

Занятие 3.

Гены, мутации и геномное редактирование.

Методы молекулярной биологии в школе

Сергей Евгеньевич Седых
кандидат биологических наук

научный сотрудник ИХБФМ СО РАН,
ст. преподаватель НГУ и СУНЦ НГУ

научный руководитель Фонда «Образование»

член комиссии РАН по популяризации науки

Выявление талантов в области наук о жизни



Подготовка наставников

Подготовка талантов



НАЦИОНАЛЬНАЯ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ
ОЛИМПИАДА



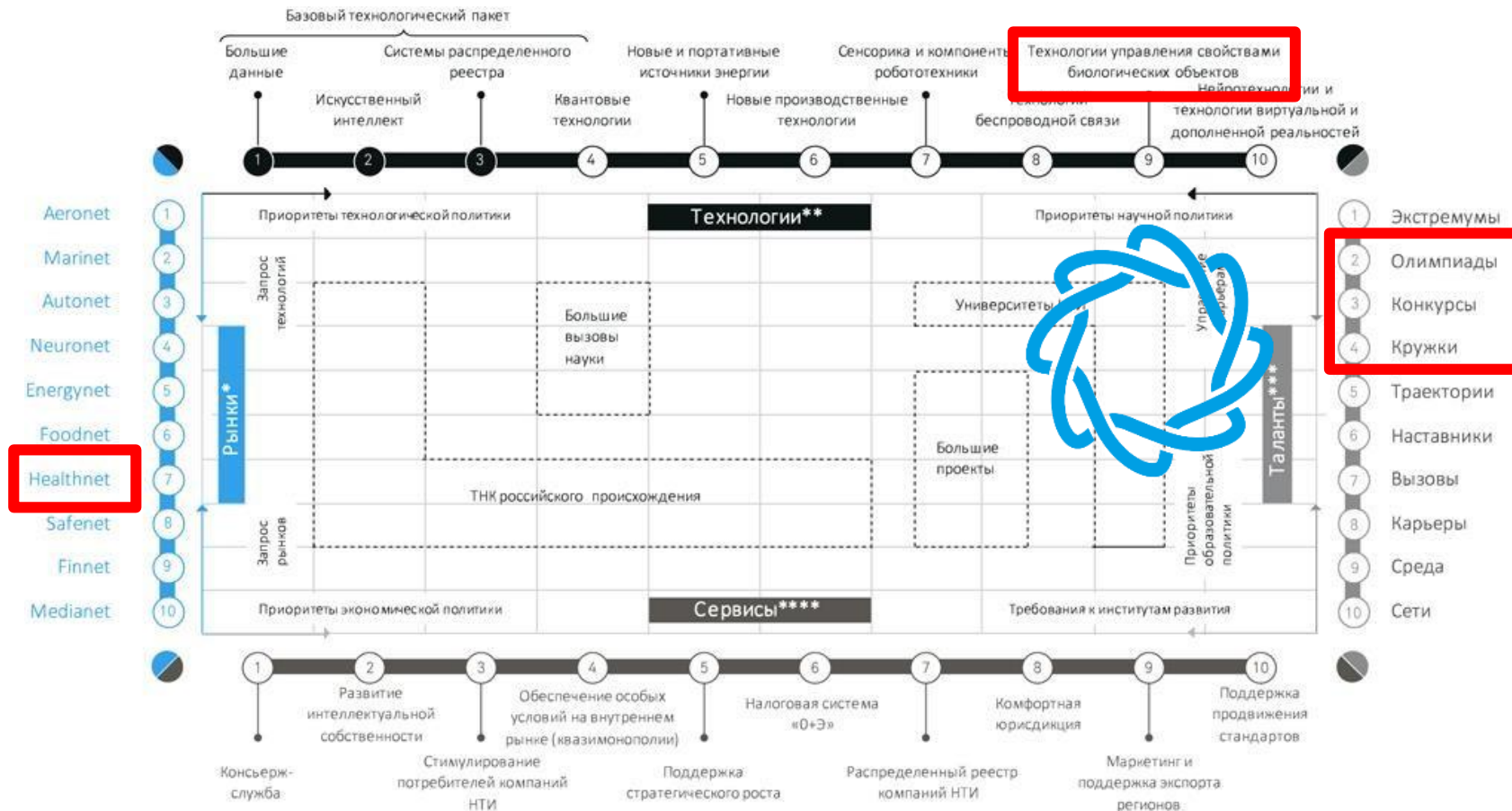
БОЛЬШИЕ ВЫЗОВЫ
ВСЕРОССИЙСКИЙ КОНКУРС
НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЕКТОВ

НАЦИОНАЛЬНАЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНИЦИАТИВА

Программа мер по формированию принципиально новых рынков
и созданию условий для глобального технологического
лидерства России к 2035 году



НАЦИОНАЛЬНАЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ОЛИМПИАДА





Олимпиада НТИ

Профиль «Геномное редактирование»

Задача финала

Участники 8–9 классов проведут эксперимент в области генной инженерии, а участники 10–11 классов займутся **анализом работы системы геномного редактирования CRISPR/Cas9.**

Финалистов ждет работа с базами данных и биоинформатическим ПО. Работа с ПЦР, рестрикционный анализ, анализ данных секвенирования.



29 марта – 3 апреля 2021

Включен в список РСОШ

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ



The Nobel Prize in Chemistry 2020



© Nobel Media. Ill. Niklas Elmehed.
Emmanuelle Charpentier
Prize share: 1/2



© Nobel Media. Ill. Niklas Elmehed.
Jennifer A. Doudna
Prize share: 1/2



Кружки инженерной биологии

- Для 8–10 классов
- Мотивация получать высшее образование
- Профориентация, выбор вуза (медицинский, классический...)
- Курс «Практическая биоинформатика»
- Подготовка к профилю «Геномное редактирование»
- Практические занятия в лабораториях
- Участие в биохакатонах



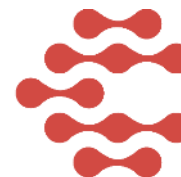
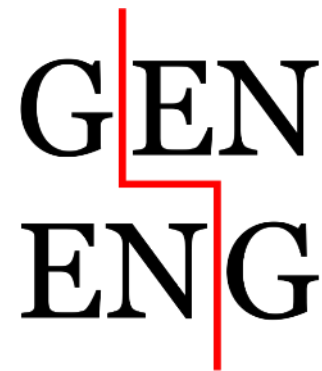
Генная инженерия в школе

Для кого?

