Viewing exam as superuser/admin

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА 2 - МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Макс. количество баллов 100

Продолжительность работы 90 мин

15 вопросов

Практическая работа состоит из трех частей.

Часть 1. Картирование плазмиды при помощи ферментов рестрикции (48 баллов)

Часть 2. Определение генотипа мутантов дрожжей при помощи ПЦР (37 баллов)

Часть 3. Ауксотрофность мутантов дрожжей по отношению к аминокислотам (15 баллов)

Советуем вам полностью прочитать все части работы перед началом их выполнения. Для полного выполнения заданий, вам необходимо будет выполнять все три части параллельно (рассмотрите рисунок ниже).

Рисунок 0.1: *Рекомендуемый график времени для выполнения трех частей*

Рисунок 0.1: *Рекомендуемый график времени для выполнения трех частей практической работы.*

1. Проверьте наличие материалов и оборудования

Задание 1

2. Подготовка реакции рестрикции

3. Инкубация реакции рестрикции

4. Приготовление агарозного геля

5. Подготовка образцов и нанесение на гель

6. Гель-электрофорез*

7. Фотографирование геля и ответы на вопросы

Задание 2

8. Приготовление реакции ПЦР

9. Проведение ПЦР (в амплификаторе)

10. Подготовка образцов и нанесение на гель

11. Гель-электрофорез*

12. Фотографирование геля и ответы на вопросы

Задание 3

13. Наблюдение и выводы + ответы на вопросы

**Используйте тот же гель, но разные лунки для разных образцов*

ВВЕДЕНИЕ

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Для выполнения работы вам понадобятся материалы A-V, перечисленные ниже. Пожалуйста убедитесь, что вам предоставлены все необходимые материалы. **При отсутствии какого-либо из них, немедленно поднимите вашу розовую карточку, но не позднее чем в течение 15 минут после начала работы, и ассистенты помогут вам.**

Пожалуйста учтите, что

1. Все растворы предоставлены в двукратном избытке от необходимого количества для проведения работы. Дополнительные материалы (включая пробирки и агарозные гели) не будут предоставлены в том случае, если вы их разлили или допустили ошибки при постановке эксперимента.

2. Используйте способ сбора жидкостей со дна пробирки, показанный вам в понедельник.

3. Имейте в виду, что одной из целей задания является оценка ваших навыков экспериментальной работы.

4. Пробирки, обозначенные голубой линией на этикетке, должны постоянно **находиться на льду**.

5. Все растворы заморожены, поэтому вам необходимо будет **оттаять и перемешать** их перед использованием.

Обозначение материала	**Количество**	Материал	**Испо в Час**
A	1	микропипетка на 1-10 мкл	1, 2
B	1	микропипетка на 20-200 мкл	1, 2
C	1	коробочка для наконечников на 1-10 мкл	1, 2
D	1	коробочка для наконечников на 20-200 мкл	1, 2
E	1	штатив для PLP-пробирок	1, 2

E	1	штатив для ПЦР пробирок	1, 2
F	1	штатив для пробирок объемом 1,5 мл	1, 2
G	5	пробирки объемом 1,5 мл (в конверте)	2
H	2	полоска пробирок обьемом на 0,2 мл для ПЦР (в конверте). Пробирки должны оставаться соединены (не разъединяйте их).	1, 2
I	1	Белый пакет с агарозным гелем с 12 лунками (Не открывайте пакет, пока вы не будете готовы к нанесению проб на гель)	1, 2
J	1	OneRun система для электрофореза с форезным буфером	1, 2
K	1	Маркерная ручка	1, 2
L	1	секундомер/таймер	1, 2
M	1	салфетки	1, 2
N	1	набор резиновых перчаток (выдаются в комнате ожидания)	1, 2
O	2	Закрывающиеся пакеты (в конверте)	1
P	1	Фотографии, показывающие рост дрожжей на восьми различных средах	3
Q	1	Схема биосинтеза различных аминокислот (на стене вашего	3

