Место для баллов:	**Код:**

КАБИНЕТ № 2
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
(*30 баллов*)

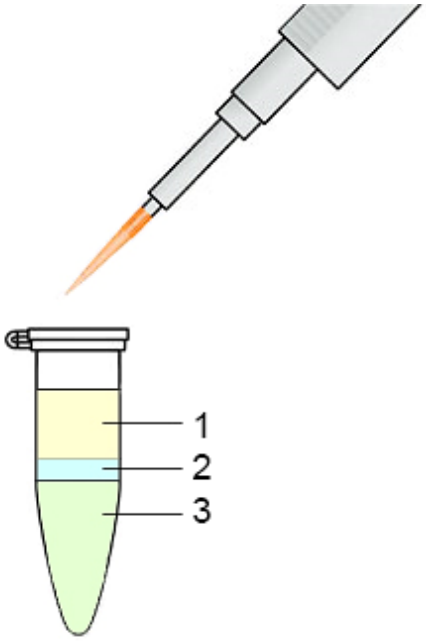
Продолжительность выполнения задания – 1 час 30 минут (90 минут).

Выделение и секвенирование ДНК

Интересующая исследователей ДНК была выделена тремя методами: органической экстракции, твердофазной экстракции и высаливанием.

1.1 При органической экстракции нуклеиновых кислот были проведены следующие манипуляции: добавление к образцу лизирующего буфера, центрифугирование, добавление протеазы и РНК-азы, смеси фенола и хлороформа (pH раствора нейтральный). После очередного центрифугирования раствор разделился на органическую, белковую и ДНК-фракции.

Подпишите соответствующие фракции на иллюстрации и обоснуйте свой выбор.



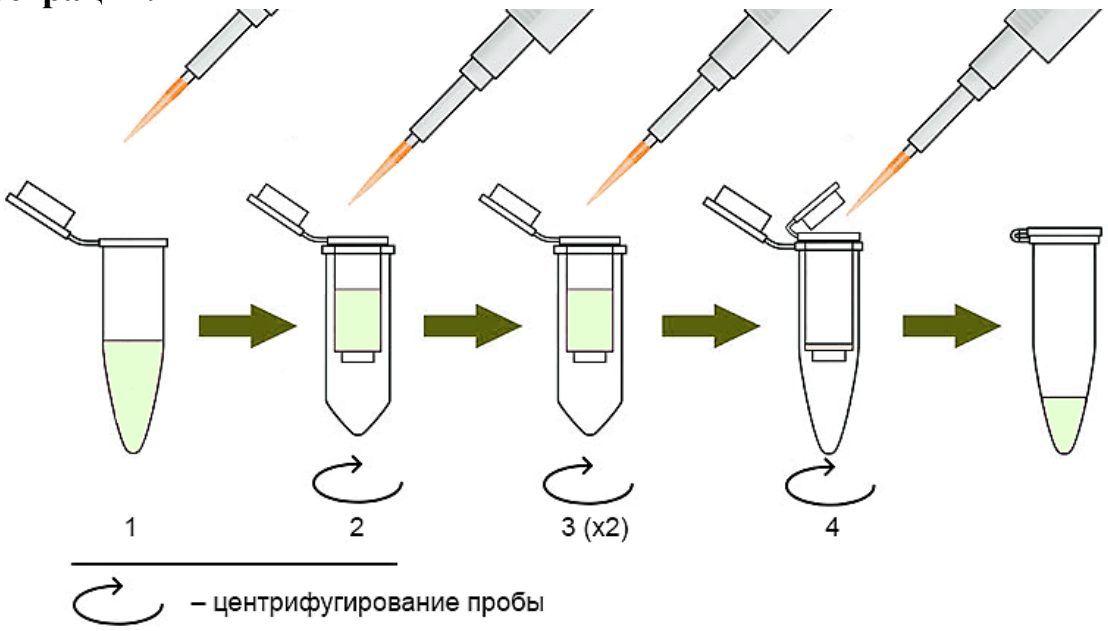
Ответ:

1.		***(0,3 балла)***
2.		***(0,3 балла)***
3.		***(0,3 балла)***

Обоснование *(2 балла)*:

1.2 Твердофазную экстракцию выполняли с использованием центробежной колонки. В качестве твердой матрицы использовали сорбирующую мембрану, в состав которой входит диоксид кремния. К образцу был добавлен лизирующий буфер, затем было проведено центрифугирование образца на колонке. Затем дважды был добавлен раствор этилового спирта с последующим центрифугированием. Последний этап центрифугирования был проведен с использованием ТЕ-буфера (Трис-ЭДТА).

Подпишите соответствующие стадии выделения ДНК на иллюстрации.

