●●●●●●●●●●●●●●●●●
TAACGCCAGTACATCGC

ATTGCGGTCATGTAGCG
●  ●●●
TAACGCCAGTACATCGC

ATTGCGGTCATGTAGCG
●  ●●●
TAACGCCAGTACATCGC
```

Реассоциация (ренатурация) ДНК

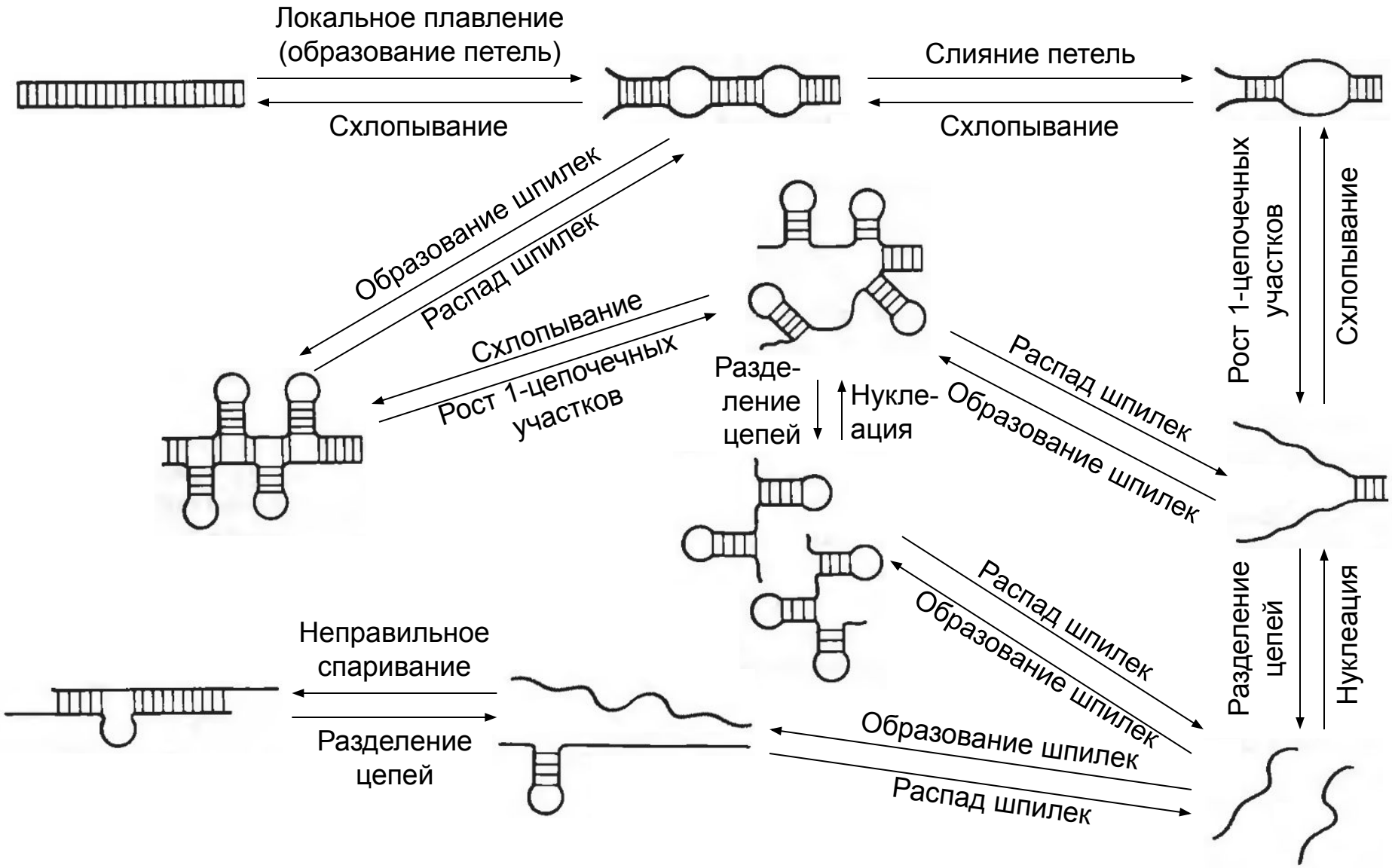
```
AAAAAAAAAAAAAAAAAA
+
TTTTTTTTTTTTTTTTTT

AAAAAAAAAAAAAAAAAA
●●●●●●●●●●●●●●●●●●
TTTTTTTTTTTTTTTTTT

AAAAAAAAAAAAAAAAAA
●●●●●●●●●●●●●●●●●●
TTTTTTTTTTTTTTTTTT

AAAAAAAAAAAAAAAAAA
●●●●●●●●●●●●●●●●●●
TTTTTTTTTTTTTTTTTT

AAAAAAAAAAAAAAAAAA
●●●●●●●●●●●●●●●●●●
TTTTTTTTTTTTTTTTTT

AAAAAAAAAAAAAAAAAA
●●●●●●●●●●●●●●●●●●
TTTTTTTTTTTTTTTTTT

AAAAAAAAAAAAAAAAAA
●●●●●●●●●●●●●●●●●●
TTTTTTTTTTTTTTTTTT

AAAAAAAAAAAAAAAAAA
●●●●●●●●●●●●●●●●●●
TTTTTTTTTTTTTTTTTT

AAAAAAAAAAAAAAAAAA
●●●●●●●●●●●●●●●●●●
TTTTTTTTTTTTTTTTTT

AAAAAAAAAAAAAAAAAA
●●●●●●●●●●●●●●●●●●
TTTTTTTTTTTTTTTTTT
```

2L + 1 вариантов …

… + липкие концы

```
AAAAAAAAAAAAAAAAAA   AAAAAAAAAAAAAAAAAA
●●●●●●●●●●●●●●●●●●   ●●●●●●●●●●●●●●●●●●
TTTTTTTTTTTTTTTTTT   TTTTTTTTTTTTTTTTTT
```

Реассоциация (ренатурация) ДНК

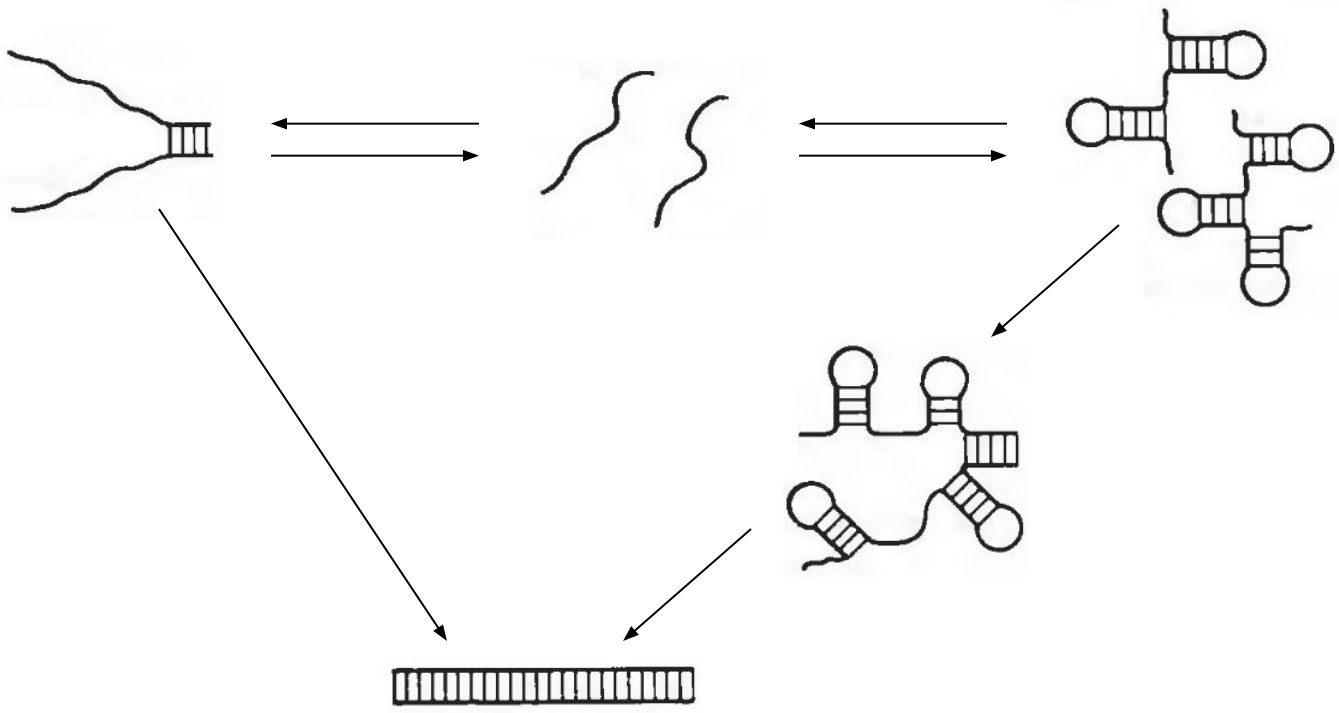


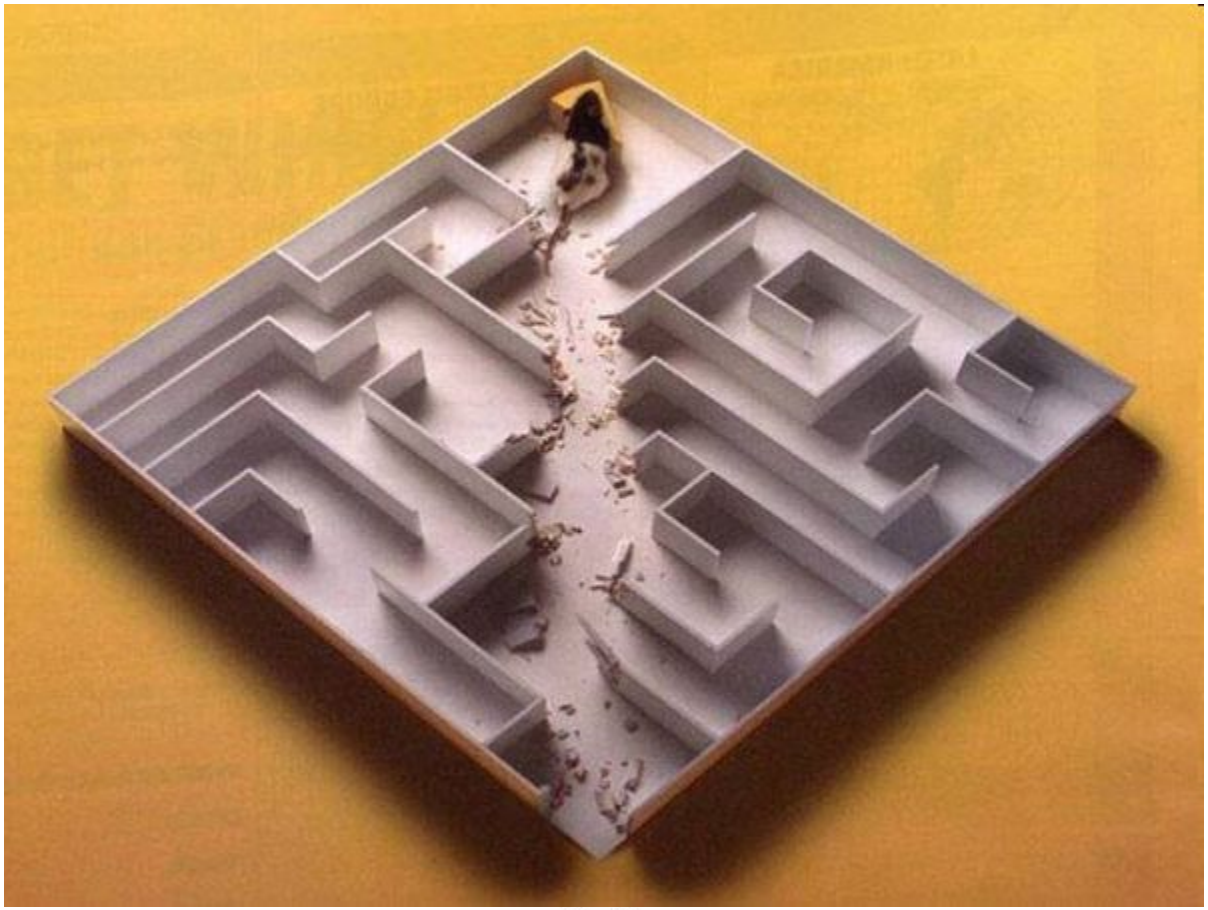
***Структуры ДНК при температурах, близких к* Tm**

Реассоциация (ренатурация) ДНК

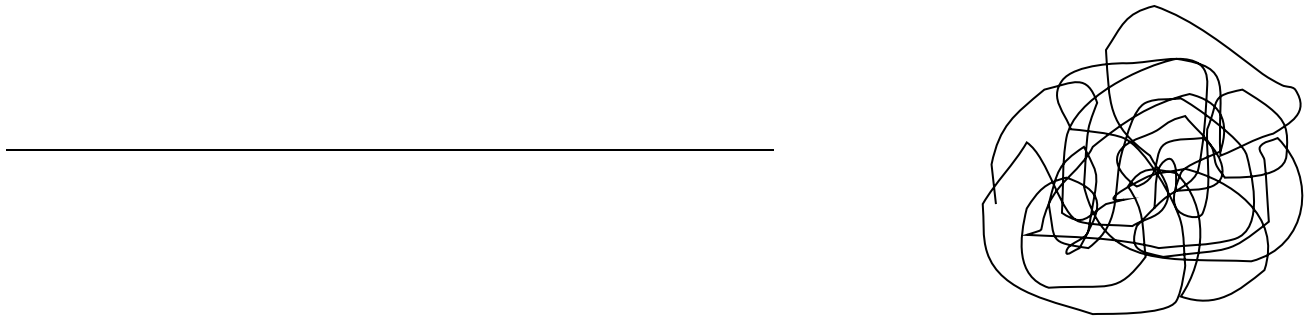
Отжиг– нагрев и медленное охлаждение

Ta – температура отжига (*a* = *“annealing”*)
Ta ≈ Tm – 5 (°C)



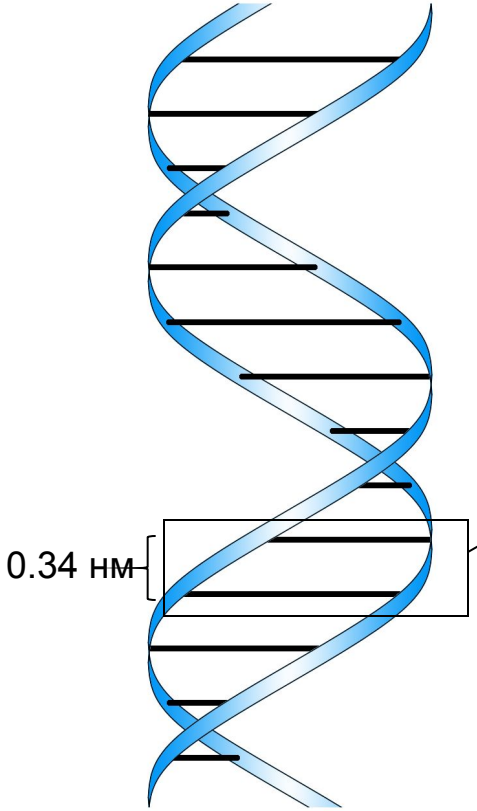


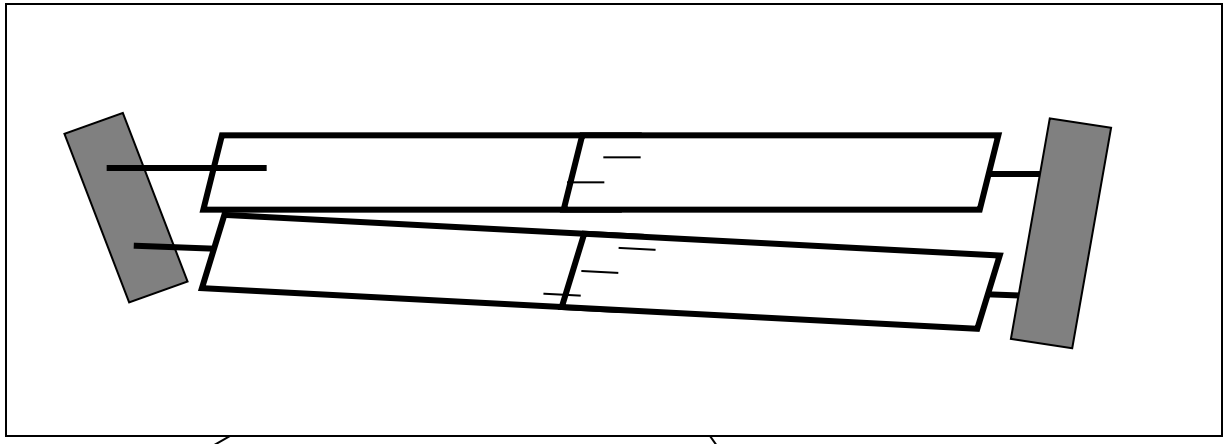
Гибкость ДНК

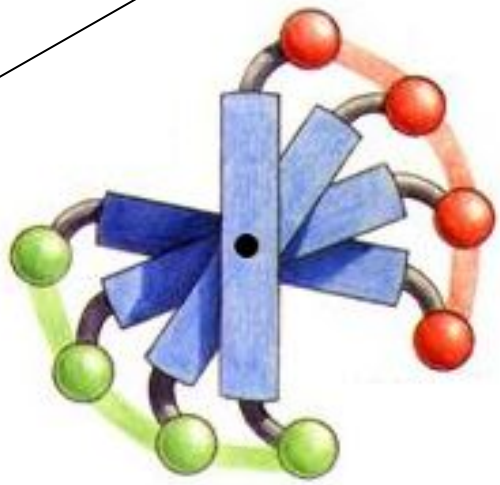


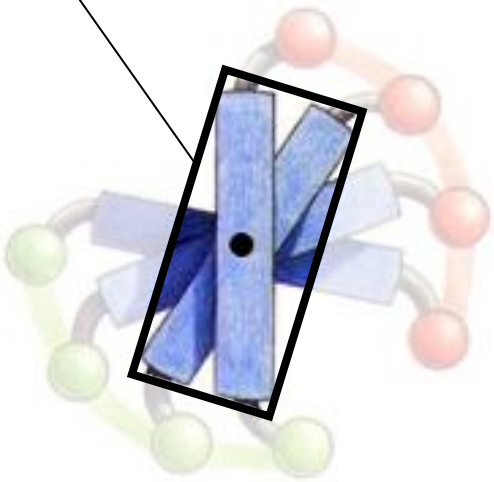
В растворе молекула ДНК представляет собой хаотичный клубок

Шаг пары оснований

