

СТРАНА: _____

УЧАСТНИК: _____



16-я Международная Биологическая Олимпиада

**Пекин
июль 2005**

Практический тест

Часть I

Общее предоставляемое время: 90 минут

16-я МБО - Практический тест

Фамилия:

Имя:

Страна:

Код:

Важно:

1. Впишите свое имя и код как на задании, так и на листах для ответов.
2. Удостоверьтесь, что все результаты записаны на листе для ответов.
3. Практический тест состоит из 4 частей. На каждую часть предоставляется 90 минут. Вы должны начать выполнение **первого** задания в соответствии с последней цифрой вашего кода участника. Например, если ваш код 221, то вашим первым заданием будет Часть I, если же ваш код 223 – то вашим первым практическим заданием будет Часть III.
4. Ваш **второй** практический тест вы определите следующим образом: участники, выполнявшие Части I или Часть II, обмениваются лабораториями. Участники, выполнявшие Часть III или Часть IV также обмениваются лабораториями.
5. Ваш **третий** практический тест определяется по следующему правилу:
если последняя цифра вашего кода участника 1, то вы переходите к Части III;
если последняя цифра вашего кода участника 2, то вы переходите к Части IV.
если последняя цифра вашего кода участника 3, то вы переходите к Части I.
если последняя цифра вашего кода участника 4, то вы переходите к Части II.

При смене лаборатории, следуйте инструкциям сопровождающего гида.

Практический тест. Часть I.

Биохимия и молекулярная биология

**Очень важное замечание: вы должны начать с задания 1
и во время прохождения гель-электрофореза из задания 1
выполнить задание 2!**

Задание 1: Разделение рестриционных фрагментов плазмидной ДНК путем
гель-электрофореза в агарозе

Приборы: Центрифуга, прибор для проведения гель-электрофореза в агарозе и
прибор для флуоресцентного фотографирования.

Важно:

Поднимите синюю карточку, имеющуюся на столе, чтобы попросить
о помощи при использовании источника тока для гель-электрофореза
и прибора для фотографирования.

Введение

Плазмиды это кольцевые двуцепочечные молекулы ДНК, которые могут
существовать в бактериальных клетках и реплицироваться независимо.
Рестриционные ферменты могут разрезать плазмидную ДНК на
фрагменты. В этом эксперименте вам предоставляются плазида и три
рестриционных фермента *Bam*HI, *Pst*I и *Hind*III. Вы будете использовать

три рестрикционных фермента для расщепления плазмидной ДНК и проведете гель-электрофорез в агарозе. Вам необходимо будет определить положение рестрикционных фрагментов и рассчитать их размер в соответствии с расстоянием пробега фрагмента ДНК, которое обратно пропорционально логарифму длины фрагмента.

Реактивы

1. 1xбуфер Трис-ацетат-ЭДТА (ТАЕ-буфер)
2. Краситель для ДНК - GeneFinder™, содержащий антоцианин и сахарозу
3. *Bam*HI
4. *Pst*I
5. *Hind*III
6. Плазмидная ДНК
7. Стандарты размеров ДНК
8. Дистиллированная вода

Оборудование

1. Лабораторные перчатки
2. Маркерный карандаш
3. Центрифужные пробирки объемом 0,5 мл
4. Штатив для центрифужных пробирок
5. Пипетки
6. Центрифуга

7. Термостат
8. Аппарат для проведения гель-электрофореза в агарозе
9. Прибор для флуоресцентного фотографирования (использовать при помощи лабораторного ассистента)

Использование оборудования

1. Пипетка:



Для эксперимента предоставляется пипетка объемом 0-10 μ l. Объем устанавливается путем вращения установочного кольца. Обозначение объема должно быть прочитано сверху вниз. После присоединения подходящего наконечника нажмите контрольную кнопку до первой остановки и поместите наконечник в жидкость. Медленно отпустите кнопку до достижения ею полной остановки для набора образца. Затем поместите наконечник с жидкостью в необходимое место и медленно нажмите кнопку до второй остановки, пока вся жидкость полностью не выйдет из наконечника. Сбросьте использованный наконечник в отходы нажатием кнопки сбрасывания.

2. Центрифуга

Нажмите рычаг остановки для открытия крышки. Поместите пробирки в ротор. Удостоверьтесь, что центрифуга загружена сбалансировано. Закройте и мягко

нажмите крышку, пока защелка крышки не войдет в нужное положение. Ротор начнет двигаться, как только крышка будет полностью закрыта. Центрифугирование продолжается 20 секунд, после чего нажмите рычаг остановки, откройте крышку и после полной остановки ротора выньте пробирки.

