

Решение задач по молекулярной биологии

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



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



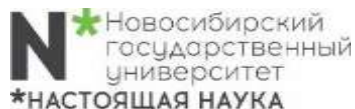
The Nobel Prize in Chemistry 2020



Dr Emmanuelle Charpentier
Emmanuelle Charpentier
Prize share: 1/2

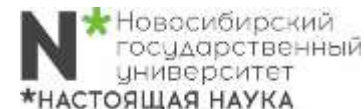


Dr Jennifer A. Doudna
Jennifer A. Doudna
Prize share: 1/2



Ссылки на ресурсы

- Группа в ВК
 - vk.com/onti_genome
- НТО
 - ntcontest.ru/profiles/gened/
- Генная инженерия в школе
 - geneng.ru
- Практическая биоинформатика
 - bit.ly/ugene_edu
- Образовательная программа
 - ntcontest.ru/mentors/education-programs



НАЦИОНАЛЬНАЯ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ
ОЛИМПИАДА

GEN
ENG



HEALTH NET
Инфраструктурный центр

Unipro **UGENE**

Подготовка к профилю «Геномное редактирование» НТО

Спецкурс по инженерной биологии (кружок НТИ)

- Биополимеры. Нуклеиновые кислоты: ДНК, РНК
- Белки. Ферменты. ДНК-полимераза
- Репликация ДНК. ПЦР. Секвенирование
- Методы исследования биополимеров. Электрофорез
- Селекция, генная инженерия
- Вирусы
- [Биоинформатика](#)

Биохаконы (лабораторные работы)

- Выделение ДНК
Рестрикционный анализ
- Метод ПЦР

Образовательная программа

- ntcontest.ru/mentors/education-programs



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



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

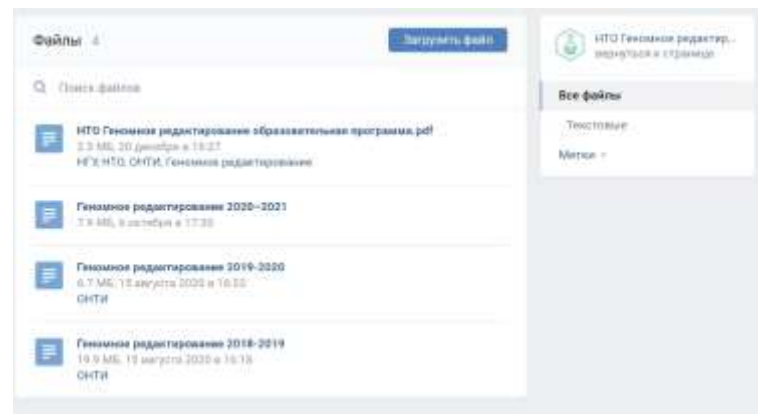
- Расчетные задачи
- Молекулярно-генетические процессы
 - Центральная догма, репликация ДНК
- Синтетическая биология
 - Генетическая инженерия
 - Геномное редактирование
- Методы молекулярной биологии
 - Полимеразная цепная реакция
 - Рестрикционный анализ
- Обработка результатов
 - Секвенирование по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

Сборники задач прошлых лет



vk.com/onti_genome

vk.com/docs-173786512

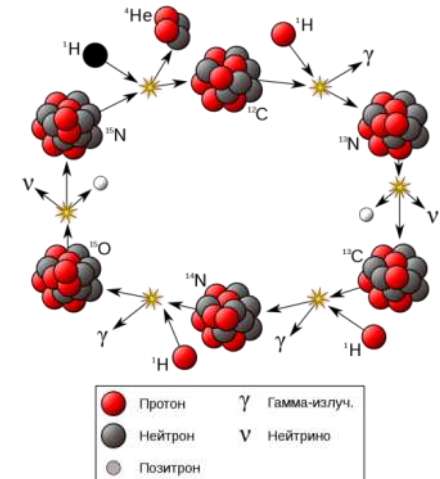
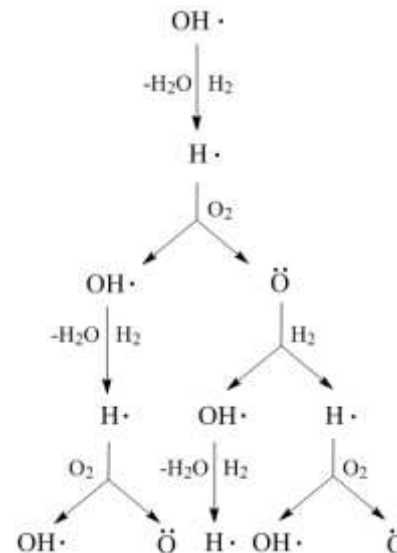
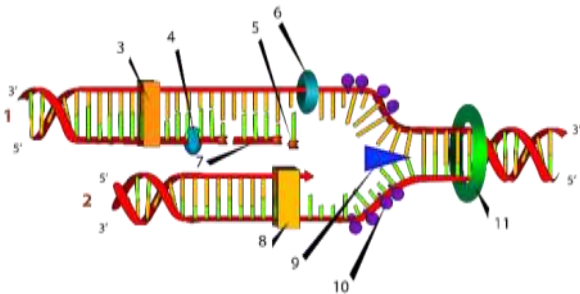