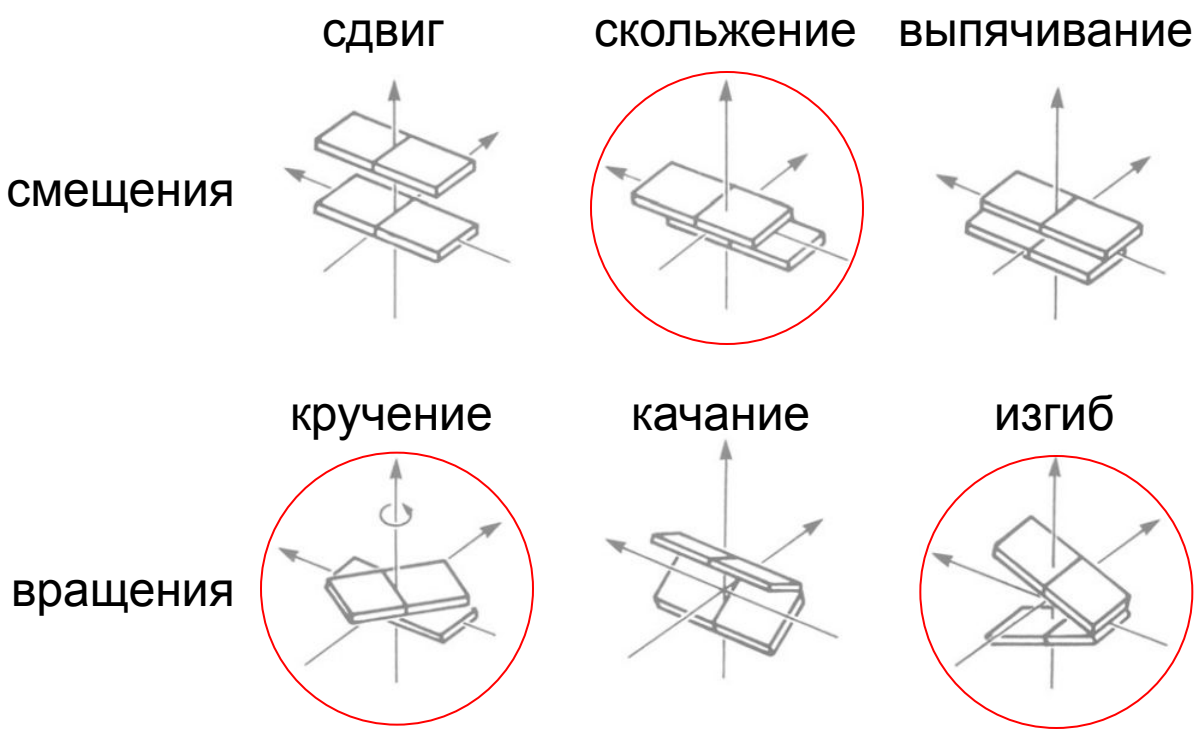




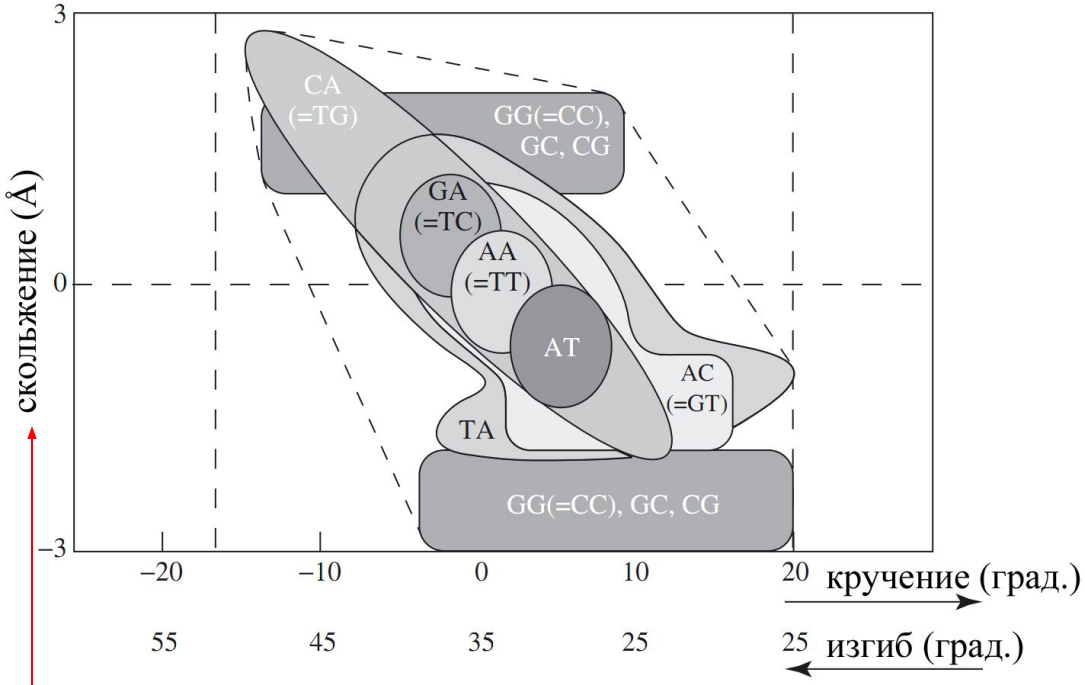




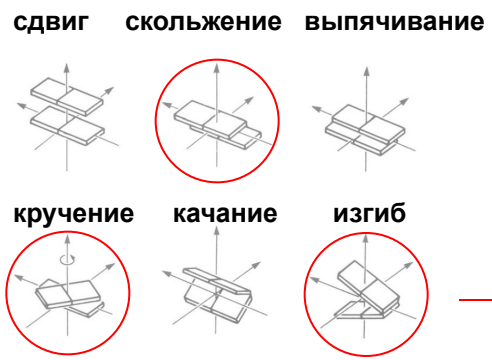
Конформации шага пары оснований



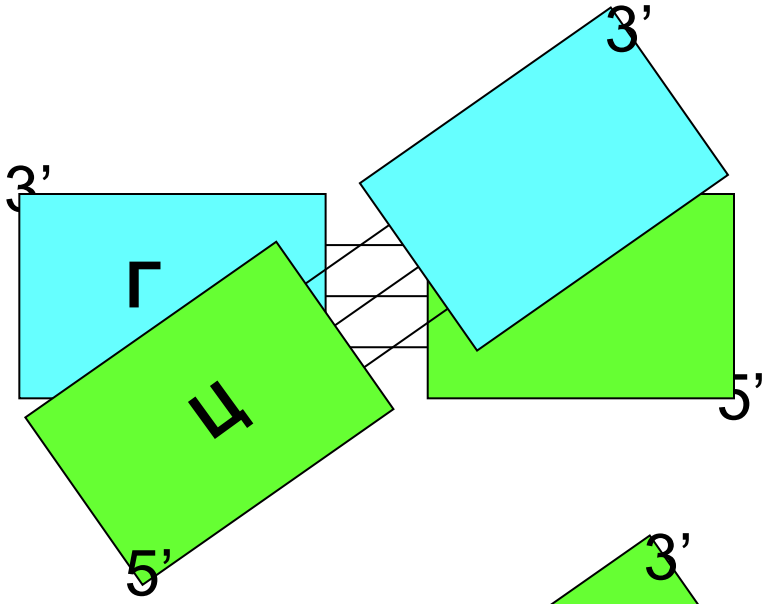
Конформационная подвижность шага пар оснований



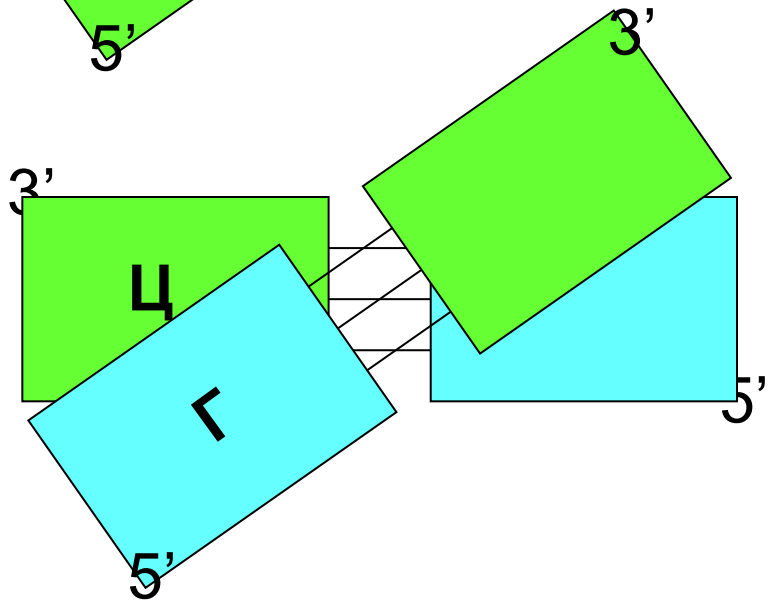
Конформационные диапазоны шагов пар оснований



Подвижность шага пар оснований



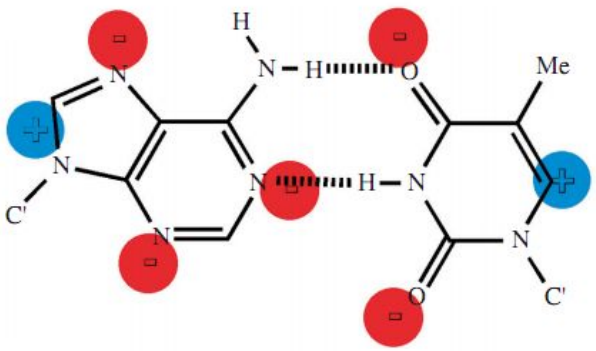
Шаг C-G



Шаг G-C

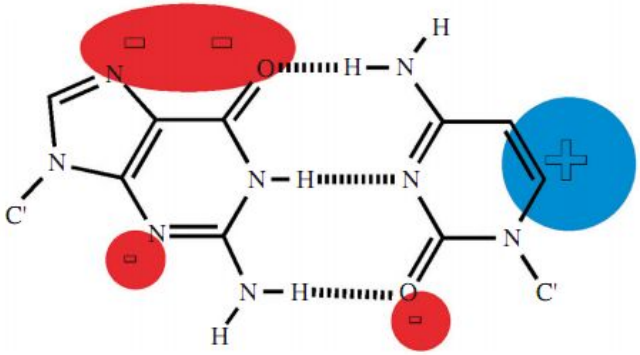
Электронная конфигурация пар оснований

A



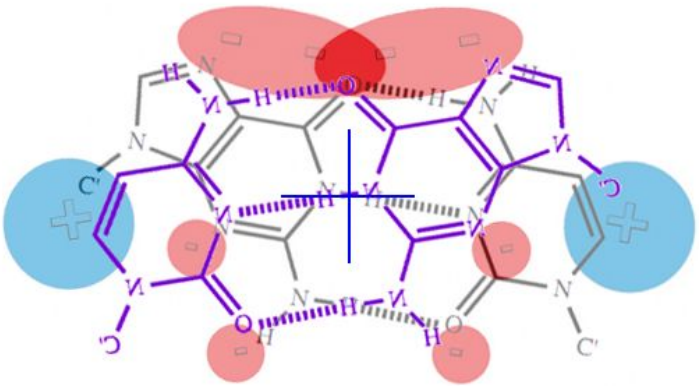
T

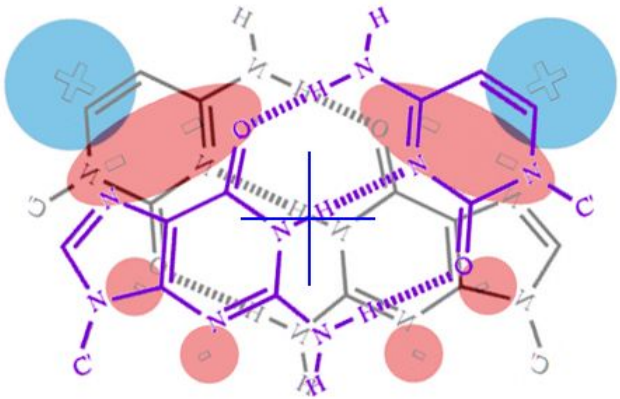
G



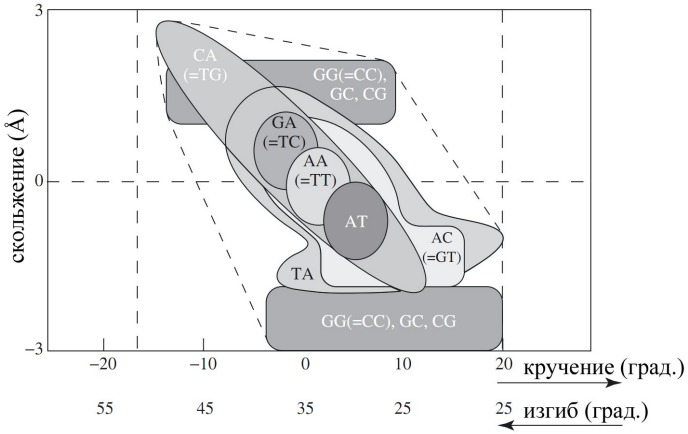
C

Электронные конфигурации шагов пар оснований





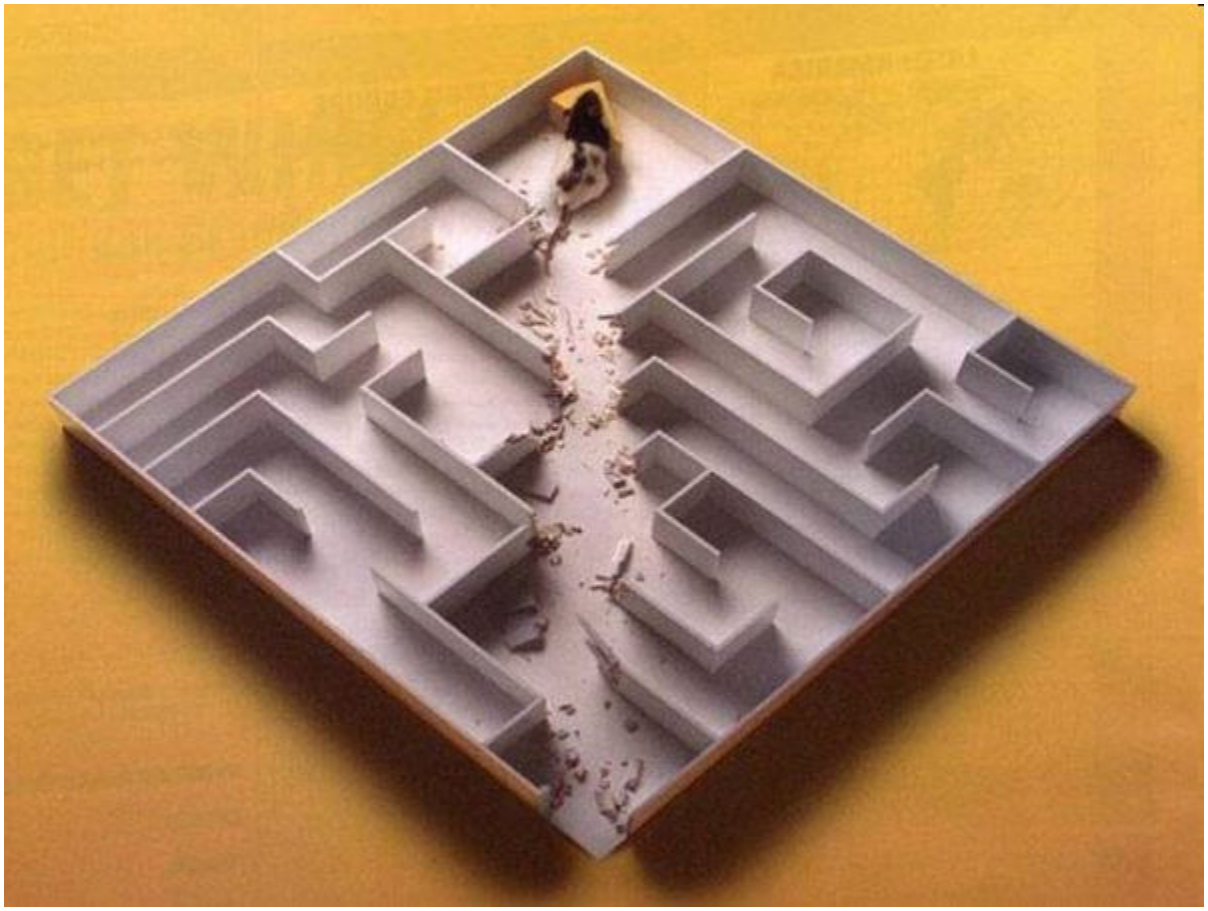
Гибкость разных последовательностей ДНК



AAAAAAAAAAAAAAAAAA
●●●●●●●●●●●●●●●●●●
TTTTTTTTTTTTTTTTTT

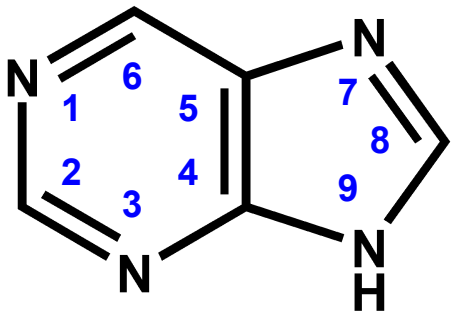
GGGGGGGGGGGGGGGGGG
●●●●●●●●●●●●●●●●●●
CCCCCCCCCCCCCCCCCC

AGCTTGACTAGTCATCA
●●●●●●●●●●●●●●●●●
TCGAACTGATCAGTAGT

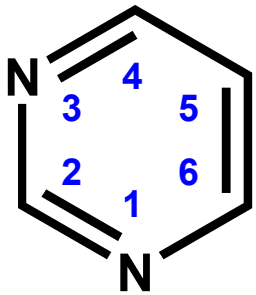


РНК
Первичная структура

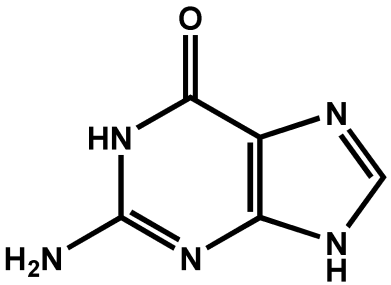
Азотистые основания



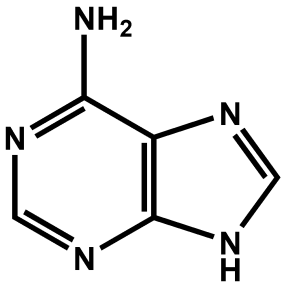
Пурин



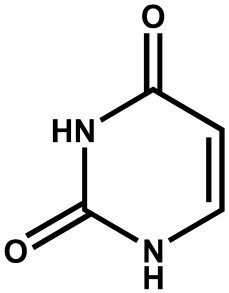
Пиримидин



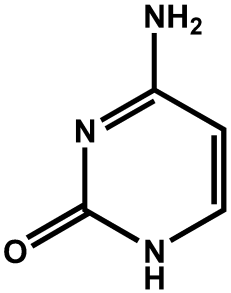
Гуанин



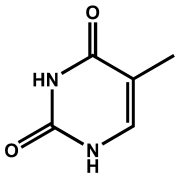
Аденин



Урацил



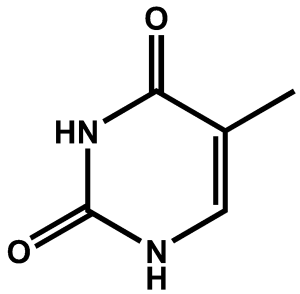
Цитозин



Тимин

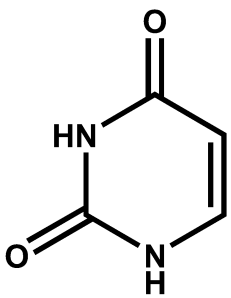
Различия в биологических свойствах урацила и тимина

ДНК

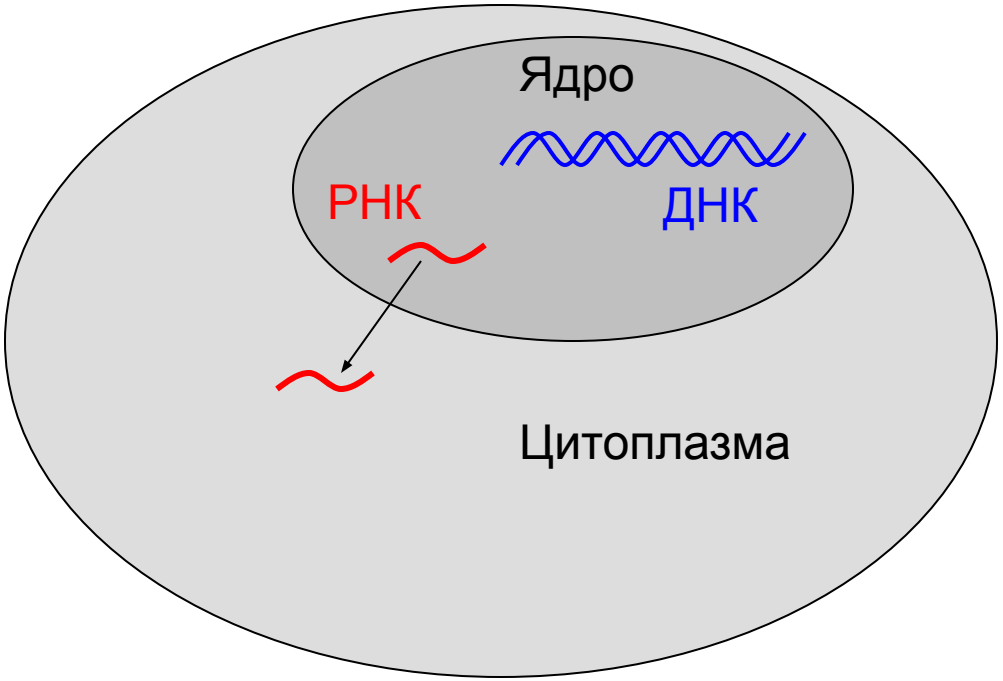