- педагоги школ и кружков
- преподаватели кванториумов и колледжей
- ученики средних и старших классов, интересующиеся естественными науками
- студенты и магистранты биологического факультета

Программа

- теоретические основы и достижения генной инженерии
- основы биоинформатики



HEALTH NET

Инфраструктурный центр

Компетенция «Геномная инженерия»



world skills
Russia

Для студентов колледжей и вузов

- Выделение плазмидной ДНК
- Биоинформатический анализ
- Построение рестрикционной карты плазмиды
- Работа с культурами непатогенных микроорганизмов
- Полимеразная цепная реакция
- Электрофорез в агарозном геле



Государственное бюджетное профессиональное образовательное учреждение Новосибирской области



НОВОСИБИРСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ КОЛЛЕДЖ
ИМ. Д. И. МЕНДЕЛЕЕВА

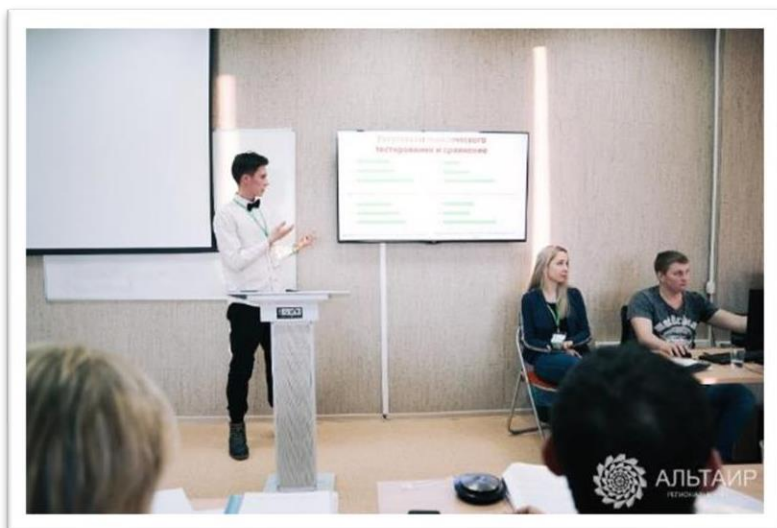
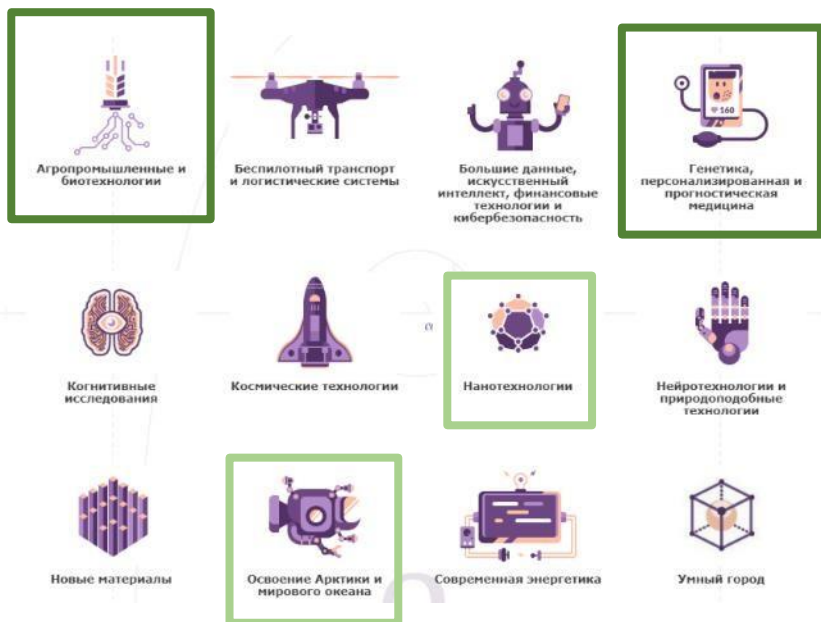


N* Новосибирский
государственный
университет
*НАСТОЯЩАЯ НАУКА



HEALTH NET
Инфраструктурный центр

«Большие вызовы»: всероссийский конкурс научно-технологических проектов



Августовская школа синтетической биологии



Преподавание генетики и молекулярной биологии в средней и высшей школе



HEALTH NET

Инфраструктурный центр



ФОНД
"ПОДДЕРЖКА
ПРОЕКТОВ
В ОБЛАСТИ
ОБРАЗОВАНИЯ"

N* Новосибирский
государственный
университет
*НАСТОЯЩАЯ НАУКА

ИХБФМ
СО РАН

BIOSCAD
Biotechnology Company

Учебник для 8–9 классов и не только



Естественно-научные предметы. Практическая молекулярная генетика для начинающих. 8-9 классы. Учебное пособие

Автор: под ред. Бородина П.М., Ворониной Е.Н.

[Сообщить о поступлении](#)

Аннотация

Все авторы этой книги – профессиональные генетики, молодые учёные. Они занимаются разными направлениями генетической науки. Из этой книги вы узнаете: - О том, что самая важная молекула – это ДНК, именно она определяет устройство нашего тела и во многом – нашу жизнь и судьбу. - О том, как возникли, как устроены, работают и передаются гены. Как и для чего их можно менять, а как их менять ни в коем случае не следует. - О проблемах, которые пока не имеют решения, над которыми генетики сейчас работают в своих лабораториях.

ISBN 978-5-09-083776-7

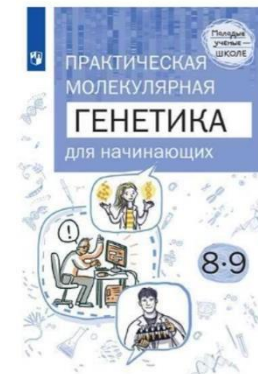
Артикул 18-0735-01

[Все характеристики](#) ▾

Оглавление

Введение	3
Модуль 1. Из чего сделаны гены	9
Глава 1. Молекулы жизни	9
Глава 2. Белки и генетический код	14
Глава 3. Ошибки в ДНК — мутации	20
<i>Практикум</i>	25
Модуль 2. Устройство и работа генов	28
Глава 4. Мир прокариот	28
Глава 5. Устройство генов у эукариот	34
Глава 6. Управление генами у эукариот	41
Глава 7. Вирусы — геномные хулиганы	47
<i>Практикум</i>	52
Модуль 3. Методы молекулярной генетики	58
Глава 8. Размножение ДНК в пробирке: полимеразная цепная реакция	58
Глава 9. Расшифровка ДНК: секвенирование	63
Глава 10. Кройка и шитьё ДНК: геновая инженерия	72
Глава 11. Конструирование организмов: трансгенные животные	76
Глава 12. Редактирование генов	81
<i>Практикум</i>	86
Модуль 4. От генов к признакам	92
Глава 13. От гена к признаку: как раскрасить kota	92
Глава 14. Гены строят организм	98
Глава 15. Хромосомные танцы в клетках тела: митоз	103
Глава 16. Хромосомные танцы в половых клетках: мейоз	110
Глава 17. Зачем нужна рекомбинация	116
<i>Практикум</i>	120
Модуль 5. Законы Менделя	123
Глава 18. Законы Менделя: один ген — один признак	123
Глава 19. Законы Менделя: несколько генов — несколько признаков	128
Глава 20. Определение пола	132
<i>Практикум</i>	136
Модуль 6. Гены в популяциях: как увидеть эволюцию	139
Глава 21. Гены в популяциях: великое равновесие	139
Глава 22. Популяции меняются: численность, миграция и выбор супруга	145
Глава 23. Популяции меняются: естественный отбор	150
<i>Практикум</i>	153

