

Mavzu: Nuklein kislotalarning tuzilishini aniqlash uslublari

- **Ma'ruzachi: Kimyo fanlari doktori, dots. L.S.Kamolov**



Reja:

1.RNK va DNK larning tuzilishi.

2.Nukleotid tarkibi va chekka guruxlar analizi.

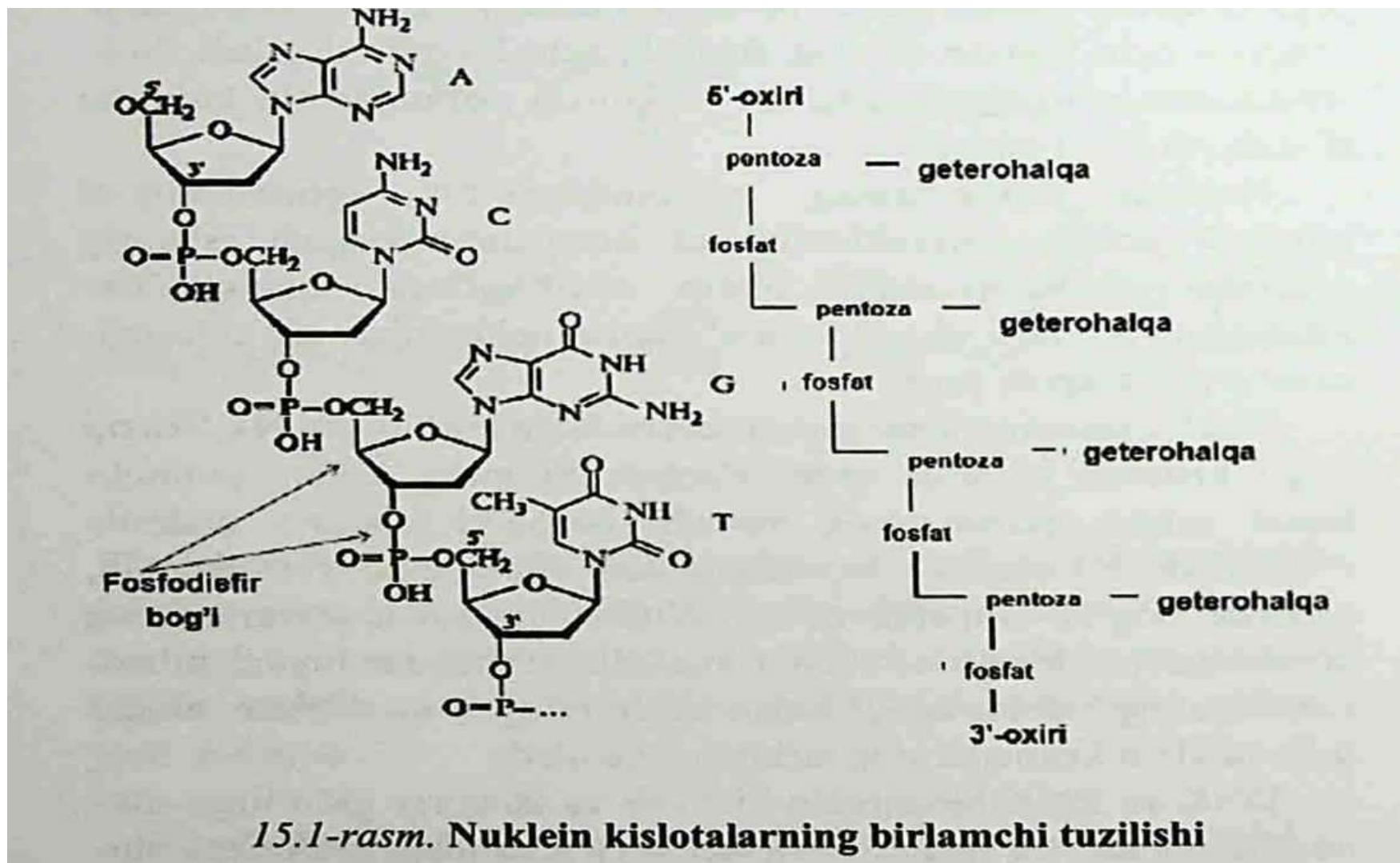
3.Nukleotidlar ketma-ketligini aniqlash usullari.

4.Eritmada va qattiq fazada oligo- va polinukleotidlarni sintez qilish usullari.

