



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN



Л. Н. ГУМИЛЕВ АТЫНДАҒЫ
ЕУРАЗИЯ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
ЕВРАЗИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Л. Н. ГУМИЛЕВА
GUMILYOV EURASIAN
NATIONAL UNIVERSITY



Студенттер мен жас ғалымдардың
«Ғылым және білім - 2015»
атты X Халықаралық ғылыми конференциясының
БАЯНДАМАЛАР ЖИНАҒЫ

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ
X Международной научной конференции
студентов и молодых ученых
«Наука и образование - 2015»

PROCEEDINGS
of the X International Scientific Conference
for students and young scholars
«Science and education - 2015»

УДК 001:37.0
ББК72+74.04
Ғ 96

Ғ96

«Ғылым және білім – 2015» атты студенттер мен жас ғалымдардың X Халық. ғыл. конф. = X Межд. науч. конф. студентов и молодых ученых «Наука и образование - 2015» = The X International Scientific Conference for students and young scholars «Science and education - 2015». – Астана: <http://www.eni.kz/ru/nauka/nauka-i-obrazovanie-2015/>, 2015. – 7419 стр. қазақша, орысша, ағылшынша.

ISBN 978-9965-31-695-1

Жинаққа студенттердің, магистранттардың, докторанттардың және жас ғалымдардың жаратылыстану-техникалық және гуманитарлық ғылымдардың өзекті мәселелері бойынша баяндамалары енгізілген.

The proceedings are the papers of students, undergraduates, doctoral students and young researchers on topical issues of natural and technical sciences and humanities.

В сборник вошли доклады студентов, магистрантов, докторантов и молодых ученых по актуальным вопросам естественно-технических и гуманитарных наук.

УДК 001:37.0
ББК 72+74.04

ISBN 978-9965-31-695-1

©Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия
ұлттық университеті, 2015

2. Технология спирта В.А. Марниченко , В.А.Смирнова – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1981, 416 с.
3. Халаим А.Ф. Технология спирта , М.: Пищевая пром-сть, 1972.
4. Фертман Г.И., Шойхет М.И. Технология продуктов брожения. Высшая школа, 1976, 343 с.
5. Справочник по производству спирта. / В.Л. Яровенко и др./.-М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1981, 336 с.

УДК 547

ТВЕРДОФАЗНЫЙ АМИДОФОСФИТНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Кушанова Анара Сериковна

anara_27@bk.ru

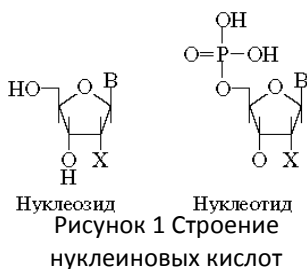
Студентка 4-ого курса, специальность «5В060600- Химия»

ЕНУ им. Гумилева, Астана, Казахстан

Научный руководитель – Ж.К.Жатканбаева

Введение

Использование твердофазного синтеза олигонуклеотидов широко применяется в фундаментальных исследованиях в области молекулярной биологии, генетической инженерии, биотехнологии, а также для диагностики инфекционных и генетических заболеваний. Нуклеиновые кислоты являются биополимерами, состоящими из мономерных остатков - нуклеотидов (нуклеиновые кислоты).



В состав нуклеиновых кислот и олигонуклеотидов входят пять нуклеотидов, отличающихся между собой строением азотистого гетероцикла. Три из них - производные аденина (А), гуанина (G) и цитозина (C) входят в состав и ДНК и РНК, производное тимина (Т) - только в ДНК, урацила (U) - только в РНК. Строение нуклеиновых кислот (Рис. 1), а также основные достижения их в химии и биохимии описаны в статьях Д.Г. Кнорре [1, 2].

Для проведения реакций проходящих во время синтеза необходимо выполнение некоторых условий, способствующих увеличению выхода олигонуклеотидов [3].

Правильность последовательности синтезированного олигонуклеотида проверяется полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Особенность ПЦР состоит в том, что амплификации подвергается область, находящаяся между участками отжига праймеров, первичная структура которых должна быть известна или задана заранее.