Тимин
(5-метилурацил)

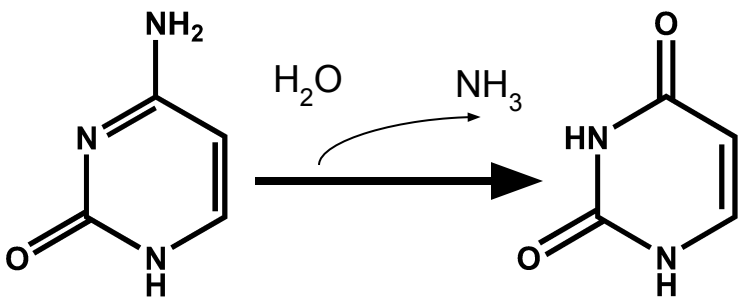
РНК



Урацил



Различия в биологических свойствах урацила и тимина



Цитозин

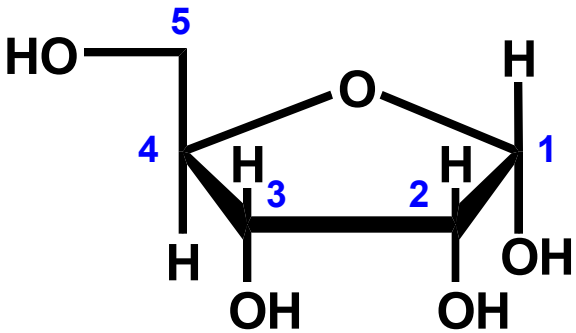
```
AUUGCUCGAUGCUUCGUUAG
●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
ŬAACGAGCUACGAAGCAAUC
A
AUUGCUCGAUGCUUUGUUAG
●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
ŬAACGAGCUACGAAGCAAUC
A
```

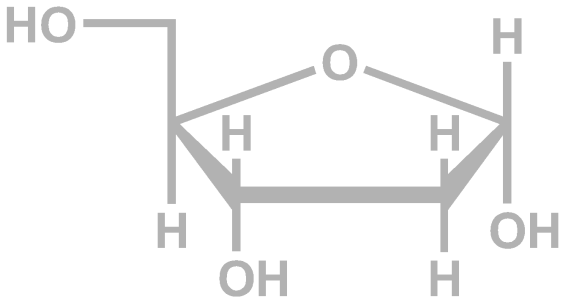
```
AUUGCUCGAUGCUUUGUUAG
●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
ŬAACGAGCUACGAAACAAUC
A
```

```
AUUGCUCGAUGCUUCGUUAG
●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
ŬAACGAGCUACGAAGCAAUC
A
```

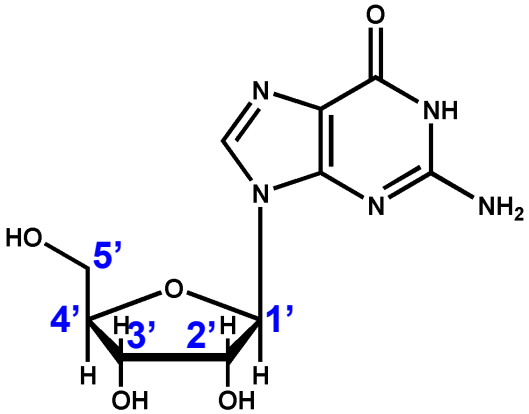
```
ATTGCTCGATGCTTCGTTAG
●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
TAACGAGCTACGAAGCAATC
A
ATTGCTCGATGCTTUGTTAG
●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
TAACGAGCTACGAAGCAATC
A
ATTGCTCGATGCTTCGTTAG
●●●●●●●●●●●●●●●●●●●●
TAACGAGCTACGAAGCAATC
A
```

Рибоза

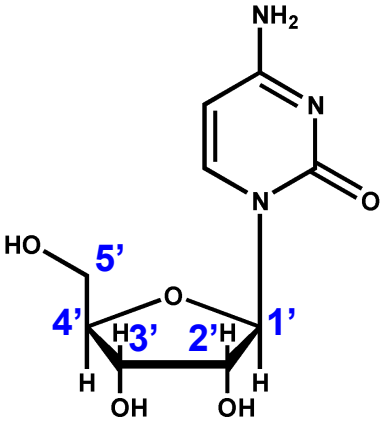




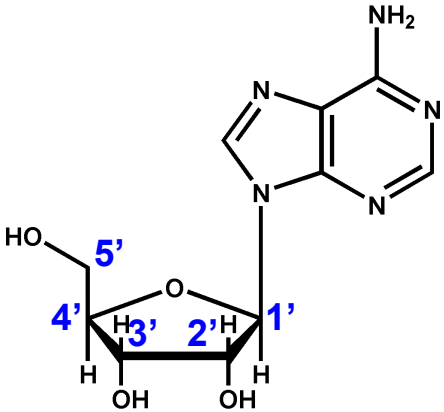
Нуклеозиды
(β-N-гликозиды)



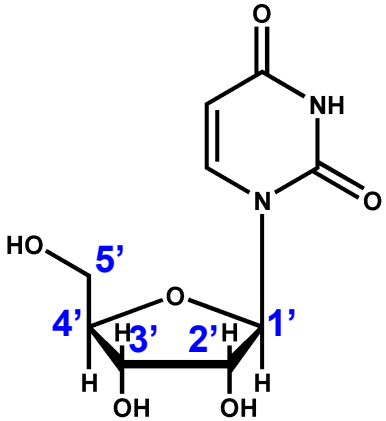
Гуанозин



Цитидин



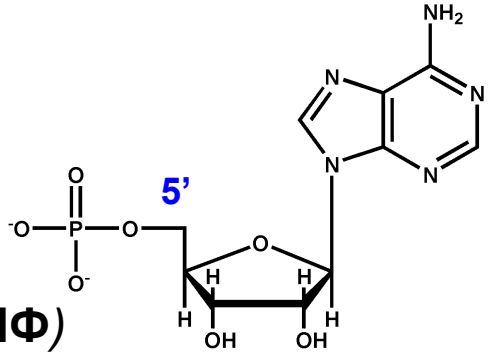
Аденозин



Уридин

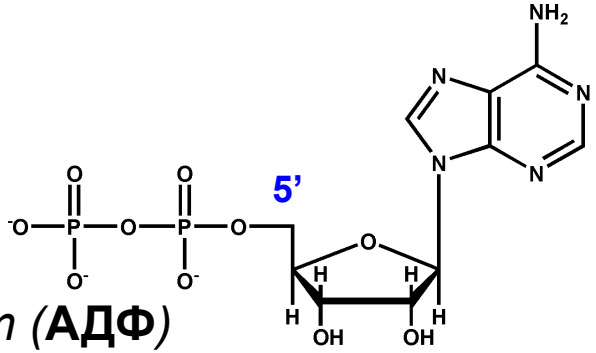
Нуклеотиды - фосфорные эфиры нуклеозидов

Эфиры ортофосфорной кислоты
нуклеозидмонофосфаты



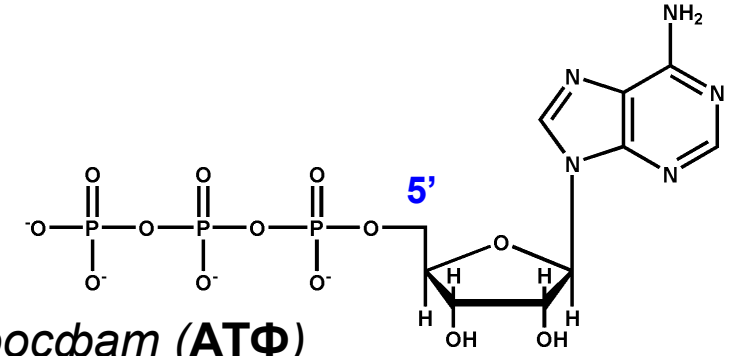
*Аденозин-5'-монофосфат (**АМФ**)*

Эфиры пирофосфорной кислоты
нуклеозиддифосфаты



*Аденозин-5'-дифосфат (**АДФ**)*

Эфиры триполифосфорной кислоты