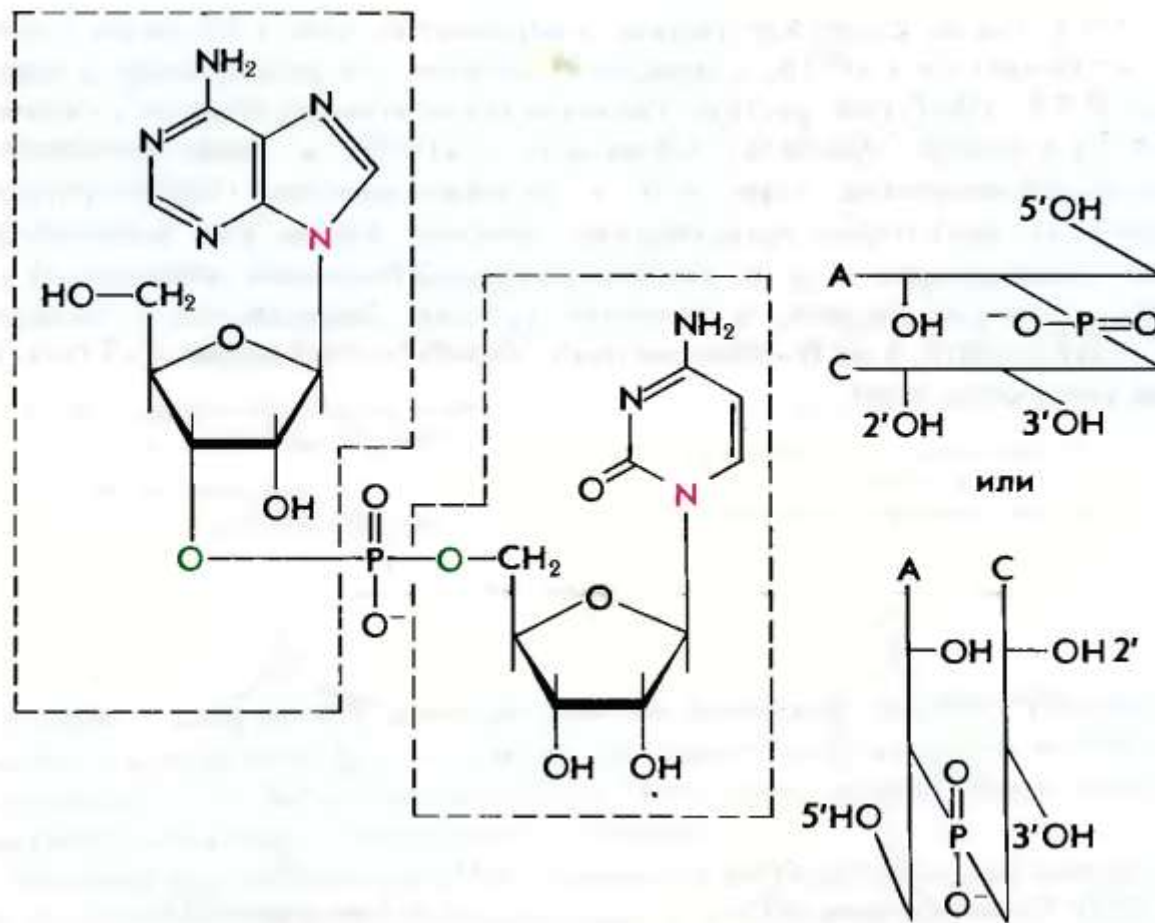
RNK va DNK larning birlamchi tuzilishi

Nuklein kislotalar yuqori molekular murakkab tuzilishli moddalardir. *Nuklein kislotalarning birlamchi tuzilishi deb nukleotidli tarkibi va nukleotidlarning ketma-ketligiga aytiladi.* Nukleotidlamining tabiati va ulaming soni nuklein kislotalarning nukleotidli tarkibi deyiladi. Nuklein kislotalaming ketma-ketligi nukleotidlar bir-biri bilan qanday tartibda bog'langanligini bildiradi. Nuklein kislotalami - polinukleotidlami mononukleotidlargacha, ulami esa asoslar, uglevod va fosfat qoldiqlarigacha parchalash mumkin. Polinukleotid zanjirda nukleotidlar bir-biri bilan fosfat guruhi orqali fosfodiefir bog⁴lari bilan bog'lanadi. Fosfat kislota qoldig'i oldingi nukleotid pentozasining C-3' atomi bilan, keyingisining C-5* atomi bilan bog⁴lanadi. Asosiy zanjir birin-ketin kelgan pentoza va fosfat guruhlaridan iborat bo⁴lib, geterohalqali asoslari asosiy zanjirga nisbatan yonaki guruh bo⁴lib joylashadi. Polinukleotid zanjirining bir uchi 5'-oxiri deyilsa. ikkinchi uchi 3'- oxiri deyiladi. Nukleotidlamining bunday ketma-ket joylanishi polinukleotid tarkibini ifodalaydi

DNK ning kimyoviy gidrolizini o‘tkazish juda murakkab jarayon, shuning uchun, DNK gidrolizi nukleaza fermenti ta’sirida fermentativ gidroliz ko‘rinishida olib boriladi

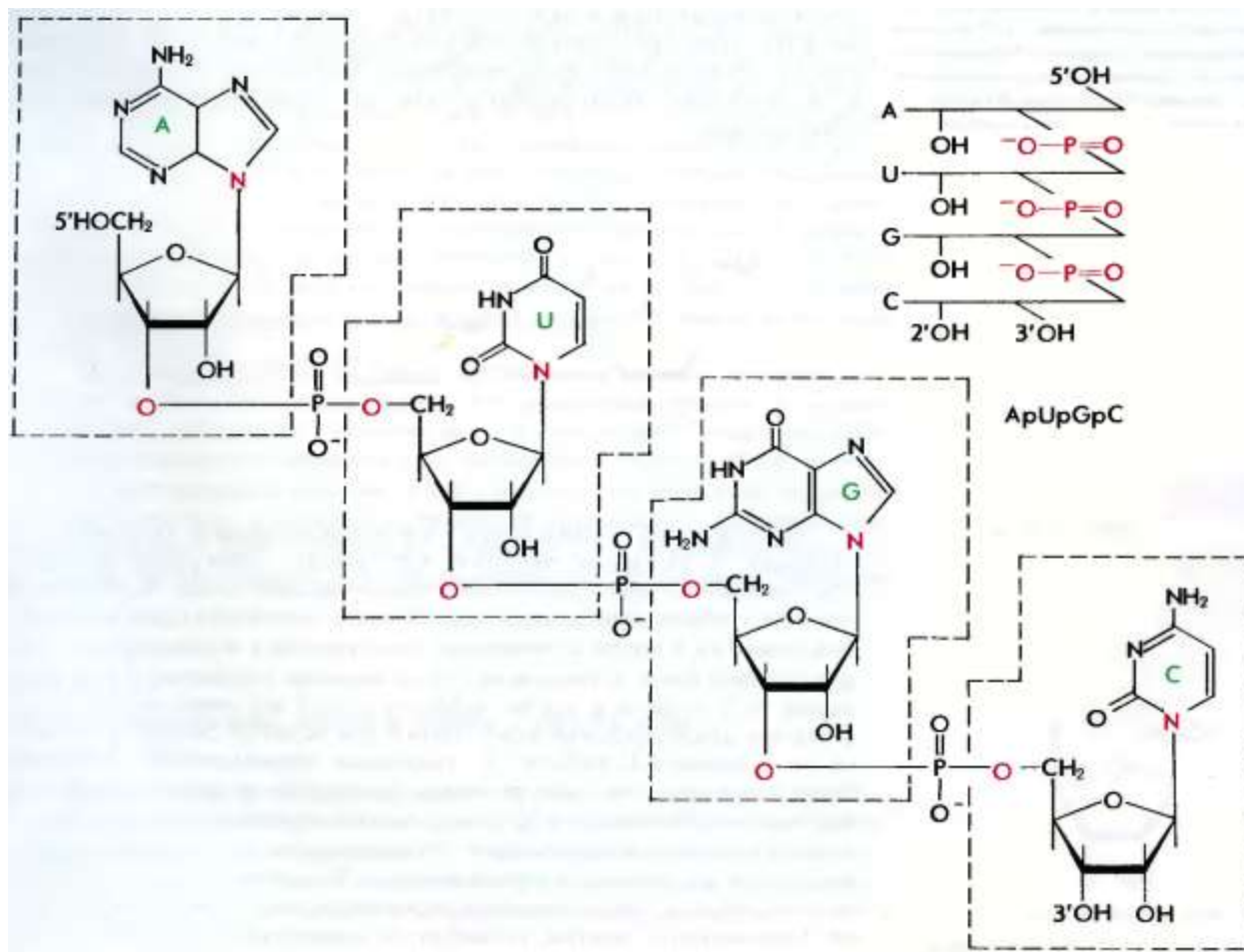


Олигонуклеотидларнинг тuzilishi



Аденилил-(3' → 5')-цитидин (ApC)

