

Country: \_\_\_\_\_

Student Code: \_\_\_\_\_

## 23-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЛИМПИАДА

8 – 15 июля 2012

СИНГАПУР



**ПРАКТИЧЕСКИЙ ТЕСТ 1**

**КЛЕТочНАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ**

Общее число баллов: **100**

Продолжительность: **90 минут**

## Дорогие участники!

- В этом тесте вам предоставлено следующее задание:  
Задание: Картирование гена путём расщепления ДНК на фрагменты эндонуклеазами рестрикции (рестриктазами)  
Часть А. Подтверждение вставки ДНК человека в клонируемую плазмиду. (80 баллов)  
Часть В. Определение направления (ориентации) вставки. (20 баллов)
- Вносите все ответы на вопросы в **Лист Ответов**, который предоставлен отдельно.
- Ответы, внесенные в Текст Задания, оцениваться **НЕ БУДУТ**.
- Пишите ваши ответы разборчиво.
- Убедитесь, что вам предоставлены все необходимые материалы и оборудование для каждого задания. При отсутствии какого-либо предмета немедленно поднимите руку.
- Прекратите отвечать на вопросы и отложите ручку **НЕМЕДЛЕННО** после звонка.
- По окончании работы вложите Листы Ответов и Задания в предоставленный конверт. Наш ассистент заберет у вас конверт.

Желаем Вам удачи! 😊

---

Материалы и оборудование:

Материалы и оборудование	Количество	Единицы
эндонуклеаза рестрикции RE1 ( <i>NdeI</i> ) (во льду)	4 $\mu$ l	пробирка
эндонуклеаза рестрикции RE2 ( <i>EcoRI</i> ) (во льду)	4 $\mu$ l	пробирка
Образец ДНК в буфере (обозначенный T) (во льду)	10 $\mu$ l x 4	пробирка
Деионизованная вода (обозначена W)	1	пробирка
камера для электрофореза ДНК и источник тока	1	набор
микропипетки и наконечники в коробочках (p10, p100)	2	штука
секундомер	1	штука
ДНК-маркеры (для контроля размера, обозначенные L1 и L2 для области (диапазона) 100 пар оснований и области (диапазона) 1 тысячи пар оснований) (во льду)	2	пробирка
краситель для нанесения ДНК на гель (голубого цвета)	1	пробирка
готовый гель в камере, уже помещенный в буфер для электрофореза	1	штука
большая чашка Петри (для размещения геля для фотографирования)	1	штука
карточка с кодом вашей страны (в держателе): для вызова ассистента	1	штука
плавающий штатив (помеченный кодом вашей страны)	1	штука
микроцентрифуга	1	штука
водяная баня на 37 °C (одна из них предназначена для вашего использования)	1	набор
Система для фотографирования геля (одна из них предназначена для вашего использования)	1	набор

## Задание (100 баллов)

### Картирование гена путем расщепления фрагментов ДНК эндонуклеазами рестрикции

#### Введение

Рестрикционное картирование широко применяется при анализе последовательностей и сходства фрагментов ДНК. Этот метод основан на уникальном расположении в геле фрагментов ДНК, образующихся после расщепления ДНК специальной комбинацией эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз, RE), после проведения электрофореза. Этот метод особенно эффективен при клонировании генов, изучении их функции и регуляции, при поиске генов, ответственных за различные заболевания, и в судебно-медицинской экспертизе.

#### Часть А. Подтверждение вставки ДНК человека в клонируемую плазмиду. (80 баллов)

Используя этот метод, вам нужно подтвердить включение фрагмента "X" ДНК человека (приблизительный размер: 760 пар оснований) в клонируемую плазмиду или вектор "V" (кольцевая молекула: приблизительный размер: 2570 пар оснований). Вам необходимо спланировать эксперимент и провести расщепление ДНК путем инкубации ДНК "Т" с эндонуклеазами рестрикции, точно следуя детальному описанию проведения инкубации и электрофореза, которые представлены ниже. После проведения электрофореза ваш гель будет проявлен с помощью красителя для ДНК (окраску проведет ассистент), сфотографирован, и вы будете должны проанализировать и объяснить полученные вами результаты.

Ход работы

- 
1. Спланируйте эксперимент по расщеплению ДНК (максимально вы можете приготовить 4 образца (пробирки)) в общем объеме 20  $\mu$ л (микролитров), используя Таблицу 1 **в Листе**

**Ответов.**

**Q1.1 (20 баллов)** Запишите нужное количество реактивов в Таблице. В колонке 2 таблицы вам представлен образец. Все объемы записывайте в  $\mu$ л (микролитры).

2. Приготовьте смесь аккуратным внесением пипеткой нужного количества реактивов. Пометьте пробирки. Осторожно перемешайте смесь в каждой пробирке путем повторного набирания и выпуска раствора пипеткой. Используйте для каждого действия новый наконечник для пипетки, чтобы избежать загрязнения одного образца другим.