Полимеразная цепная реакция

П олимеразная Ц епная Р еакция

используется
ДНК-полимераза

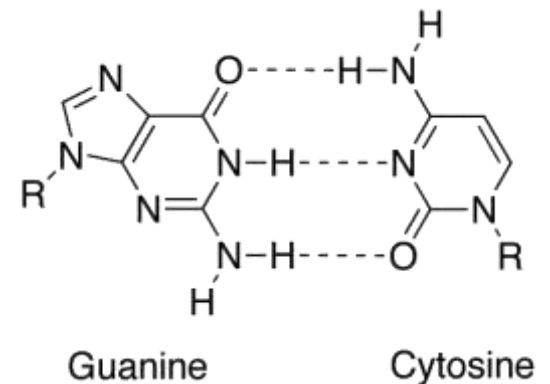
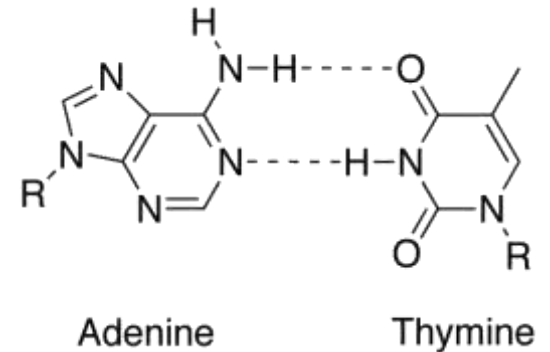
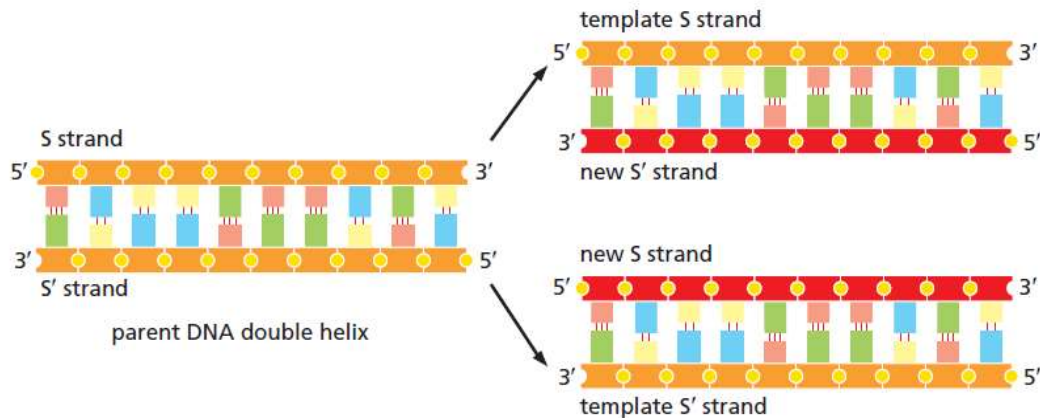
продукт реакции является
субстратом (матрицей) для
следующей реакции