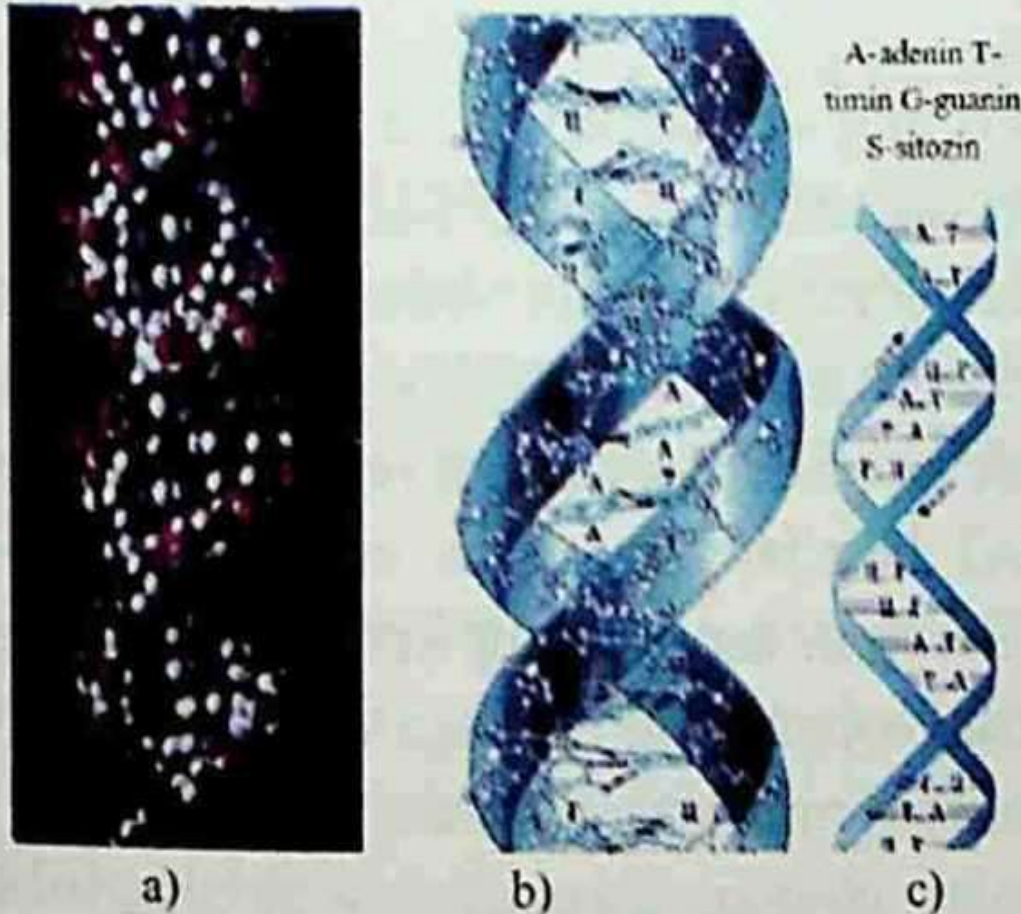
Oligonukleotidlarning tuzilishi



Аденилил - (3' → 5') – уридил - (3' → 5') – гуанилил - (3' → 5') – цитидин (ApUpGpC)

DNKning ikkilamchi tuzilishi

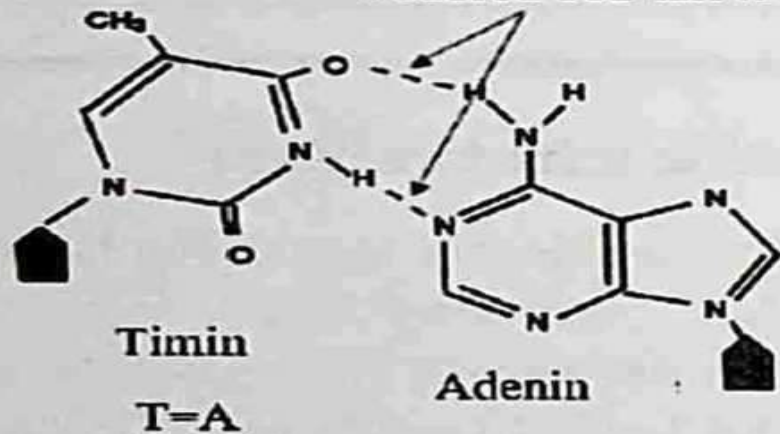
DNK ikkilamchi tuzilishi deb polinukleotid zanjiming fazoviy joylashishiga aytiladi. 1953-yilda Dj.Uotson va F.Kriklaming taxmini bo'yicha DNKning ko'pchilik molekulalari uchun ikkilamchi tuzilishi qo'sh spiral shaklida hosil bo'ladi. Bu modelga ko'ra DNK molekulasi birgalikda o'ng tarafga buralib, diametri 1,8-2,0 nm bo'lgan qo'sh spiral hosil qiluvchi ikkita polinukleotid zanjirlardan iboratdir.



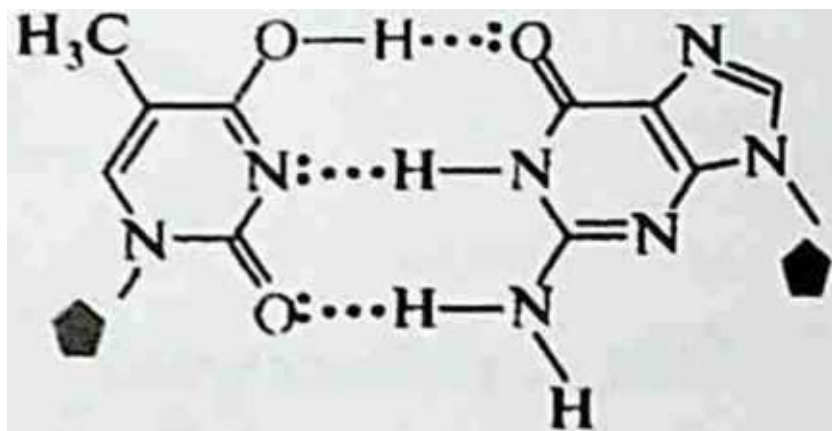
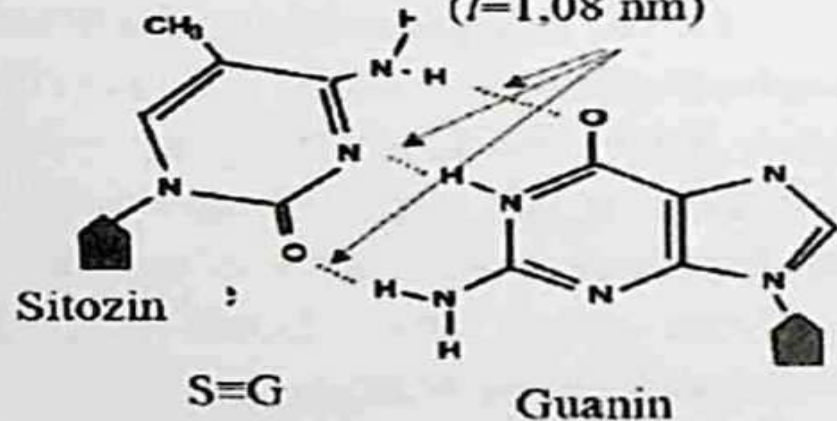
15.2-rasm. DNKning ikkilamchi tuzilishi: sharsterjenli modeli (a), hajmli modeli (b), oddiy modeli (c)

Nuklein asoslarning komplementarligi

Vodorod bog'lari ($l=1.1$ nm)