Q	1	аминокислот (на отсеке вашего рабочего места)	3
R	1	Маркер молекулярного веса ДНК 1 Кб (Кб - тысяча пар оснований).	1, 2
S	1	Розовая карточка для вызова ассистента	1, 2, 3
T	2	Маленькие этикетки с идентификационным номером (ID)	1, 2
U	1	Большие этикетки с идентификационным номером (ID)	1
V	1	Вода, 540 мкл	1, 2

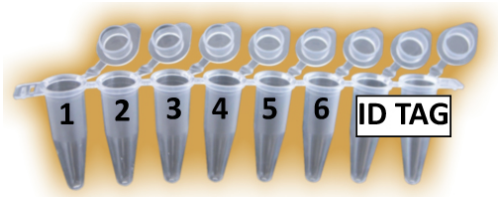


Рисунок 0.2: *Материал H: Пробирки и этикетка с индивидуальным номером, на которой находятся код страны и личный номер участника*

Ведерко со льдом, в котором находятся пробирки объемом 1,5 мл, содержащие некоторые растворы.

Номер раствора (жидкости)	**Количество**	**Обозначение**	Объем (мкл)	**Содержимо**
1	1	dNTPs	60	смесь дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ

2	1	DNApol buffer	140	Буфер для ДН полимеразы I
3	1	Loading buffer	100	Загрузочный буфер для агарозного ге электрофоре
4	1	Prime A	30	Пара праймер A
5	1	Prime B	30	Пара праймер B
6	1	Prime C	30	Пара праймер C
7	1	Prime D	30	Пара праймер D
8	1	Prime E	30	Пара праймер E
9	1	DNApol	14	ДНК полимер
10	1	1Kb ladder	12	Маркеры молекулярно веса ДНК для гель-электрофоре
11	1	Buffer 1	8	Буфер 1 (10X
12	1	Buffer 2	8	Буфер 2 (10X
13	1	Buffer 3	8	Буфер 3 (10X
14	1	Template DNA WT	6	Матрица ДНК дикого типа
15	1	Template mutant	6	Матрица ДНК мутанта

		mutant		мутанта
16	1	Plasmid tube 1	6	Пробирка с плазмидой 1
17	1	Plasmid tube 2	6	Пробирка с плазмидой 2
18	1	ApaI	6	Фермент рестрикции ApaI
19	1	EcoRI	6	Фермент рестрикции EcoRI
20	1	SmaI	6	Фермент рестрикции SmaI

1. КАРТИРОВАНИЕ ПЛАЗМИДЫ ПРИ ПОМОЩИ ФЕРМЕНТОВ РЕСТРИКЦИИ (48 БАЛЛОВ)

Был поставлен эксперимент для определения внутриклеточной локализации белка Alb у *Saccharomyces cerevisiae* (пекарские дрожжи). Для слияния последовательности гена белка alb (999 bp) с двумя разными последовательностями, кодирующими два разных флуоресцирующих белка, ген alb был вставлен в две разные плазмиды (pX и pZ). В результате были получены плазмиды pX:alb и pZ:alb. Клетки *E.coli* были трансформированы соответствующими плазмидами.

Клетки *E. coli* были трансформированы двумя различными смесями с продуктами реакции лигирования. Плазмиды, выделенные из клеток полученных двух штаммов *E.coli*, находятся в пробирках 1 и 2 . Вам необходимо определить, какие из возможных четырех плазмид (pX, pX:alb, pZ or pZ:alb) находятся в каждой из двух пробирок (по одной в каждой пробирке).

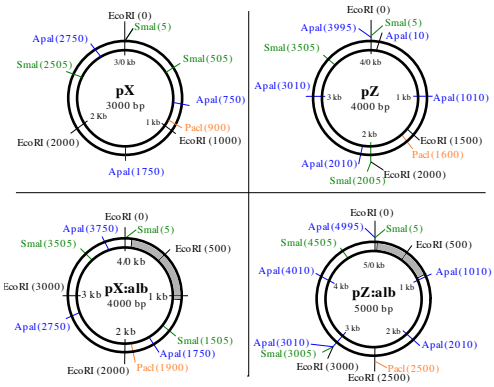


Рисунок 1.1. *Рестрикционная карта ДНК плазмиды для 'pX', 'pZ', 'pX:alb' и 'pZ:alb'*