Модуль 7. Генетика количественных признаков	159
Глава 24. Наследование количественных признаков	159
Глава 25. Поиск генов количественных признаков	165
Глава 26. От поведения к генам	168
Глава 27. От генов к поведению	173
<i>Практикум</i>	179
Модуль 8. Генетика открывает исторические тайны	182
Глава 28. ДНК как хронометр эволюции	182
Глава 29. Кто от кого произошёл: филогенетические деревья	189
Глава 30. Генетика на археологических раскопках	195
Глава 31. Генетическая криминалистика	200
<i>Практикум</i>	207
Модуль 9. Генетическая история человечества	212
Глава 32. Предыстория возникновения человека	212
Глава 33. Неандертальцы, денисовцы и другие люди	216
Глава 34. Великое переселение народов	221
<i>Практикум</i>	225
Модуль 10. Геномные технологии	228
Глава 35. «Омы» над геномом	228
Глава 36. Доместикация и центры генетического разнообразия	234
Глава 37. Сохранить и изучить гены, чтобы менять будущее	240
Глава 38. Воскрешение мамонтов и клонирование организмов	245
Глава 39. Три истории о том, как генетика спасает жизни	249
<i>Практикум</i>	255
Заключение	259
Ответы на задачи	264
Предметный указатель	266



Какие задачи могут решать школьники 8–9 и 10–11 классов?

- Расчетные задачи
- Молекулярно-генетические процессы
 - Центральная догма, репликация ДНК
- Синтетическая биология
 - Генетическая инженерия
 - Геномное редактирование
- Методы молекулярной биологии
 - Полимеразная цепная реакция
 - Рестрикционный анализ
- Обработка результатов
 - Секвенирование по Сэнгеру
- Биоинформатика: UGENE, база данных NCBI, Python

Задачи из учебника

Модуль 3

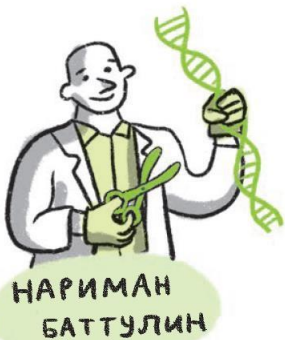
МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ

Вы уже знаете, что геномы устроены очень сложно. Для того чтобы расшифровать принципы работы генома, без специальных методов работы с ДНК не обойтись. В этом модуле мы разберём ключевые для генетики методы.

Про полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и секвенирование ДНК вам расскажет **Анастасия Юнусова**, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории генетики развития Института цитологии и генетики СО РАН.



Про методы геномной инженерии, геномного редактирования и создания трансгенных животных расскажет уже известный вам **Нариман Баттулин**.



Глава 8

РАЗМНОЖЕНИЕ ДНК В ПРОБИРКЕ: ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ



Практикум

Задача «КАКАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ВСТРЕЧАЕТСЯ ЧАЩЕ?»

Рестриктазы узнают последовательность из 4—6 нуклеотидов и разрезают её. Какая рестриктаза будет чаще разрезать ДНК: которая узнаёт 4 нуклеотида или которая узнаёт 6 нуклеотидов? Сколько раз случайную последовательность ДНК из 1000 нуклеотидов разрежут обе рестриктазы?

Задача «КАРТА РЕСТРИКЦИИ»

Карта рестрикции — это схематическое изображение фрагмента ДНК, на котором указаны места разрезания рестриктазами. Карты рестрикции активно использовали генные инженеры, когда у них не было возможности использовать ПЦР для синтеза гена и надо было вырезать участок ДНК так, чтобы не повредить ген.

Молекула ДНК длиной 10 тыс. пар нуклеотидов была разрезана на фрагменты двумя рестриктазами. При разрезании рестриктазой *EcoRI* ДНК разрезается на фрагменты 2 и 8 кб (1 кб, или *килобаза* = 1000 нуклеотидов), а при разрезании рестриктазой *BamHI* — на фрагменты 3 и 7 кб.

- Постройте карту рестрикции, учитывая, что ДНК, разрезанная сразу двумя рестриктазами, состоит из фрагментов 1, 2 и 7 кб.
- Определите, в какой части молекулы ДНК должен находиться искомый ген, чтобы его можно было перенести в другую плазмиду целиком, если известно, что его длина 4 кб.

Работа 3-1. КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРАЙМЕРОВ

Для разработки тест-системы для выявления носителей заболевания (пациентов, у которых вирус есть, но сами они не болеют) вирус выделяют от больных и определяют кусочек его нуклеотидной последовательности.

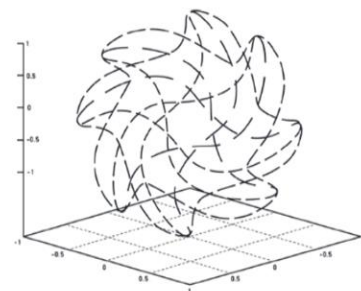
Сборники задач прошлых лет



Олимпиада НТИ

Профиль: «Инженерные биологические системы»

5. Материалы заданий олимпиады школьников отборочного и заключительного этапов олимпиады, ответы на задания заключительного этапа с указанием выставяемых баллов за каждое задание