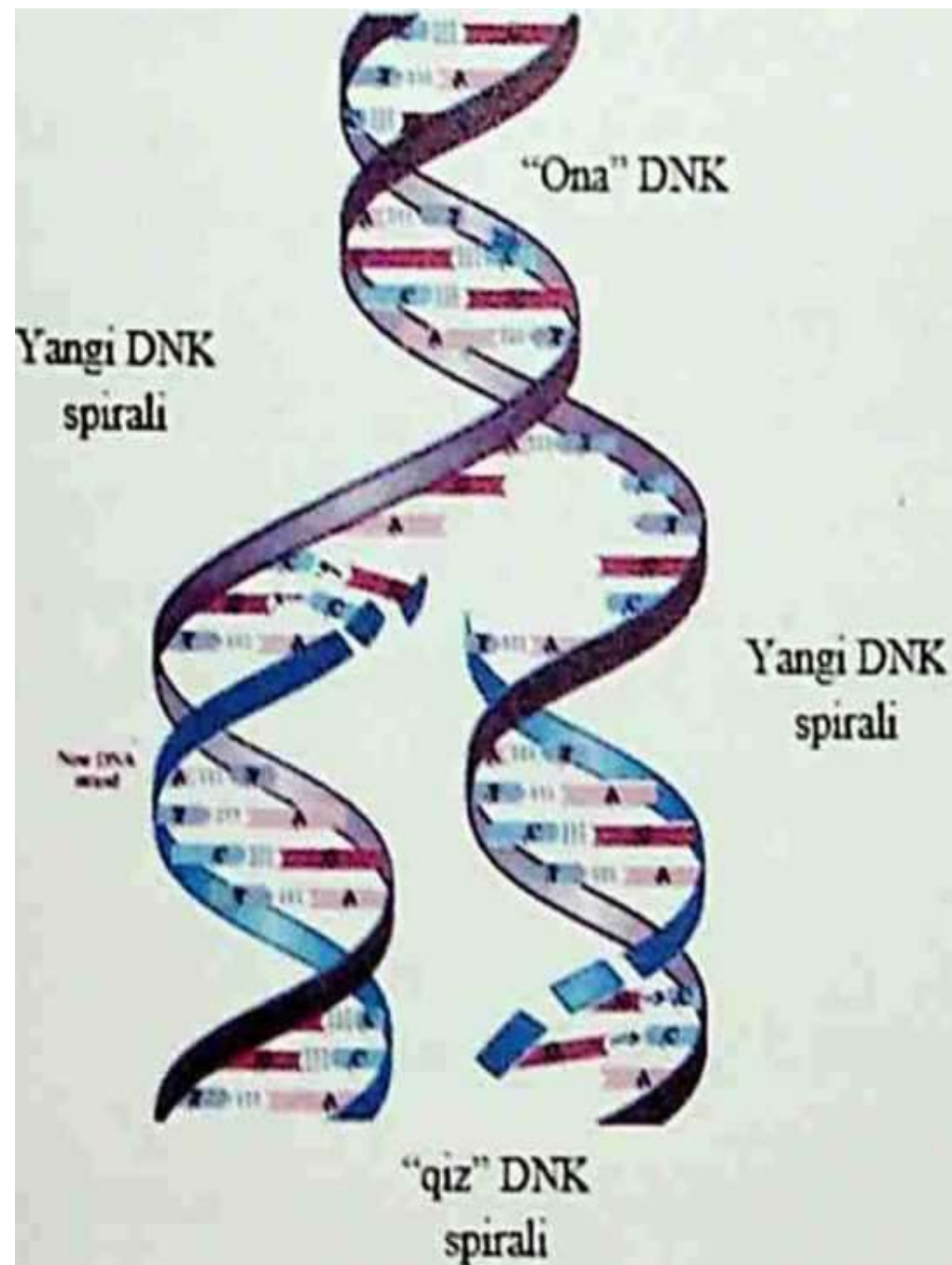


Vodorod bog'lari
($l=1,08$ nm)



DNK replikatsiyasi

Oʻsimliklar, hayvonlar va bakteriyalar hujayrasidagi DNKning vazifasi - genetik axborotni saqlashdan iborat. Hujayralar boʻlingan sari, genetik axborotni yangi hujayralarga oʻtkazib beradigan, DNKning nusxalari hosil boʻla boshlaydi. Replikatsiyada DNKning boshlangʻich “onta” zanjiri boʻlinib ikkita yangi zanjim hosil qiladi, shu bilan DNK ning komplementar zanjirlari hosil boʻladi. Jarayon xelikaza fermenti taʼsirida qoʻsh spiralning bir qismida komplementar asoslarni bogʻlab turuvchi vodorod bogʻlari uzilib, zanjim yechilishidan boshlanadi. Hosil boʻlgan alohida zanjirlar (naʼmuna) DNKning yangi komplementar zanjirlarining sintezi uchun shablon boʻlib xizmat qiladi (15.3-rasm). DNK polimeraza fermenti taʼsirida nukleotidlar oʻrtasida fosfodiefir bogʻlar hosil boʻladi va komplementar juftlar shakllanadi. Natijada, boshlangʻich DNKning qoʻsh spiralidan nusxa olinadi. DNKning har bir yangi molekulasidagi zanjirlarining bittasi avvalgi molekulaning nusxasi, ikkinchisi esa yangi sintezlangan zanjir boʻladi. Bu jarayon ikkita yangi DNK hosil boʻlishiga olib keladi. Ular shartli ravishda “qiz” DNKlar deyilib, bir birining tuzilishini qaytaradi va “ona” DNKning aniq nusxasi hisoblanadi. DNK replikatsiyasi jarayonida juftlanish komplementarlik asosida amalga oshganligi, DNKning yangi zanjirlarida nuklein asoslarni toʻgʻri joylashuvining garovi boʻladi.

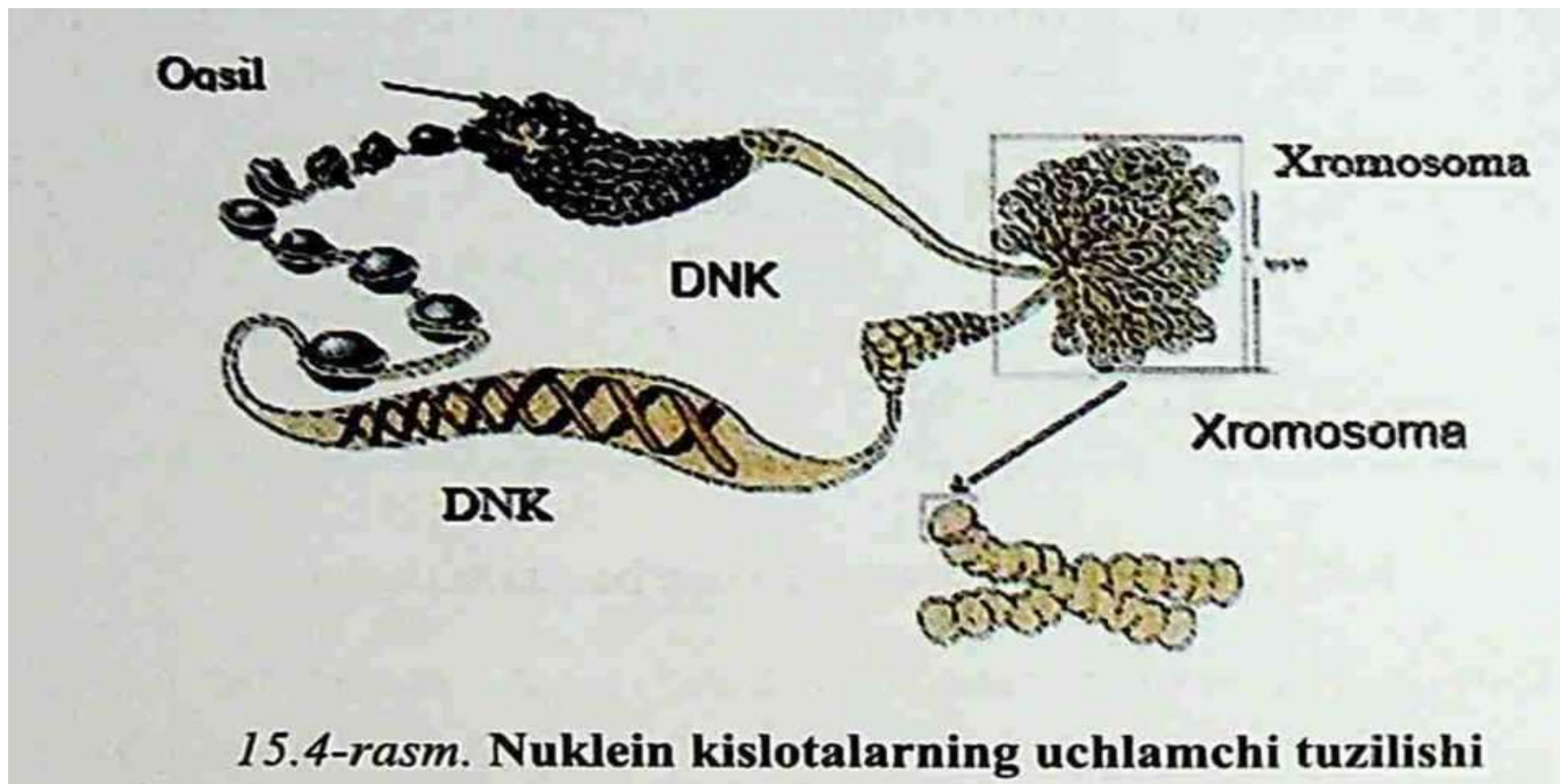


15.3-rasm. DNK replikatsiyasida DNK ning aloxida zanjirlari yangi DNK sintezi uchun namuna (shablon) bo'lib boshlang'ich DNK ninganiq nusxasi ko'rinishdagi ikkita yangi komplementar spirallarni hosil qiladi.