Репликация ДНК

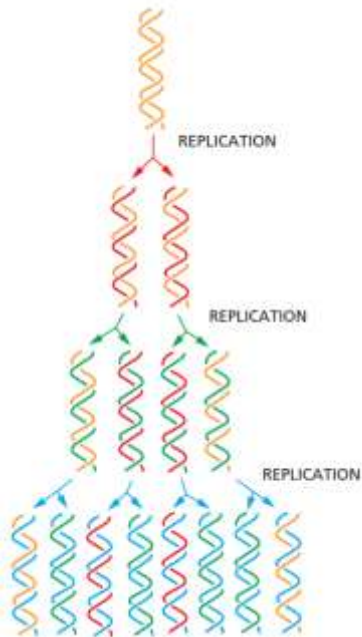
Пары оснований одинаковы по размерам

- Комплементарные пары: А – Т, Г – Ц



Механизм репликации ДНК

Механизм
Уотсона-Крика



Three postulated methods of DNA Replication



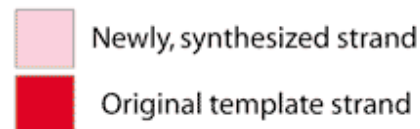
Полуконсервативный



Консервативный

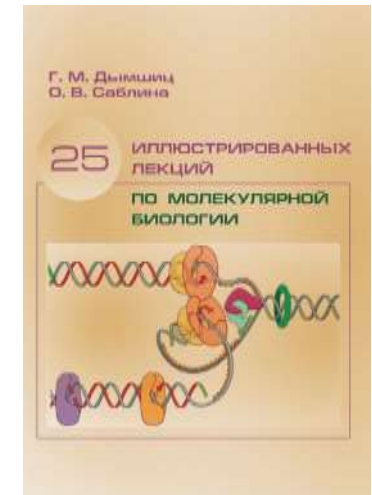
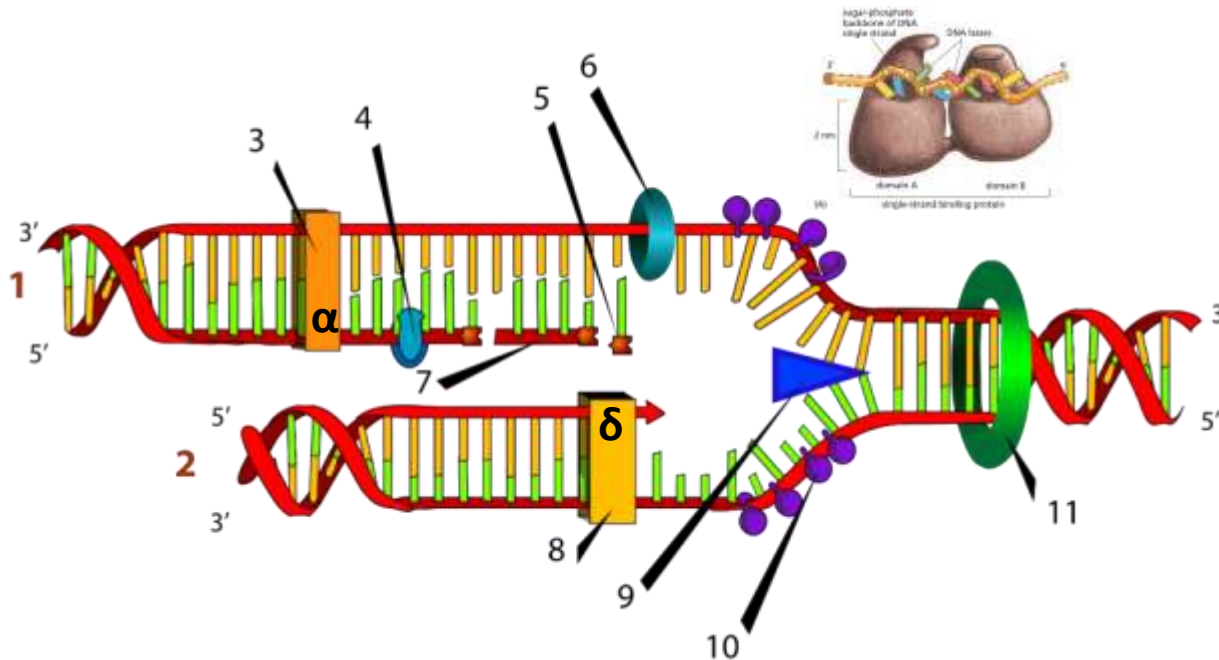