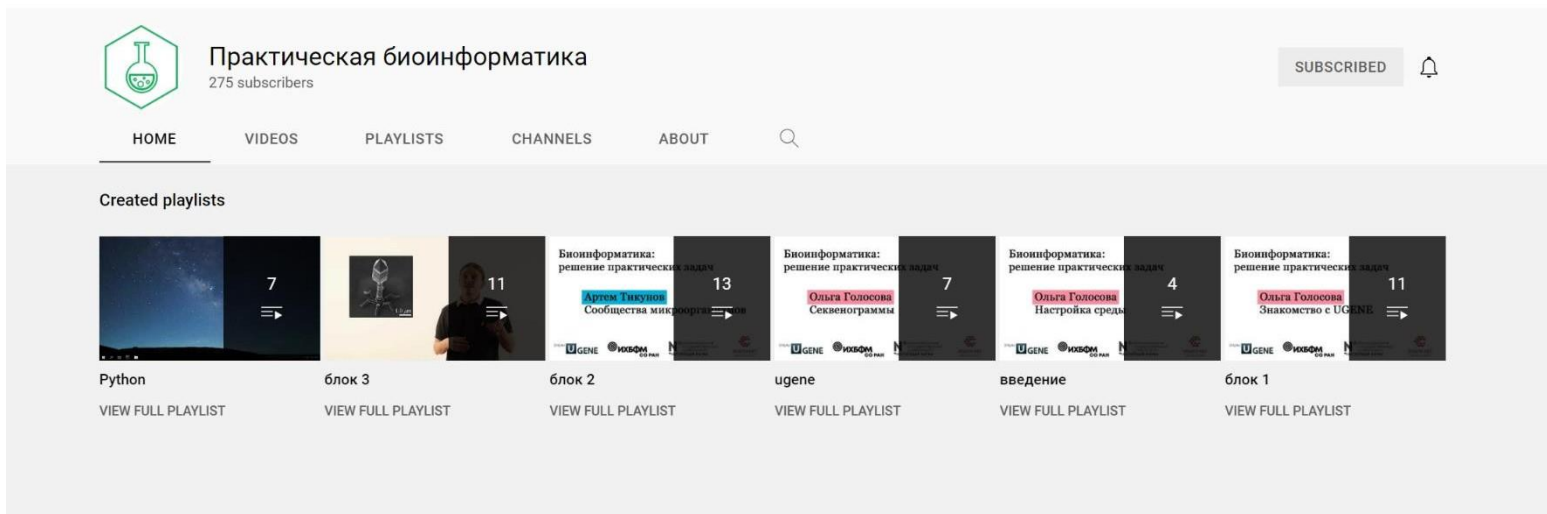
МАТЕРИАЛЫ ЗАДАНИЙ
командной инженерной олимпиады школьников
«Олимпиада Кругового движения
Национальной технологической инициативы»
по профилю
«Геномное редактирование»

2019/20 учебный год

<http://nti-contest.ru>

vk.com/docs-173786512

Практическая биоинформатика



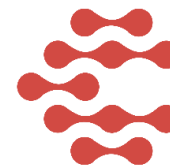
The screenshot shows the YouTube channel page for 'Практическая биоинформатика'. The channel has 275 subscribers and is subscribed to. The navigation menu includes HOME, VIDEOS, PLAYLISTS, CHANNELS, and ABOUT. The 'Created playlists' section displays six playlists:

Playlist Name	Video Count	Thumbnail Description	View Full Playlist
Python	7	Thumbnail with a night sky and a play button	VIEW FULL PLAYLIST
блок 3	11	Thumbnail with a person speaking	VIEW FULL PLAYLIST
блок 2	13	Thumbnail with text: 'Биоинформатика: решение практических задач. Артем Тихонов. Сообщества микробиоты'	VIEW FULL PLAYLIST
ugene	7	Thumbnail with text: 'Биоинформатика: решение практических задач. Ольга Голосова. Секвеннограммы'	VIEW FULL PLAYLIST
введение	4	Thumbnail with text: 'Биоинформатика: решение практических задач. Ольга Голосова. Настройка среды'	VIEW FULL PLAYLIST
блок 1	11	Thumbnail with text: 'Биоинформатика: решение практических задач. Ольга Голосова. Знакомство с UGENE'	VIEW FULL PLAYLIST

bit.ly/ugene_edu



<https://www.youtube.com/c/Практическаябиоинформатика>



HEALTH NET

Инфраструктурный центр

Расчетные задачи

Приготовление разведений растворов

[расчеты]

Концентрацию компонентов в растворе обозначают различными способами. Широко используют количественные характеристики, например, г/л, моль/л (М), % и другие [1]. Например, при приготовлении растворов для нанесения образцов на гель, или при расчете компонентов смеси для ферментативных реакций часто используют кратные растворы (2х, 4х, 5х, 10х). Например, для приготовления 100 мл однократного водного раствора (1х), нужно взять 50 мл двукратного раствора (2х) и добавить 50 мл дистиллированной воды.

Задача. Сколько десятикратного (10х) буферного раствора для проведения ферментативной реакции необходимо добавить к 45 мкл реакционной смеси для достижения однократной (1х) концентрации буферного раствора? **Ответ введите в виде натурального целого числа** без "мкл".

Приготовление раствора заданной концентрации

[расчеты]

В лаборатории имеется 96% медицинский спирт. В качестве дезинфицирующего агента обычно используют 70% раствор спирта.

Задача. Необходимо приготовить 200 мл 70% этилового спирта, используя имеющийся 96% медицинский спирт. Считайте плотность спирта равной плотности дистиллированной воды. Введите необходимый для приготовления раствора объем дистиллированной воды в виде целого числа (без обозначения мл).

Расчетные задачи

Реакционная смесь

После обработки вектора pNB1 рестриктазами *BamHI* и *EcoRI* и выделения целевого фрагмента, производят лигирование этого фрагмента с олигонуклеотидом, структура которого описана в предыдущей задаче.

Реакцию лигирования проводят в реакционной смеси объемом 10 мкл, содержащей:

- 50 нг фрагмента вектора pNB1,
- 3 мкл олигонуклеотида,
- 2 мкл Quick Ligase Buffer,
- 1 мкл T4 Quick Ligase
- воды без примесей нуклеаз.

Концентрация фрагмента вектора pNB1 — 23.8 нг/мкл.

Задача. Сколько мкл воды необходимо добавить в раствор?

Расчетные задачи

Расчет реакционной смеси

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержит:

- фрагмент плазмидной ДНК после рестрикции,
- продукт ПЦР,
- 1 мкл ДНК-лигазы фага T4,
- 10X буферный раствор для лигазной реакции.

Известно, что соотношение (молярное) плазмиды (длина 3500 пар оснований) к ПЦР-продукту (длина 700 пар оснований) в реакционной смеси должно быть 1:3. Концентрация плазмиды, измеренная на спектрофлуориметре — 25 нг/мкл, концентрация ПЦР-продукта — 20 нг/мкл.

Задача. Вычислите объем плазмиды, фрагмента ДНК, буферного раствора и воды, если известно, что в реакционную смесь следует добавить 100 нг плазмидной ДНК.

Ответы введите в мкл, округлите до ближайших целых значений.

Молекулярно-генетические процессы

Принцип комплементарности (задание изменено)

[Репликация ДНК]

Последовательность лидирующей цепи ДНК при репликации 3'-ATG CAT GCA TGC-5'

Известно, что ДНК-полимераза движется по матричной цепи в направлении 3'→5' и синтезирует дочернюю цепь в направлении 5'→3'.