нуклеозидтрифосфаты

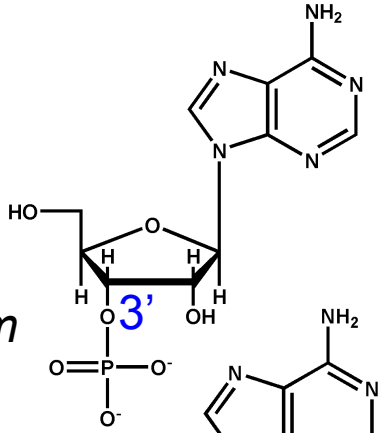


*Аденозин-5'-трифосфат (**АТФ**)*

Нуклеотиды - фосфорные эфиры нуклеозидов

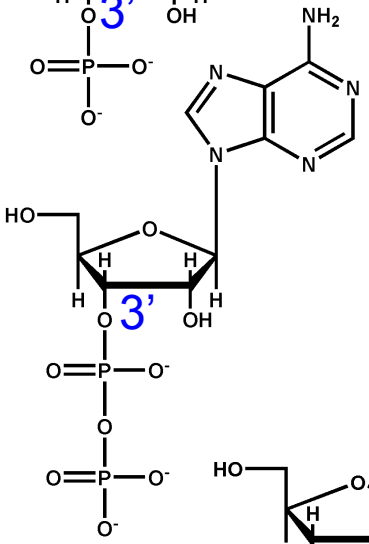
Эфиры ортофосфорной кислоты
нуклеозидмонофосфаты

Аденозин-3’-монофосфат



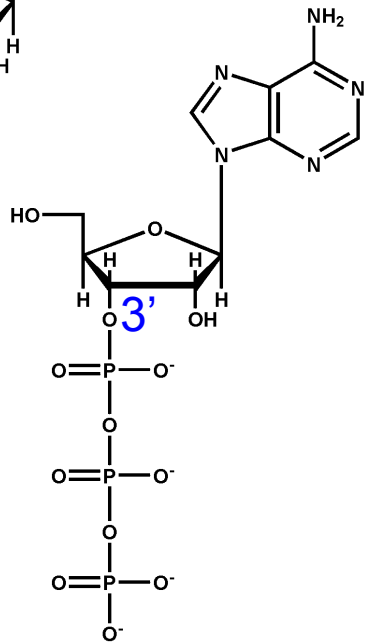
Эфиры пирофосфорной кислоты
нуклеозиддифосфаты

Аденозин-3’-дифосфат



Эфиры триполифосфорной кислоты
нуклеозидтрифосфаты

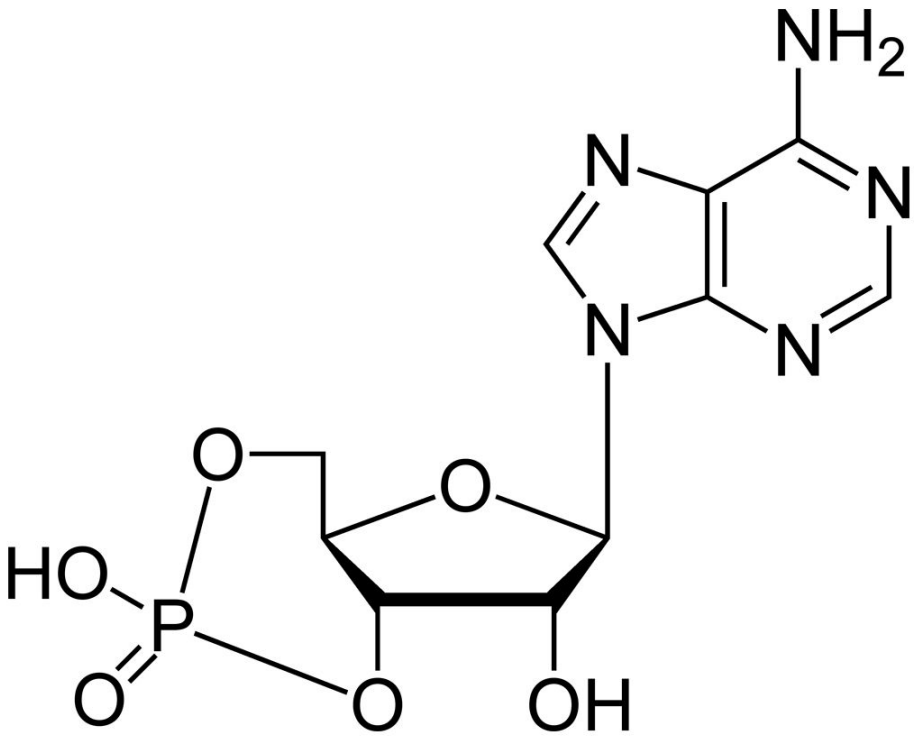
Аденозин-3’-трифосфат



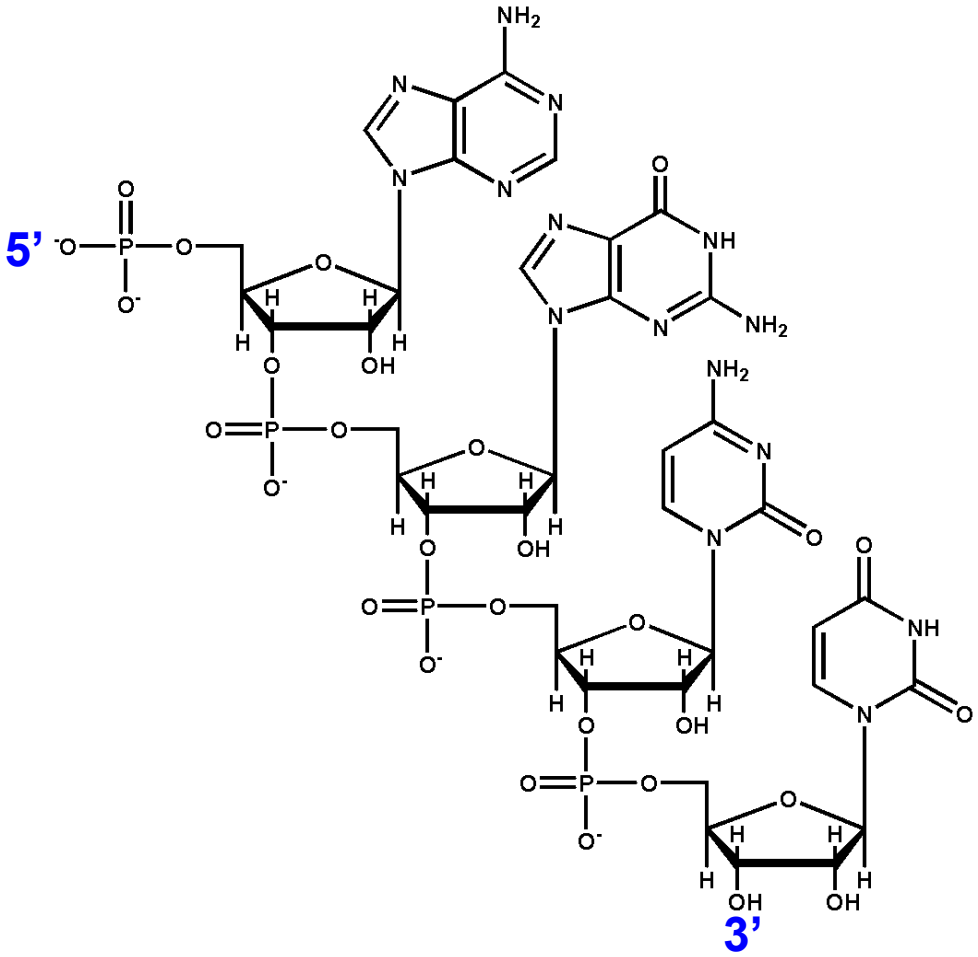
цАМФ

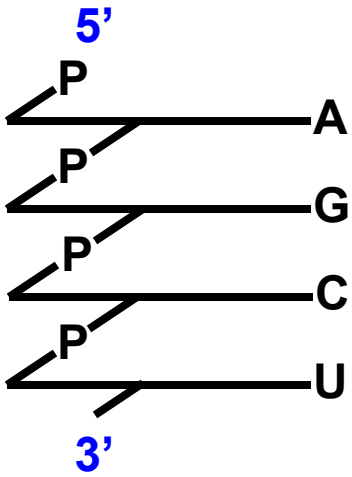
аденозин-3’,5’-цикломонофосфат

3’,5’-цикло-АМФ



Олигонуклеотиды и полинуклеотиды NpNpNpNpN…

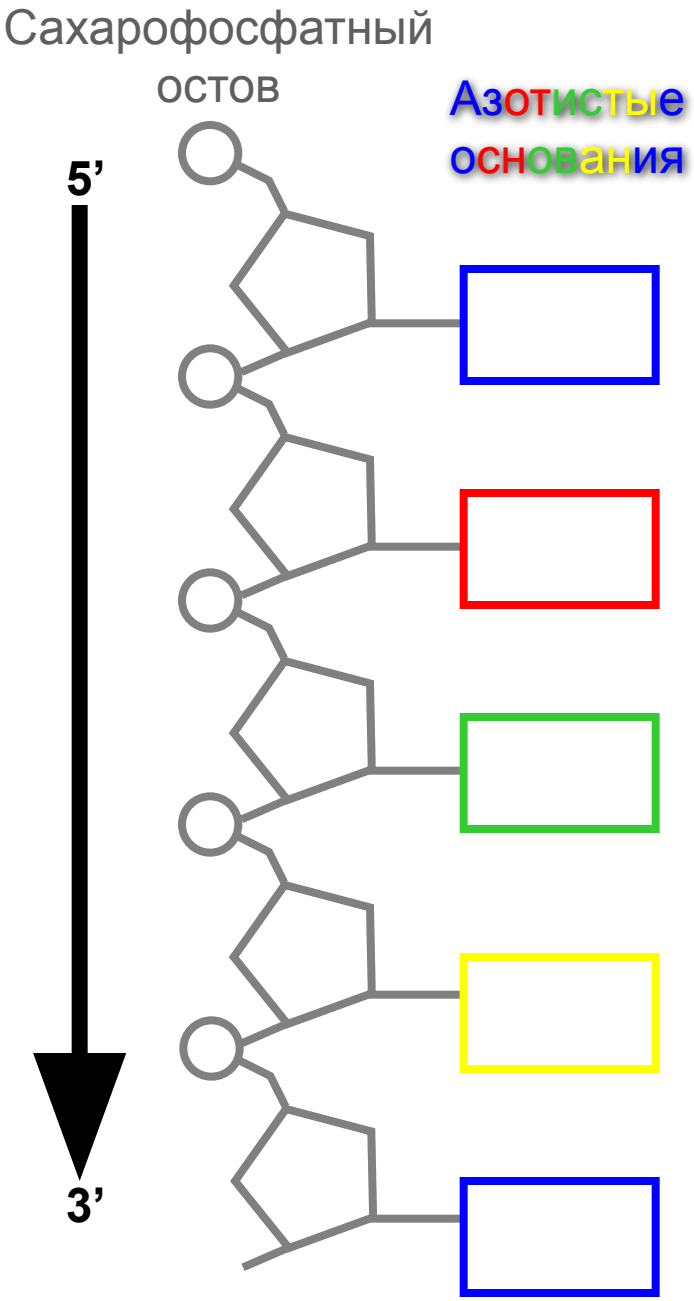




5’-pApGpCpU-3’

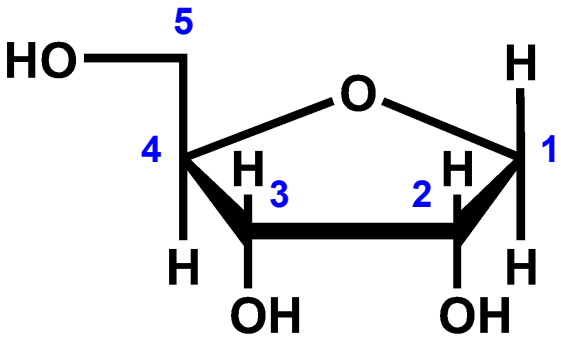
AGCU

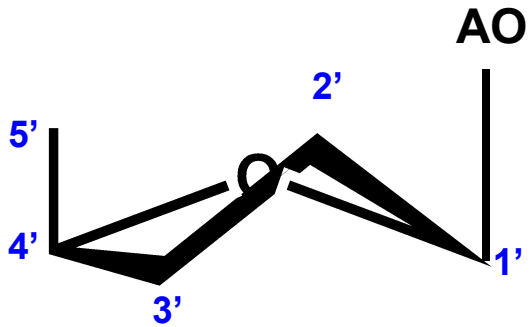
Первичная структура РНК



РНК
Вторичная структура

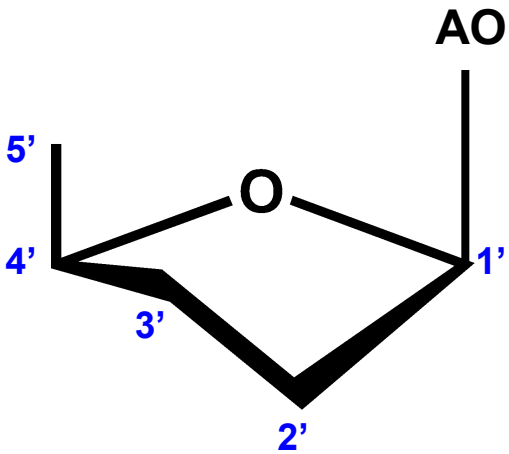
Конформации фуранозного кольца



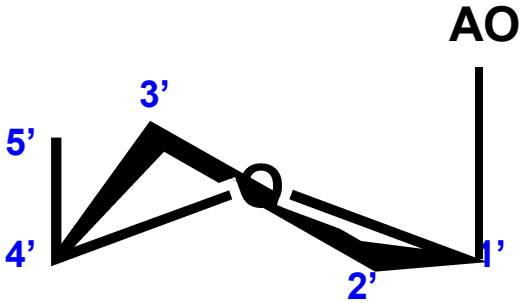


C2’-эндо

(РНК в мономерной форме)

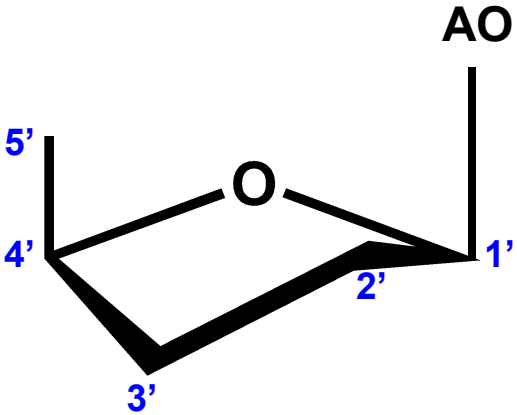


C2’-экзо



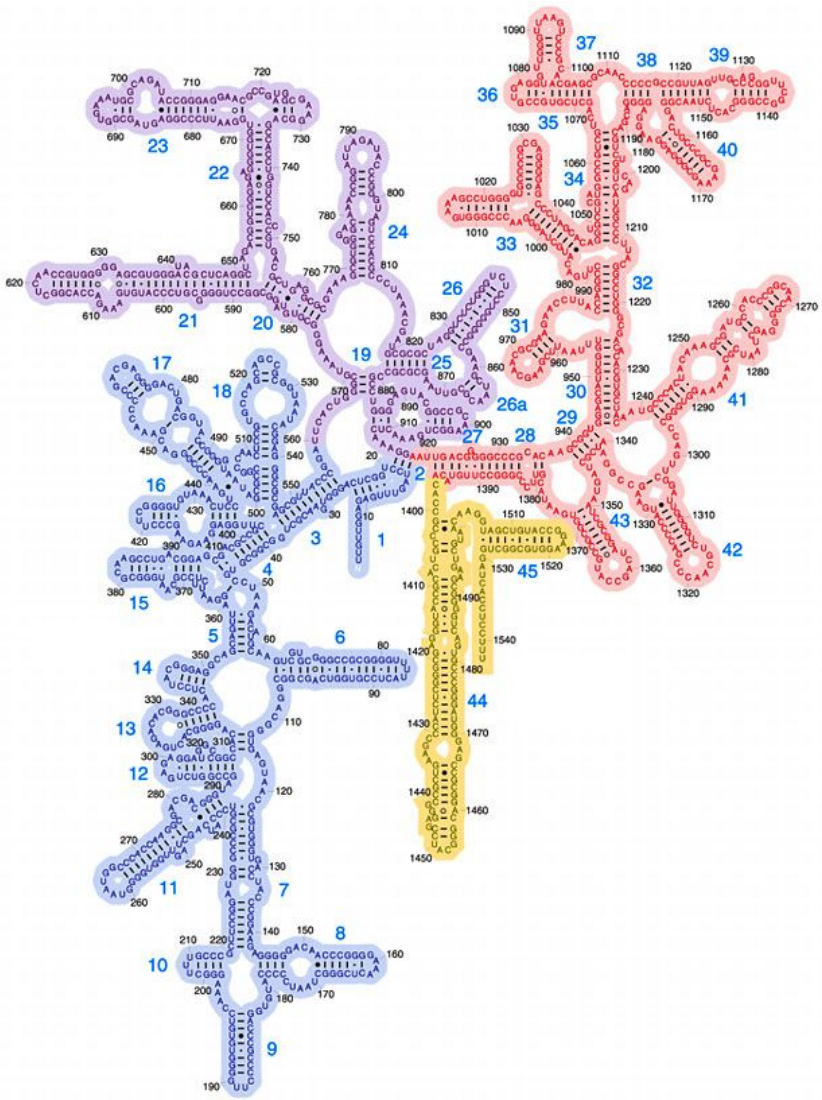
C3’-эндо

(РНК в мономерной форме
и в двойной спирали)

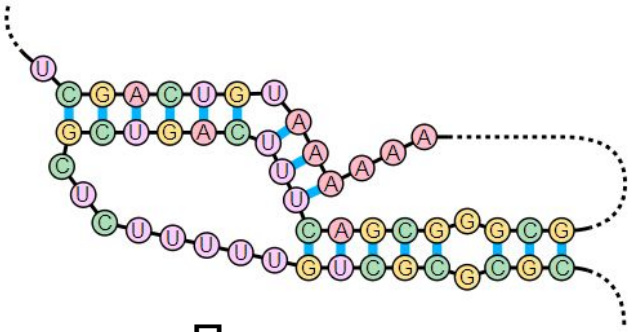


C3’-экзо

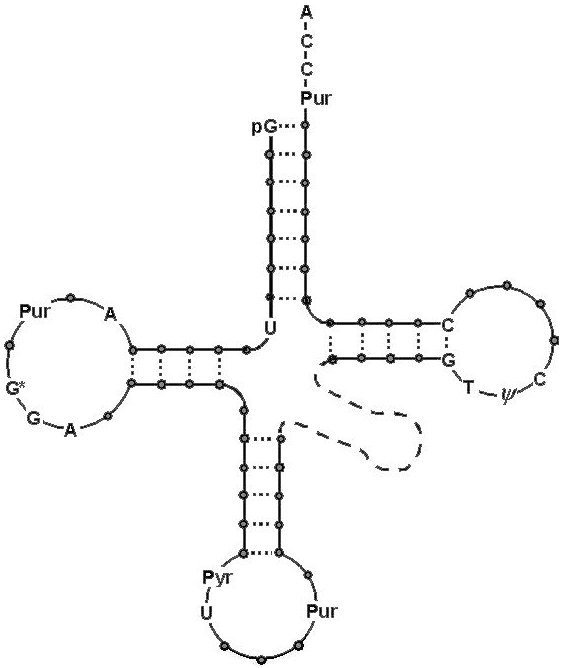
Внутрицепочечные шпильки



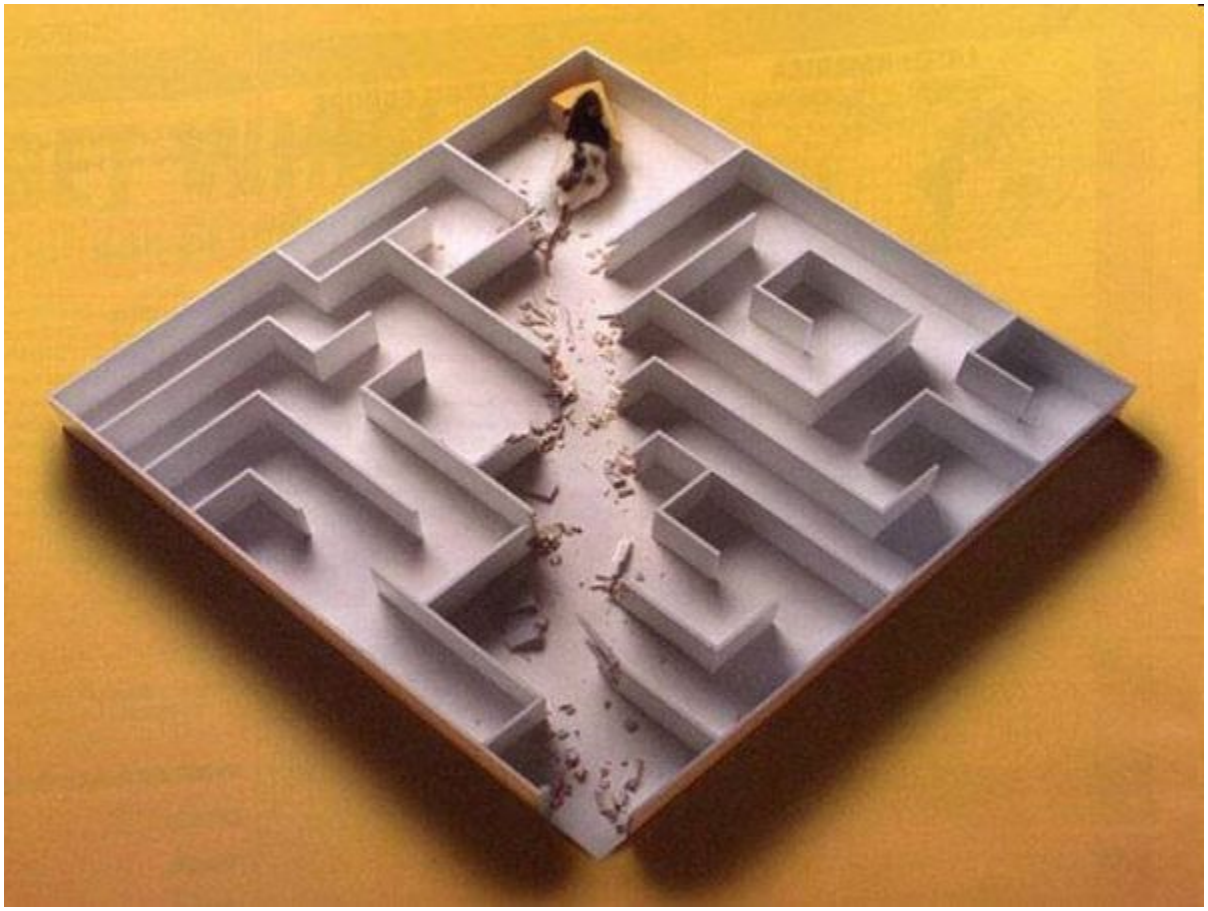
16S рРНК



Псевдоузел

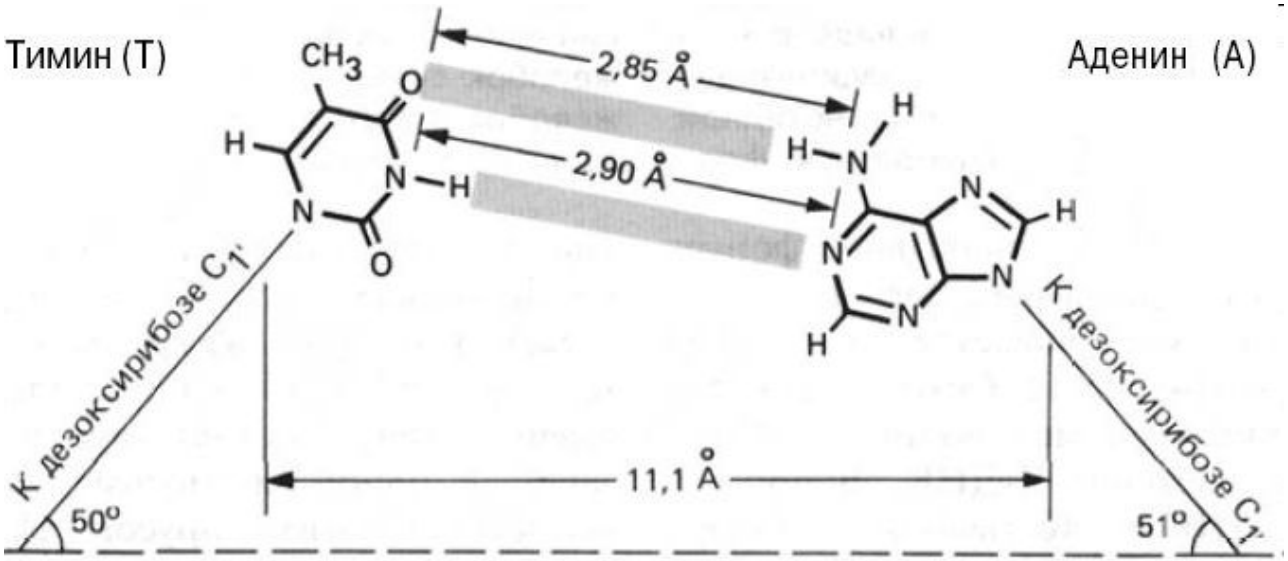


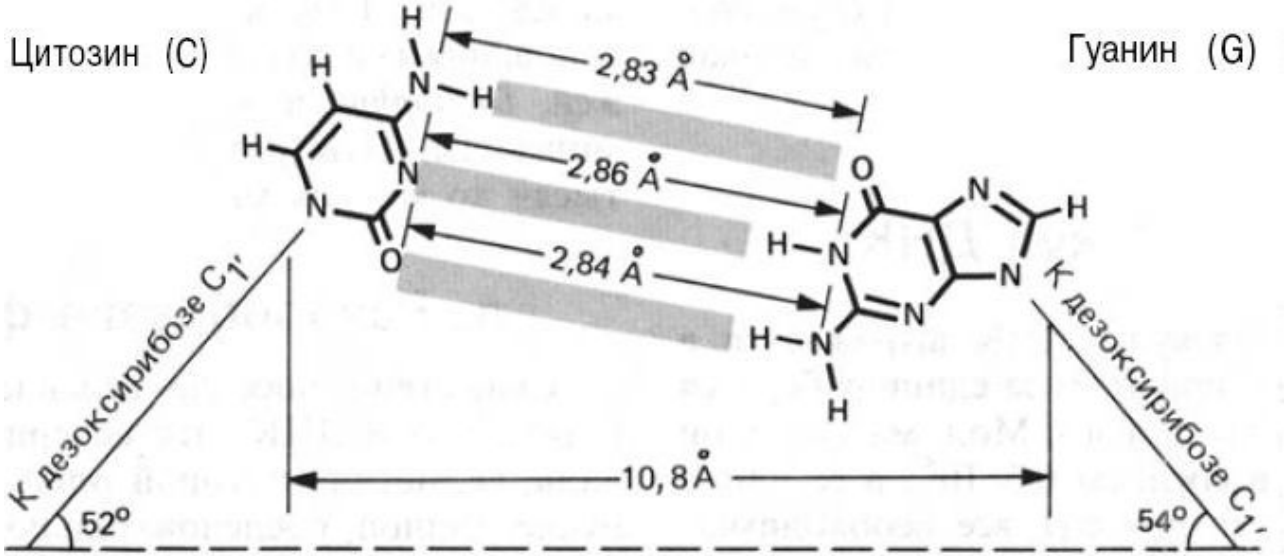
тРНК



Нестандартные вторичные и третичная структура нуклеиновых кислот