Для этого подготавливается master mix (смесь состоящая из буфера, ДНК, dNTP, воды и Taq полимеразы), после чего в master mix добавляется прямой и обратный праймер (олигонуклеотид). ПЦР состоит из трех стадий: денатурация, отжиг и пролонгация. В конце каждого цикла количество праймеров увеличивается в 2 раза. Количество циклов выбирается по необходимости увеличения концентрации, а концентрация увеличивается в геометрической прогрессии выраженной по формуле $C=2^n$ (где n – количество циклов).

Правильность синтезированных олигонуклеотидов определяется в стадии отжига. Во время отжига выбирается определенная температура (температура вычисляется по формуле, где учитывается соотношение G-C и A-T), при которой водородная связь, образующая между одноцепочечным ДНК и олигонуклеотидом была устойчивая. Если синтезированный олигонуклеотид не имеет правильной последовательности, то во время отжига он не будет образовывать устойчивую водородную связь с одноцепочечным ДНК.

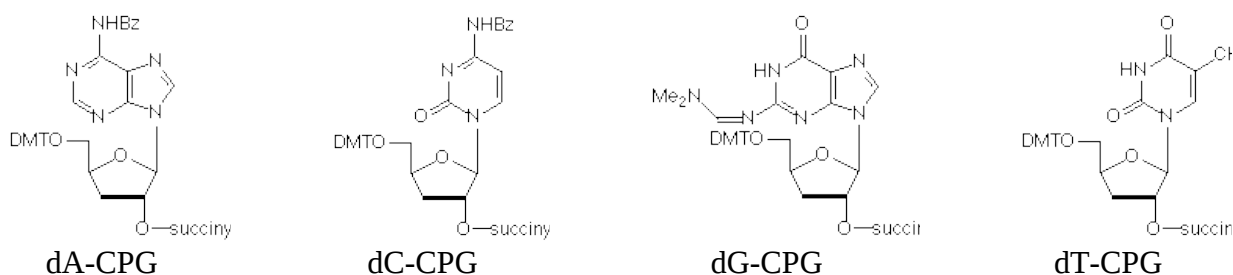
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез проводился на автоматическом синтезаторе ASM-800 (Россия) и управлялся с помощью компьютера. Была создана инертная среда с использованием гелия. Для синтеза использовали готовую реакторную колонку с прикрепленным нуклеозидом к твердому носителю. Для первого синтеза мы выбрали синтез из следующей цепи:



выбирали реакторную колонку с dG-CPG (CPG показывает что нуклеозид связан с твердым носителем, см. Рис 2).

После помещения колонки в реакторный отсек производили проверку установки на целостность блоков, герметичность системы и содержание всех нужных реагентов в необходимом количестве. Время синтеза зависит от длины выбранного олигонуклеотида.



**DMT – диметокситрети́л, защитная группа, соединенная с 5-ым атомом углерода дезоксирибозы.*

Рисунок 2 Нуклеозиды, связанные с твердым носителем

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Синтез начинается со снятия защитной группы DMTr- с помощью раствора DbI (Deblocking solution). Этот процесс сопровождается с появлением оранжевой окраски во время промывки колонки. Для присоединения следующего нуклеотида к нуклеотиду со снятой защитной группой использовали активирующий реагент Act. Активирующий реагент способствует отщеплению -NR_2 от фосфита и соединению фосфора с 5 атомом углерода дезоксирибозы через кислородный мостик. После чего этот атом фосфора обрабатывали окисляющим реагентом Oxd. Окислитель окисляет активный трёхвалентный атом фосфора до пяти валентного атома фосфора, тем самым стабилизируя его. Таким образом, мы присоединили нуклеотид к нуклеозиду, связанного с твердым носителем. Цикл повторяется в зависимости от длины синтезируемого олигонуклеотида.

Защитную группу DMTr- с последнего нуклеотида можно удалить или же оставить, что позволяет функция синтезатора. Это зависит от выбранного метода очистки.

По окончании синтеза реакторные колонки сушили 10 минут в вакуумном насосе и содержимое колонки перенесли в пробирку, в виде сухого порошка.