Задание. Выберите, какие последовательности могут быть синтезированы ДНК-полимеразой согласно принципу комплементарности?

Выберите все подходящие ответы из списка

- 5'-ATG CAT GCA TGC -'3
- 3'-CGT ACG TAC GTA-5'
- 5'-TAC GTA CGT ACG-'3
- 3'-GCA TGC ATG CAT-5'

Репликация ДНК

Репликация ДНК

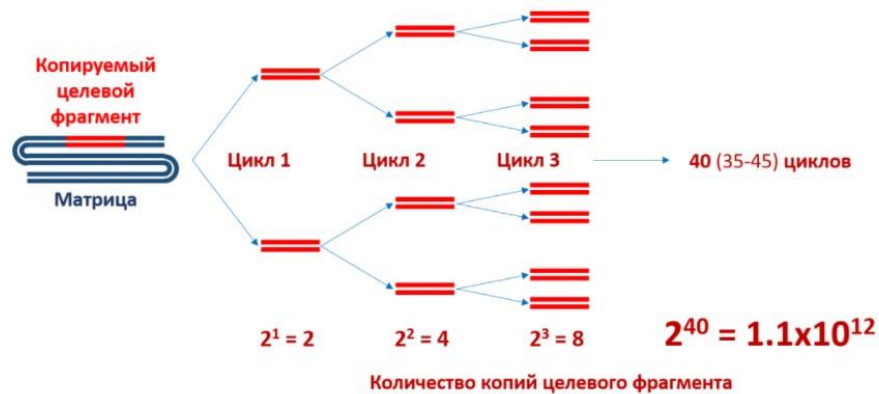
Репликация ДНК — процесс синтеза дочерней молекулы на матрице ДНК. У всех живых организмов процесс репликации ДНК обеспечивает точную передачу генетической информации из клетки и в клетку и из поколения в поколение. Репликация обычно происходит перед делением клетки.

Задача. Выберите правильные суждения о принципах репликации ДНК, особенностях ДНК-полимеразы и процессе синтеза ДНК.

- ДНК-полимераза синтезирует новую цепочку ДНК в направлении $5' \rightarrow 3'$
- ДНК-полимераза движется по матрице одноцепочечной ДНК в направлении $3' \rightarrow 5'$
- Молекулы ДНК после репликации содержат одну цепочку материнской и одну цепочку дочерней ДНК
- Синтез ДНК по отстающей цепи происходит фрагментами Оказаки
- ДНК-полимераза движется по матрице одноцепочечной ДНК в направлении $5' \rightarrow 3'$
- У эукариот в результате репликации происходит укорочение концов хромосом
- У прокариот в результате репликации происходит укорочение кольцевой ДНК
- ДНК-полимераза может удлинять существующие нуклеотидные последовательности только с $5'$ -конца
- В клетках эукариот фермент праймаза синтезирует РНК-затравку, которую затем достраивает ДНК-полимераза
- ДНК-полимераза синтезирует новую цепочку ДНК в направлении $3' \rightarrow 5'$

Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция — один из самых востребованных методов молекулярной биологии. Данный метод позволяет в течение часа получить миллиарды копий исходной молекулы ДНК.



Задача. Сколько молекул ДНК образуется в пробирке с реакционной смесью на 20 цикле ПЦР, если известно, что в реакционную смесь добавили 10 копий матрицы ДНК. Для расчета используйте формулу.

$$N = m \times 2^n$$

Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция

Какие компоненты содержит реакционная смесь, используемая для отрицательного контроля при ПЦР?

Рекомендуемая литература

1. Рекомендации по постановке ПЦР <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf>
2. 12 методов в картинках: полимеразная цепная реакция <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaiia-reaktsiia>

- Обратный праймер
- Буферный раствор
- АТФ
- Хлориды калия и магния
- Дистиллированная вода
- Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
- ДНК-полимераза
- Прямой праймер
- Матрица ДНК

Полимеразная цепная реакция

ПЦР-диагностика COVID-19

Для диагностики COVID-19 используют метод ОТ-ПЦР-РВ (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией и детекцией результатов в режиме реального времени). В качестве матрицы используют кДНК, полученную обратной транскрипцией.

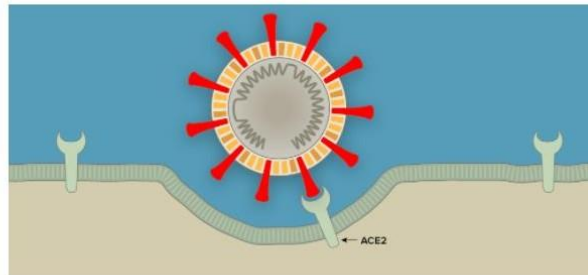
Задача. Выберите верные суждения об использовании метода ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией для диагностики SARS-CoV-2.

- Преимущество количественной ПЦР по сравнению с ПЦР с детекцией по конечной точке в том, что вероятность контаминации продуктами количественной ПЦР, намного ниже
- Использование зонда в количественной ПЦР позволяет в реальном времени следить за наработкой специфического продукта
- Перед ПЦР-анализом на COVID-19, анализируемый образец обрабатывают ДНКазой для удаления возможных примесей совыделяющейся ДНК
- При детекции SARS-CoV-2 полимеразная цепная реакция происходит после обратной транскрипции
- Количество нарабатываемых молекул ДНК пропорционально количеству копий геномной РНК SARS-CoV-2 в образце
- Номер цикла, на котором выходит кривая амплификации образца пациента соответствует циклу развития вируса в организме
- Для детекции результатов количественной ПЦР используют гель-электрофорез
- В результате ПЦР происходит наработка миллиардов молекул геномной РНК SARS-CoV-2
- Кривые амплификации пациента с COVID-19 выходят позже, чем у здоровых пациентов
- В процессе обратной транскрипции на матрице вирусной РНК образуется несколько копий комплементарной ДНК

ПЦР *in silico*

ACE2 – рецептор SARS-CoV-2

Рецептором нового коронавируса SARS-CoV-2 в организме человека является ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2) [1]. После заражения белок Spike на поверхности вириона связывается с ACE2 и таким образом вирус попадает внутрь клетки.



В одной из статей для амплификации мРНК гена ACE2 использовали следующие пары праймеров:

ace2.1f 5' -GGGATCAGAGATCGGAAGAAGAAA-3' , ace2.1r 5' -AGGAGGTCTGAACATCATCAGTG-3'

и

ace2.2f 5' -AAACATACTGTGACCCCGCAT-3' , ace2.2r 5' -'ССАAGCСТСАGCATATTGAACA-3'

Используйте последовательности в базе данных NCBI NM_021804.3 и NP_068576.1 [2], соответствующие мРНК и белку ACE2 и инструмент UGENE "PCR in silico", для определения длины получаемых ПЦР-фрагментов.