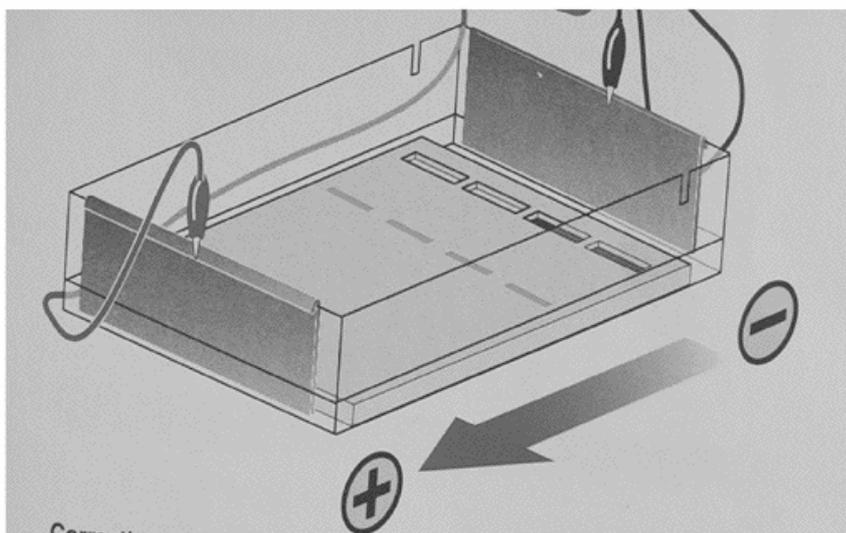
3. Расщепление рестрикционными ферментами

Рестрикционные ферменты типа II узнают определенные последовательности и расщепляют ДНК в месте узнавания. Плазмидная ДНК, предоставленная вам, должна быть расщеплена тремя различными ферментами: *Bam*HI, *Pst*I и *Hind*III. Добавьте соответствующее количество фермента(ов) в пробирки с плазмидной ДНК и закройте крышку. Хорошо смешайте путем осторожного постукивания по дну центрифужной пробирки. Проинкубируйте центрифужную пробирку при 37°C в течение 15 мин.

4. Аппарат для гель-электрофореза в агарозе

Для вас приготовлен 0,8% агарозный гель с лунками. Заполните ванночку для электрофореза 1xTAE-буфером таким образом, чтобы он покрыл поверхность геля. Поверхность буфера должна находиться приблизительно на 3-4 мм выше, чем поверхность агарозного геля. Поместите 10 µl образца, содержащего (1) плазмидную ДНК, расщепленную рестрикционным ферментом, и (2) краситель для ДНК в лунки геля. **Учтите**, что наконечник должен находиться на 1-2 мм выше над дном лунки, чтобы вы могли нанести весь образец в лунку, не повредив ее дно. После нанесения образца закройте крышку ванночки для электрофореза. Заметьте, что красный провод присоединяется к аноду, а черный провод присоединяется к

катоду. Позовите лабораторного ассистента поднятием зеленой карточки для подключения прибора к источнику тока. Запустите образцы при 100 вольтах на 40 минут. После этого позовите ассистента поднятием зеленой карточки для отключения от источника тока. Каждому участнику предоставляется отдельная ванночка для электрофореза, тогда как источником тока он пользуется совместно с другим участником.



5. Прибор для фотографирования флуоресцирующего геля в видимом свете

Этой системой управляют лабораторные ассистенты. Ваши образцы содержат нетоксичный краситель, который делает связанные фрагменты ДНК видимыми.

Ход эксперимента

1. Пронумеруйте восемь центрифужных пробирок объемом 0,5 мл маркерным карандашом. В каждую пробирку внесите добавки, как указано в Таблице:

Таблица 1. Расщепление плазмидной ДНК рестрикционными ферментами

No.	Плазмид ДНК (μl)	<i>Bam</i> HI (μl)	<i>Pst</i> I (μl)	<i>Hind</i> III (μl)	ddH ₂ O (μl)
1	5	1			9
2	5		1		9
3	5			1	9
4	5	1	1		8
5	5	1		1	8
6	5	1	1	1	7
7	5				10

- Смешайте хорошо образцы и проинкубируйте пробирки 1-6 при 37°C в течение 15 минут. Оставьте пробирку 7 в штативе. Если вы обнаружите капли раствора на внутренних стенках пробирки, то можете использовать центрифугу для сбора капель на дне пробирки. Центрифуги находятся на столе впереди.
- Поместите агарозный гель (приготовленный для вас заранее) в ванночку для электрофореза, налейте буфер 1×TAE в ванночку так, чтобы он покрыл гель слоем около 3-4 мм. Гель содержит 10 лунок для нанесения образцов.
- Добавьте 6 μl раствора стандартов размеров ДНК в центрифужную пробирку No. 8.
- Добавьте 3 μl 5x красителя для ДНК в каждую пробирку и хорошо смешайте.
- Нанесите 5 μl стандартов размеров ДНК (пробирка No. 8) в **ПЕРВУЮ** лунку. **Нанесите все ваши образцы плазмид в лунки от второй до**