Q. 1 Размер фрагментов ДНК (2 балла)

Отметьте ниже наличие фрагментов ДНК, ожидаемых при полной рестрикции четырех плазмид при помощи **PacI**

✓ = присутствует

— = отсутствует

	PX	PX:ALB	PZ	PZ:ALB
0.5 тыс. пар оснований	☐	☐	☐	☐
1.0 тыс. пар оснований	☐	☐	☐	☐
1.5 тыс. пар оснований	☐	☐	☐	☐
2.0 тыс. пар оснований	☐	☐	☐	☐
2.5 тыс. пар оснований	☐	☐	☐	☐

3.0 тыс. пар оснований	☐	☐	☐	☐
3.5 тыс. пар оснований	☐	☐	☐	☐
4.0 тыс. пар оснований	☐	☐	☐	☐
4.5 тыс. пар оснований	☐	☐	☐	☐
5.0 тыс. пар оснований	☐	☐	☐	☐

Различным ферментам рестрикции требуются различные условия реакции (Табл. 1.1)

Таблица 1.1. *Ферменты рестрикции и оптимальные условия их активности.*

Фермент	% активности в буфере 1	% активности в буфере 2	% активности в буфере 3	оптимальная темг °C
ApaI	25	50	100	25
EcoRI	10	100	10	37
PacI	100	75	10	37
SmaI	0	0	100	25

РЕСТРИКЦИЯ ДВУХ ПЛАЗМИД

ВЫБОР ФЕРМЕНТА РЕСТРИКЦИИ (4 БАЛЛА)

Q. 2

Задание:

Задание.
У вас имеются три фермента рестрикции, **ApaI**, **EcoRI**, и **SmaI**. Укажите какой из этих трех ферментов позволит вам отличить друг от друга четыре плазмиды. Учтите пожалуйста, что фрагменты ДНК размером короче **100** пар оснований дают очень слабые полосы и их размер не может быть определен точно.

1. APAL
2. ECORI
3. SMAL

Q. 3 РАСТВОРЫ ДЛЯ РЕСТРИКЦИИ (4 БАЛЛА)

Рестрикция двух плазмид

Ход работы

1. Подпишите полоску пробирок для ПЦР объемом **0,2** мл **S1**, **S2**, **S3** и **S4** (первые четыре пробирки соответственно).
2. Спланируйте свой эксперимент для идентификации двух плазмид, используя один из ферментов для всех реакций рестрикции. Включите в качестве контроля неразрезанную ДНК плазмиды. Конечный (общий) обьем для каждой реакции должен составить **10** мкл. Типичная реакционная смесь для фермента рестрикции состоит из следующих компонентов: **2** мкл плазмидной ДНК, **1** мкл фермента, **1** мкл буфера и вода до объема **10** мкл.

Укажите с точностью до десятых, какие компоненты вы внесете в каждую из четырех пробирок (все объемы даны в микролитрах). Если вы не собираетесь ничего добавлять в пробирку, поставьте '**0**'.

	S1(мкл)	S2 (мкл) (Контроль)	S3 (мкл)	S4 (мкл) (Контроль)
Пробирка с плазмидой1				
Пробирка с плазмидой				

2				
ApaI				
EcoRI				
SmaI				
Буфер 1 (10X)				
Буфер 2 (10X)				
Буфер 3 (10X)				
Вода				
Общий объем				

Q. 4 УСЛОВИЯ РЕАКЦИИ РЕСТРИКЦИИ (2 БАЛЛА)

Продолжение хода работы

3. Смешайте необходимые компоненты для реакции рестрикции как вы рассчитали в вопросе **2**.
4. Установите на пипетке обьем **5** мкл и перемешайте в каждой пробирке ее содержимое путем набора и выпускания жидкости **5-10** раз. Постарайтесь избежать образования пузырьков воздуха, держа постоянно наконечник пипетки ниже уровня жидкости.
5. Поместите полоску пробирок объемом **0,2** мл в пакет с замком. Закройте его и наклейте снаружи этикетку с вашим идентификационным номером.