DNKning uchlamchi tuzilishi

DNKning uchlamchi tuzilishida hujayra DNKsining qo'sh spirali zanjirining ba'zi joylarida superspirallarni hosil qiladi. Superspirallanish DNK molekulasiga xromosomada ixcham joylashishiga imkon beradi. 8 sm uzunlikka ega bo'lgan DNK 5 nm uzunlikka ega bo'lgan xromosomada joylashadi. DNK uzunligi 100000 barobar qisqaradi.

DNKning uchlamchi tuzilishi ularni yadrodagilari oqsillar bilan asosan lizin va arginin hisobiga birikishidan hosil bo'ladi va hujayra siklining ma'lum bosqichida xromosoma shakliga ega bo'lib qoladi

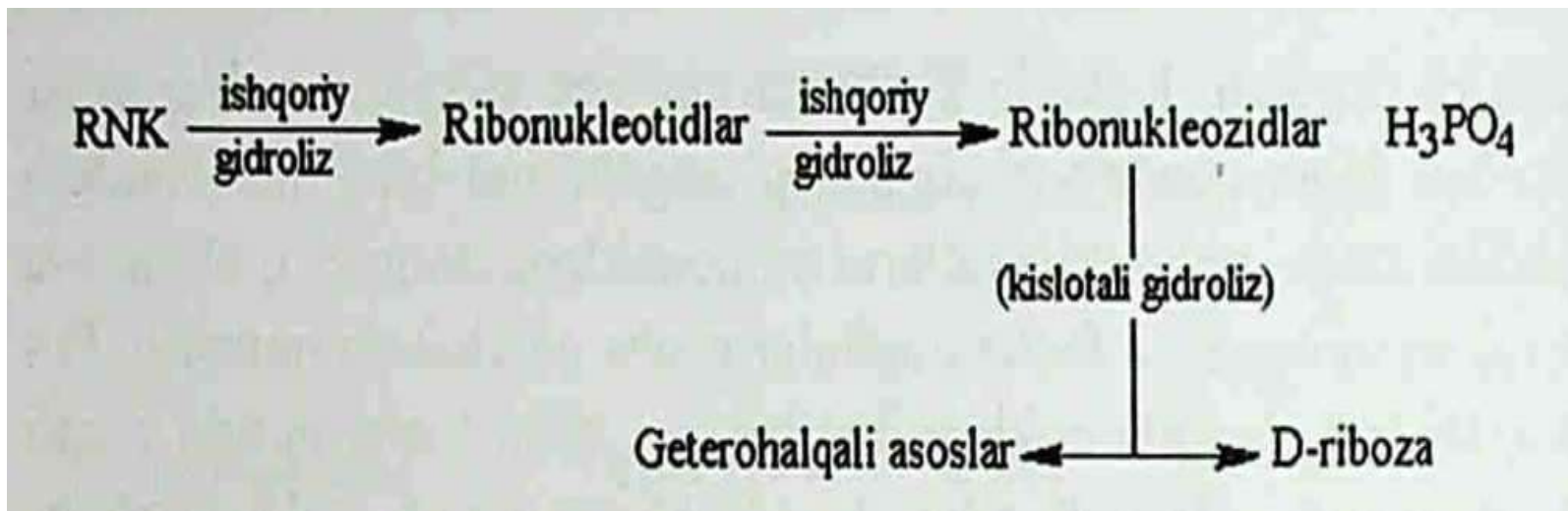


15.4-rasm. Nuklein kislotalarning uchlamchi tuzilishi

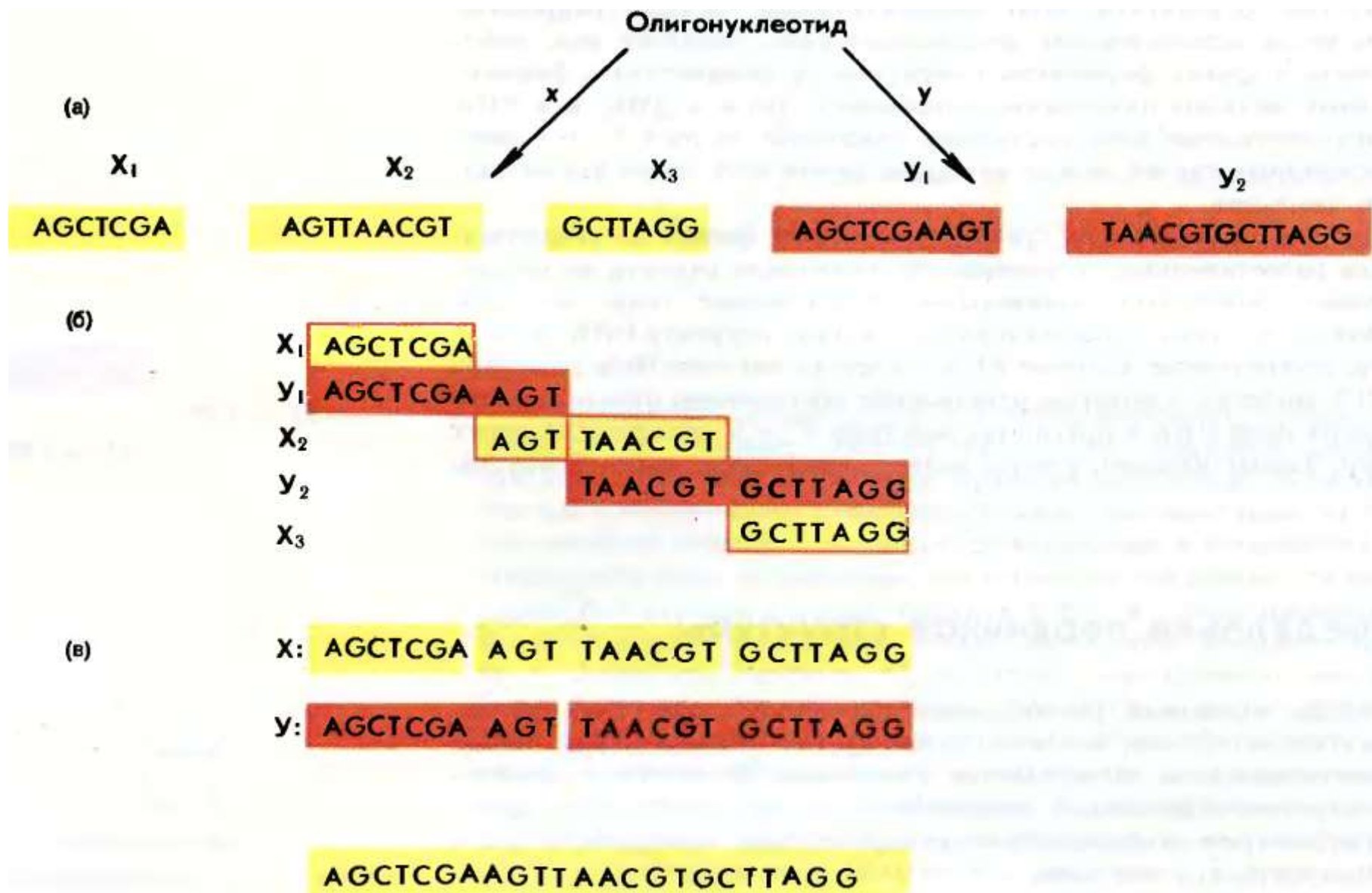
Nukleotid tarkibi va chekka guruxlar analizi