восьмой в порядке, указанном в Таблице 1. Обратите внимание: Номера пробирок не соответствуют номерам лунок. Используйте для нанесения каждый раз новый наконечник для пипетки. Закройте крышку прибора для электрофореза. Поднятием синей карты позовите ассистента для подключения к источнику тока. Длительность электрофореза при 100 вольтах 40 минут. **(Примечание: ожидая время прохождения электрофореза, перейдите к выполнению задания 2).**

7. После электрофореза позовите ассистента для отключения от источника тока поднятием синей карты. Наденьте перчатки и выньте держатель геля.
8. Поместите ваш гель в коробку с вашим номером участника, закройте крышкой и оставьте коробку на столе. Ассистент лаборатории сделает фотографию геля и выпечатает вам рисунок.

Разделение рестрикционных фрагментов плазмидной ДНК методом гель-электрофореза в агарозе (24 балла: 3 балла за каждую линию). Баллы за это задание будут присуждаться профессором, ответственным за этот тест.

Три балла за каждую линию: отсутствие ДНК – ни одного балла; размытая линия с четкими полосами – минус 1 балл; неполное расщепление – минус 1 балл; нечеткие полосы – минус 1 балл.

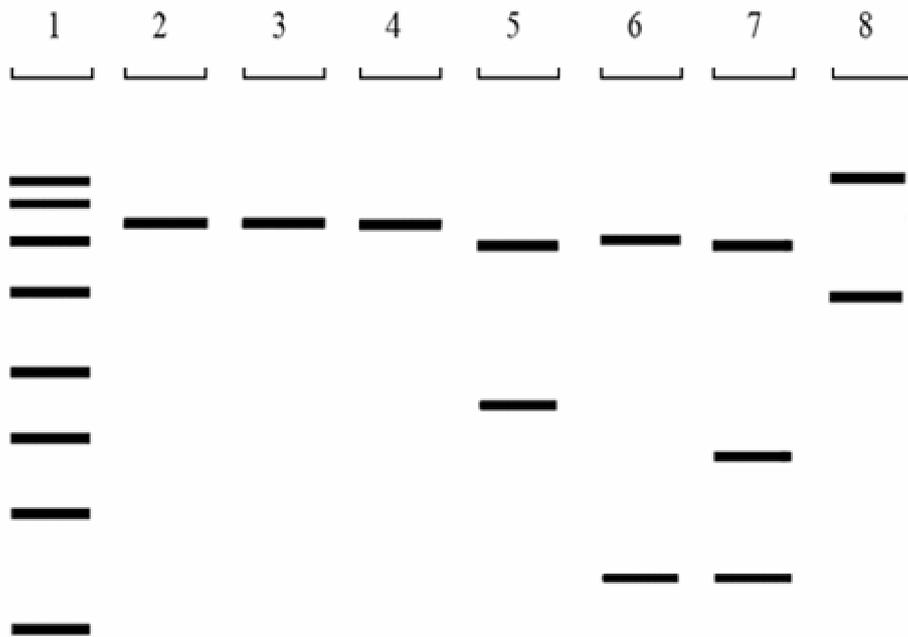
Поместите здесь фотографию вашего геля после того, как она будет напечатана ассистентом лаборатории.



Задание 2: Определение сайтов рестрикции ферментов и размера рестрикционных фрагментов ДНК. (16 баллов)

Из-за ограниченности времени вы не сможете использовать полученный вами гель для определения размера фрагментов. Однако рисунок ниже показывает положение фрагментов ДНК в агарозе, который был получен при расщеплении идентичной плазмиды теми же тремя рестрикционными ферментами. Описание расщепления и нанесения образцов в гель полностью идентичны таковым в инструкции к заданию

1. Ответьте на вопросы соответственно рисунку.



Вопрос 1. Сколько сайтов рестрикции имеет эта плаزمида для *Pst*I, *Bam*HI and *Hind*III, соответственно? (3 балла)

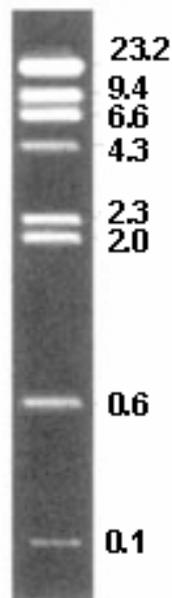
- A. *Pst*I:1, *Bam*HI: 0, *Hind*III : 2.
- B. *Pst*I:2, *Bam*HI : 0, *Hind*III : 2.