Укажите ниже, какие условия вы используете для рестрикции.

1. 25°C

2. 37°C

Продолжение работы

6. Поднимите вашу розовую карточку и наблюдатель поместит ваши образцы в выбранный вами инкубатор.

Для полного расщепления плазмидной ДНК необходима инкубация в течение 15 минут.

7. Через 20 минут поднимите вашу розовую карточку и попросите наблюдателя принести вам ваши образцы. Учтите, что ваши образцы **НЕ БУДУТ доставлены вам, пока вы не попросите их**.

8. Проверьте, получили ли вы ваши образцы.

9. Добавьте к каждому образцу 3 мкл загрузочного буфера.

10. Смешайте содержимое пробирок путем набирания и выпускания жидкости 10 раз (старайтесь избежать образования пузырьков).

Следуйте методике для агарозного гель-электрофореза и проанализируйте результаты рестрикции при помощи электрофореза.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

ВНИМАНИЕ: ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ! ***НЕ перемещайте*** *RunOne-прибор для электрофореза после его включения!* ***НЕ ВСТАВЛЯЙТЕ*** *что-либо в отверстие в крышке прибора после старта электрофореза!*

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫЕ ВЕЩЕСТВА. ВСЕГДА пользуйтесь защитными перчатками при работе с агарозным гелем, так как он обработан красителем ДНК

ПРОВЕДЕНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Ваши образцы из частей 1 и/или 2 должны быть подвергнуты анализу путем электрофореза в агарозном геле.
a. Нанесите пробы из Части 1 и проведите электрофорез в течение 15-20 минут.
b. Выключите прибор
c. Нанесите образцы из Части 2
d. Заново включите прибор вместе со всеми образцами для дополнительных 15-20 минут электрофореза.

Ход работы

1. Оденьте резиновые перчатки.

2. Откройте крышку RunOne-прибора для электрофореза подняв ее вверх.

3. Достаньте гель из белого пакета. Снимите прозрачную крышку и осторожно достаньте гель из прозрачной упаковки. Обращайтесь с гелем очень осторожно, так как он легко повреждается. Сохраните белый пакет, так как он понадобится вам позднее.

4. Проверьте, нет ли на геле видимых повреждений, таких как трещины, отсутвие лунок или наличие пузырьков внутри геля. При обнаружении таких недостатков сообщите о них немедленно наблюдателю поднятием вашей розовой карточки.

5. Поместите гель в камеру для электрофореза как показано на Рисунке 1.2

Рисунок 1.2: *Камера RunOne для электрофореза (слева) и возможные положения (ориентации) агарозного геля*

ПРОВЕДЕНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА- ПРОДОЛЖЕНИЕ

7. Поместите гель в форезный буфер, чтобы он полностью покрыл его. **Если этого НЕ произошло**, поднимите вашу розовую карточку и наблюдатель окажет вам помощь.

8. Нанесите образцы на агарозный гель, как описано в Таблице 1.2 (образцы из части 1) и Таблице 1.3 (образцы из части 2). Нанесите 3 мкл маркера молекулярного веса ДНК, 13 мкл образцов из Части 1 и 15 мкл образцов из Части 2.

Таблица 1.2. *Лунки 1-5 для Части 1*

Лунка	1	2	3	4	5
Образец	Маркер ДНК	S1	S2(контроль)	S3	S4(контроль)
Объем (мкл)	3	13	13	13	13

Таблица 1.3. Лунки 6-12 для Части 2

Лунка	6	7	8	9	10	11	1
Образец	Маркер ДНК	ПЦР-1	ПЦР-2	ПЦР-3	ПЦР-4	ПЦР-5	П
Объем (мкл)	3	15	15	15	15	15	1

ПРОВЕДЕНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА - продолжение

9. Закройте крышку RunOne-прибора.

10. При помощи регулятора “Voltage select” установите напряжение в 100 V.

11. Нажмите клавишу включения “Run/Stop” . Продолжительность электрофореза составляет 15 - 20 минут.

Вы не сможете наблюдать за передвижением полос ДНК в геле в реальном времени, но голубой индикаторный краситель, присутствующий в буфере, двигается с такой же скоростью, как и фрагмент ДНК длиной в 300 bp.

