

Занятие 7. СОВРЕМЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ДНК

Цель занятия: ознакомиться с основными молекулярно-биологическими методами анализа ДНК.

1. Определение нуклеотидной последовательности ДНК.
2. Амплификация фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции.
3. Скрининг ампликонов.

Тематика рефератов

1. Саузерн-блот гибридизация, общая характеристика, примеры использования.
2. Полимеразная цепная реакция.
3. Метод секвенирования.

Вопросы для самоконтроля

1. Что представляет собой амплификация?
2. Что такое полимеразная цепная реакция?
3. Какой процесс лежит в основе ПЦР?
4. Дайте характеристику фермента, осуществляющего ПЦР.
5. Какие виды детекции продуктов ПЦР вы знаете?
6. Что такое полиморфизм длин рестриционных фрагментов?
7. Перечислите основные этапы ПДРФ-анализа.
8. Дайте определение понятию секвенирование.
9. Опишите методику автоматического секвенирования.

Задание 1. Запишите основные стадии полимеразной цепной реакции.

Задание 2. Объясните, на чем основывается метод электрофореза.

Задание 3. Решите задачи:

1. Фрагмент человеческой ДНК длиной 4 тысячи нуклеотидных пар имеет два сайта рестрикции для фермента EcoRI. Как будет выглядеть электрофореграмма, окрашенная этидиум бромидом, после электрофореза в агарозном геле образца данной ДНК, разрезанной этой рестриктазой на неровные части?

2. Молекула ДНК величиной 17 кб была разрезана на фрагменты двумя рестриктазами. Результаты электрофоретического анализа в агарозном геле, полученных фрагментов ДНК после окраски этидиум

бромидом представлены на фореграмме рисунок 80. При разрезании рестриктазой № 1 ДНК разрезается на три фракции величиной 8, 6 и 3 кб, а при разрезании рестриктазой № 2 на две фракции – 10 и 7 кб. ДНК, разрезанная сразу двумя рестриктазами № 1 и № 2, состоит из четырёх фракций величиной 8, 6, 2 и 1 кб.

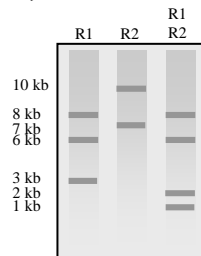


Рисунок. Электрофо-реграмма ДНК-фрагмен-тов (R1 и R2 - рестриктазы)

В каком порядке полученные рестрикционные фрагменты распо-ложены в исходной молекуле ДНК величиной 17 кб? Иными словами, необходимо построить рестрикционную карту ДНК 17кб.

3. Анализ ДНК был проведен в большой семье, среди членов ко-торой наблюдалось доминантное аутосомное заболевание, прояв-ляющееся в 40 лет и позже. Образцы ДНК каждого члена семьи об-работали рестрикционным ферментом TagI и полученные фрагменты ДНК разделили при помощи электрофореза в агарозном геле. Затем провели Саузерн-блот гибридизацию с использованием радиоактив-ной пробы, состоящей из фрагмента клонированной ДНК человека. Родословная исследованной семьи и полученная автордиограмма электрофорезированной ДНК представлены на рисунке 81 ниже. Чер-ным отмечены члены семьи, имеющие заболевание.

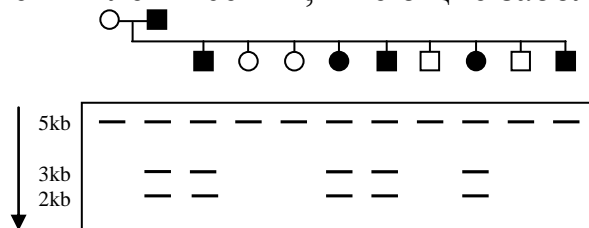
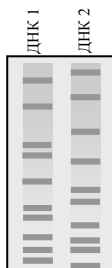


Рисунок. Родословная семьи в которой распространено доминантное ауто-сомное заболевание и электрофо-реграмма образцов ДНК каждого члена се-мьи, обработанных рестрикционным ферментом TagI.

Проанализируйте полные взаимоотношения между полученными с помощью радиоактивной пробы спектрами ДНК членов семьи и ге-ном болезни. Нарисуйте соответствующие хромосомные участки ро-дителей.

4. Образцы человеческой ДНК обработанные рестриктазами бы-ли проанализированы методом фингерпринта с использованием ра-диктивно меченого зонда комплементарного к звеньям минисател-литной ДНК. Схематическое изображение радиогаммы проведённо-

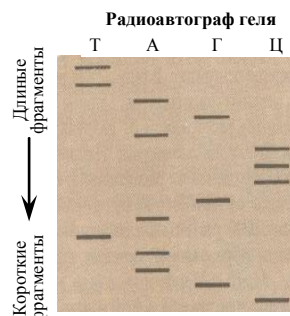
го фингерпринта ДНК представлены на рисунке справа.



Исходя из характера спектра укажите у одного или двух человек была взята ДНК для анализа?

5. Нуклеотидная последовательность короткого рестриционного фрагмента ДНК длиной в 15 нуклеотидов была сиквенирована методом Максама-Гилберта.