Задача. Ввести числовой ответ в соответствующее поле (без обозначений п.о.).

Рестрикционный анализ

Задача. Используя программу UGENE [1], карту плазмиды pBluescript [2], проведите анализ фрагментов ДНК которые образуются в результате рестрикции. Определите число фрагментов плазмиды pBluescript, образовавшихся после рестрикции *RsaI*. Определите длину самого протяженного фрагмента.



Определение длины и массы фрагмента ДНК

[расчеты; рестрикция]

В результате разрезания плазмиды pBluescript (длина 2961 п.н.) рестриктазой *RsaI* получено несколько фрагментов.

Используя программу UGENE, карту плазмиды pBluescript, проведите анализ фрагментов ДНК которые образуются в результате рестрикции.

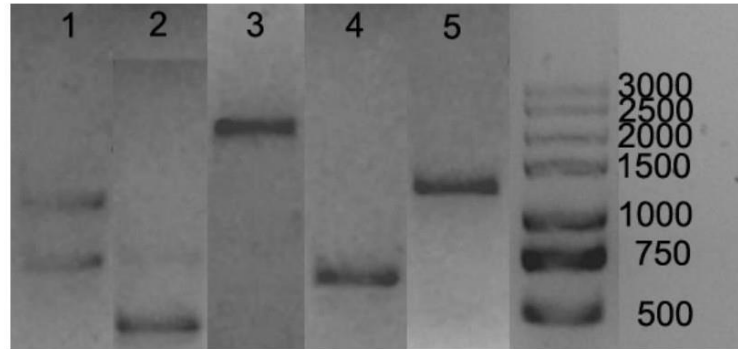
Задача. Определите массу самого короткого фрагмента плазмиды pBluescript, образовавшегося после рестрикции *RsaI*, если известно, что масса исходной плазмиды составляла 2021 нг. Ответ округлите до целого числа.

Рестрикционный анализ

Электрофорез ДНК

Для визуализации ДНК-фрагментов а также их разделения в зависимости от длины использует гель-электрофорез [1].

Для определения длины полученных ДНК фрагментов используются коммерческие растворы ДНК, которые содержат фрагменты ДНК молекул строго определенных длин. Такие растворы называется «маркерами длин ДНК-фрагментов» («DNA ladder», «линейка», «маркеры ДНК») [2].



Задача. Приведена фотография геля, на который был нанесен маркер ДНК, образцы ДНК (дорожки 1-5). Справа расшифрованы длины фрагментов ДНК маркера. Соотнесите длину фрагментов ДНК на дорожках 1-5.

Дорожка 1

1100 и 704 п.н.

Дорожка 2

410 п.н.

Дорожка 3

2080 п.н.

Дорожка 4

603 п.н.

Дорожка 5

1320 п.н.

Рестрикционный анализ

Задача. Используя программу UGENE (или аналогичную) [1], карту плазмиды pUC19 (последовательность нуклеотидов можно найти по ссылке, сохранить в блокноте в текстовом формате с расширением .fasta) [2], **сопоставьте** число фрагментов ДНК которые образуются при гидролизе плазмидной ДНК pUC19 различными эндонуклеазами рестрикции.

RsaI	241 + 676 + 1769
VneI	1023 + 1663
Acc16I	241 + 644 + 1801
PvuII	322 + 2364
AccBSI	497 + 943 + 1246
BmI	1306 + 1380

Генетическая инженерия

Бело-синяя селекция

Для экспрессии рекомбинантных белков в кишечной палочке широко используют плазмидные векторы. При помощи эндонуклеаз рестрикции, требуемую последовательность ДНК клонируют в плазмиду. Для определения бактерий, содержащих плазмиды со вставкой, используют бело-синюю селекцию. После трансформации компетентных клеток в таком случае используют среду, содержащую соединение X-gal. Трансформированные клетки, содержащие плазмиду со вставкой и без вставки, отличаются по цвету.



Задача. Выберите правильные суждения.

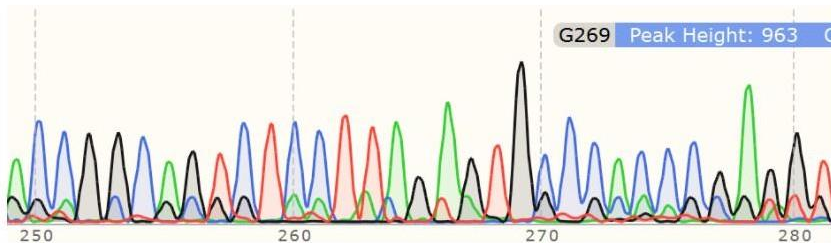
- Клетки, не содержащие плазмиду, не вырастают на чашке Петри с антибиотиком
- Белые колонии превращаются в синие после вставки необходимой последовательности в плазмиду
- Колонии, содержащие плазмиду со встройкой, окрашены в белый цвет
- Синие колонии превращаются в белые после вставки необходимой последовательности в плазмиду
- Бета-галактозидаза гидролизует бесцветный X-gal с образованием окрашенного продукта
- Бета-галактозидаза гидролизует синий X-gal с образованием неокрашенного продукта
- Вставка последовательности в плазмиду приводит к нарушению функционированию гена LacZ
- Белковый продукт гена LacZ – фермент бета-галактозидаза
- Плазида, содержащая вставку, вызывает накопление X-gal в клетках
- Колонии, содержащие плазмиду со встройкой, окрашены в синий цвет

Метод Сэнгера

Определение последовательности ДНК по секвенограмме

[секвенирование]

Современный вариант исполнения метода Сэнгера [1, 2] предполагает использование автоматических капиллярных ДНК-анализаторов, которые определяют наличие флуоресцентно-меченых мономеров-терминаторов в составе продуктов реакции. Затем с помощью программного обеспечения прибора устанавливают соответствия между длиной продуктов и положением конкретного нуклеотида. В итоге получается «секвенограмма», аналогичной той, что представлена на рисунке:



Разные цвета обозначают положения различных нуклеотидов (четыре цвета – четыре нуклеотида):

- Зеленая линия – положения А
- Красная линия – положения Т
- Черная линия – положения G
- Синяя линия – положения С

Задача. Определите последовательность и с помощью сервиса BLAST [3] установите, какому гену она принадлежит.

Метод Сэнгера

Секвенирование по Сэнгеру

Для анализа последовательности нуклеиновых кислот по методу Сэнгера в настоящее время используют автоматические генетические анализаторы.

Задача. Выберите правильные суждения.