Примечание: для пипетирования объемов менее 10  $\mu$ л используйте микропипетку р10 (с наклейкой белого цвета).

3. Отцентрифугируйте все четыре пробирки в микроцентрифуге, предварительно сбалансировав ротор, размещая пробирки друг напротив друга. Во время приготовления смеси и после центрифугирования всегда держите пробирки во льду.

4. После приготовления проб выньте их из льда, поместите их в плавающий штатив и проинкубируйте их в предназначенной для вас водяной бане при 37 °C в течение 20 минут (секундомер предоставляется). Удостоверьтесь, что после 20 минут инкубации вы взяли свои образцы.

5. Пока идет инкубация в течение 20 минут, дайте ответы на следующие вопросы **в Листе**

**Ответов:**

**Q1.2 (2 балла  $\times$  5 = 10 баллов)** Укажите правильное(ые) утверждение(ия) знаком ( $\checkmark$ ), а неправильное(ые) утверждение(я) - знаком ( $\times$ ).

- Каждая RE разрезает ДНК в месте специфической последовательности.
- Каждая RE разрезает ДНК только с 3'- или 5'-концов.

- c. RE наиболее эффективна для расщепления ДНК при температуре 4°C.
- d. RE можно месяцами хранить при комнатной температуре.
- e. В отличие от экзонуклеаз, RE разрезает ДНК только внутри молекулы.

**Q1.3 (2 балла × 5 = 10 баллов)** Какие из следующих утверждений относительно принципа разделения ДНК путем гель-электрофореза являются верными?

Отметьте правильное(ые) утверждение(я) знаком (✓), а неправильное(ые) - знаком (✗).

- a. Фрагменты ДНК положительно заряжены по всей поверхности.
- b. Меньшие фрагменты ДНК передвигаются под действием тока в геле быстрее.
- c. Меньшие фрагменты ДНК менее заряжены, чем большие фрагменты, поэтому они передвигаются в геле быстрее.
- d. Относительная плотность геля определяет продолжительность разделения.
- e. Напряжение, при котором происходит электрофорез, определяется количеством нанесённой на гель ДНК.

6. По истечении 20 минут расщепления ДНК, выньте ваши пробирки из водяной бани.

7. Добавьте в каждую пробирку по 4 µл красителя для нанесения ДНК (голубого цвета).

Осторожно перемешайте смесь набиранием и выпусканьем смеси при помощи пипетки и проведите центрифугирование в микроцентрифуге.

8. Используя пипетку р100 (с наклейкой жёлтого цвета), нанесите 15 µл смеси

расщепленной ДНК в “лунки” предоставленного агарозного геля. Убедитесь, что вы аккуратно поместили наконечник пипетки в вершине лунки и внесли смесь в лунки, не повредив их. Нанесите по 15 µл каждого из маркеров, L1 и L2. Нанесите ваши пробы в соответствии со схемой дорожек, начиная с левого края геля.

Маркер L1	Пробирка 1	Пробирка 2	Пробирка 3	Пробирка 4	Маркер L2
-----------	------------	------------	------------	------------	-----------

9. Закройте камеру крышкой и подключите к источнику тока. Длительность электрофореза составляет 20 минут при напряжении 100 вольт. Будьте осторожны и не дотрагивайтесь ни до какой части прибора для электрофореза и источника тока.
10. Проверяйте регулярно, вошли ли ваши пробы в гель и передвигаются ли они к положительному электроду. Если вам необходима помощь ассистента, поместите вашу сигнальную карточку в верхней части правой стенки вашей кабины.
11. Во время электрофореза дайте ответ на следующие вопросы **в Листе Ответов:**

**Q1.4 (20 баллов)** Предположим следующую ситуацию: Линейная ДНК человека (размером 1 тысяча пар оснований, т.п.о.) была подвергнута расщеплению ферментом RE3, что привело к образованию 2 фрагментов размером 650 и 350 пар оснований. Этот же участок ДНК в 1 тысячу пар оснований был подвергнут расщеплению другим ферментом RE4, что привело к образованию 2 фрагментов размером 800 и 200 пар оснований. Если этот же участок ДНК длиной в 1 тысячу пар оснований был подвергнут расщеплению одновременно двумя ферментами RE3 и RE4, образовалось 3 фрагмента ДНК, размером 650, 200 и 150 пар оснований.

Нарисуйте на предоставленном для этого месте в листе ответов линейную карту этого участка ДНК, указав на ней место действия RE3 и RE4. Ниже в качестве примера приводится схема такого рисунка (размеры даны в т.п.о.).



12. Если 20 минут закончились и электрофорез прошел, выключите прибор и поднимите крышку камеры. Осторожно выньте гель (вместе с пластиковой подставкой!) и поместите его в предоставленную чашку Петри. Принесите ваш гель к прибору для геле-документации, который предназначен для использования вами. Ассистент сделает для вас фотографию.