На основе спектра представленного на радиограмме справа определите (прочитайте) нуклеотидную последовательность фрагмента ДНК.



6. В ходе расследования убийства на месте преступления была обнаружена капля крови принадлежащая убийце. Спектры ДНК данной капли крови, а также семи подозреваемых, полученные в результате фингерпринта минисателлитной ДНК представлены на радиограмме, приведенной на рис. 83. Спектр ДНК образцов капли крови, оставленный преступником на радиограмме отмечен звёздочкой, а спектры семи подозреваемых - цифрами.

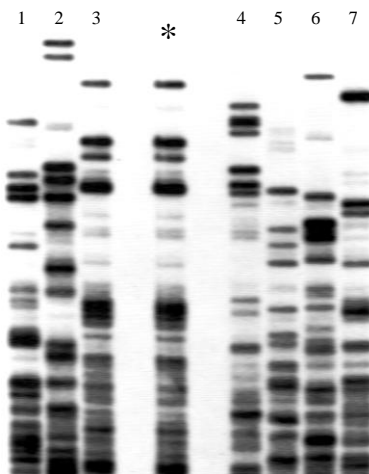


Рисунок. Фингерпринт спектров минисателлитной ДНК образца капли крови убийцы и семи подозреваемых в преступлении.

Исходя из представленных спектров ДНК образцов крови на радиограмме после фингерпринта, укажите, кто из семи подозреваемых является предполагаемым преступником?

7. Для идентификации членов семьи, захороненных в начале XX в., из костных останков ученым удалось получить лишь около 10 ко-

пий небольших фрагментов ДНК, содержащих нужный ген. Такое ограниченное количество копий ДНК не позволяет провести секвенирование и электрофоретический анализ гена, что исключает генетическую идентификацию и дактилоскопию членов семьи.

Каково будет количество копий ДНК нужного гена, если исследователю удастся провести 20 успешных циклов амплификации (размножения) фрагментов ДНК из костных останков, используя метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)?

8. В лаборатории возникла задача не только размножить, но и клонировать в плазмиде рUC18 структурный ген мыши из предыдущей задачи. Как нужно модифицировать праймеры использованные в предыдущей задаче, для того, что бы после амплификации встроить ген мыши в плазмиду по сайтам BamI и EcoRI.

Тест

1. Какие стадии включает ПЦР?

- 1) денатурация;
- 2) гибридизация;
- 3) полимеризация;
- 4) ренатурация.

2. Как называется термостабильный фермент, осуществляющий ПЦР?

- 1) синтетаза;
- 2) праймаза;
- 3) Таg-полимераза;
- 4) ревертаза.

3. Секвенирование – это:

- 1) размножение отдельных участков ДНК;
- 2) определение нуклеотидных последовательностей ДНК;
- 3) разделение фрагментов ДНК.

4. Какой из методов секвенирования основан на химической деградации фрагмента ДНК, радиоактивно меченного с одного конца?

- 1) метод Сенгера;
- 2) метод Максама-Гилберта;
- 3) автоматическое секвенирование.

5. Скорость продвижения фрагментов ДНК в агарозном геле зависит :

- 1) от длины фрагмента ДНК;

- 2) от нуклеотидного состава фрагмента ДНК;
- 3) от внешних условий.

6. Рестрикционные карты – это:

- 1) расположение участков ДНК для различных видов;
- 2) светящиеся фракции ДНК;
- 3) фракции ДНК, гибридизировавшиеся с радиоактивно-меченным зондом.

7. Какой краситель используется для окрашивания фракций ДНК после электрофореза?

- 1) этидиумбромид;
- 2) метиленовый синий;
- 3) жидкость Реес-Эккера.

8. При какой температуре протекает стадия гибридизации в ПЦР?

- 1) 90°;
- 2) 60°;
- 3) 40°;

9. Какой ученый получил Нобелевскую премию за разработку ПЦР?

- 1) Л. Худ;
- 2) К. Мюллис;
- 3) Э. Чаргафф.

10. Назовите матричный процесс, лежащий в основе полимеразной цепной реакции:

- 1) транскрипция
- 2) трансляция;
- 3) репликация.

11. Праймеры – это:

- 1) короткие (10-30 н.п.) одноцепочечные фрагменты ДНК или РНК, комплементарные 3'-концевым последовательностям ДНК;
- 2) рестрикционные фрагменты;
- 3) фрагменты полипептидной цепи.

12. Стадия ПЦР, на которой при нагревании до 90° происходит разрушение водородных связей между нитями ДНК, называется:

- 1) полимеризация;
- 2) гибридизация;
- 3) денатурация;
- 4) ренатурация.

13. ПЦР используется для анализа:

- 1) ДНК;
- 2) белка;
- 3) аминокислот.

14. Фермент Таq-полимераза был выделен из:

- 1) термофильных бактерий;
- 2) мезофильных бактерий;
- 3) дрожжей.

15. За 20 циклов амплификации количество копий ДНК достигает величины:

- 1) 10^6 ;
- 2) 10^9 ;
- 3) 10^3 .