Диффузионный



* not found to be
biologically significant

Компоненты репликационной вилки

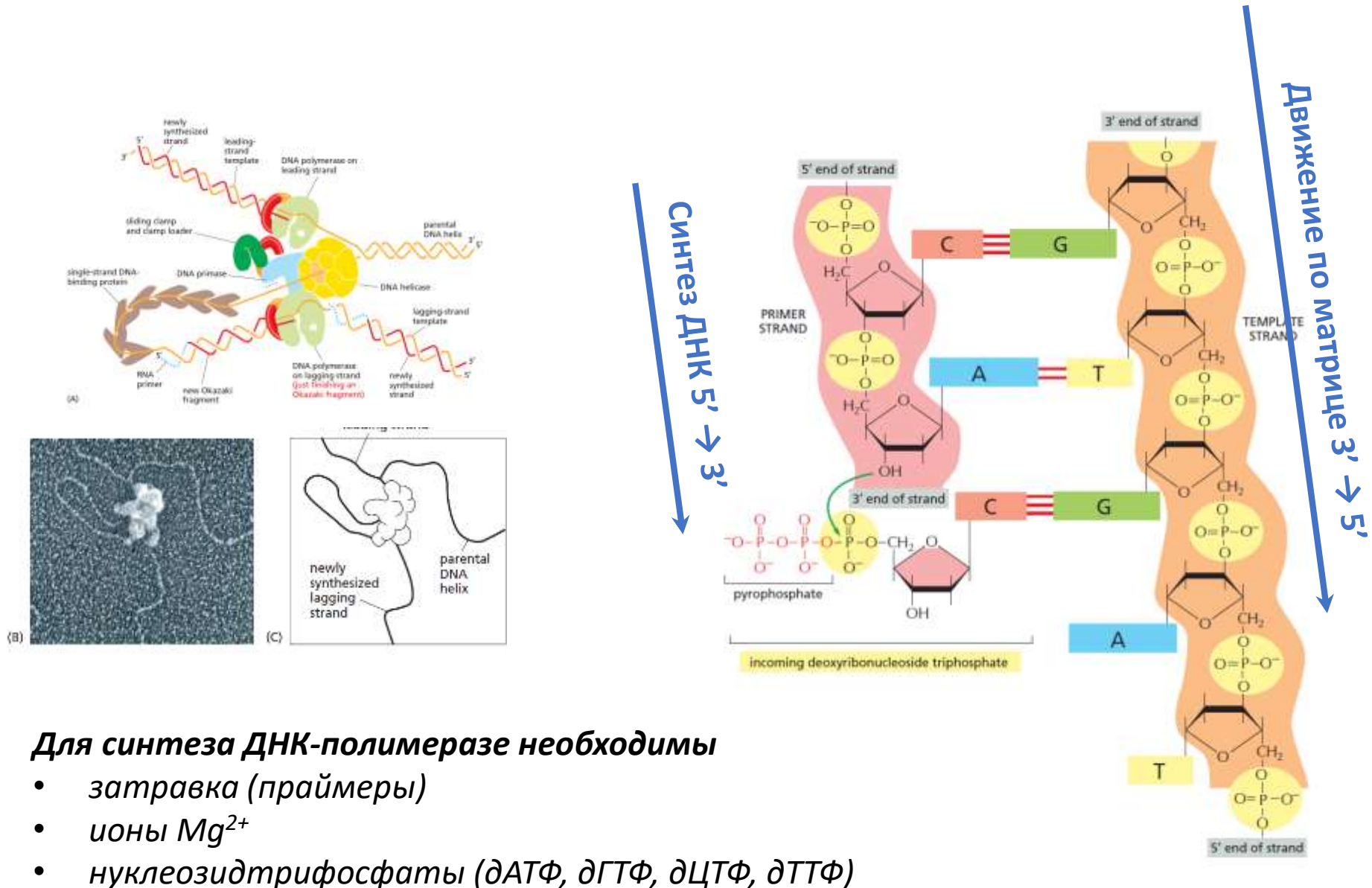


- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1. запаздывающая нить | 7. фрагмент Оказаки |
| 2. лидирующая нить | 8. ДНК-полимераза (Pol δ) |
| 3. ДНК-полимераза (Pol α) | 9. хеликаза |
| 4. ДНК-лигаза | 10. SSB – белки, связывающие одноцепочечную ДНК |
| 5. РНК-праймер | 11. топоизомераза |
| 6. праймаза | |

<https://e-lib.nsu.ru/reader/bookView.html?params=UmVzb3VyY2UtMzQ5OQ/cGFnZTAwMQ>

<https://www.youtube.com/playlist?list=PLcsjsqLLSfNBSQRWQXz0Pgf1ILkFz8GKx>

Репликация ДНК



Для синтеза ДНК-полимеразе необходимы

- затравка (праймеры)
- ионы Mg^{2+}
- нуклеозидтрифосфаты (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ)