Для отделения синтезированного продукта от твердого носителя использовали метод аммонолиза: с помощью концентрированного аммиака и моноэтаноламина. Аммонолиз с концентрированным аммиаком проводили при 90°C в течение 1 часа с интервалом перемешивания 10 минут, и при 60°C оставляли на ночь. С моноэтаноламином также в течение 1 часа с интервалом перемешивания 10 минут при 60°C .

Мы применяли аммонолиз для отделения CPG от синтезированного олигонуклеотида. После аммонолиза пробирки остужали до комнатной температуры и фильтровали. Фильтрат сушили в вакуумном испарителе при условии вакуума 1,5-1,6 бар и температуры 60°C , пока

объем фильтрата не достиг 100мкл. Таким образом, мы увеличили концентрацию олигонуклеотида и избавились от аммиака, упарив его. При применении моноэтаноламина, к фильтрату добавляется 1 мл 0,01 М буфер ТЕАА (ацетат триметиламмония) и ставится на очистку в жидкостной хроматограф системы OPS-201.

Очистка олигонуклеотидов производилась на гель-электрофореze и жидкостном хроматографе. Принцип метода гель электрофореze заключается в том, что исследуемый олигонуклеотид вносят в лунку, расположенную у края геля находящегося в буферном растворе 1X TBE. Макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, и когда через гель пропускают электрический ток, они перемещаются в электрическом поле. Молекулы одинакового размера (и одинакового заряда) движутся единым фронтом, образуя в геле дискретные невидимые полосы. Чем меньше размер молекул, тем быстрее они движутся. Постепенно исходный препарат, состоящий из разных макромолекул, разделяется на зоны, распределенные по длине пластинки. За ходом электрофореze следили по перемещению в геле красителя – заряженного низкомолекулярного вещества 6X Loading Dye, которое вносили в каждую лунку перед началом электрофореze. Когда краситель достигает конца пластины, электрофореze останавливали, а гель окрашивали красителем бромистым этидием, прочно связывающимся с нуклеиновыми кислотами. Если образец представляет собой дискретный набор макромолекул разного размера, то после электрофореze получается набор четких полос, расположенных одна под другой. Если же распределение молекул по размеру более или менее непрерывно, то получается смазанная картина, также по интенсивности окраски полос можно судить о концентрации макромолекул в синтезированном образце [4].

Очистка жидкостным хроматографом, на обращенной фазе, включает в себя очистку и детритилирование олигонуклеотидов (данная очистка тритилом возможно только для олигонуклеотидов, которые на последней стадии синтеза не обрабатывались раствором Dbl). Исходный раствор олигонуклеотида, включающий целевой олигонуклеотид и примеси олигонуклеотидов меньшей длины, наносились на колонку с обращенной фазой. Целевой олигонуклеотид своей защитной диметокситритильной группой связывается с фазой. Первая промывка 12% раствором ацетонитрила вымывает из колонки короткие олигонуклеотиды, не содержащие на конце диметокситритильную группу. Следующая обработка раствором TClA обеспечивает снятие защитных групп с оставшегося целевого олигонуклеотида, и затем колонка промывается водой. Целевой олигонуклеотид смывается раствором 15% ацетонитрила в пробирку. Очистка колонки от всех остатков олигонуклеотидов выполняется при промывке 75% раствором ацетонитрила.

Таким образом, нами синтезированы на автоматическом синтезаторе олигонуклеотиды разной длины (от 16 до 25 нуклеотидных пар оснований) и проверено их полное соответствие с заданной последовательностью путем проведения ПЦР. Эту методику можно дальше использовать для научных и промышленных целей, а также можно синтезировать олигонуклеотиды с модифицированными нуклеотидами и присоединять олигонуклеотидам флуоресцентные красители-метки.

Список использованных источников

1. Кнорре Д.Г. Биохимия нуклеиновых кислот // Соросовский Образовательный Журнал. 2008, № 8, С. 30-35.
2. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия. М.: Высш. шк., 2001.
3. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. – М.: Мир, 2002
4. Л.М. Халимская. Химический синтез белков и нуклеиновых кислот с использованием автоматических синтезаторов// Соросовский Образовательный Журнал. 2010, №10, С.37-42