Nuklein asosini pentoza molekulasi bilan bog'lovchi N-glikozid bog'i kislotali muhitda gidrolizlanadi. Shuning uchun, polinukleotid zanjiri gidrolizining birinchi bosqichi ishqoriy muhitda o'tkaziladi. Bu muhitda faqat murakkab efir bog'lar gidrolizlanib, glikozid bog'lar saqlanib qoladi. Nukleozidlarni nuklein asos va pentozagacha gidrolizlash uchun kislotali gidrolizdan foydalaniladi. Gidrolizning har bir bosqichidan keyin olingan moddalarni analiz qilib nuklein kislotalarning tarkibi o'rganiladi.

DNK va RNK bir-biridan kislotali va ishqoriy gidrolizga munosabati bilan farq qiladi. DNK ishqoriy muhitdagi gidrolizga chidamli boladi. RNK esa ishqoriy muhitda nukleotidlarga, nukleotidlar esa o'z navbatida nukleozid va fosfat kislota qoldig'igacha gidrolizlanadi. Nukleozidlar kislotali muhitda geterohalqali asos va uglevodlarga gidrolizlanadi



Nukleotidlar ketma-ketligini aniqlash usullari



DNK tahlili yordamida barmoq izlarini aniqlash

DNK-daktiloskopiya yoki DNK ni profillash (ma'lum toifaga keltirish, guruhlash) deb nomlanuvchi jarayonda DNK ning kichik namunasi qon, teri, so'lak yoki jinsiy suyuqlik (sperma)dan olinadi.

DNK miqdorini polimeraza zanjirli reaksiya usilini qo'llab ko'paytiriladi. So'ngra gelga joylashtirilgan va elektroforez yordamida o'lchami bo'yicha ajratib chiqilgan DNKni yana ham mayda qismlarga bo'lish uchun restriksiya fermentlaridan foydalaniladi. DNKning o'ziga xos ketma-ketligini saqlab turish uchun radioaktiv zond qo'shiladi. Rentgen plyonkasining bir qismi gel (maxsus suyuqlik) ustiga joylashtirilganda ma'lum ketma-ketlik bilan bogliq zondan tushayotgan yorug'lik (nur) DNK barmoq izlari deb nom olgan to'q va och rangdagi uzun chiziqlar modelini hosil qiladi. Olimlarning hisobiga ko'ra, aynan shunday DNK barmoq izlariga ega egizak bo'lmagan ikkita odam soni butun dunyo bo'yicha bir milliarddan kam. DNK-daktiloskopiyaning kriminalistikada qo'llanilishiga misol qilib jinoyatni sodir etganlikda gumonlanuvchi shaxsni aniqlash uchun qon, soch yoki jinsiy suyuqlik singari DNK namunalaridan foydalanilishini keltirish mumkin. So'nggi yillarda DNK-daktiloskopiya xatolik tufayli sudlangan shaxslarni ozod qilish uchun ham foydalaniladi. Bundan tashqari, bolaning biologik ota-onasini aniqlash, vafot etgan kimsaning shaxsini aniqlash hamda donorlik a'zolarini o'zaro muvofiqligini aniqlash uchun ham DNK-daktiloskopiya murojaat qilinadi.

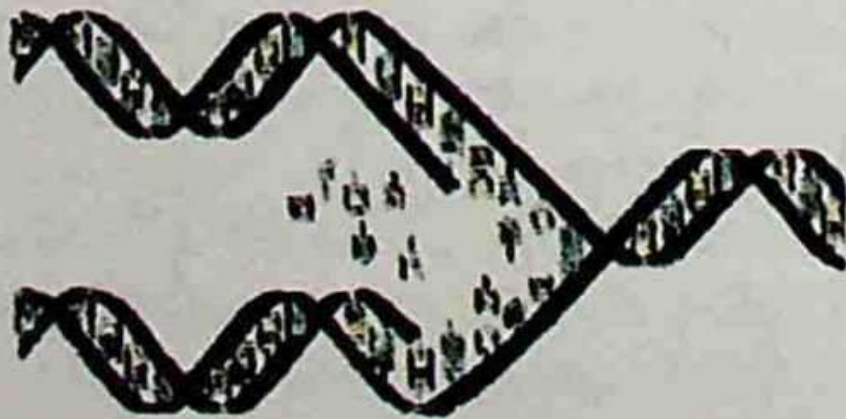
Odam Genomini aniqlash loyihasi

1990 yilda boshlanib 2003-yilda tugallangan odam genomini aniqlash loyihasi AQSH energiya departamenti va SogMiqni saqlash milliy institutining Yaponiya, Fransiya, Germaniya, Buyuk Britaniya hamda boshqa davlatlar ishtirokidagi hamkorligida olib bo'rilgan. Loyiha rejalariga ko'ra, odam DNKsidagi 25 000 yaqin gen o'rganib, tarkibidagi asoslar juftlarining ketma-ketligini aniqlab, natijalami Internet ma'lumotlar bazasida kiritish maqsad qilib olingan.

Olimlarning aniqlashicha, genomning katta qismi hech qanday funktsiya bajarmay, millionlab yillar davomida avloddan-avlodga o'tib kelgan. Genlarning katta bloklari kerakli oqsillarni kodlamasa ham replikatsiyalanadi. Shunday qilib, kodlashda ishtirok etadigan genlar qismi umumiy genomning 1% nigina tashkil etadi. Genom loyihasining natijalari bizga genetik kasalliklarga sabab bo'luvchi defektli genlarni aniqlashga yordam beradi. Bugungi kunda, DNK identifikatsiyasi o'roq shaklli hujayra anemiyasi, mukovissidoz, sut bezi saratoni, yo'g'on ichak saratoni, Xantington kasalligi hamda Lu Gerig kasalligi singari nasliy kasalliklarga olib keluvchi genlarni aniqlash uchun ham qoplaniladi.