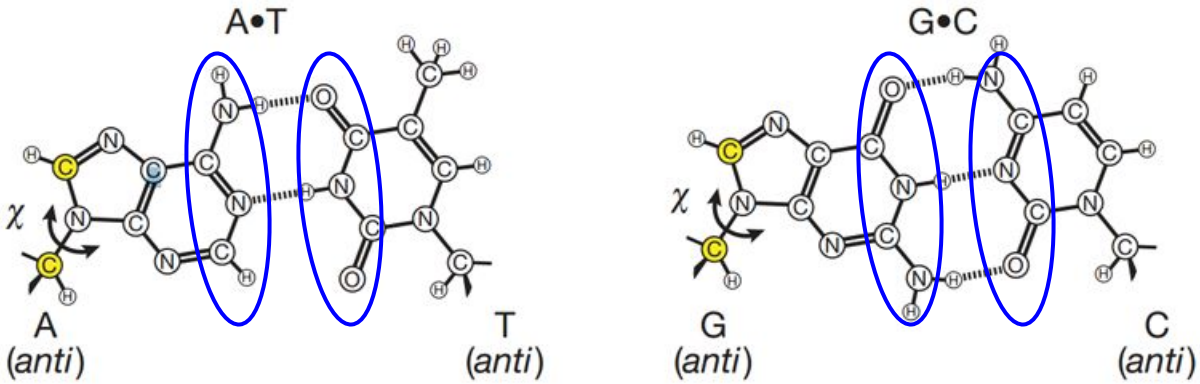
Уотсон-криковские пары



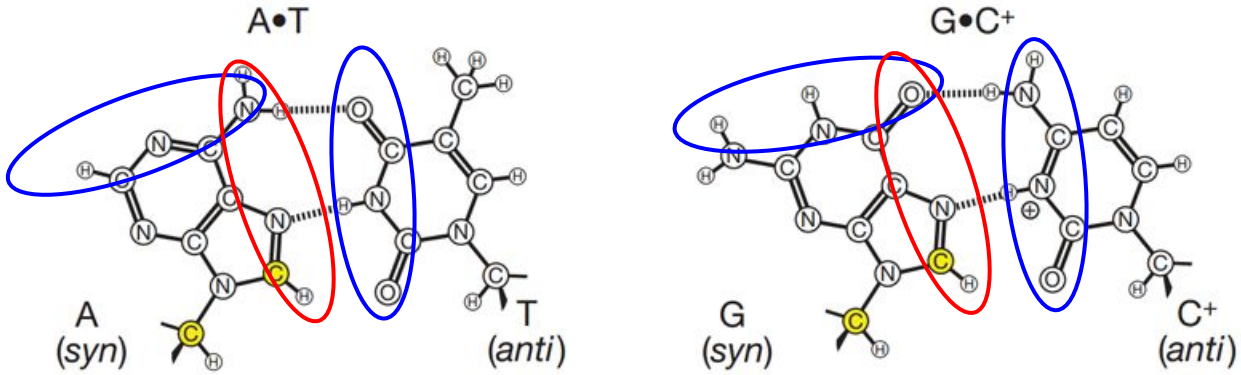


Хугстиновские пары

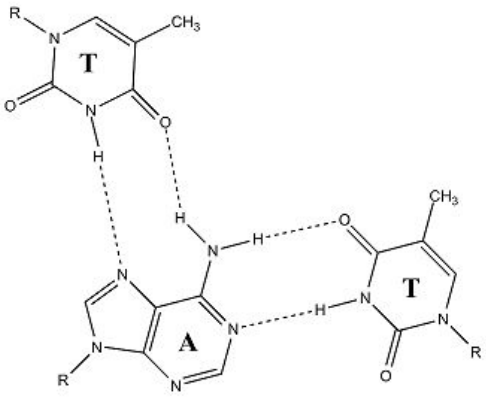
Уотсон-криковские пары



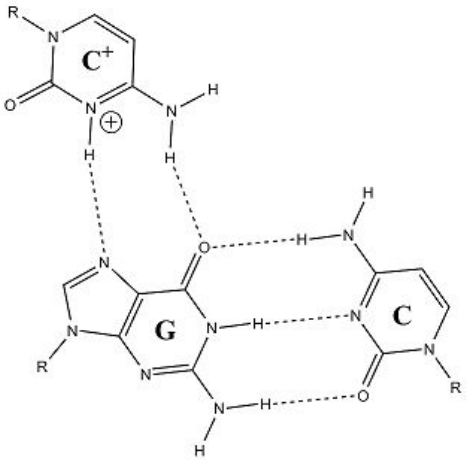
Хугстиновские пары



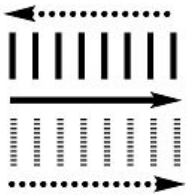
Триплекс в большом желобке



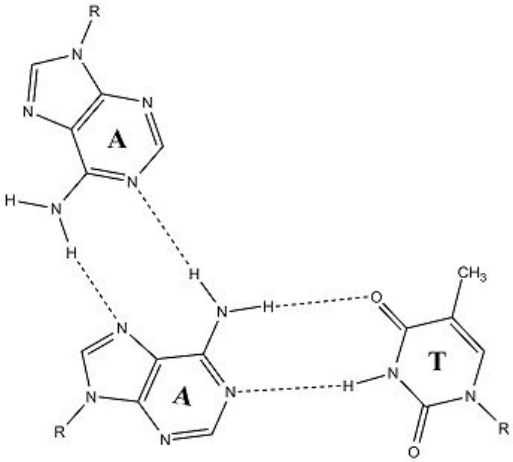
TA*T



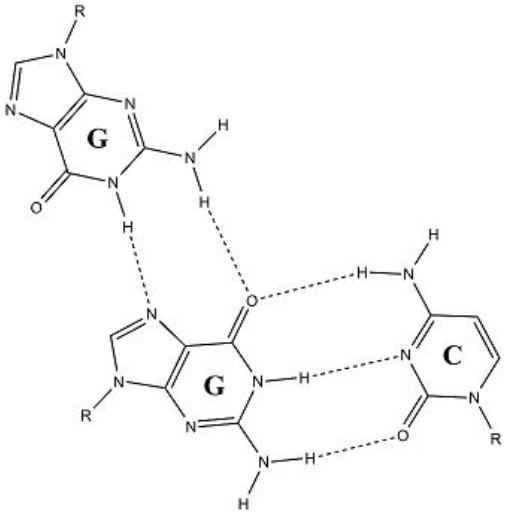
CG*C+



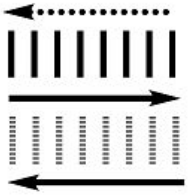
YR*Y



TA*A

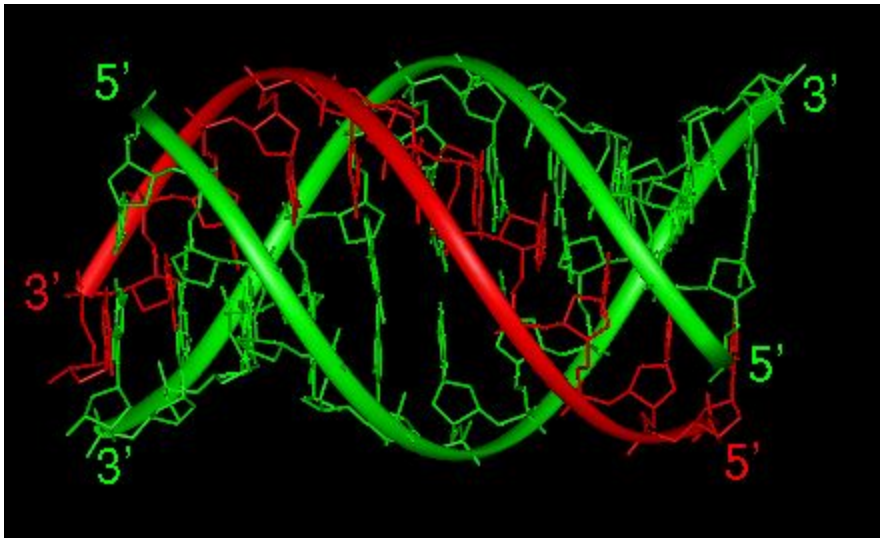


CG*G

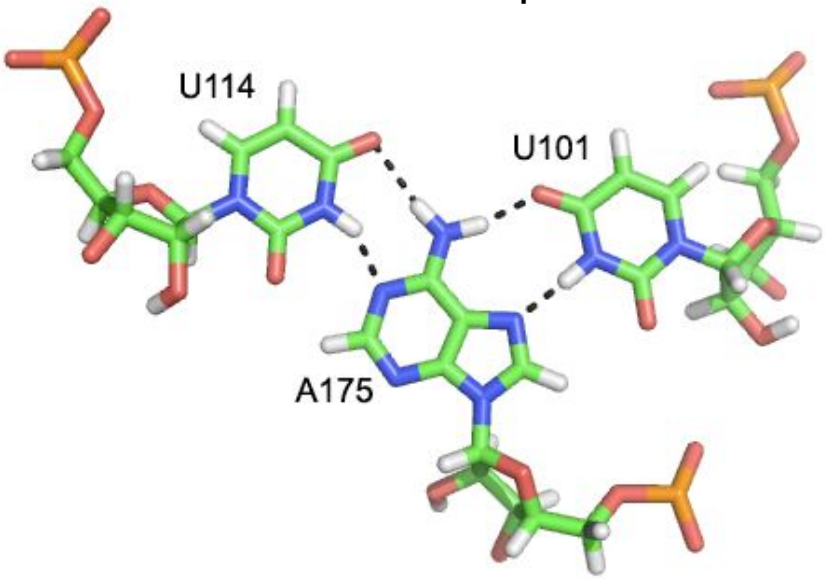


YR*R

Триплекс в большом желобке

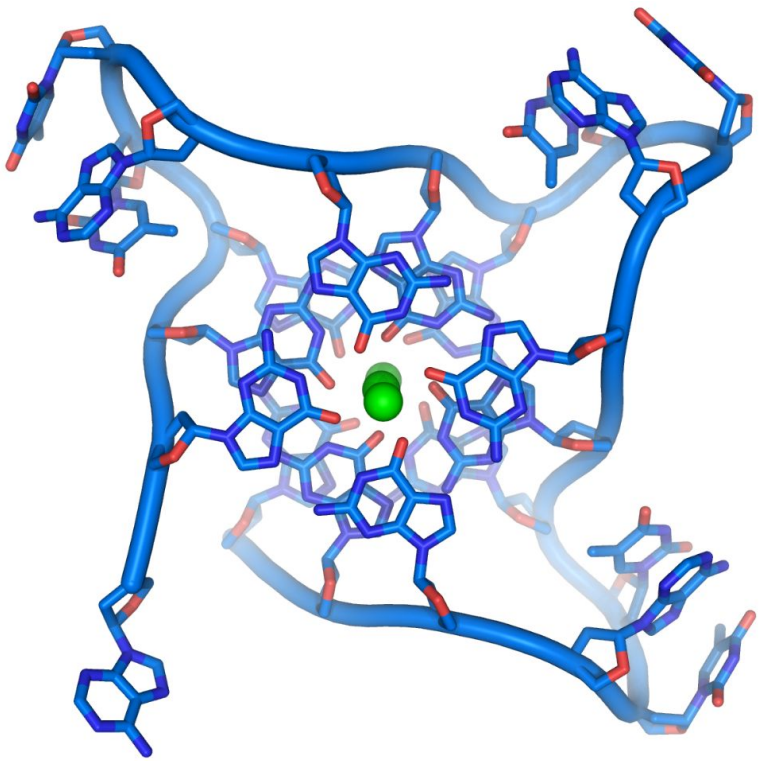


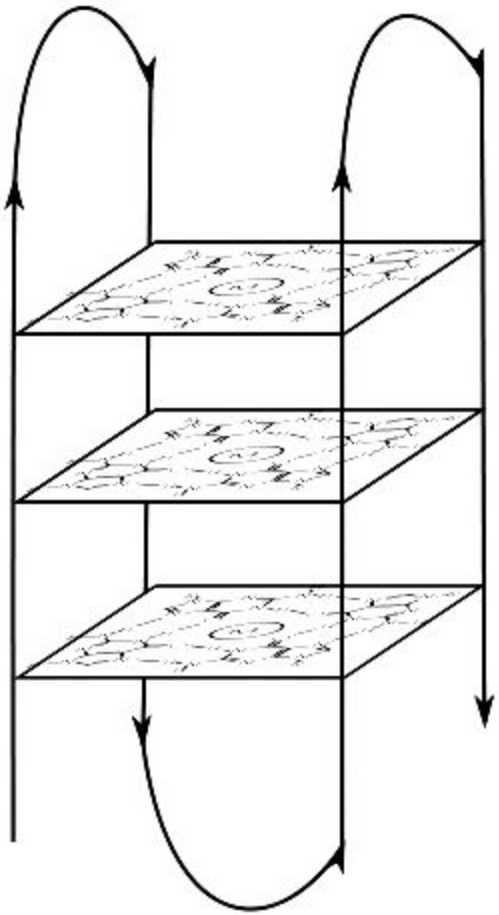
РНК Теломеразы



Квадруплекс

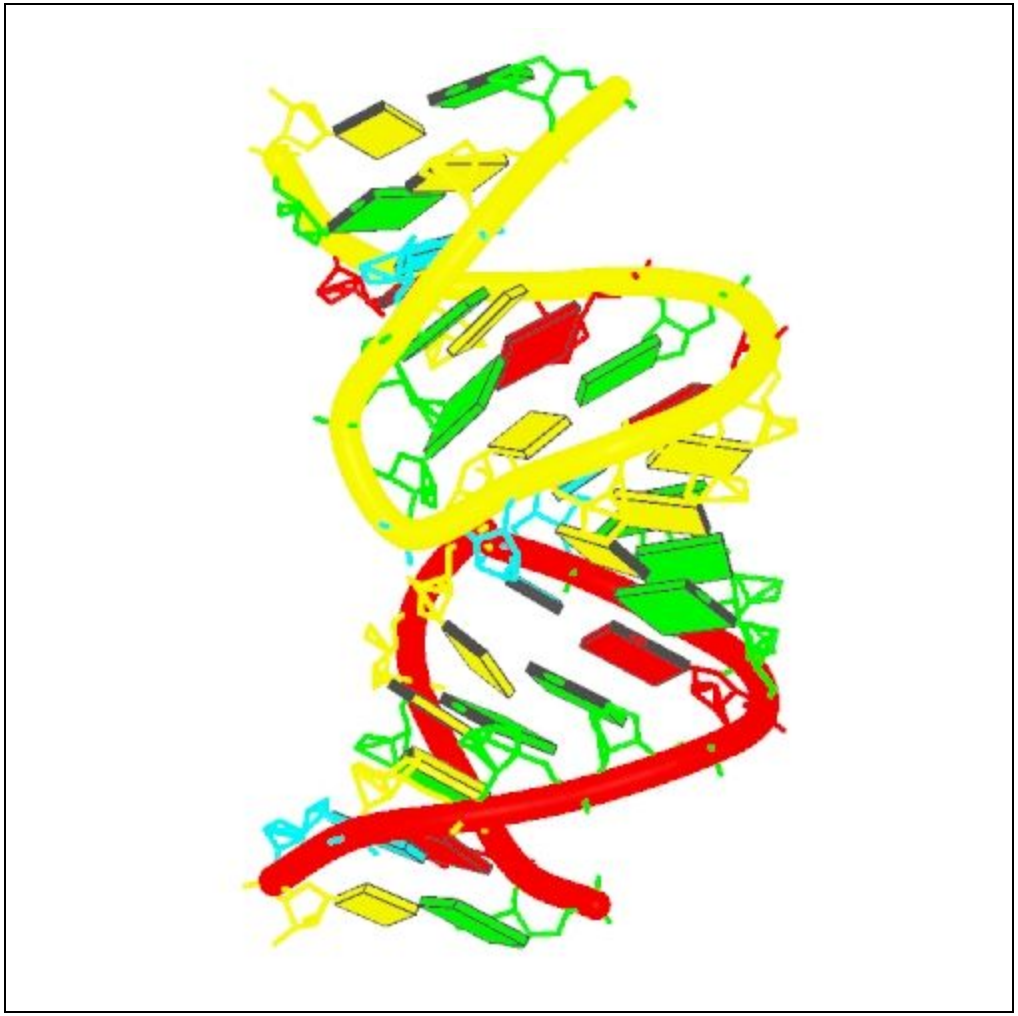
Теломерная ДНК





Целующиеся петли

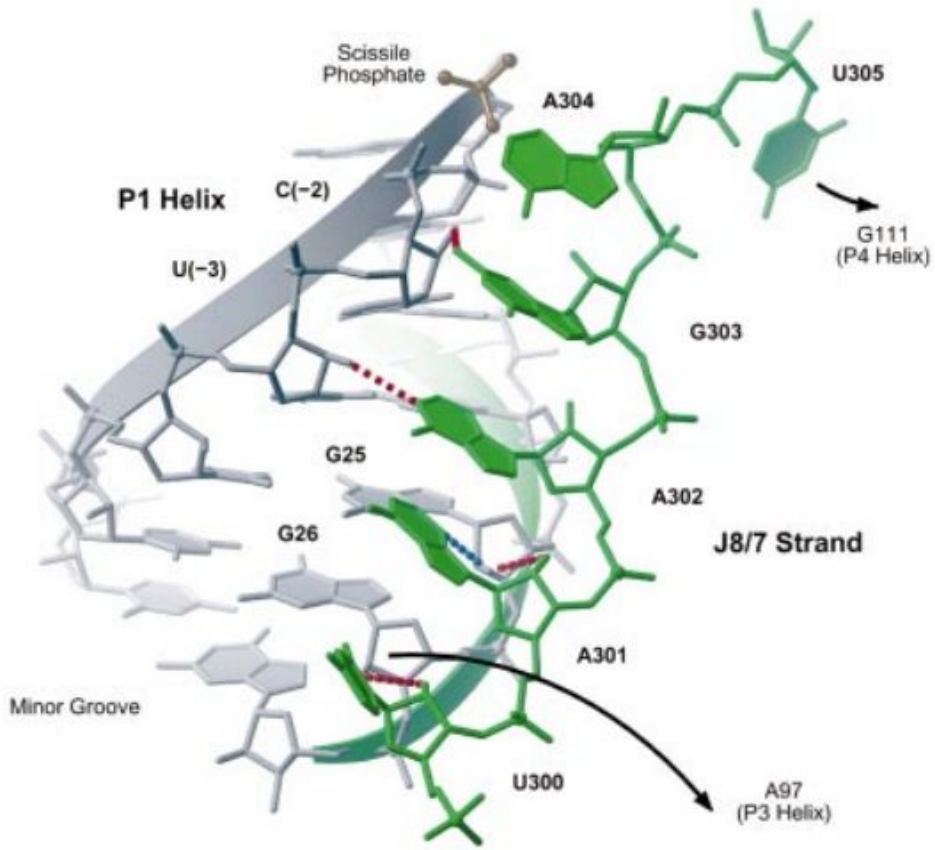
Транспортная РНК



Триплекс в малом желобке

(водородные связи между азотистым основанием и малой бороздкой)

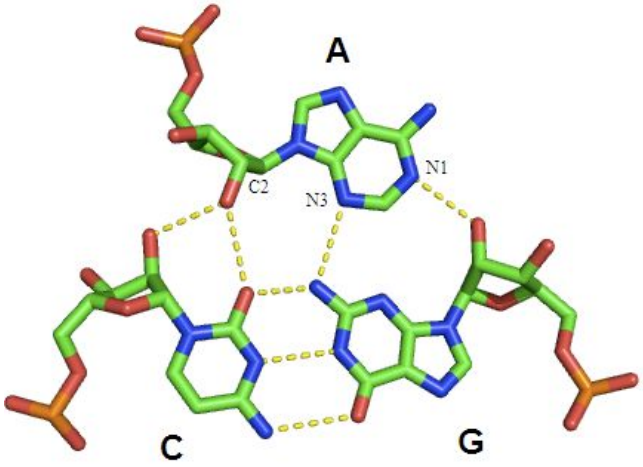
Самосплайсирующиеся рибозимы

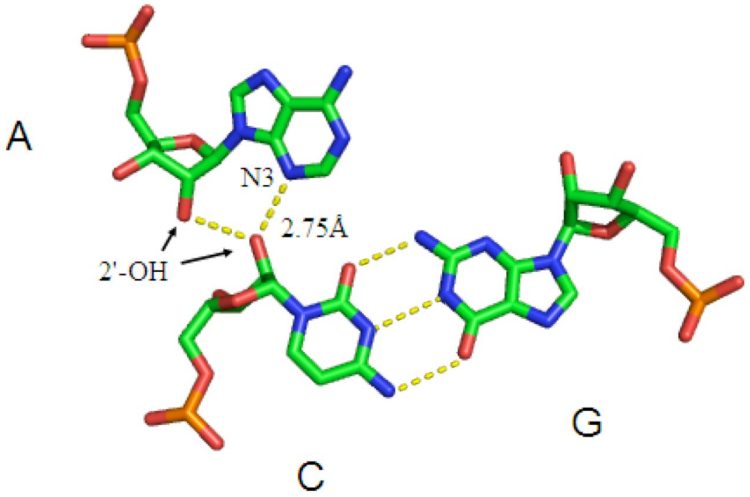


Триплекс в малом желобке
Мотив «ля-минор» (A-minor motif)

(водородные связи между аденином и малой бороздкой)

Транспортная РНК

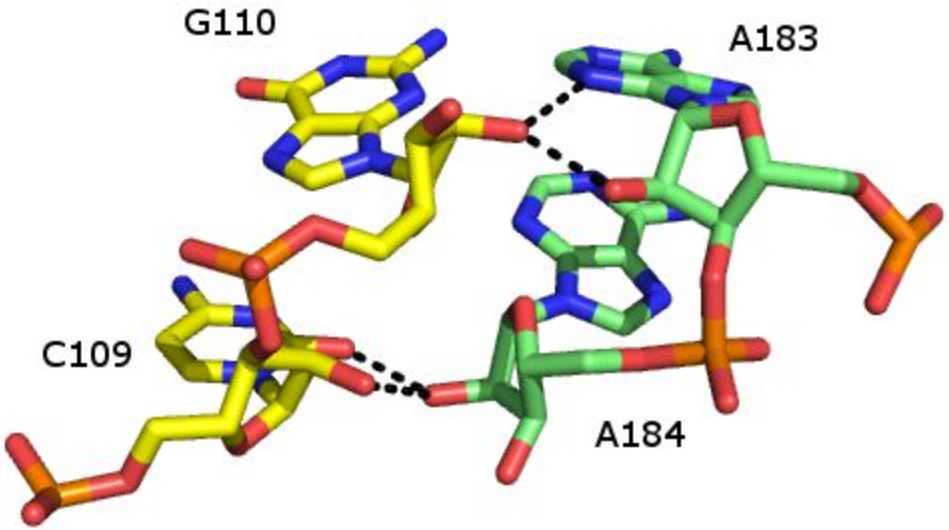




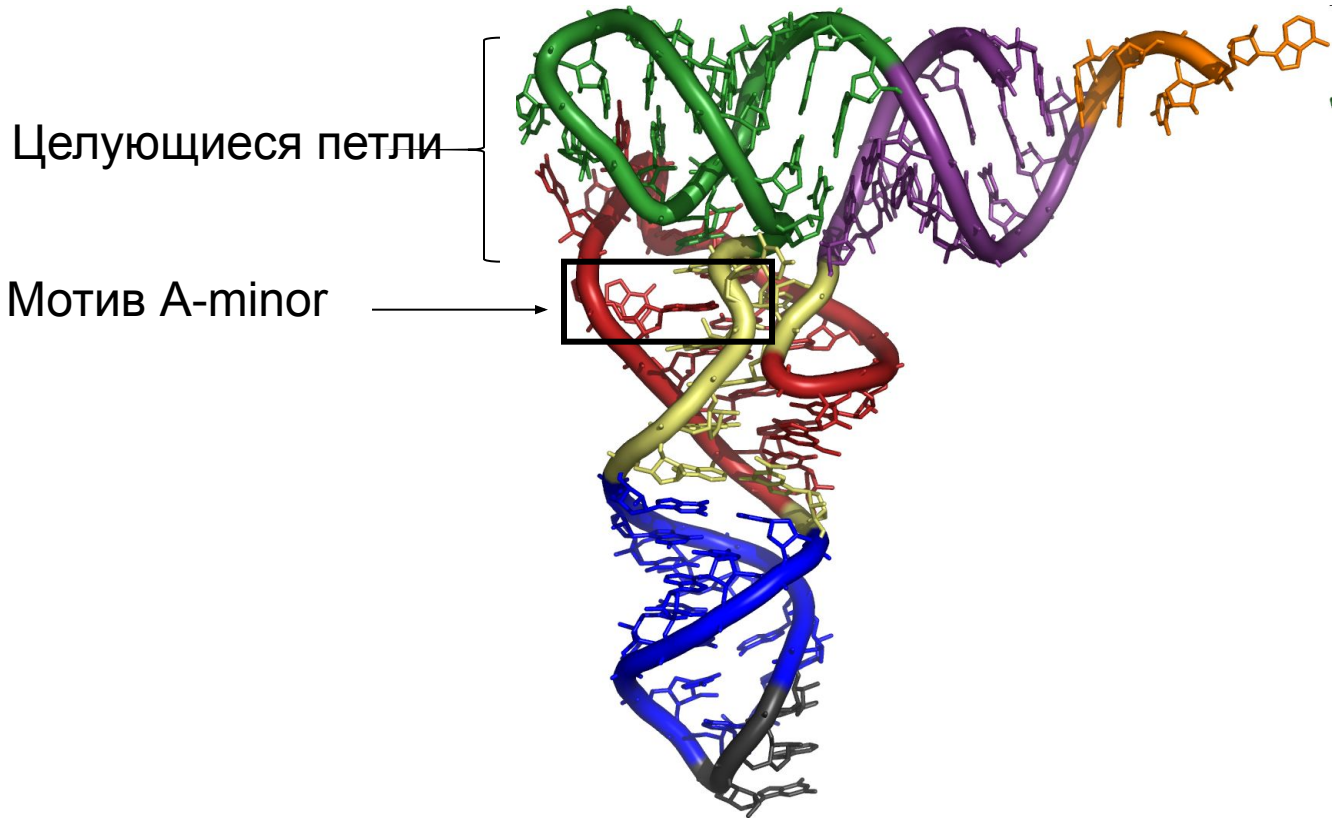
Рибозная «застежка-молния»

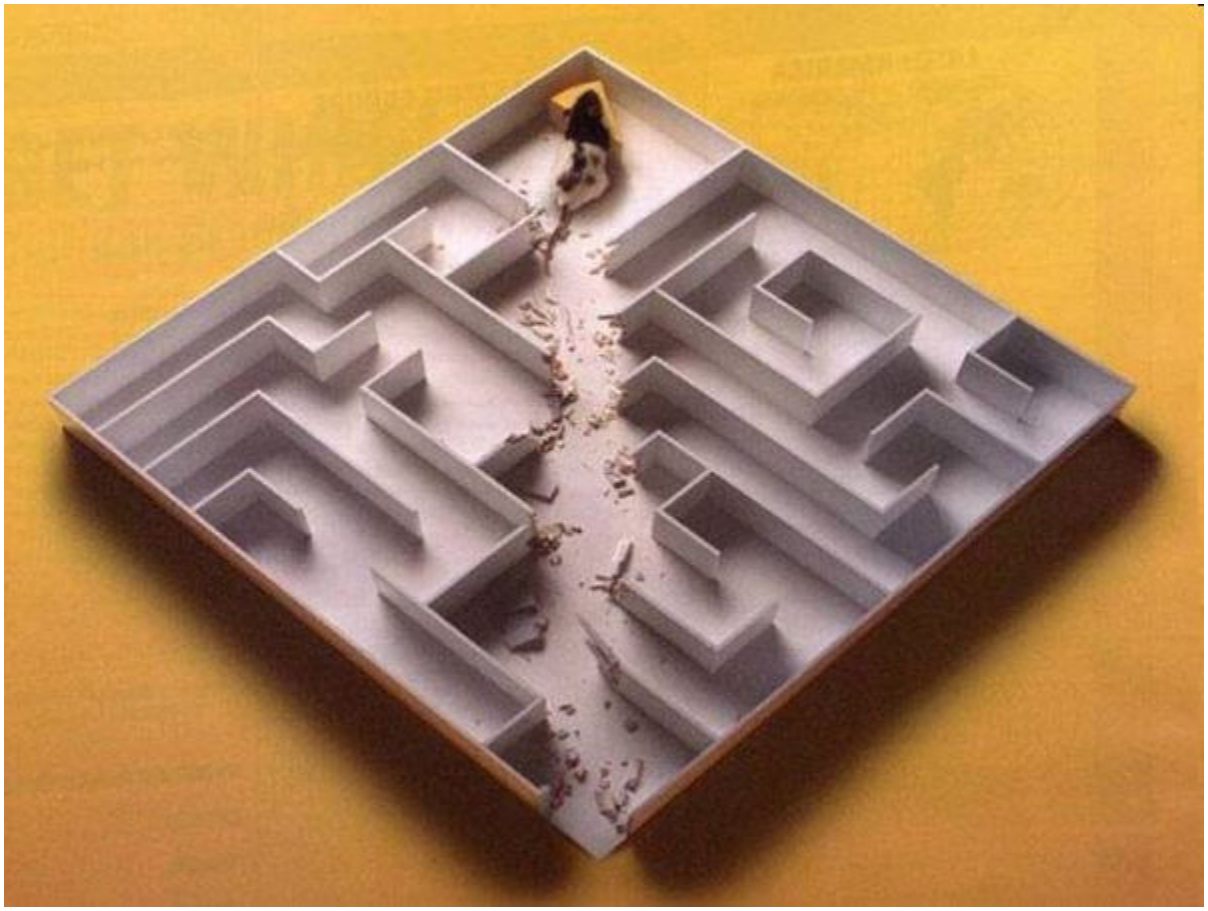
(водородные связи между ОН группами у С2’ атома рибозы)

Рибосомальная РНК



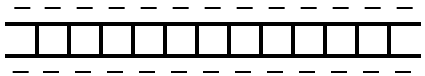
Третичная структура тРНК

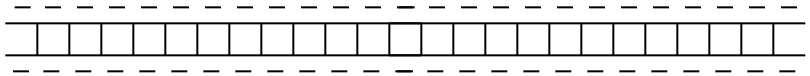