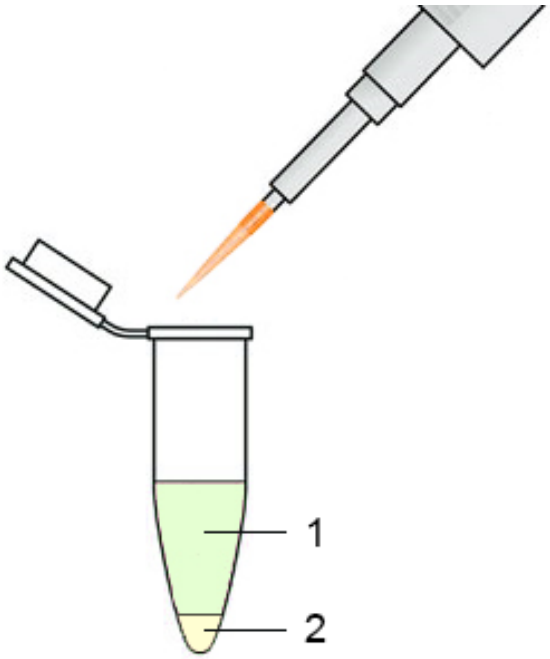


Ответ:

1.		***(0,75 балла)***
2.		***(0,75 балла)***
3.		***(0,75 балла)***
4.		***(0,75 балла)***

1.3 Выделение ДНК методом высаливания проводили путем добавления к образцу лизирующего буфера и протеолитических ферментов с последующей длительной инкубацией в буфере с высокой концентрацией хлорида натрия. После центрифугирования образовались белково-клеточная и содержащая ДНК фракции.

Подпишите соответствующие фракции на иллюстрации и обоснуйте свой выбор.

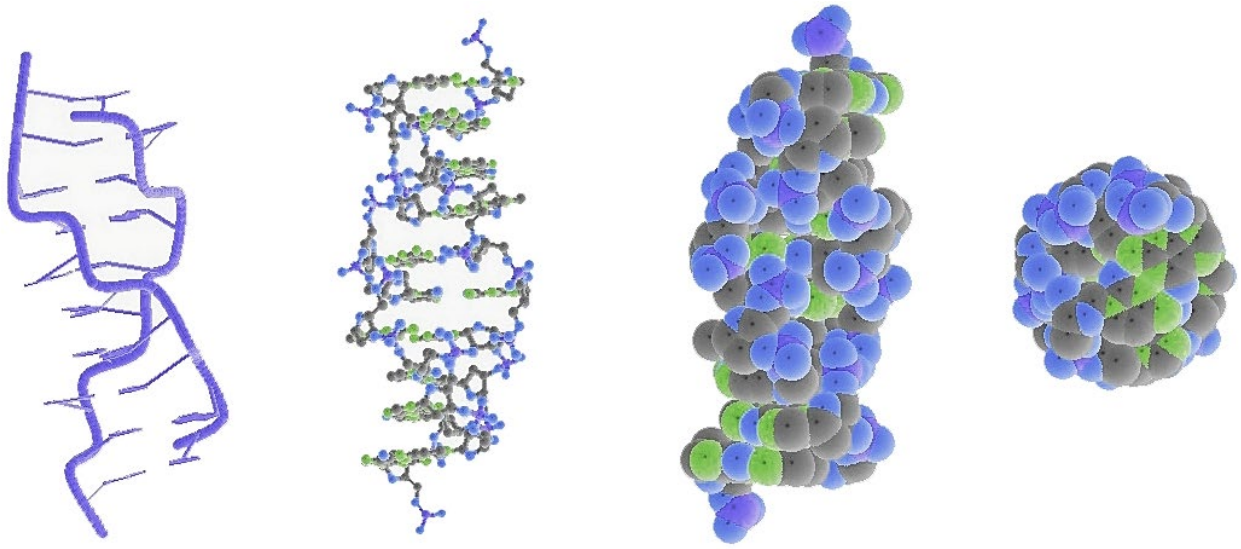


Ответ:

1.		***(0,6 балла)***
2.		***(0,6 балла)***

Обоснование *(1,7 балла)*:

1.4 Выделенная молекула ДНК имеет следующую структуру, представленную разными способами визуализации и с разных ракурсов:



Заполните таблицу, характеризующую изображенную структуру ДНК:

Форма ДНК		***(0,6 балла)***
Направление спирали		***(0,6 балла)***
Количество пар оснований на один оборот спирали		***(0,6 балла)***
Диаметр, нм		***(0,6 балла)***
Стабильная/временная структура		***(0,6 балла)***

1.5 Для секвенирования целевого фрагмента из выделенной ДНК для 7 разных видов необходимо было предварительно провести полимеразную цепную реакцию.

Рассчитайте и укажите в таблице количество mQ, которое необходимо добавить в общую реакционную смесь ПЦР на 7 образцов, если финальный объем пробы должен составить 30 мкл для 1 образца.

Реактив	**Объём, мкл**	
mQ		***(1,5 балла)***
dNTP (дезоксинуклеотидтрифосфаты)	21	
Праймер в прямой ориентации	6,3	
Праймер в обратной ориентации	6,3	
$MgCl_2$	7	
Буфер	21	
Полимераза	7	
ДНК	3,6	

1.6 Рассчитайте температуру плавления (Tm) праймеров для ПЦР:

Праймер в прямой ориентации – 5′-GGTCAACAAATCATAAAGAT-3′

Ответ:	Tm		°C	***(1,5 балла)***

Праймер в обратной ориентации – 5′-TAAACTTCAGGGTGACCAAA-3′

Ответ:	Tm		°C	***(1,5 балла)***

1.7 Зачастую при проведении ПЦР используется Taq-полимераза – термостабильный бактериальный фермент. При оптимальной температуре скорость работы фермента составляет около 60 нуклеотидов в секунду.