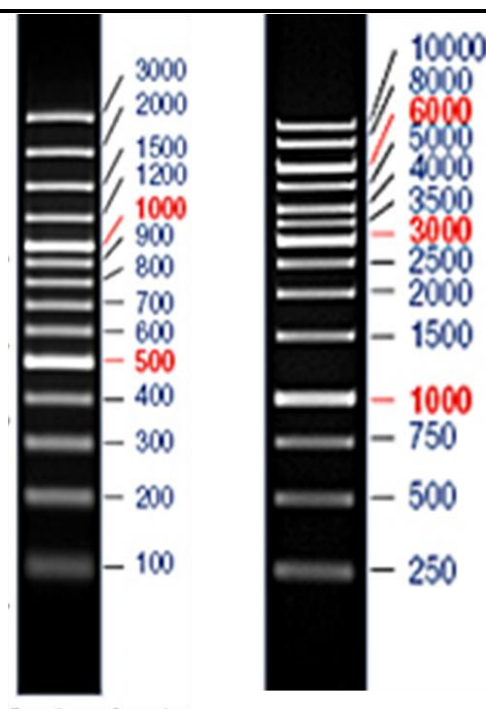
13. Принесите ваш гель и фотографию обратно на ваше рабочее место и поднимите вашу карточку для вызова ассистента, который прикрепит фотографию вашего геля на предусмотренное для этого место **в Листе Ответов**.

**Q1.5 (10 баллов)** Ваши навыки по проведению электрофореза будут оцениваться по качеству полученного геля.

14. Основываясь на результатах электрофореза, дайте ответ на следующие вопросы **в Листе Ответов**:

**Q1.6 (1 балл × 5 = 5 баллов)** Используя приведённые ниже маркеры размера ДНК (в парах оснований) в качестве эталона, определите размеры полученных вами фрагментов/полос. Для определения размера Вы можете провести линию через интересующую вас полосу и соответствующую дорожку геля с маркерами. Сколько фрагментов ДНК образовалось под действием RE1 и RE2? Каков(ы) его/их размер(ы)? Ответ представьте в виде числа(чисел).





L1: ДНК маркер для 100 пар оснований

L2: ДНК маркер для 1 тысячи пар оснований

**Q1.7 (1 балл)** Какой размер образца ДНК (Т)? Ответ предоставьте в виде числа.

**Q1.8 (1 балл)** Основываясь на ваших результатах, определите, является ли размер исследуемого образца ДНК (Т) больше или меньше или равен размеру пустого вектора? Отметьте ваш ответ знаком (✓) в соответствующей клетке.

**Q1.9 (1 балл)** Содержит ли исследуемый образец ДНК (Т) какую-либо вставку? Если да, отметьте это знаком (✓), а если нет - знаком (✗).

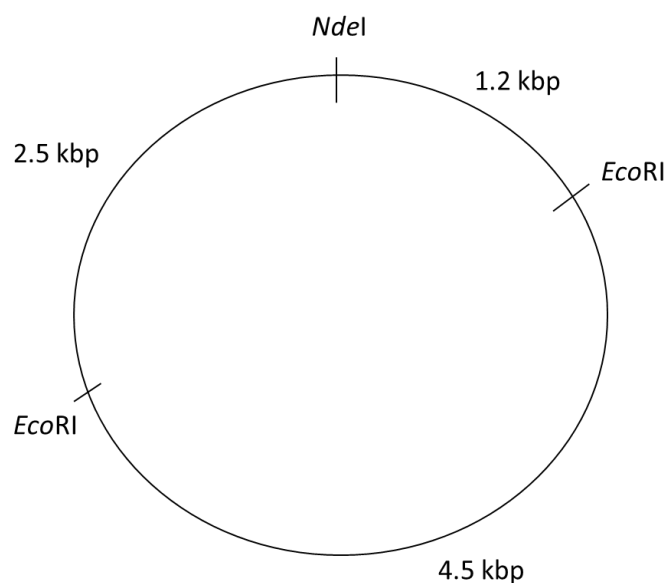
**Q1.10 (2 балла)** Оказалось, что нерасщеплённая ДНК движется быстрее, чем любой из образцов, расщепленных RE2. Почему? Отметьте правильный ответ знаком (✓) в соответствующей клетке.

- Меньший размер фрагмента нерасщеплённой ДНК вызван деградацией ДНК.
- Нерасщеплённая ДНК более компактно упакована и поэтому продвигается в геле быстрее.

с. RE2 остаётся связанной с ДНК и поэтому замедляет ее продвижение в геле.

Часть В. Определение направления вставки фрагмента. (20 баллов)

**Q1.11 (20 баллов)** Нарисуйте вероятную(ые) рестрикционную(ые) карту(карты) ДНК "Т", указав относительное расположение мест расщепления RE1 и RE2 и расстояние между ними в Листе Ответов. В качестве примера такая карта представлена ниже.



**КОНЕЦ ТЕСТА**