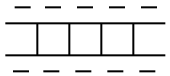


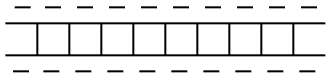
Методы исследования нуклеиновых кислот

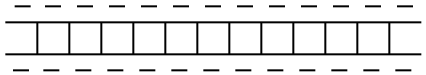
Электрофорез

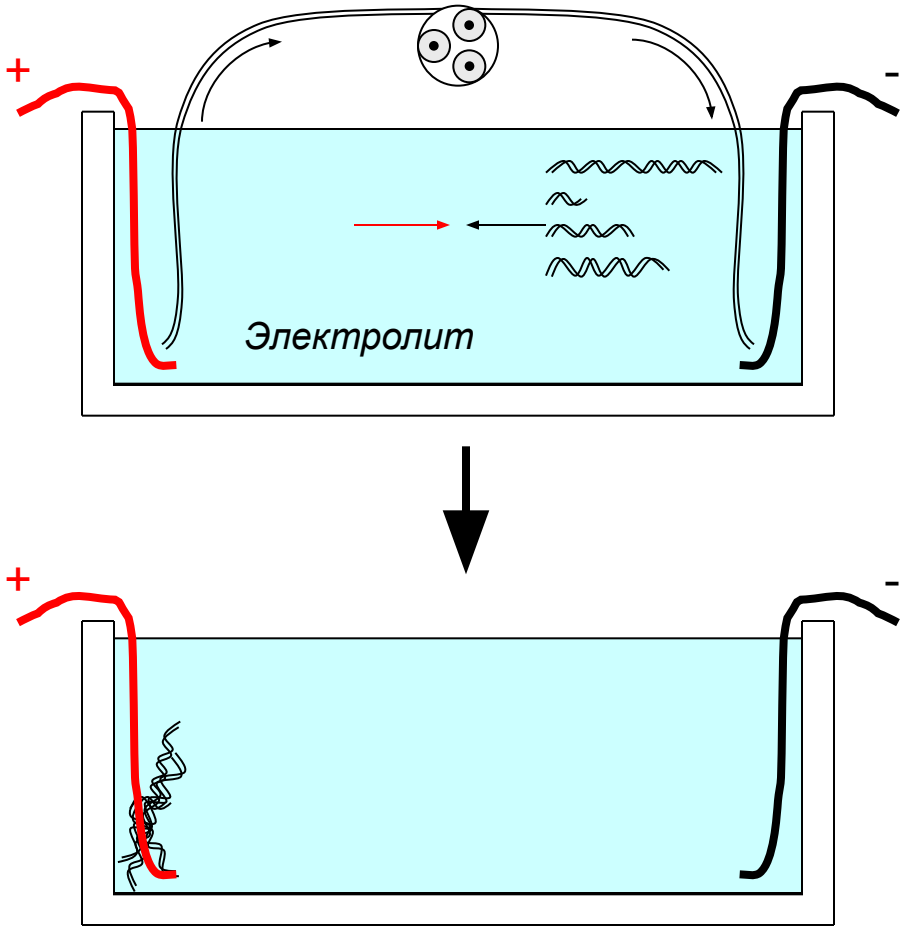


1 

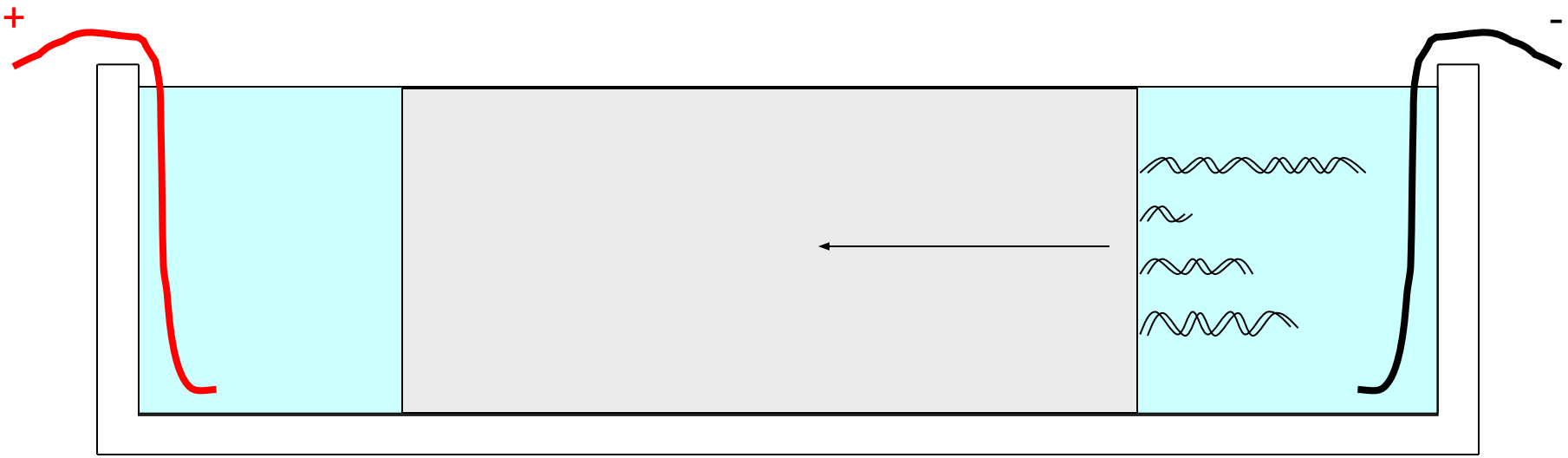
2 

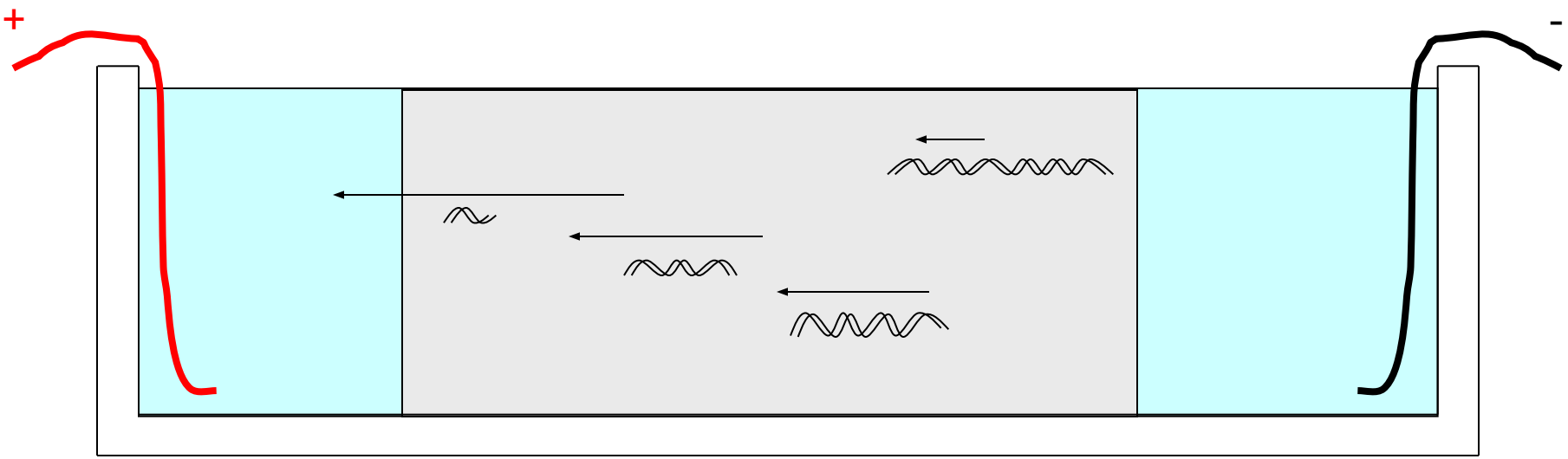
3 

4 



Гель-электрофорез





Гель-электрофорез

$$lg\mu = lg\mu_0 - Kr \cdot \tau$$

μ – *электрофоретическая подвижность в геле*

μ_0 – *электрофоретическая подвижность в электролите*

Kr – *коэффициент замедления*

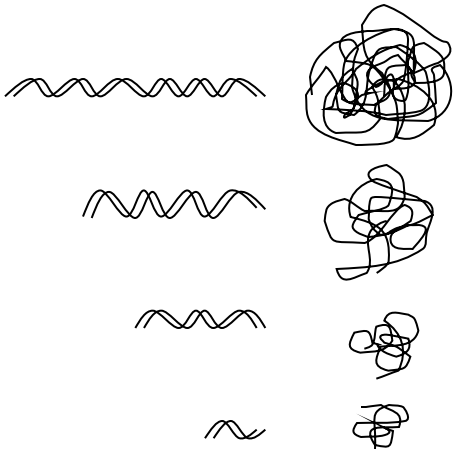
τ – *концентрация геля*

$$\mu = \frac{z}{6\pi\eta r}$$

z – *заряд молекулы*

η – *вязкость среды*

r – *радиус молекулы*

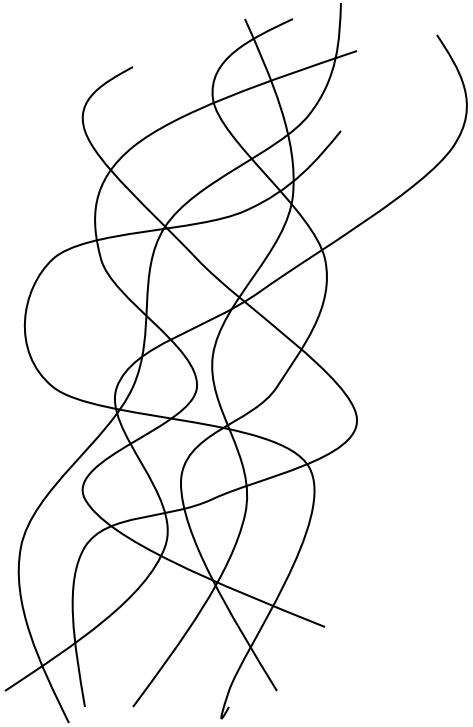


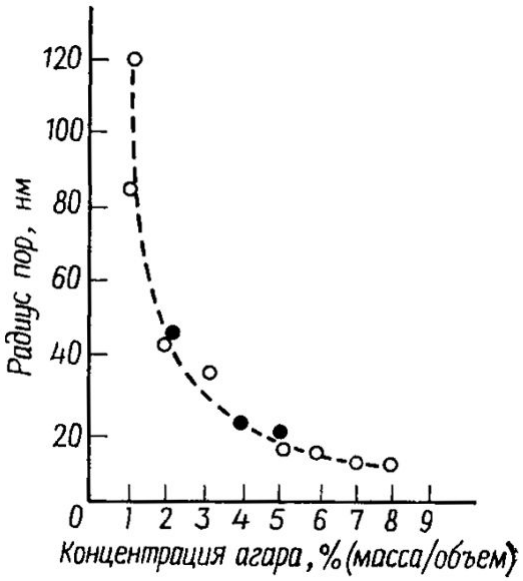
Kr – *коэффициент замедления*

z – *заряд молекулы*

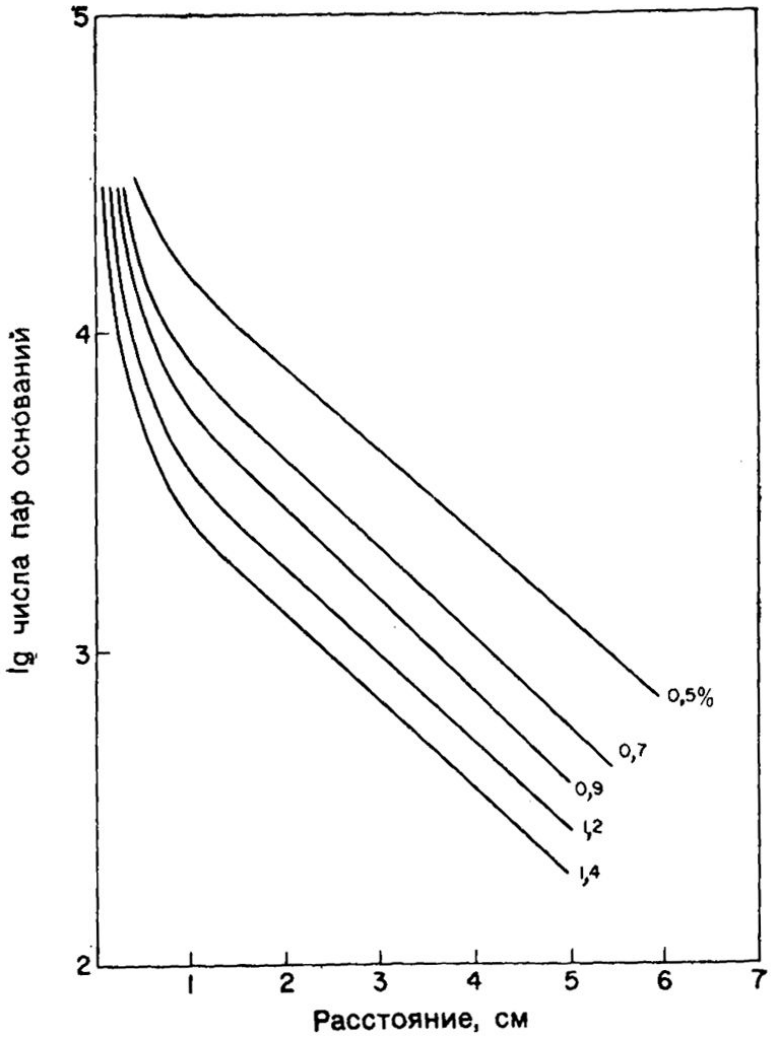
r – *радиус молекулы*

Гель-электрофорез





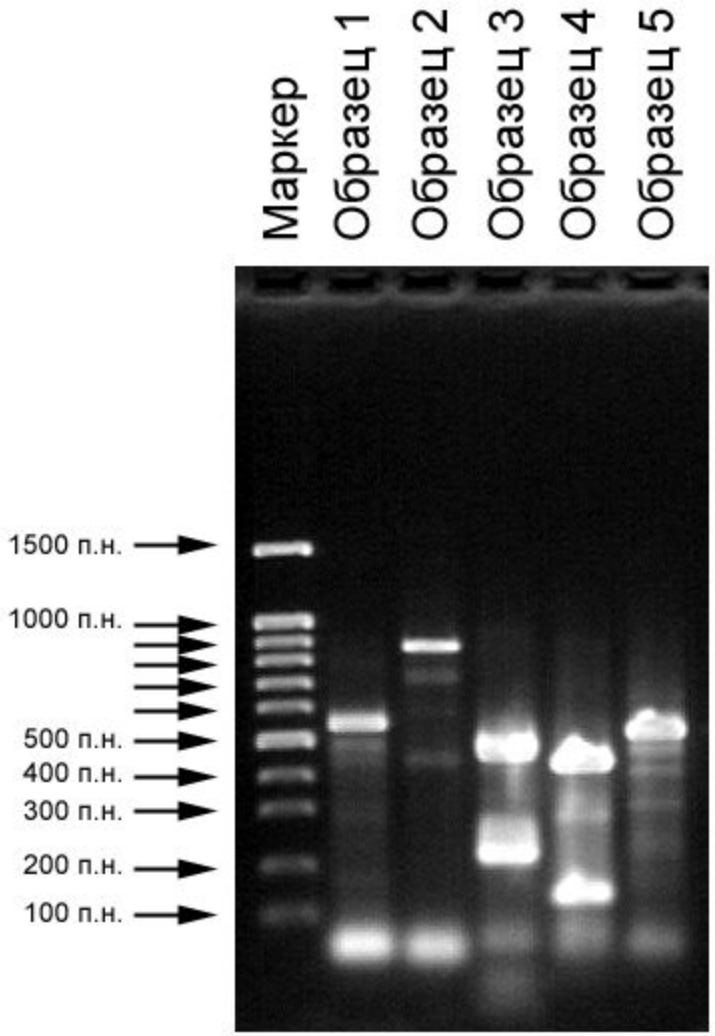
Гель-электрофорез



Зависимость электрофоретической подвижности от длины ДНК в гелях разной плотности

Гель-электрофорез

Определение длины фрагмента ДНК

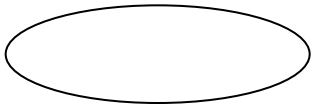


Гель-электрофорез

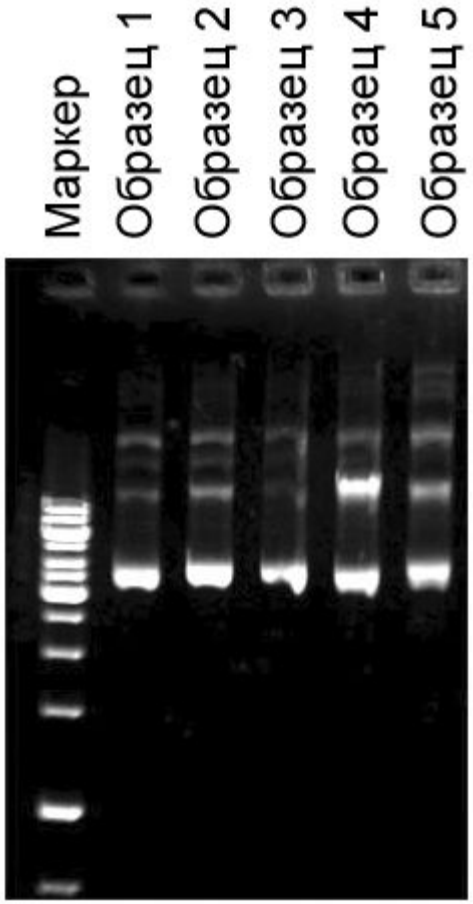
Определение состояния ДНК

Линейная ДНК

Кольцевая ДНК



Кольцевая суперскрученная ДНК



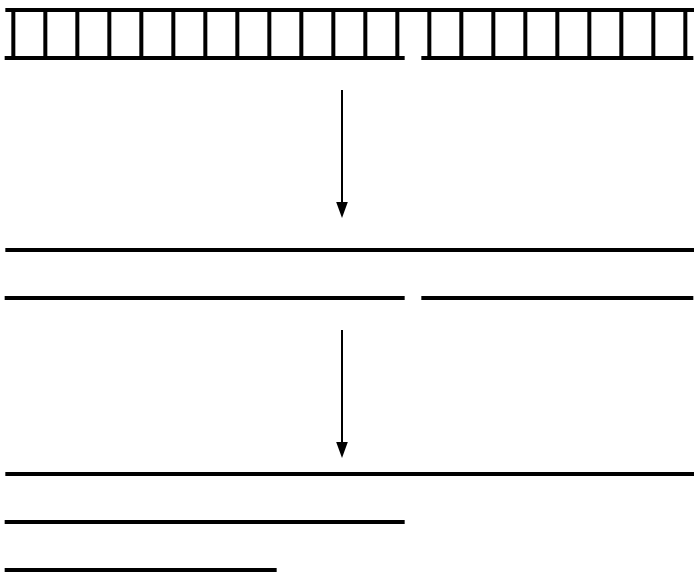
Кольцевая ДНК

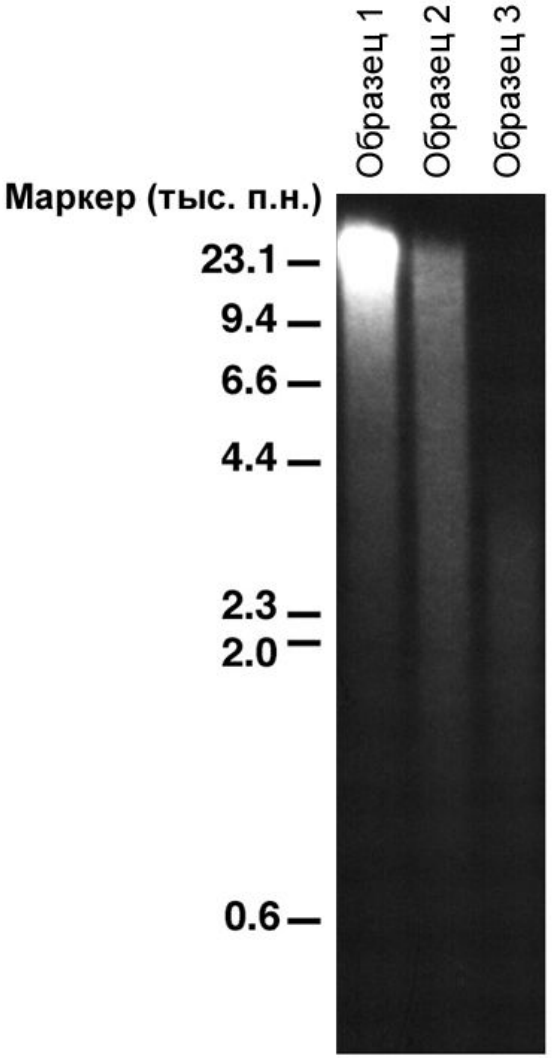
Линейная ДНК

Кольцевая суперскрученная ДНК

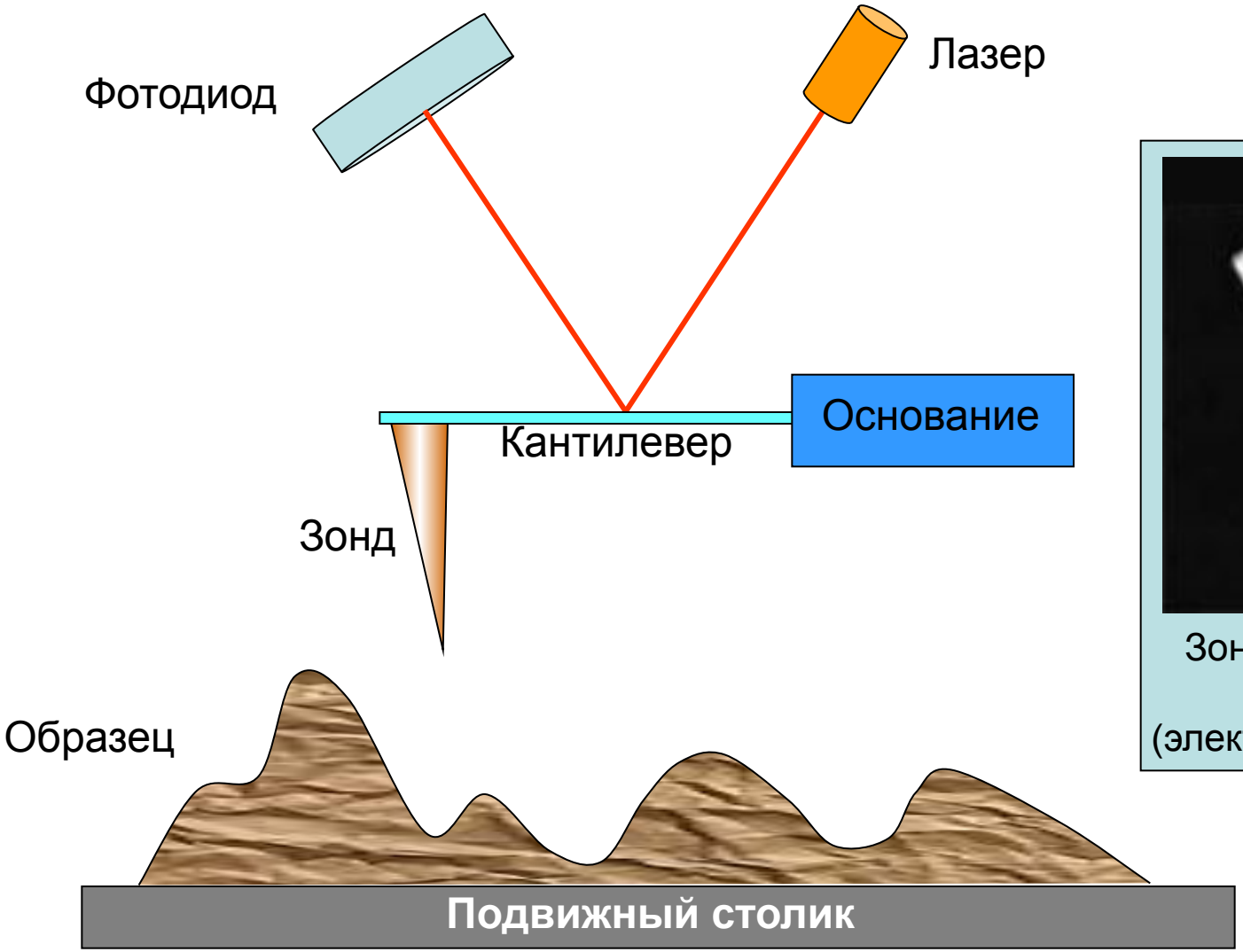
Гель-электрофорез

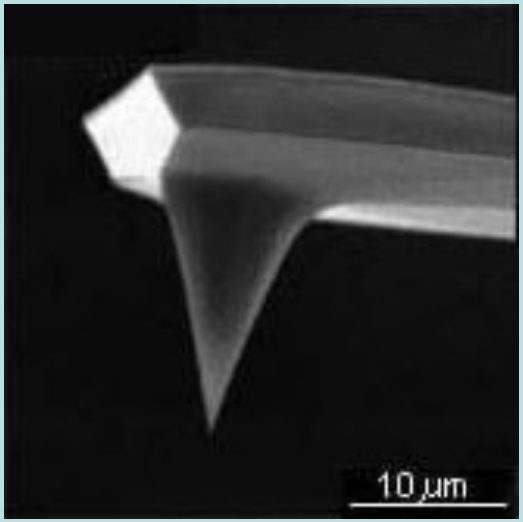