12. Через 20 минут отключите прибор нажатием клавиши “Run/Stop”.

13. Поднимите вашу розовую карточку и наблюдатель предоставит вам оборудование, необходимое для визуализации ДНК в агарозном геле и документации геля.

Для документации сфотографируйте полосы ДНК на геле при помощи планшета и оборудования, представленного вам наблюдателями МБО. Ассистент также поможет вам оптимально настроить планшет и сфотографировать гель.

14. Наденьте перчатки

15. Поместите агарозный гель вместе с подложкой на столик с подсветкой.

16. Накройте столик с гелем черным колпаком (black photo hood).

17. Поместите планшет на верху фотокамеры таким образом, чтобы линза (объектив) смотрела в камеру.

18. Сфотографируйте ваш гель.

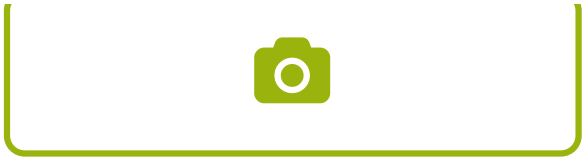
Q. 5 СФОТОГРАФИРУЙТЕ ПОЛОСЫ ДНК НА ГЕЛЕ

Сделайте три удачных снимка геля с ДНК. Эти снимки будут использоваться для оценки успешности проведенных ПЦР-реакции, реакции рестрикции, нанесения маркера молекулярного веса ДНК, а также правильности анализа.

Загрузите первый снимок вашего геля.

Загрузите второй снимок вашего геля.

Загрузите третий снимок вашего геля.



20. После окончания документации геля, пожалуйста переместите его в белый пакет в котором он был предоставлен.

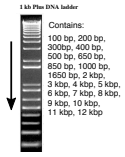
Q. 6 РЕСТРИКЦИЯ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК

Укажите здесь для каждого образца, разрезана ли плазмидная ДНК добавленным ферментом рестрикции или нет.

	РАЗРЕЗАНА	**НЕ** РАЗРЕЗАНА
S1	○	○
S2	○	○
S3	○	○
S4	○	○

Сейчас вам будет предоставлен рисунок геля, на котором представлены результаты, полученные для выбранного вами фермента рестрикции (Вопрос 3). Используя этот рисунок, ответьте на Вопрос 7 и Вопрос 8. **ПРИМЕЧАНИЕ: ВЫ ПОЛУЧИТЕ ДОСТУП К ЭТОМУ РИСУНКУ ТОЛЬКО ПОСЛЕ ДОКУМЕНТАЦИИ ВАШЕГО ГЕЛЯ.**

Используйте предоставленные размеры фрагментов ДНК маркера молекулярного веса.



Q. 7 РАЗМЕР/РАЗМЕРЫ ФРАГМЕНТА/ФРАГМЕНТОВ ДНК, ПОЛУЧЕННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ РЕСТРИКЦИИ ВЫБРАННЫМ ВАМИ ФЕРМЕНТОМ.

Укажите, присутствовал ли фрагмент ДНК данного размера в вашей реакции рестрикции.

✓ = присутствует	— = отсутствует

	ФРАГМЕНТЫ ДНК, ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ РЕСТРИКЦИИ ДНК В ”ПРОБИРКЕ С ПЛАЗМИДОЙ 1”	ФРАГМЕНТЫ ДНК, ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ РЕСТРИКЦИИ ДНК В ”ПРОБИРКЕ С ПЛАЗМИДОЙ 2”
0,5 kb (тыс. пар осн.)	☐	☐

1,0 kb (тыс. пар осн.)	☐	☐
1,5 kb (тыс. пар осн.)	☐	☐
2,0 kb (тыс. пар осн.)	☐	☐
2,5 kb (тыс. пар осн.)	☐	☐
3,0 kb (тыс. пар осн.)	☐	☐
3,5 kb (тыс. пар осн.)	☐	☐
4,0 kb (тыс. пар осн.)	☐	☐
4,5 kb (тыс. пар осн.)	☐	☐
5,0 kb (тыс. пар осн.)	☐	☐
5,5 kb (тыс. пар осн.)	☐	☐
6,0 kb (тыс. пар осн.)	☐	☐

Q. 8 ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПЛАЗМИД В ПРОБИРКАХ

Укажите здесь, какие плазмиды содержатся в двух пробирках, а какие отсутствуют. Поставьте знак '**+**' в последней колонке, если невозможно определить присутствие плазмиды в пробирке.