- Для проведения одной секвенирующей реакции в современной версии метода Сэнгера используют четыре пробирки с разными терминаторами
- Метод Сэнгера с использованием автоматического анализатора позволяет в одной секвенирующей реакции получить последовательность до 10 тысяч пар нуклеотидов
- Для терминации (обрыва цепи) в методе Сэнгера используют дезоксинуклеозидтрифосфаты
- Концентрация терминирующих ddNTP в реакционной смеси сопоставима с концентрацией dNTP
- Секвенирующую реакцию обычно проводят в ПЦР-амплификаторе
- В современной версии метода Сэнгера используют не радиоактивно, а флуоресцентно меченые субстраты
- Реакционная смесь содержит ДНК-зависимую РНК-полимеразу
- Продукты секвенирующей реакции разделяют в генетическом анализаторе методом капиллярного электрофореза
- Для проведения секвенирующей реакции можно использовать очищенный от примесей ПЦР-продукт и один из праймеров (секвенирующий)
- Секвенирующую реакцию с разными флуоресцентными ddNTP можно проводить в одной пробирке

Работа в базе NCBI

База данных NCBI содержит несколько последовательностей, соответствующих гену ACE2 человека [2].

Используя последовательности NM_021804.3 и NP_068576.1, найдите информацию о мРНК и белковом продукте гена ACE2.

Известно, что мРНК содержит 3'- и 5'- нетранслируемые области (НТО) [3].

```
ORIGIN
1 ggcactcata catacactct ggcaatgagg acactgagct cgctttgaa atttgacaag
61 ataaccacta aaatctcttt gaattctatg ttgttggat cccatggcta cagaggatca
121 ggagttgaca tagatactct ttgatttca taccatgtgg aggccttctt acttccacgt
181 gaccttgact gagtttttaa tagcgcccaa cccaagtcca aaggctgata agagagaaaa
241 tctcatgagg aggttttagt ctagggaagg tcattcagtg gatgtgatct tggctcacag
301 gggacgatgt caagctcttc ctggctcctt ctacgcttg ttgctgtaac tgctgtcag
361 tccaccattg aggaacaggc caagacattt ttggacaagt ttaaccacga agccgaagac
421 ctgttctatc aaagtccaact tgcttcttgg aattataaca ccaatattac tgaagagaat
481 gtccaaaaca tgaataatgc tggggacaaa tggctgcctt ttttaagga acagtccaca
541 cttgcccaca tgtatccaact acaagaatct cagaatcaca cagtcaagct tcagctgcag
601 gctcttcagc aaaatgggtc ttcagtgctc tcagaagaca agagcaaacg gttgaacaca
661 attcctaata caatgagcac catctacagt actggaagaag tttgtaacc agataatcca
721 caagaatgct tattacttga accaggtttg aatgaaataa tggcaaacag tttagactac
781 aatgagaggc tctgggcttg ggaagctgg agatctgggg tcggcaagca gctgaggcca
841 ttatatgaag agtatgtggt cttgaaaaat gagatggcaa gagcaaatca ttatgaggac
901 tatgggattt attggagagg agactatgaa gtaaatgggg tagatggcta tgactacagc
961 cgcgccaggt tgattgaaga tgtggaacat acctttgaag agattaaac attatatgaa
1021 catcttcatg cctatgtgag ggcaagttg atgaaatgct atccttcta tatcagtcca
1081 attggatgcc tccctgctca tttgcttggg gatatgtggg gtagattttg gacaactctg
1141 tactctttga cagtccctct tggacagaaa ccaaacatag atgttactga tgcaatggtg
1201 gaccaggcct gggatgcaca gagaatattc aaggaggccg agaagtcttt tgatctgttt
1261 ggtcttccca atatgactca aggattctgg gaaaatcca tgctaacgga cccaggaaat
1321 gttcagaaag cagtctgcca tcccacagct tgggacctgg ggaaggcgga cttcaggatc
1381 cttatgtgca caaaggtgac aatggacgac ttcctgacag ctcatcatga gatggggcat
1441 atccagtatg atatggcata tgctgcacaa cttttctgc taagaatgg agctaattgaa
1501 ggattccatg aagctgttgg gaaatcatg tcactttctg cagccacacc taagcattta
1561 aaatccattg gtcttctgtc acccgatttt caagaagaca atgaaacaga aataaacttc
```

Задача. Ввести числовой ответ в соответствующее поле (без обозначений п.о.), выбрать правильные суждения.

Ген ACE2 содержит экзон(ов). В мРНК гена ACE2 человека кодон ATG является
стартовым. Ген ACE2 находится в плече хромосомы.

Геномное редактирование

Механизм работы системы CRISPR\Cas9

Система редактирования генома включает следующие белково-нуклеиновые компоненты:

- фермент **Cas9**
- направляющая РНК (**sgRNA**) — синтетический олигонуклеотид, который содержит два участка, в природе представленные в виде двух молекул: **crRNA** и **tracrRNA**
- мотив протоспейсера (**PAM**)

Задание. Заполните пропуски

На первом этапе работы системы геномного редактирования происходит связывание , далее образовавшийся комплекс связывается с ДНК-мишени. PAM последовательность имеет вид . После связывания Cas9 и PAM, происходит и sgRNA связывается с . Cas9 делает разрыв на расстоянии 3 нуклеотида от PAM. Комплекс диссоциирует от ДНК.

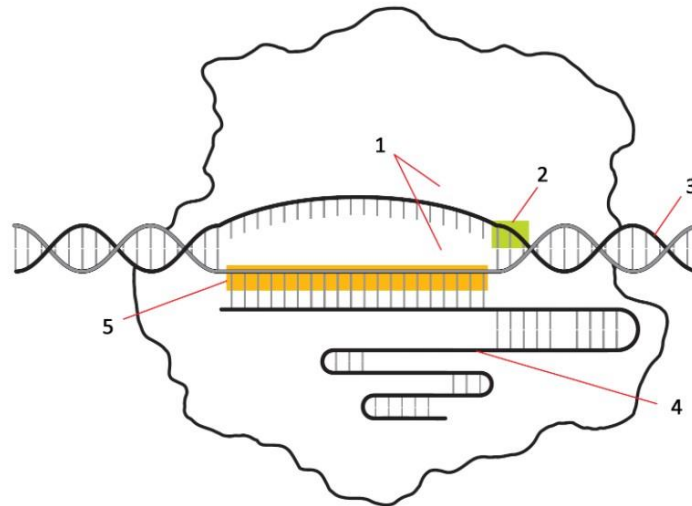
Геномное редактирование

Схема работы системы CRISPR\Cas9

Система редактирования генома включает следующие белково-нуклеиновые компоненты:

- фермент **Cas9**
- направляющая РНК (**sgRNA**) – синтетический олигонуклеотид, который содержит два участка, в природе представленные в виде двух молекул: **crRNA** и **tracrRNA**
- мотив протоспейсера (**PAM**)

Задание. Соотнесите компоненты системы редактирования генома с обозначениями на схеме



Эссе (студ. трек, 2020/21)

Роль системы репарации ДНК в геномном редактировании

Нобелевская премия по химии в 2020 году была вручена "за разработку метода редактирования генома" Эмманюэль Шарпентье и Дженнифер Даудне.