Определение однонитевых разрывов в ДНК





Атомно-силовая микроскомия (АСМ)
Atomic force microscopy (AFM)

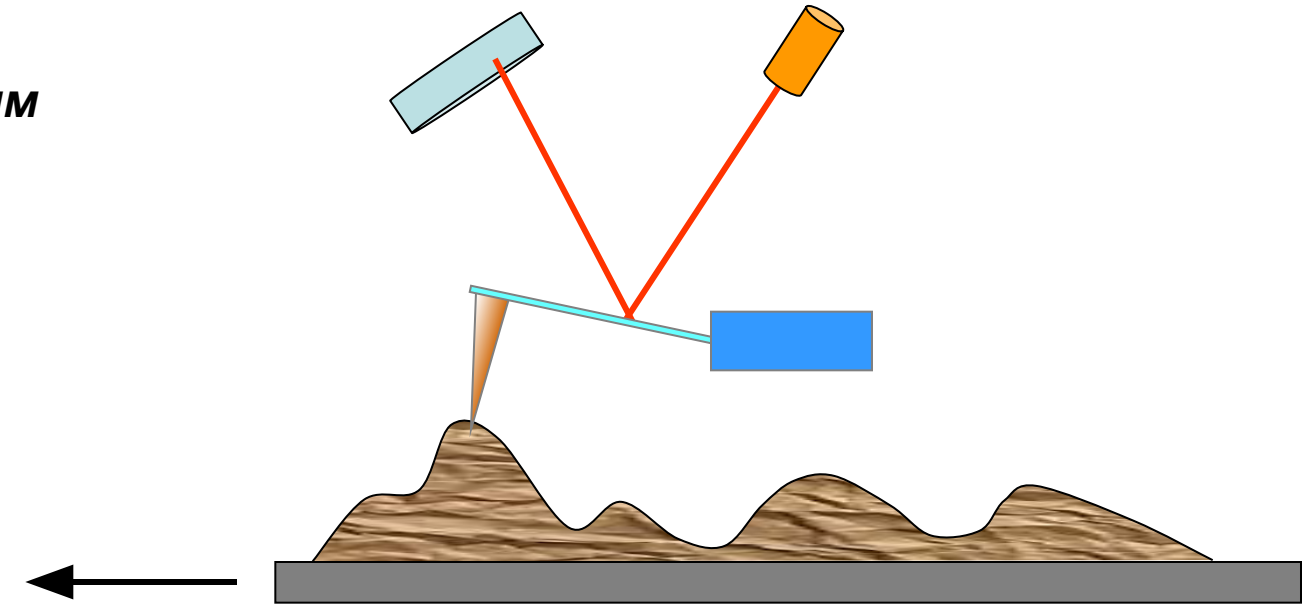


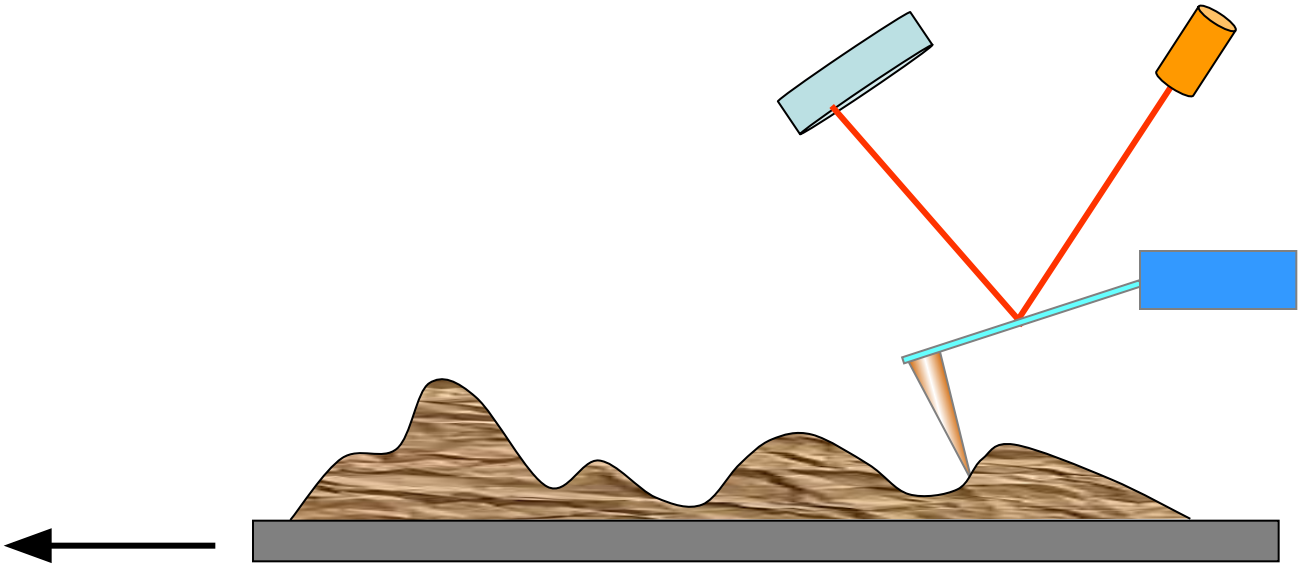


Зонд на прямоугольной консоли (электронная микроскопия)

АСМ

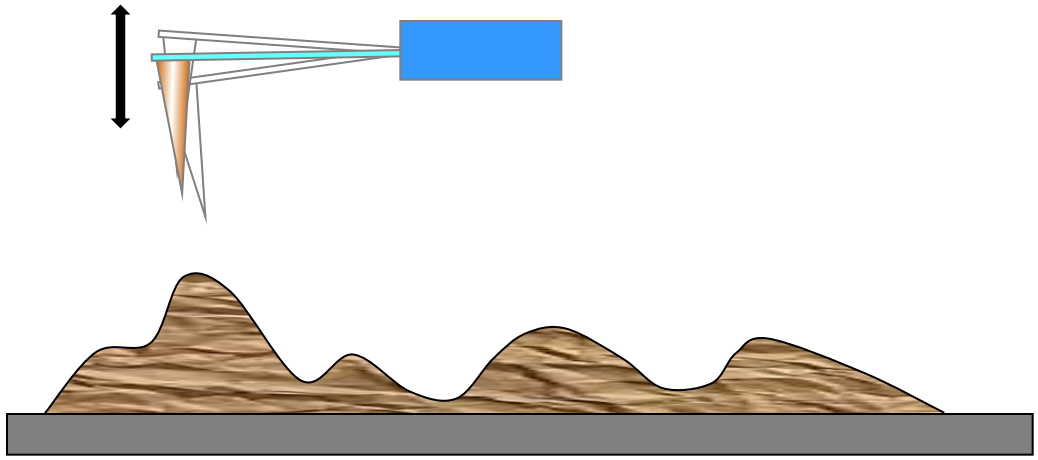
Контактный режим

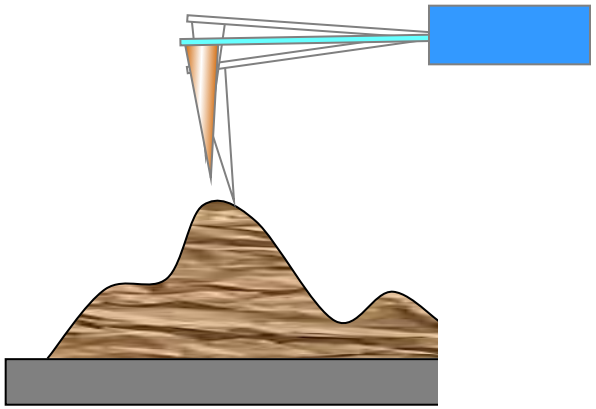


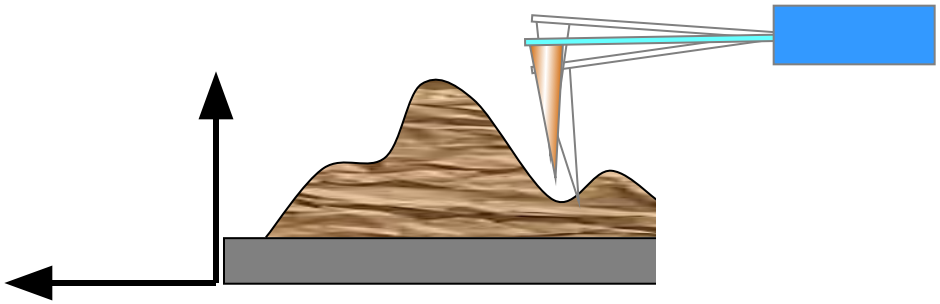


АСМ

«Полуконтактный» режим
Tapping mode



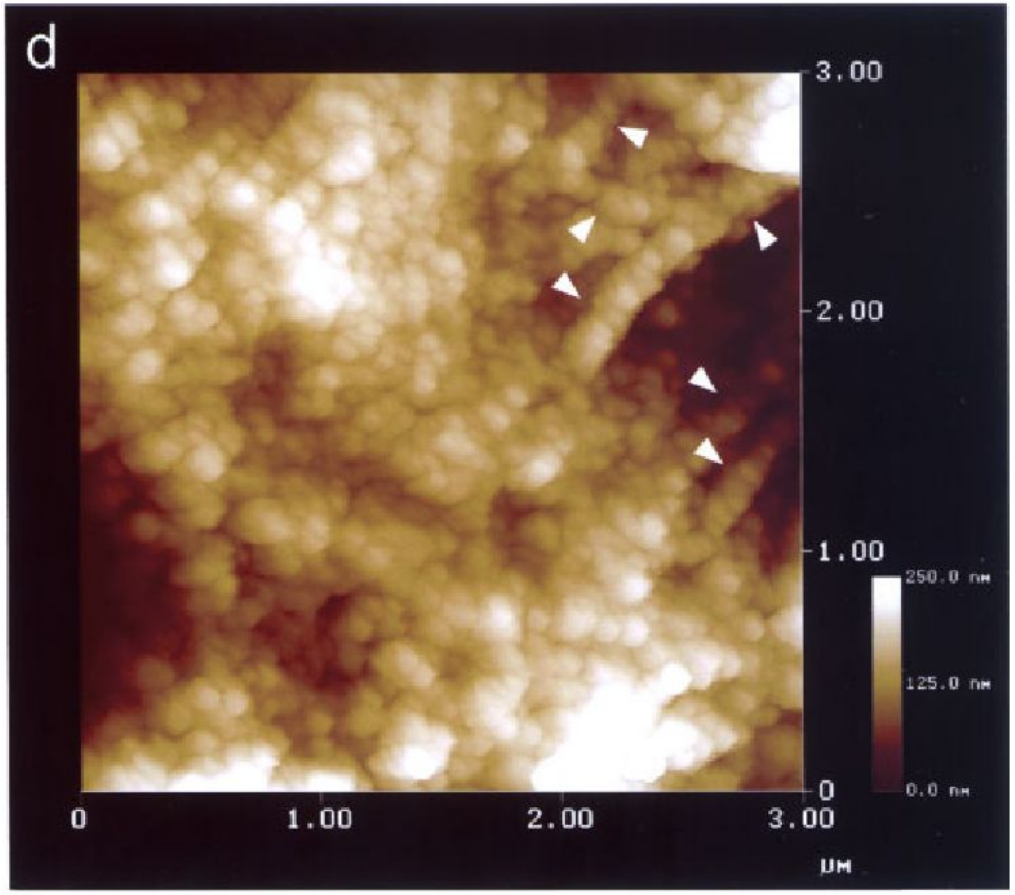




АСМ

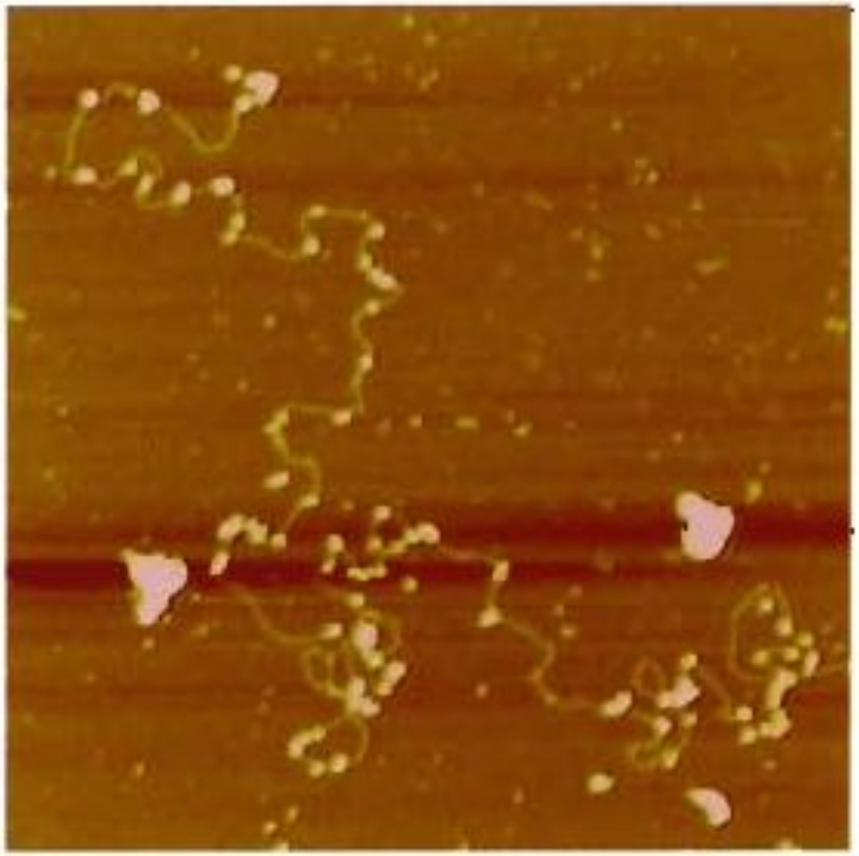
Глобулярная структура хромосомы

Глобулы диаметром 80 нм

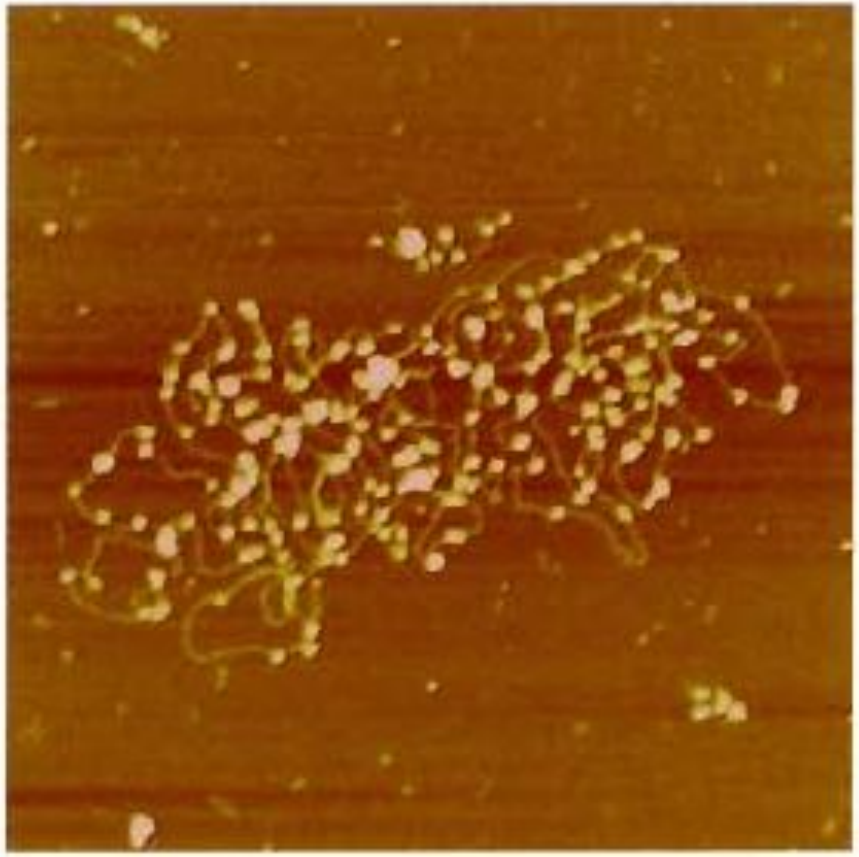


АСМ

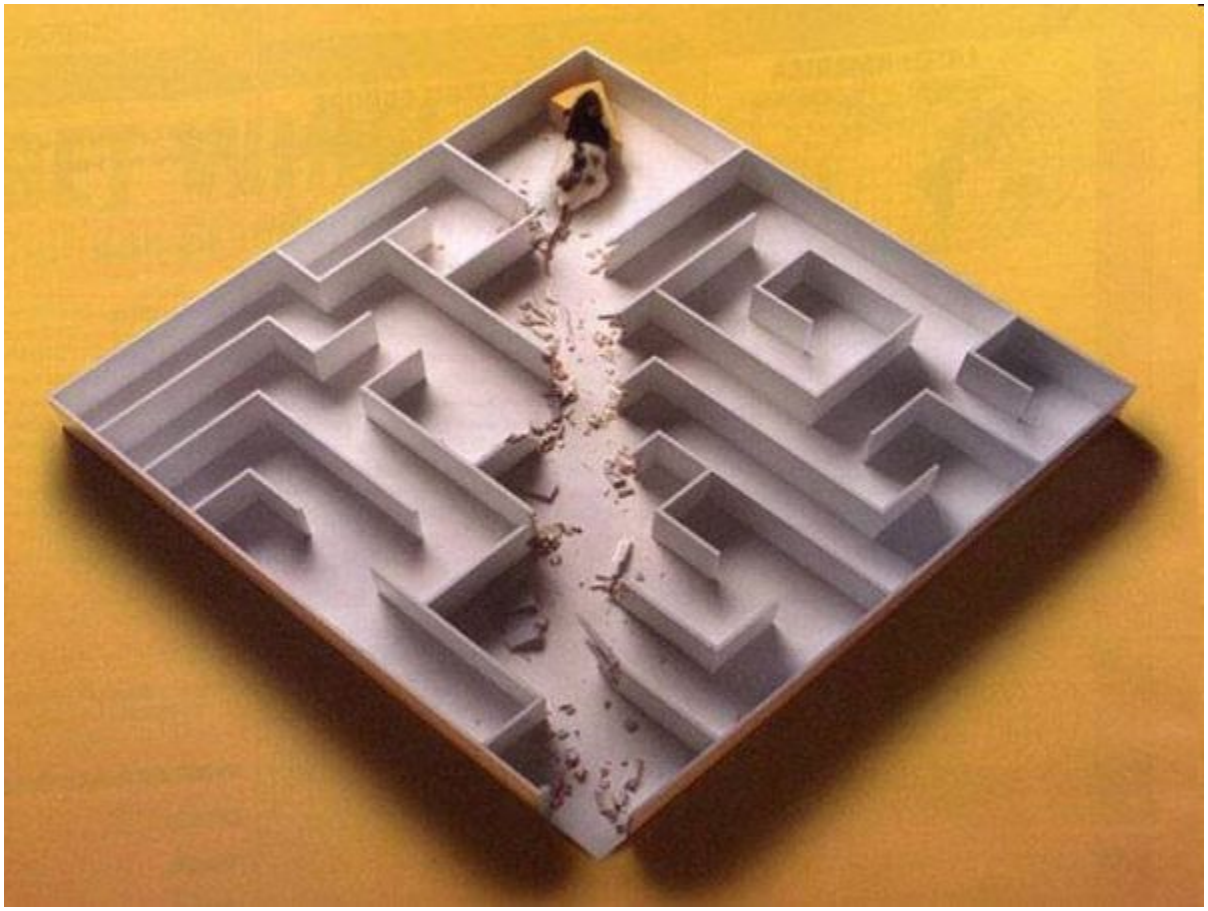
Взаимодействие ДНК с белками
(для эффективного связывания требуется суперскрученность)



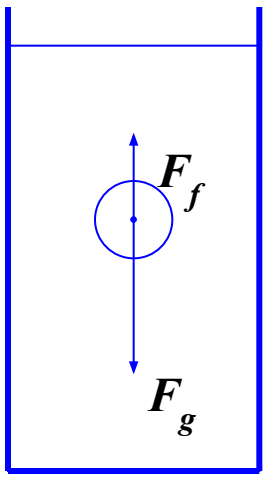
Линейная ДНК



Суперскрученная ДНК



Седиментация



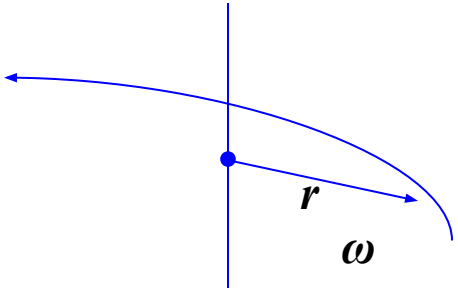
$$V_s = \frac{1}{18} \cdot \frac{D^2 \cdot (\rho_ч - \rho_c) \cdot a}{\eta_c}$$

D – диаметр частицы
$\rho_ч$ – плотность частицы
ρ_c – плотность среды
ηc – вязкость среды

V_S – скорость движения без ускорения

$a = \omega 2r$

Седиментация – движение с постоянной скоростью



$a = \omega^2 r$

ω – угловая скорость (рад/с)
r – радиус (м)

При одинаковых плотностях частицы большего диаметра седиментируют намного быстрее частиц меньшего диаметра (D^2)

Скорость седиментации пропорциональна плотности частицы. Мелкие частицы с большей плотностью могут седиментировать быстрее, чем крупные частицы с меньшей плотностью.

