Место для баллов:	**Код:**

КАБИНЕТ № 2
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ
(*30 баллов*)

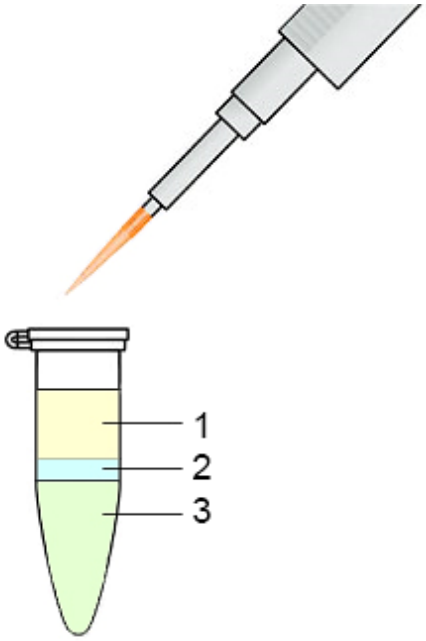
Продолжительность выполнения задания – 1 час 30 минут (90 минут).

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:

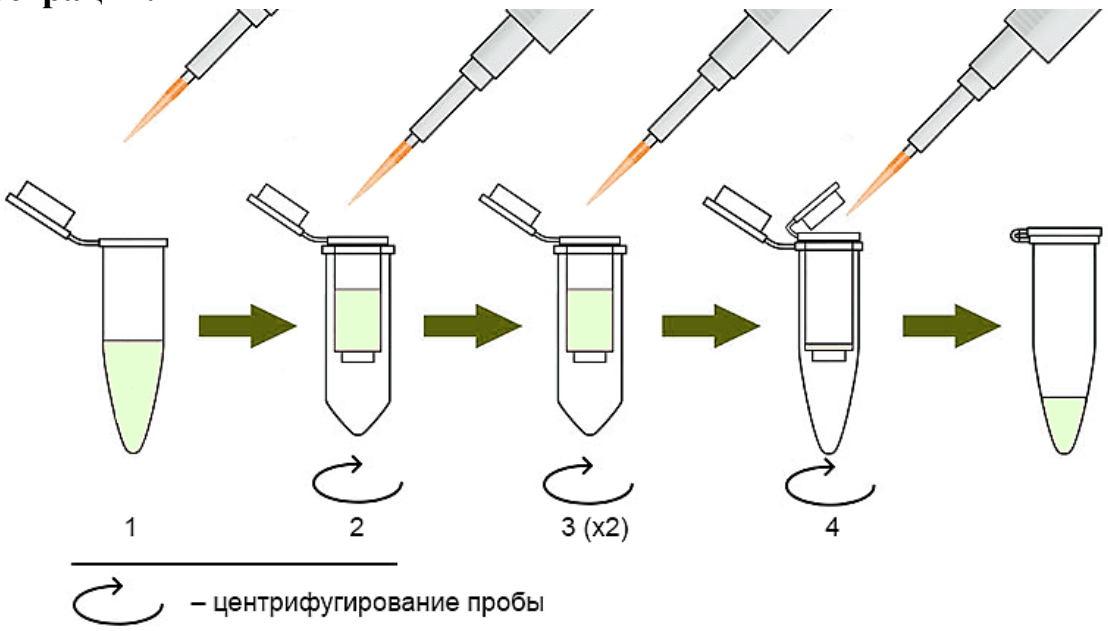
1.	*Водная ДНК-фракция*	***(0,3 балла)***
2.	*Белковая фракция*	***(0,3 балла)***
3.	*Органическая фракция*	***(0,3 балла)***

Обоснование *(2 балла)*:

При центрифугировании лизата со смесью фенола и хлороформа образуется
два слоя из-за разницы в плотности органических растворителей и воды.
Нижний гидрофобный слой будет содержать органическую фазу,
состоящую из растворителей, липидов, углеводов и частично
денатурировавших белков, а верхний гидрофильный – водный раствор с ДНК.
При этом часть денатурированных белков будут образовывать преципитат
на границе водной и органической фаз.

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.

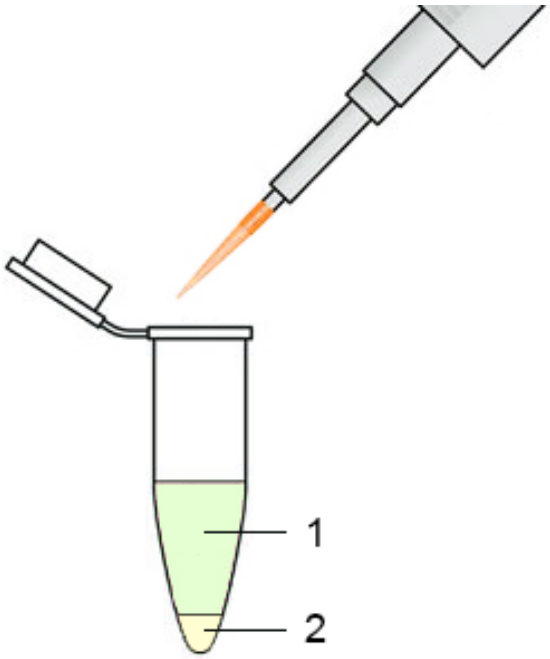


Ответ:

1.	*Лизинг / лизис клеточных компонентов*	***(0,75 балла)***
2.	*Сорбция / связывание ДНК с сорбентом*	***(0,75 балла)***
3.	*Отмывка / очищение образца от лишних примесей*	***(0,75 балла)***
4.	*Элюирование / извлечение ДНК из сорбента_*	***(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.



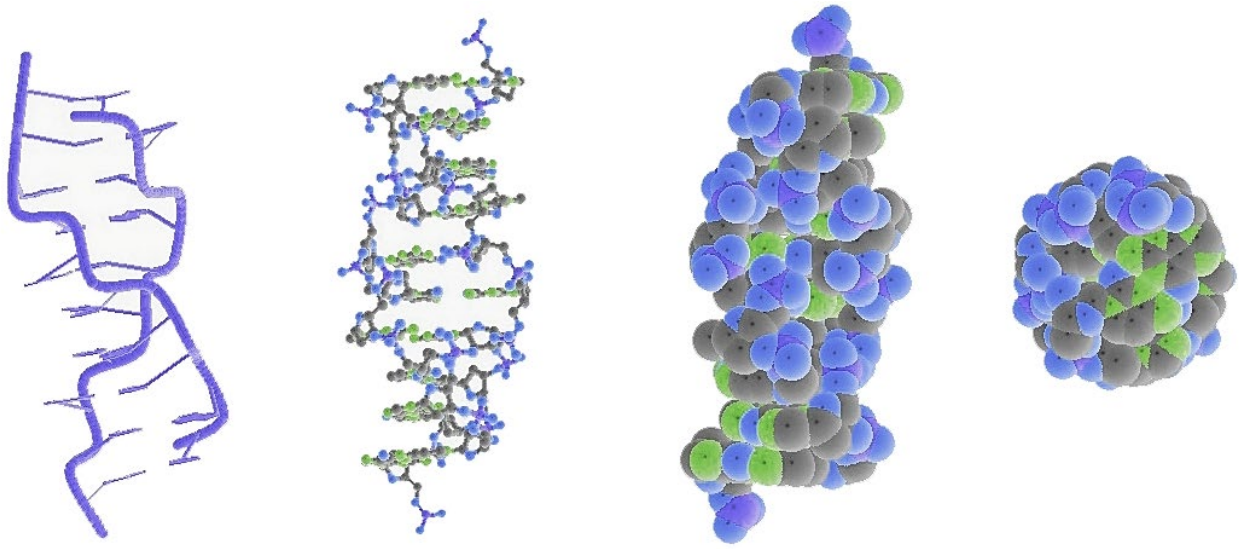
Ответ:

1.	*Содержащая ДНК фракция*	***(0,6 балла)***
2.	*Белково-клеточная фракция*	***(0,6 балла)***

Обоснование *(1,7 балла)*:

Одновалентные соли, в данном случае хлорид натрия, в высокой концентрации
способствуют денатурации и осаждению белков и других клеточных
компонентов. Центрифугирование позволяет более точно отделить белковый
осадок от ДНК в супернатанте.

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



Заполните таблицу, характеризующую изображенную структуру ДНК:

Форма ДНК	*Z-форма*	***(0,6 балла)***
Направление спирали	*левозакрученная*	***(0,6 балла)***
Количество пар оснований на один оборот спирали	*12*	***(0,6 балла)***
Диаметр, нм	*1,8*	***(0,6 балла)***
Стабильная/временная структура	*временная*	***(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	***116,2***	***(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	

Пояснения к решению задания 1.5 для жюри

Один из подходов к решению: даны объемы реактивов для общей реакционной смеси на 7 образцов. Рассчитываем объем на 1 образец.

Реактив	**Объём на 1 образец, мкл**
mQ	*x*
dNTP (дезоксинуклеотидтрифосфаты)	3
Праймер в прямой ориентации	0,9
Праймер в обратной ориентации	0,9
$MgCl_2$	1
Буфер	3
Полимераза	1

Так как в условии указано, что использована ДНК 7 разных видов, то в общей реакционной смеси её не будет (ДНК каждого вида должна быть добавлена индивидуально в отдельную пробирку после разлива общей реакционной смеси по образцам). Следовательно, объем реакционной смеси на 1 образец без учета ДНК составит 26,4 мкл (30-3,6). Сумма всех реактивов из расчетов на 1 образец составляет 9,8 мкл, значит нужно добавить 16,6 мкл mQ для доведения реакционной смеси до нужного объема. Соответственно, для 7 образцов необходимый объем mQ составит 116,2 мкл.