За счет отсутствия какой активности обеспечивается высокая скорость работы фермента?

(0,7 балла)

1.8 В 1977 году Фредрик Сэнгер постулировал и опубликовал первый метод секвенирования ДНК – метод обрыва цепи, который сейчас называют методом секвенирования по Сэнгеру. Метод предполагает использование определенного вида нуклеотидов.

Про какие нуклеотиды идет речь?

(0,7 балла)

Что отличает такие нуклеотиды от обычных динуклеотидов?

(0,7 балла)

Классический метод секвенирования по Сэнгеру предполагает детекцию результатов при помощи электрофореза – метода, основанного на разделении фрагментов ДНК разной длины за счет разной скорости их движения в агарозном геле под действием электрического поля.

Для постановки электрофореза необходимо приготовить 1,5 % агарозный гель объемом 25 мл.

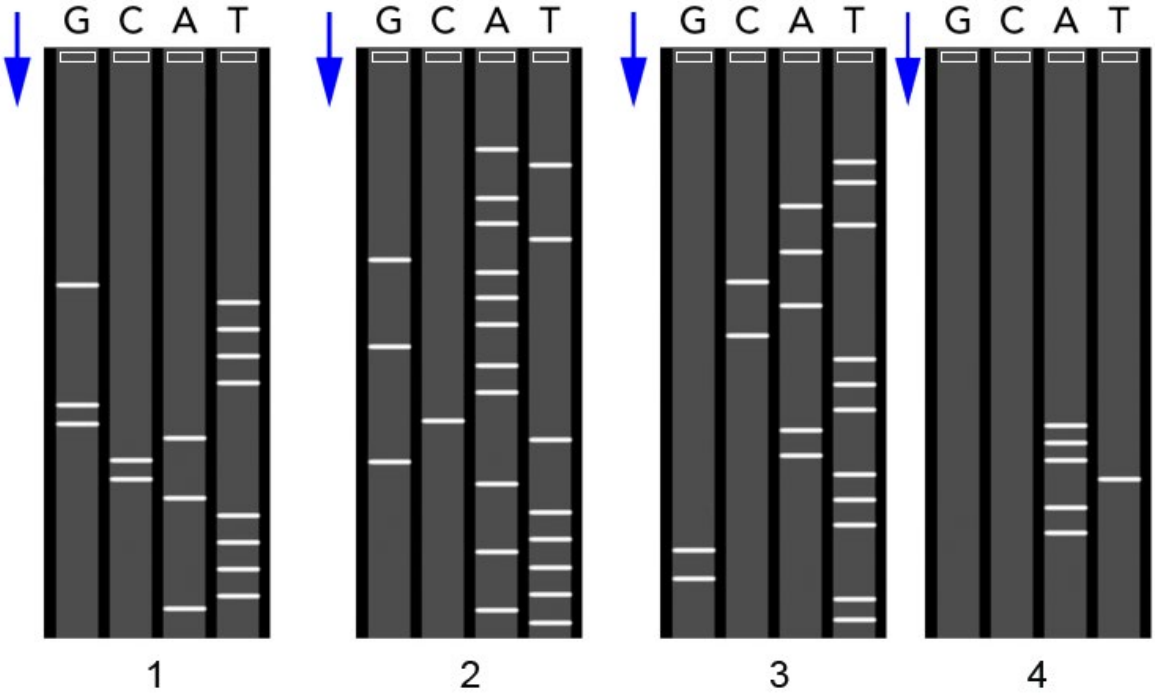
Какое количество сухой агарозы необходимо взвесить? Ответ запишите в граммах, с округлением до 3 знаков после запятой.

Ответ: ***(0,6 балла)***

Пластину приготовленного агарозного геля с внесенными образцами помещают в аппарат для горизонтального гель-электрофореза и подключают источник постоянного напряжения. **ДНК при таком напряжении двигается в направлении** _____ **заряженного электрода –** _____ **(дополните предложение –** ***1 балл*****).**

1.9 Перед Вами результаты электрофореза после проведения секвенирования классическим методом Сэнгера для одной из проб. Целевая последовательность для этой пробы была до этого несколько раз амплифицирована с использованием разных пар праймеров, чтобы обеспечить получение всей биологической информации.

1.9.1 Запишите расшифрованные при помощи этого метода участки биологической последовательности.



Ответ:

Участок 1		***(1 балл)***
Участок 2		***(1 балл)***
Участок 3		***(1 балл)***
Участок 4		***(1 балл)***

1.9.2 Восстановите итоговую последовательность из расшифрованного пула прочтений.

Ответ:

	(6 баллов)