Скорость седиментации пропорциональна ускорению.

Скорость седиментации обратно пропорциональна вязкости среды.

Коэффициент и константа седиментации

Теодор Сведберг
(Theodor H. E. ("The") Svedberg)
1884-1971

$$s = \frac{1}{18} \cdot \frac{D^2 \cdot (\rho_ч - \rho_c)}{\eta_c}$$

s – коэффициент седиментации

при известных ρ_c и η_c *s* зависит только от параметров частицы – *D* и $\rho_ч$

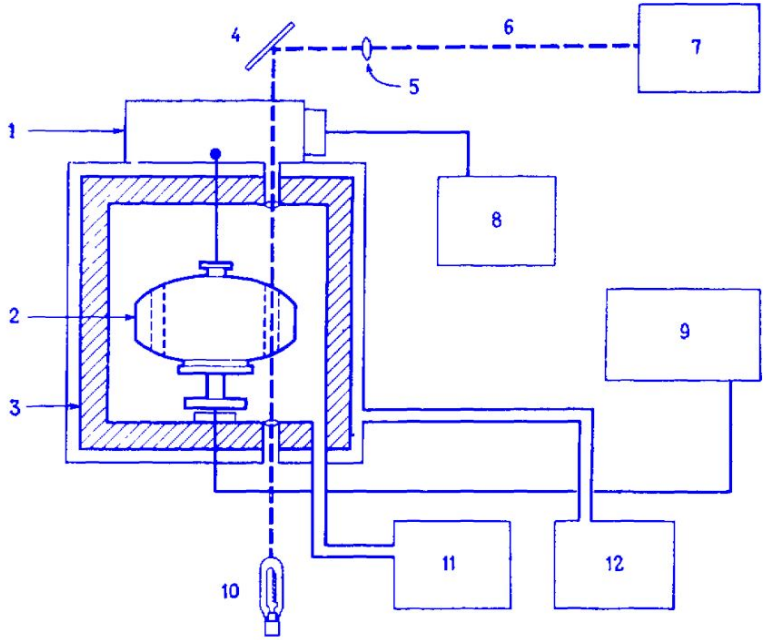
Если седиментация происходит в воде при 20°C ($\rho_{20,W}$ и $\eta_{20,W}$ известны),

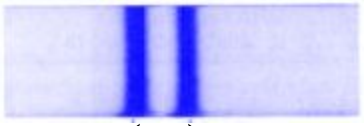
то *s* в воде при 20°C – это константа седиментации $s_{20,W}$

$$s_{20,W} = \frac{1}{18} \cdot \frac{D^2 \cdot (\rho_ч - \rho_{20,W})}{\eta_{20,W}}$$

1 S (сведберг) = 10^{-13} сек

Ультрацентрифуга





Молекулы с разными V_s

1923 г. – 5000 g
1926 г. – 100000 g
1931 г. – 200000 g
1933 г. – 400000 g
1934 г. – 900000 g

1 – Мотор
2 – Ротор
3 – Бронированная камера
4 – Зеркало
5 – Оптическая система
6 – Путь света
7 – Регистрирующее устройство
8 – Элементы управления
9 – Контроль температуры
10 – Источник света
11 – Вакуумный насос
12 – Система охлаждения

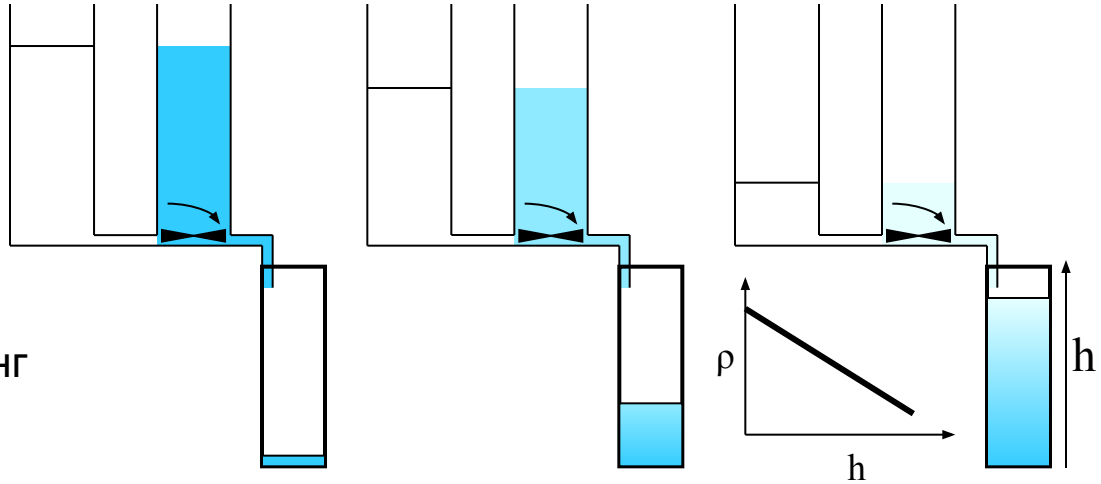
Плавучая плотность

$$s_{20,W} = \frac{V_s}{a} = \frac{(\rho_ч - \rho_{20,W}) \cdot \eta_c}{(\rho_ч - \rho_c) \cdot \eta_{20,W}}$$

Annu.Rev.Biochem.-2005.-74.-1–28

Кай Ульрик Линдерстрем-Ланг
(Kaj Ulrik Linderstrøm-Lang)
1896-1959

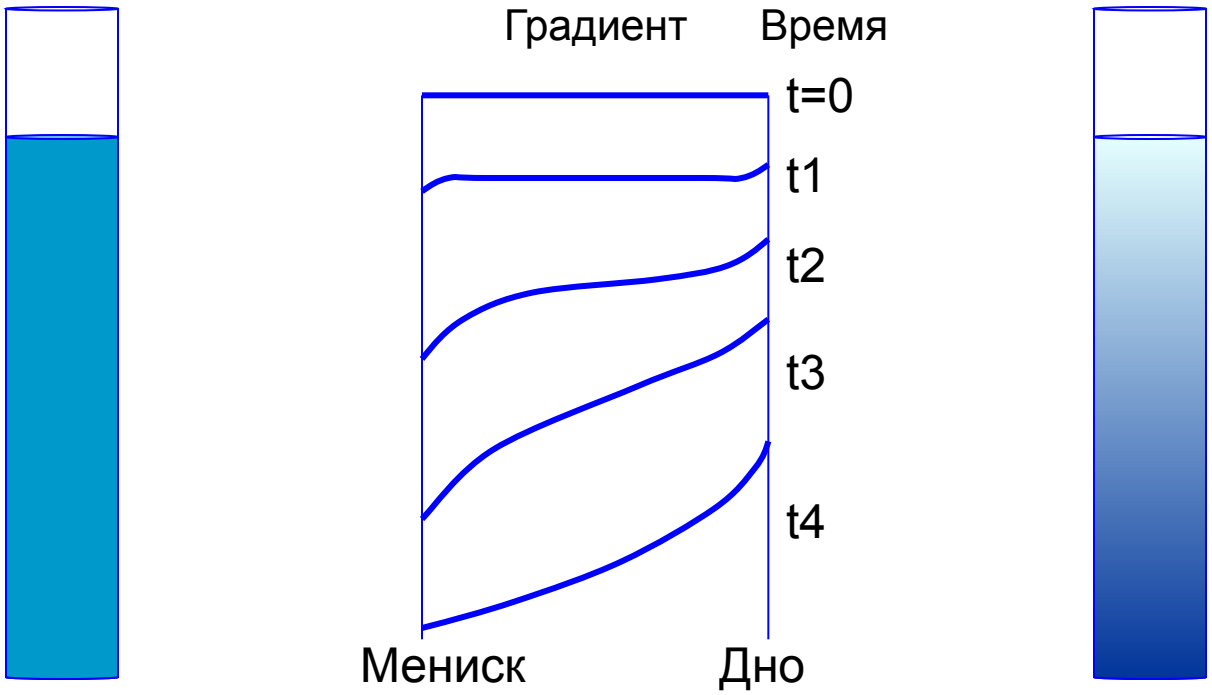
Создание градиента плотности в колонке Линдерстрема-Ланга



Плавучая плотность

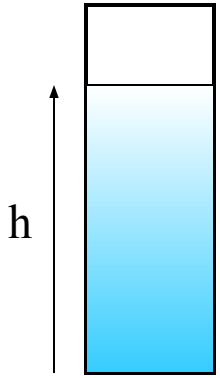
$$s_{20,W} = \frac{V_s}{a} = \frac{(\rho_ч - \rho_{20,W}) \cdot \eta_c}{(\rho_ч - \rho_c) \cdot \eta_{20,W}}$$

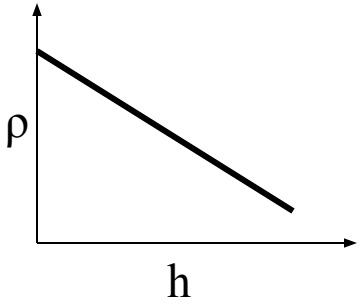
Формированиее градиента плотности
при ультрацентрифугировании растворов солей

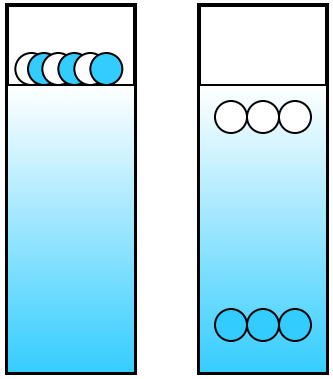


Плавучая плотность

$$s_{20,W} \quad \frac{V_s}{a} = \frac{(\rho_ч - \rho_{20,W}) \cdot \eta_c}{(\rho_ч - \rho_c) \cdot \eta_{20,W}}$$





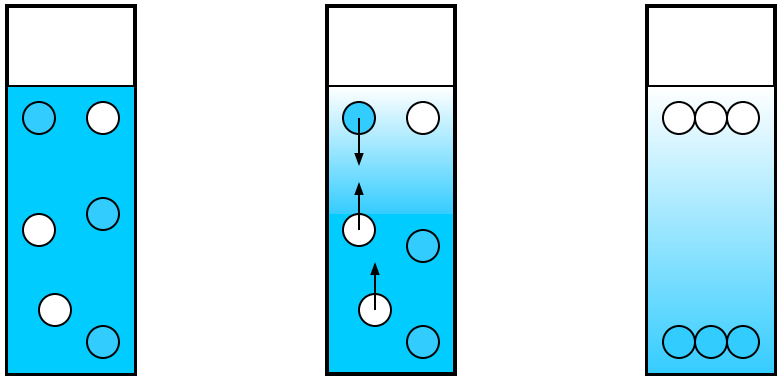


Плавучая плотность $\rho_ч$
плотность частицы в растворе

плотность среды, при которой движение частицы прекращается, т.е. разность $\rho_ч - \rho_c = 0$

Плавучая плотность

$$s_{20,W} \quad \frac{V_s}{a} = \frac{(\rho_ч - \rho_{20,W}) \cdot \eta_c}{(\rho_ч - \rho_c) \cdot \eta_{20,W}}$$



$\rho_ч - \rho_c = 0$

$\rho_ч - \rho_c = 0$

Седиментация

$$M_ч = s \cdot \frac{f}{(1 - \rho_c / \rho_ч)}$$

***f* – фактор трения**
зависит от:
формы частицы
размера частицы
вязкости жидкости

Определение $M_ч$ с применением седиментационного анализа требует определенных допущений

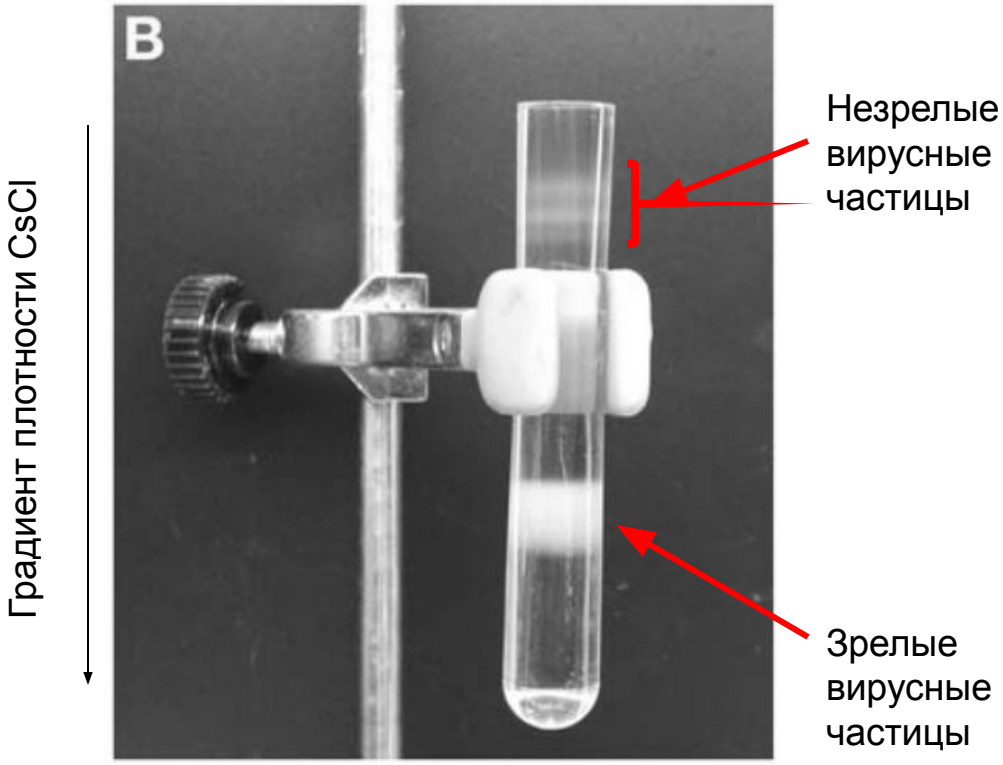
Видимая $M_ч$ зависит от формы и размера частицы

По результатам седиментационного анализа видимую $M_ч$ выражают в сведбергах:

5S рРНК, 16S рРНК, 23S рРНК, 30S субъединица рибосомы, и т.д.

Небольшое отступление

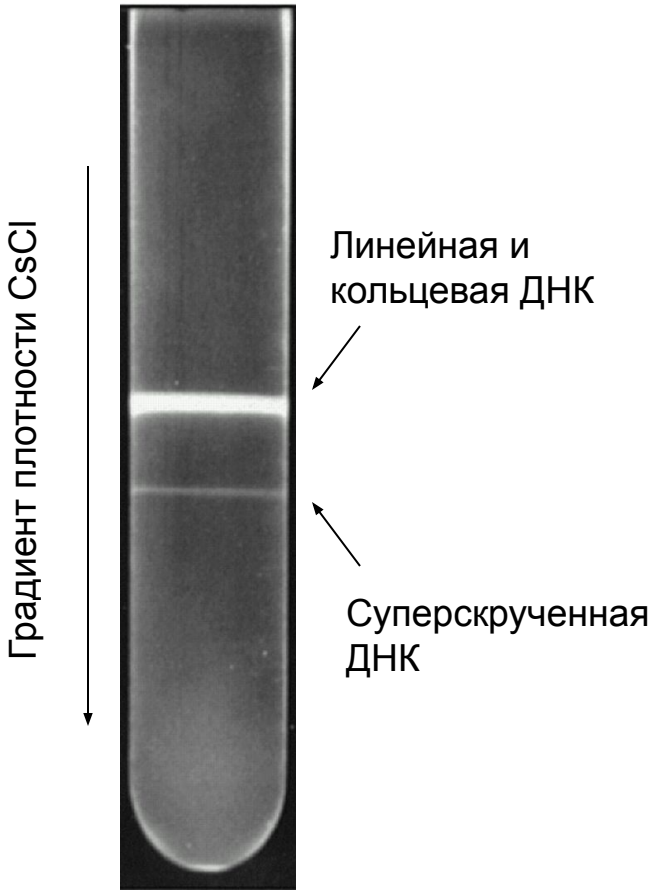
Разделение частиц по плавучей плотности



Methods in Biotechnology, Vol. 24: Animal Cell Biotechnology

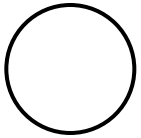
Ультрацентрифугирование

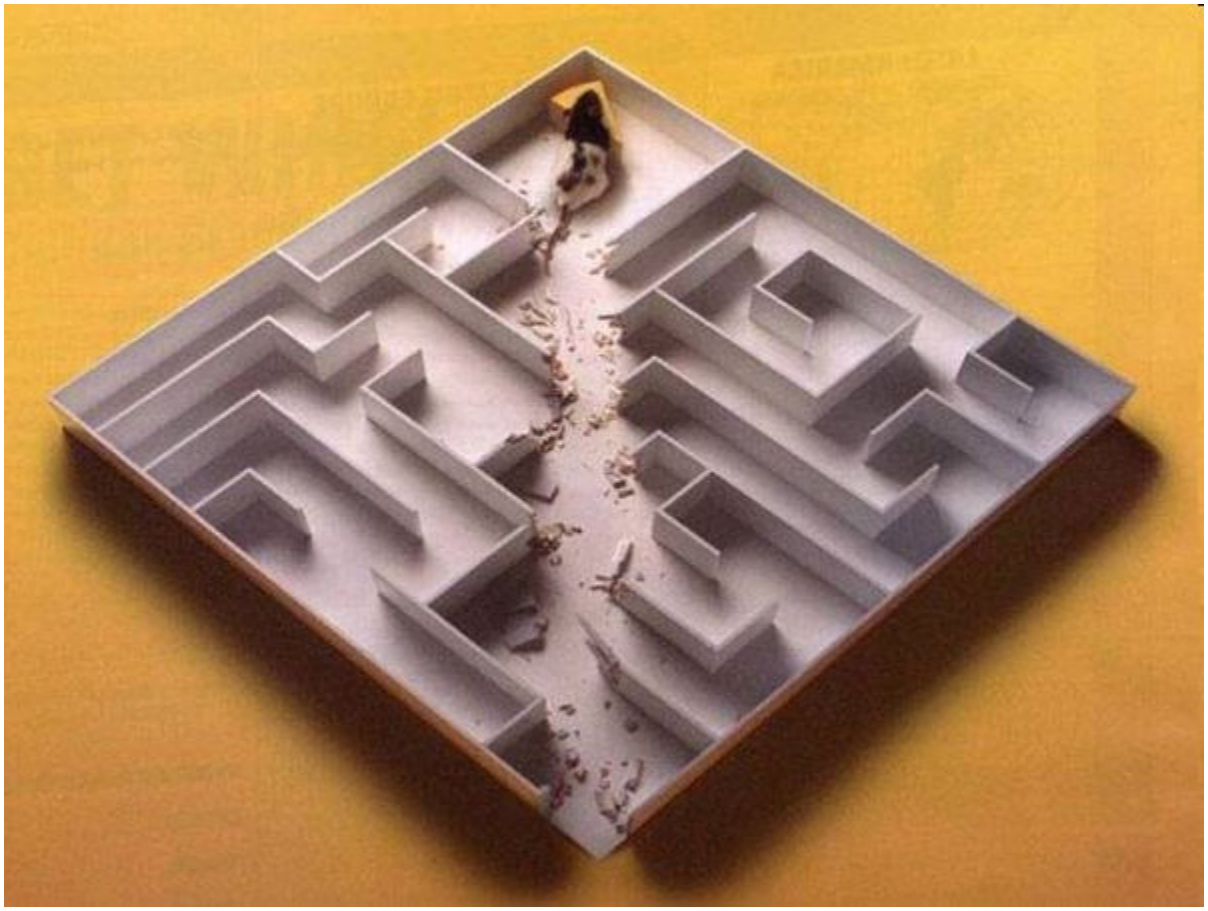
Разделение частиц по плавучей плотности



Journal of General Virology.-2000.-81.-3073-3082

Для ДНК митохондрий человека



$s_{20,w} = 26$

$s_{20,w} = 37$