= Плазмида присутствует

= Плазмида отсутствует

	ПЛАЗМИДА PX	ПЛАЗМИДА PX:ALB	ПЛАЗМИДА PZ	ПЛАЗМИДА PZ:ALB
Пробирка с плазмидой 1	☐	☐	☐	☐
Пробирка с плазмидой 2	☐	☐	☐	☐

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПА МУТАНТОВ ДРОЖЖЕЙ ПРИ ПОМОЩИ ПЦР (37 БАЛЛОВ)

Вы выделили мутант дрожжей, которому для роста требуется присутствие тирозина и фенилаланина в питательной среде. Способность мутанта расти на среде без триптофана не исследовалась. Обратное скрещивание мутанта показало, что затронут один единственный ген.

Вам необходимо определить генетическую основу наблюдаемой

ауксотрофности. Вам предосталены пять пар праймеров (Таблица 2.1), каждая из которых позволяет определить мутантную аллель одного из генов, кодирующих пять ключевых ферментов пути биосинтеза ароматических аминокислот (Рис. 2.1).

Таблица 2.1. *Имеющиеся пары праймеров, гены, которые они амплифицируют, и ожидаемый размер ДНК продукта в случае аллели дикого типа и мутантной аллели*

Пара		Размер продукта	Размер продукта ПЦР

Пара праймеров	Ген	ПЦР (пар.осн.) - дикий тип	(пар.осн.) -мутантный алелль
A-прямой + A-обратный	*TYR1*	500	400
B-прямой + B-обратный	*PHA2*	500	250
C-прямой + C-обратный	*ARO7*	500	300
D-прямой + D-обратный	*TRP5*	500	350
E-прямой + E-обратный	*ARO2*	500	300

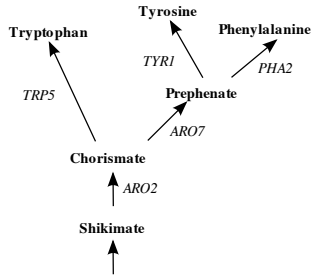


Рис. 2.1. *Схема биосинтеза ароматических аминокислот (начиная сверху слева : триптофан, тирозин, фенилаланин, префенат, хоризмат и шикимат) и гены, кодирующие отдельные ферменты этого биосинтетического пути.*

Q. 9 ВЫБОР ПАР ПРАЙМЕРОВ (5 БАЛЛОВ)

Основываясь на результатах, полученных от применения двух из пяти предоставленных пар праймеров (Табл. 2.1.) вы сможете определить

генетическую основу пищевых потребностей, наблюдаемых у мутантов дрожжей.

Укажите комбинацию двух пар праймеров (**A**, **B**, **C**, **D** или **E** из Таблицы **2.1**), которые следует использовать.

	A	B	C	D	E
Первая пара праймеров	○	○	○	○	○
Вторая пара праймеров	○	○	○	○	○

Ход работы

1. Приготовьте Master-mix (смесь для ПЦР) для реакций ПЦР в пробирке на 1,5 мл смешав: 196 мкл воды + 70 мкл буфера для ДНК полимеразы (x5) + 35 мкл дНТФ-ов + 7 мкл ДНК полимеразы.

2. Смешайте содержимое пробирки путем набора и выпуска жидкости 5-10 раз пипеткой, установленной на 100 мкл.

3. Найдите полоску пробирок для ПЦР на 0,2 мл и приклейте маленькую этикетку с вашим идентификационным номером.

4. Подпишите пробирки 1 - 6 (**НЕ отрывайте** отдельные пробирки от полоски – если вы это сделаете, ваши пробирки не будут приняты для ПЦР).