DNK denaturatsiyasi

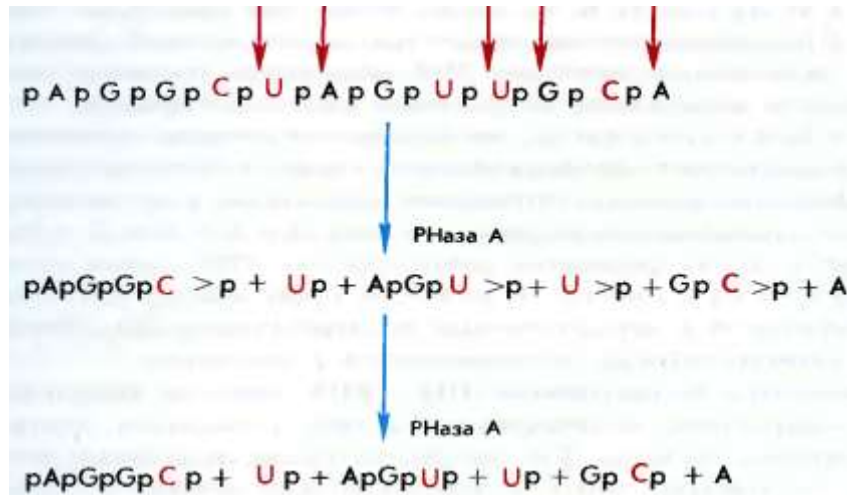
Nuklein kislotalarning ikkilamchi tuzilishi azot asoslari oʻrta- sida vodorod bogʻlari bilan gidrofob bogʻlar yuzaga kelishi, yaʼni kuchsiz oʻzaro taʼsirlar hisobiga hosil boʻladi. Shu munosabat bilan xuddi oqsillarga oʻxshab oʻrtacha darajadagi taʼsirlar natijasida nuklein kislotalar denaturatsiyaga uchrashi mumkin. Nuklein kis- lotalar 70-100°C gacha qizdirilganda, shuningdek, kuchli kislotali yoki ishqorli muhitlarda, mochevina qoʻshilganida denaturatsiya yuz beradi. Vodorod bogʻlari bilan gidrofob bogʻlar uzilishi natijasida zanjirlar bir-biridan qochib, tartibsiz koptokcha shakliga ke- lib qoladi. Qizdirish yoli bilan denaturatsiyaga uchratilgan nuklein kislota eritmasi sovutilsa, u holda uzilgan boglar yana tiklanadi va muayyan sharoitlarda dastlabki (denaturatsiyadan oldingi) preparat strukturalarga oʻxshab ketadigan qoʻsh spiralli spirallar hosil boladi, yaʼni renativatsiya hodisasi yuzaga keladi. Denaturatsiya va re- nativatsiya hodisalalariga molekulalami duragaylash usuli asoslan- gan. Bu usul nuklein kislotalarning tuzilishini oʻrganish, shuning- dek, ulami fraksiyalarga, yaʼni tarkibiy qismlarga ajratish uchun qollaniladi.



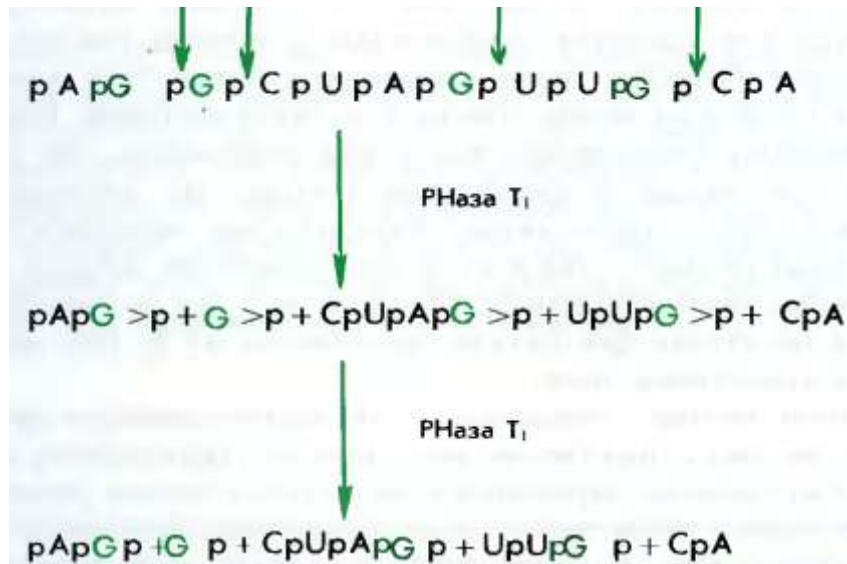
**15.5-rasm. DNK
denaturatsiyasida
qoʻsh spiral uzilishi**