1.6 Рассчитайте температуру плавления (Tm) праймеров для ПЦР:

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

Ответ:	Tm	***52***	°C	***(1,5 балла)***

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

Ответ:	Tm	***56***	°C	***(1,5 балла)***

Температура плавления праймеров рассчитывается при помощи формулы
Tm= 2(nA+nT)+4*(nG+nC),*
где nA, nT, nG, nC – количество соответствующих нуклеотидов в праймере.

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?

У Taq-полимеразы отсутствует 3',5'-экзонуклеазная	***(0,7 балла)***
активность, что способствует более высокой скорости работы фермента	

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?

Радиоактивно меченные дидезоксинуклеотиды (ddNTP)	***(0,7 балла)***

Что отличает такие нуклеотиды от обычных динуклеотидов?

Такие нуклеотиды содержат водородную группу вместо	***(0,7 балла)***
гидроксильной, присутствие которой обеспечивает остановку синтеза цепи	

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.

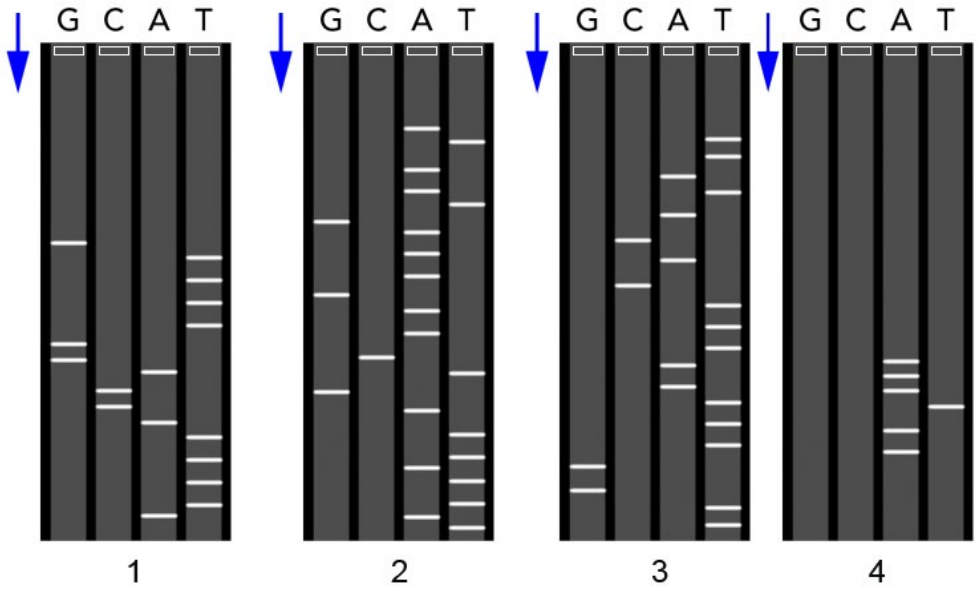
Ответ:	*0,375 г*	***(0,6 балла)***

Расчет содержания вещества в растворе производится по формуле
*C = (P * V) / 100, где P - процентное содержание, %; V - объем, мл*

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** *положительно* **заряженного электрода –** *анода*. **(*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	*ATTTTACCAGGTTTTG*	***(1 балл)***
Участок 2	*TATTATTAGTCAAGAAAGTAATA*	***(1 балл)***
Участок 3	*TTGGTTTAATTTCACATATT*	***(1 балл)***
Участок 4	*AATAAA*	***(1 балл)***

Каждое присоединение дидезоксинуклеотида вызывает остановку синтеза цепи. Например, в лунке с модифицированным аденином (А) терминация синтеза будет происходить во всех положениях, где в цепи должен быть аденин. В результате получается много фрагментов разной длины, оборванных на одном конкретном типе основания. Учитывая, что фрагменты с меньшим размером двигаются быстрее, чем более крупные, восстановление последовательности происходит снизу-вверх – от более легкого фрагмента к более тяжелому и, следовательно, длинному.

1.9.2 Восстановите итоговую последовательность из расшифрованного пула прочтений.

Ответ:

ATTTTACCAGGTT[TTG]GTTTAATTTCACA[TATT]ATTAGTCAAGA AAGT	
[AATA]AA	***(6 баллов)***

Целевая последовательность была амплифицирована несколько раз с использованием разных пар праймеров, следовательно, полученные фрагменты могут содержать на концах одинаковые участки нуклеотидов. Сборка итоговой последовательности происходит по принципу поиска перекрывающихся участков из разных прочтений, выделенных в ответе квадратными скобками.