Основополагающие статьи были опубликованы в 2012 году, за 8 последующих лет было опубликовано более 20 тысяч работ, посвященных данному методу.

Задание. Напишите эссе объемом не более 3000 символов (с учетом пробелов) на тему "**Роль системы репарации ДНК в геномном редактировании**". Опишите, какие механизмы поддержания целостности ДНК важны в работе инструментов геномного редактирования CRISPR\Cas. Как можно увеличить специфичность работы системы геномного редактирования, зная особенности работы системы репарации ДНК?

Комментарии, критерии оценивания:

- Правильная аргументация, обоснование ответа
- Ссылки на литературные источники приветствуются
- Заимствование больших фрагментов текста не приветствуется

Эссе 10–11, 2020/21

Задание. Напишите эссе объемом не более 3000 символов (с учетом пробелов) на тему "**Проблемы и задачи геномного редактирования**".

Постарайтесь ответить на вопросы:

- Какие проблемы (задачи) стоят сегодня перед технологией геномного редактирования CRISPR\Cas?
- Как решали эти задачи до появления технологии CRISPR\Cas?

Комментарии, критерии оценивания:

- Правильная аргументация, обоснование ответа
- Ссылки на литературные источники приветствуются
- Заимствование больших фрагментов текста не приветствуется
- При превышении рекомендованной длины текста, оцениваться будут первые 3000 символов (с учетом пробелов)

Эссе 8–9, 2020/21

Задание. Напишите эссе объемом не более 3000 символов (с учетом пробелов) на тему "**Являются ли организмы, полученные в результате геномного редактирования, генетически модифицированными?**"

Постарайтесь в ответе привести аргументы в пользу обеих точек зрения.

Учебник для 8–9 классов и не только



Естественно-научные предметы. Практическая молекулярная генетика для начинающих. 8-9 классы. Учебное пособие

Автор: под ред. Бородина П.М., Ворониной Е.Н.

[Сообщить о поступлении](#)

Аннотация

Все авторы этой книги – профессиональные генетики, молодые учёные. Они занимаются разными направлениями генетической науки. Из этой книги вы узнаете: - О том, что самая важная молекула – это ДНК, именно она определяет устройство нашего тела и во многом – нашу жизнь и судьбу. - О том, как возникли, как устроены, работают и передаются гены. Как и для чего их можно менять, а как их менять ни в коем случае не следует. - О проблемах, которые пока не имеют решения, над которыми генетики сейчас работают в своих лабораториях.

ISBN 978-5-09-083776-7

Артикул 18-0735-01

[Все характеристики](#) ▾

Практическая часть

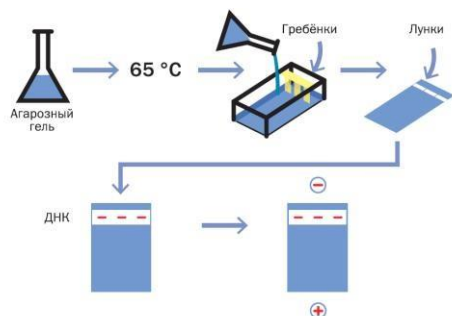


Рис. 2-18. Подготовка и проведение электрофореза в агарозном геле

2. Раствор агарозы остудите до 50 °С и залейте в специальные формочки для геля.

В форму для заливки геля вертикально вставляют гребёнки, образующие в геле лунки, в которые в дальнейшем вносят образец (рис. 2-18).

3. После того как гель затвердеет, аккуратно извлеките гребёнку, переложите гель в камеру с электрофоретическим буфером (содержит электролиты), внесите в лунки образцы ДНК и включите напряжение.

Для визуализации ДНК в геле в образцы добавляют специальные красители: одни связываются с ДНК и проявляются при освещении ультрафиолетом или синим светом, другие видны невооружённым глазом и позволяют контролировать миграцию образца в геле.

4. Зарисуйте картину электрофореза, которую вы увидели. Пометьте на рисунке лунки в геле и направление тока. Сделайте выводы о подвижности и длине ДНК, которую вы добавляли в гель.

Для примера на рисунке 2-19 приведены ДНК-маркеры в агарозном геле. ДНК-маркер содержит фрагменты ДНК известной длины. По их подвижности можно определить приблизительный размер молекул ДНК.

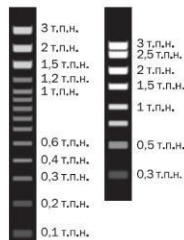
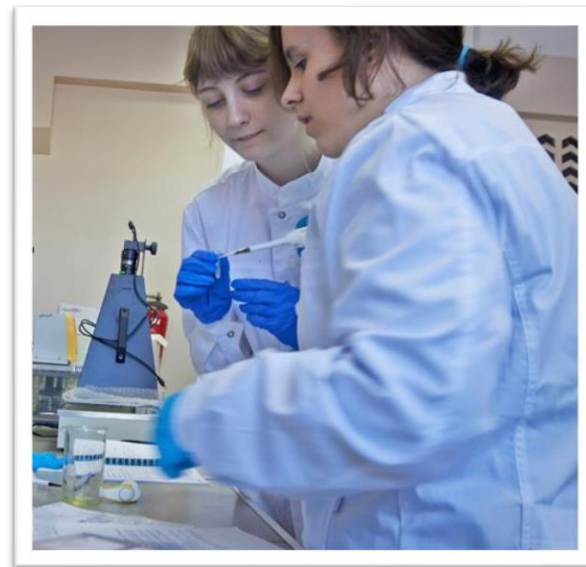


Рис. 2-19. Электрофореграмма ДНК-маркеры в агарозном геле



Оборудование

- Амплификатор
- Термостат
- Центрифуга
- Камера для электрофореза
- Автоматические дозаторы
- Система гель-документации (трансиллюминатор)
- Штативы, наконечники, пробирки
- Реактивы для электрофореза, реактивы для ПЦР



Сергей Евгеньевич Седых кандидат биологических наук

- научный сотрудник ИХБФМ СО РАН, НГУ, преподаватель НГУ, СУНЦ НГУ
- руководитель профиля «Геномное редактирование» Олимпиады НТИ
- научный руководитель Фонда «Поддержка проектов в области образования»
- член комиссии РАН по популяризации науки
- sirozha@gmail.com