RNK fermentativ parchalash

Рибонуклеаза А



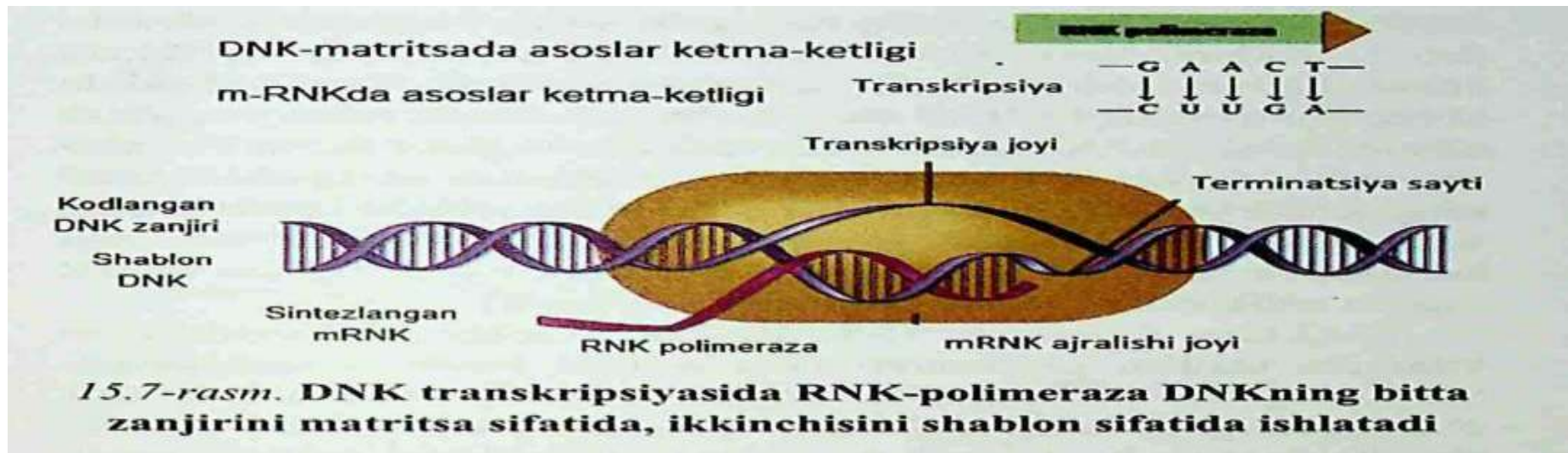
Рибонуклеаза Т1

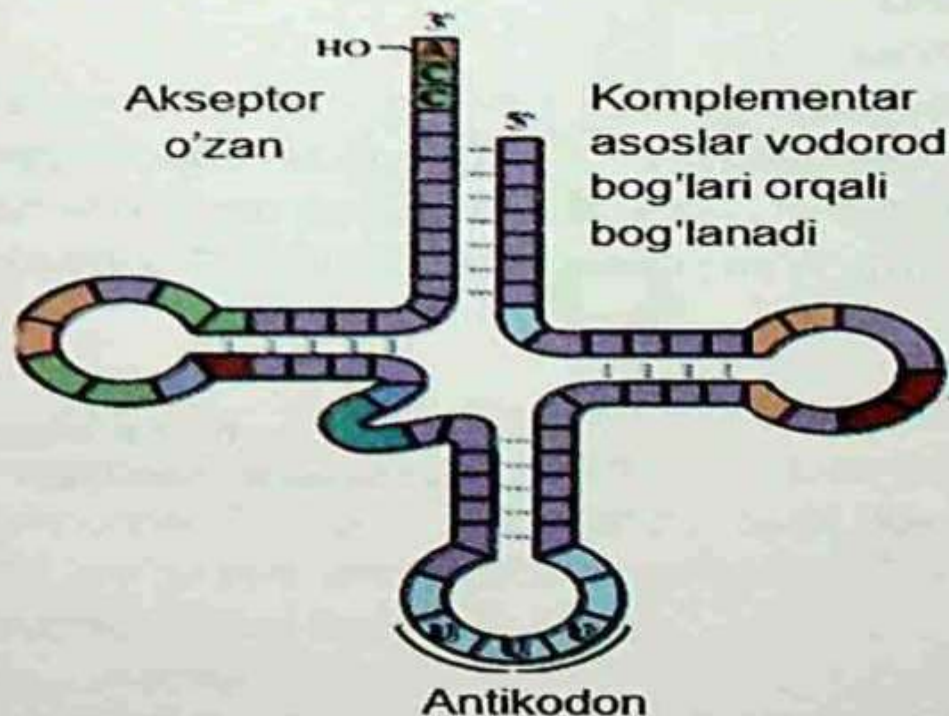


Eritmada va qattiq fazada oligo- va polinukleotidlarni sintez qilish usullari

Transkripsiya: niRNKsintezi. Transkripsiya gen saqllovchi DNK molekulasida zanjiming bir qismi yechilib nusxa olishga tayyor bo'lishidan boshlanadi. DNKning mazkur ajralgan qismi ichida RNK-polimeraza fermenti zanjirdan birini mRNK sinlezi uchun matritsa sifatida qo'llaydi. Shuningdek, DNK sintezidagi kabi S (sitozin) G(guanin) bilan komplementar ravishda bog'lanadi, lckin mRNKda U(uratsil) A(adenin) bilan juft hosil qiladi. RNK-polim-erazalar DNK matritsa zanjiri bo'ylab harakatlanib asoslar o'rtasi- da bog' hosil bolishini ta'minlaydi. RNK-polimeraza terminatsiya joyiga yetganda, transkripsiya yakunlanadi va yangi mRNK ajratilib yuboriladi. DNKning uzilgan qismi o'zining qo'sh spiralli tuzilishi- ga qaytadi.

Transport RNK (tRNK) RNK molekulalarining umumiy hiso- bidan eng kami bo'lib, mRNKda saqlanuvchi genetik axborotni o'qib, ma'lum bir aminokislalani ribosomaga oqsil sintezi uchun olib keladi. Faqat tRNKgina oqsillar uchun genetik axborotni oqsil- lar aminokislotalariga tasljiy oladi



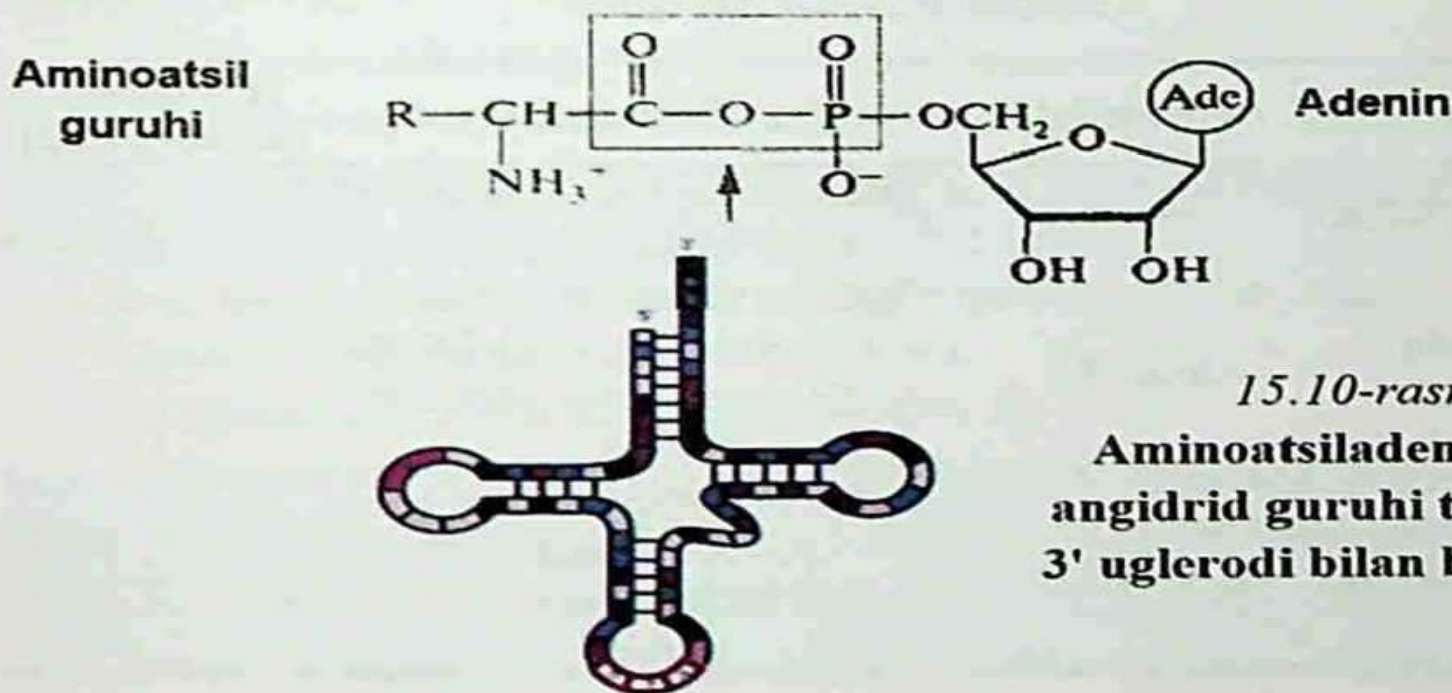
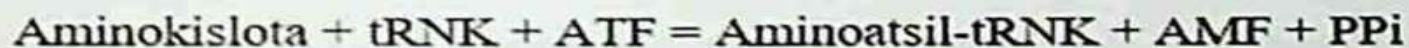


15.8-rasm. Transport RNKning “beda bargi” shaklidagi tuzilishi

20 ta aminokislotalarning har biriga bittadan ortiq t-RNK to‘g‘ri keladi. 70 tadan 90 tagacha nukleotidlardan iborat barcha tRNK strukturalari o‘zaro o‘xshash. Bir nechta komplementar asoslar vodorod bog‘lar bilan bog‘lanib asosiy zanjirda qo‘sh zanjirli bo‘laklarni hosil qiladi. Aslida tRNK strukturasi murakkab, ammo biz uni soddalashtirib uch yaproqli “beda bargi” shaklida chizishimiz mumkin. tRNKning barcha molekulalari akseptor o‘zan sifatida tanilgan ASS nukleotidlar ketma-ketligidan iborat 3 ta ohi- riga ega. Maxsus ferment ta’sirida aminokislota akseptorli o‘banning uchida joylashgan erkin -OH guruhi bilan murakkab efir bog‘ini hosil qilish orqali birikadi. Har bir tRNK mRNKdagi uchta asosga komplementar bo‘lib joylashgan uch asos ketma-ketligidan tashkil topgan antikodonni o‘zida saqlaydi

tRNKning aminoatsillanishi - aminokislotalarni faollashtirish jarayoni. Bu jarayon oqsil biosintezining birinchi bosqichida boradi yiginnata aminokislota murakkab efir bog'i bilan tegishli tRNK ga bog'lanadi.

Aminoatsillash fennentning katalitik markazida kechadigan ikki bosqichda boradi. Birinchi bosqichida ATF va aminokislota birikishi natijasida oraliq modda atsiladenilat hosil bo'ladi. Ikkinchi bosqichida aminoatsil qoldig'i ferment bilan bogMangan aminoatsi- ladenilatdan tegishli maxsus tRNKga ko'chib o'tadi. (15.10-rasm). Aminoatsillash quyidagi sxema bilan ifodalanishi mumkin



E'TIBORINGIZ UCHUN RAHMAT!