C. *Pst*I:2, *Bam*HI : 1, *Hind*III : 0.

D. *Pst*I:1, *Bam*HI : 1, *Hind*III : 1.

Вопрос 2. Линейная лямбда-ДНК часто расщепляется рестрикционными ферментами и используется как стандарт молекулярных масс при электрофорезе в агарозном геле. На рисунке ниже показан профиль расщепления вирусной лямбда-ДНК на фрагменты при помощи *Hind*III. Числа справа от геля обозначают размер фрагментов в kb.

λ -DNA *Hind*III



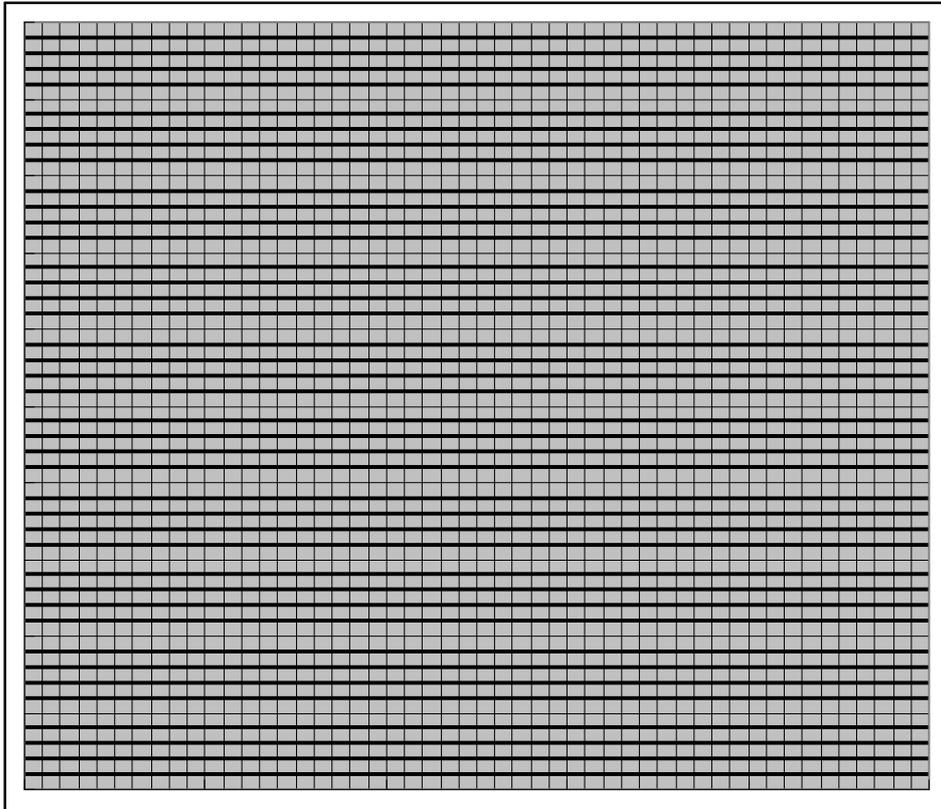
Какое/Какие из следующих утверждений является/являются правильным(и)? (3 балла)

1. Имеется 8 сайтов для *Hind*III на лямбда-ДНК.
2. Поскольку лямбда-ДНК может расщепляться *Hind*III, то молекула

лямбда-ДНК должна быть двуцепочечной.

3. Профиль, показанный на рисунке выше, скорее всего представляет снимок фрагментов ДНК окрашенных флуоресцентным красителем.
- A. 1
 - B. 1, 2, 3
 - C. 2, 3
 - D. 3

Вопросы 3-5. Профиль геля содержит восемь полос стандартов размера ДНК на дорожке 1 и величины этих фрагментов ДНК являются следующими (в bp): 200, 500, 800, 1200, 2000, 3000, 4500, 7000. Известно, что подвижность фрагмента ДНК обратно пропорциональна логарифму длины фрагмента. Постройте график зависимости логарифма величины фрагмента ДНК (kb) от его подвижности (см) на разлинованном ниже поле. Вычислите величины фрагментов ДНК (kb).



Вопрос 3. Размер (kb) наименьшего рестриционного фрагмента между сайтами

*Pst*I и *Hind*III составляет: (3 балла)

- A. 2,5
- B. 0,8**
- C. 1,1
- D. 0,6

Вопрос 4. Размер (kb) меньшего рестриционного фрагмента между сайтами

*Hind*III и *Bam*HI составляет: (3 балла)

- A. 0,8

B. 0,4

C. 0,5

D. 0,6

Вопрос 5. Длина плазмиды (kb) составляет: (4 балла)

A. 5,2

B. 6,9

C. 4,8

D. 4,3