5. Внесите пипеткой по 44 мкл смеси Master-mix в каждую из шести пробирок для ПЦР.

6. Добавьте в пробирки 1 - 3 по 5 мкл первой выбранной вами пары праймеров.

7. Добавьте к пробиркам 4 - 6 по 5 мкл выбранной вами второй пары праймеров.

8. Добавьте к пробиркам 1 и 4 по 1 мкл ДНК-матрицы дикого типа.

9. Добавьте к пробиркам 2 и 5, по 1 мкл ДНК-матрицы мутанта.

10. Добавьте к пробиркам 3 и 6 по 1 мкл воды.

11. Смешайте компоненты для каждой реакции отдельно путем набора и выпускания жидкости 5-10 раз пипеткой, установленной на 45 мкл.

12. Закройте крышки.

Таблица 2.2. Три программы ПЦР (1-3), хранимые при 10°C.

Программа 1	Программа 2	Программа 3
98°C на 1 мин.	98°C на 1 мин.	98°C на 1 мин.
25 раз: 98°C на 15 сек. 55°C на 5 сек. 72°C на 20 сек.	25 раз: 72°C на 20 сек. 55°C на 5 сек. 98°C на 15 сек.	25 раз: 72°C на 10 сек. 98°C на 15 сек. 55°C на 5 сек.
72°C на 1 мин.	72°C на 1 мин.	72°C на 1 мин.
Сохранить при 10°C	Сохранить при 10°C	Сохранить при 10°C

Q. 10 ВЫБОР ПРОГРАММЫ ПЦР (2 БАЛЛА)

Укажите ниже путем выбора правильного варианта, какая из трех программ ПЦР **(**Таблица **2.2)** должна быть использована для успешной амплификации, если температура плавления праймеров **(Tm)** равна **60 °C** и используемая ДНК**-**полимераза способна синтезировать ДНК со скоростью **25 bp/**сек при **72 °C?**

1. ПРОГРАММА ПЦР 1
2. ПРОГРАММА ПЦР 2
3. ПРОГРАММА ПЦР 3

ВАЖНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

1. Убедитесь, что ответы на вопросы 9 и 10 даны так, как вы намеревались. Если вы довольны вашими ответами, утвердите их, нажав ”LOCK ANSWERS”.

Примечание: нажав ”LOCK ANSWERS”, вы не сможете больше внести изменения.

2. Когда ваши вопросы будут утверждены, поднимите вашу розовую карточку и наблюдатель поместит ваши образцы в амплификатор. Длительность программы ПЦР составляет 20 минут. (В это время выполняйте Части 1 или 3 соответственно таблице во введении).

3. Через 20 минут поднимите вашу карточку и вам возвратят ваши образцы. Не забудьте, что ваши образцы НЕ отдадут вам, пока вы не обратитесь за ними.

4. При возврате образцов, убедитесь, что вы получили **ваши** образцы.

5. После ПЦР подготовьте ваши образцы для агарозного гель-электрофореза, добавляя по 10 мкл форезного буфера к каждому образцу и хорошо перемешивая содержимое путем набирания и выпусканияпипеткой смеси 5 раз (избегайте образования пузырьков).

6. Нанесите образцы как описано в разделе ”Электрофорез в агарозном геле”.

7. Для документации сфотографируйте гель (Эта фотография будет оценена и за нее вы сможете получить максимально 22 балла).

Сейчас вам будет предоставлен рисунок геля, полученный для пары праймеров, выбранной вами ранее для ПЦР-анализа. Используйте этот рисунок для ответов на Вопросы 11 и 12. **ПРИМЕЧАНИЕ: ВЫ ПОЛУЧИТЕ ЭТОТ РИСУНОК ОТ АССИСТЕНТА, ВЕРНУВШЕГО ВАШ ГЕЛЬ.**

Q. 11 РАЗМЕР ФРАГМЕНТОВ ДНК (4 БАЛЛА)

Укажите наличие ДНК-продукта данного размера (пар осн.), знаком ’+’. Предоставьте ответы столбец за столбцом.

= присутствует

	ПЦР-1	ПЦР-2	ПЦР-3	ПЦР-4	ПЦР-5	ПЦР-6
150 bp (пар осн.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
200 bp (пар осн.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
250 bp (пар осн.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
300 bp (пар осн.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
350 bp (пар осн.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
400 bp (пар осн.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
450 bp (пар осн.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
500 bp (пар осн.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐
550 bp (пар осн.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐

Q. 12 НАРУШЕННЫЕ ЭТАПЫ БИОСИНТЕЗА (4 БАЛЛА)

На основании ваших результатов укажите для каждого из пяти возможных ферментативных этапов, показанных на Рис. **2.1**, функционируют ли они или нет, или их состояние невозможно определить с использованием данных праймеров.

ФУНКЦИОНИРУЕТ	НЕ	НЕВОЗМОЖНО

	ФУНКЦИОНИРУЕТ	ФУНКЦИОНИРУЕТ	ОПРЕДЕЛИТЬ
TRP5	○	○	○
TYR1	○	○	○
PHA2	○	○	○
ARO7	○	○	○
ARO2	○	○	○

3. АУКСОТРОФНОСТЬ МУТАНТОВ ДРОЖЖЕЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К АМИНОКИСЛОТАМ (15 БАЛЛОВ)

Гаплоидный гриб *Saccharomyces cerevisiae* (пекарские дрожжи) используется в течение многих лет в качестве модели для изучения основного метаболизма у эукариот. В норме дрожжи могут синтезировать все двадцать аминокислот, необходимых для синтеза белка. Под воздействием УФ-мутагенеза были получены ауксотрофные мутанты по различным аминокислотам. На рисунках показан рост штаммов *S. cerevisiae* (1–5) на восьми различных средах (A - H). Положение 1 = нет клеток (контроль); положение 2 = Штамм 1; положение 3 = Штамм 2; положение 4 = Штамм 3; положение 5 = Штамм 4; положение 6 = Штамм 5. Состав среды для чашек A - H прпедоставлен в Таблице 3.1.

НЕ ДЕЛАЙТЕ НИКАКИХ ПОМЕТОК НА ФОТОГРАФИЯХ

Таблица 3.1. Питательные среды

Среда	Состав
A	Богатая сложная среда (дрожжевой экстракт + пептон+

A	декстроза)
B	Минимальная среда без добавления аминокислот
C	Минимальная среда + гомоцистеин
D	Минимальная среда + изолейцин
E	Минимальная среда + треонин
F	Минимальная среда + метионин + треонин
G	Минимальная среда + лизин
H	Минимальная среда + пролин

Q. 13 НАЛИЧИЕ/ОТСУТСТВИЕ РОСТА У ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ (10 БАЛЛОВ)

Укажите ниже наличие или отсутствие роста, используя знак "**+**"для обозначения роста, а знак "**–**" для отсутствия роста.

	ШТАММ 1	ШТАММ 2	ШТАММ 3	ШТАММ 4	ШТАММ 5
Среда A	☐	☐	☐	☐	☐
Среда B	☐	☐	☐	☐	☐
Среда C	☐	☐	☐	☐	☐
Среда D	☐	☐	☐	☐	☐

Среда E	☐	☐	☐	☐	☐
Среда F	☐	☐	☐	☐	☐
Среда G	☐	☐	☐	☐	☐
Среда H	☐	☐	☐	☐	☐

Q. 14 НАРУШЕННЫЙ/ЫЕ ЭТАП/Ы БИОСИНТЕЗА (5 БАЛЛОВ)

Основываясь на наблюдаемом характере роста, предположите, какой/какие ферментативные этап/этапы наиболее вероятно затронуты у пяти штаммов **(1–5)**. Впишите для каждого мутанта номер **(1–31)**, указывающий на нарушенную ферментативную реакцию, или "**0**", если никакой этап не нарушен. **(**Рассмотрите схему биосинтеза на стенке вашего рабочего места**)**.

	Штамм 1	Штамм 2	Штамм 3	Штамм 4	Ш
НОМЕР энзиматической реакции на схеме					

Рисунок 3.1. *Упрощенная модель биосинтеза аминокислот в дрожжах.*

КОНЕЦ