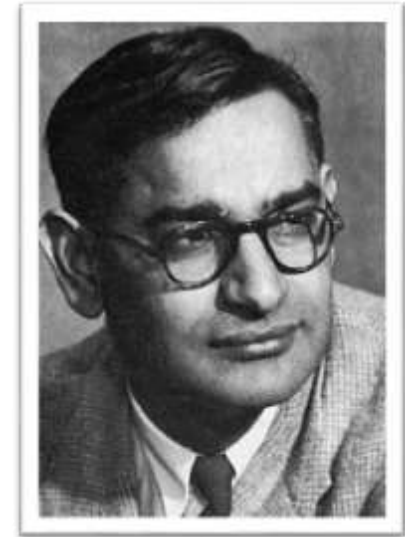
Принципы репликации

1. **Полуконсервативность** — одна цепь молекулы ДНК, образовавшейся в результате репликации, является вновь синтезированной, а вторая — материнской
2. **Матричный синтез** — последовательность синтезируемой цепи ДНК однозначно определяется последовательностью материнской цепи в соответствии с принципом комплементарности
3. **Направленность** — идёт в направлении от 5'-конца новой молекулы к 3'-концу
4. **Потребность в затравке (праймере)** — фермент ДНК-полимераза удлиняет 3'-конец существующей молекулы
5. **Полунепрерывность** — одна из цепей ДНК синтезируется непрерывно, а вторая — в виде набора отдельных коротких фрагментов (фрагментов Оказаки)
6. **Начинается с определённых участков ДНК**, которые называются сайтами инициации репликации

ПЦР: синтез олигонуклеотидов

Предпосылки

- 1960 – Корана разработал методы синтеза ДНК олигонуклеотидов для сборки генов
- 1968 – Нобелевская премия по физиологии и медицине
«за расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белков» (совм. с Холли и Ниренбергом)
- 1971 – синтез короткой ДНК с использованием одного праймера



Хар Гобинд Корана

ДНК → РНК → белок

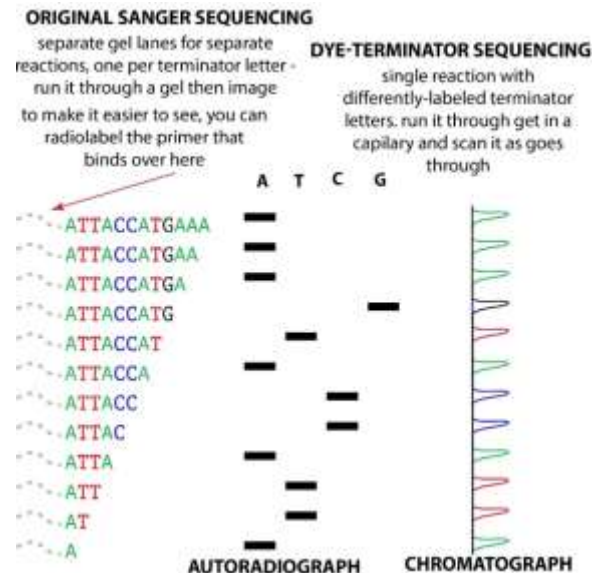
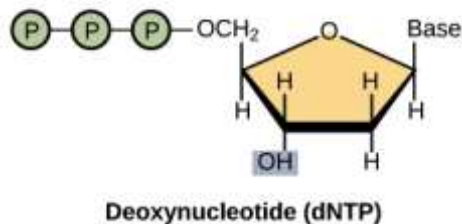
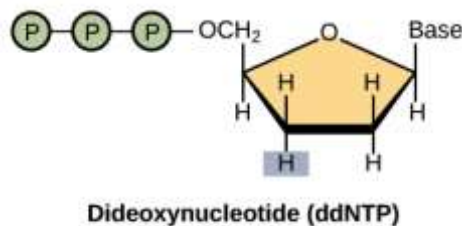
ПЦР: метод Сэнгера

Предпосылки

- 1977 – Сэнгер описал метод определения последовательности ДНК при помощи ддНТФ и радиоактивно меченого олигонуклеотидного праймера (Нобелевская премия по химии 1980)



Фредрик Сэнгер



ПЦР: второй праймер

1983 – Кэри Муллис разрабатывает методику определения мутации, приводящей к серповидноклеточной анемии

- добавляет в метод Сэнгера **второй праймер** для более точной детекции
- добавляет термоциклирование для увеличения количества синтезируемой ДНК

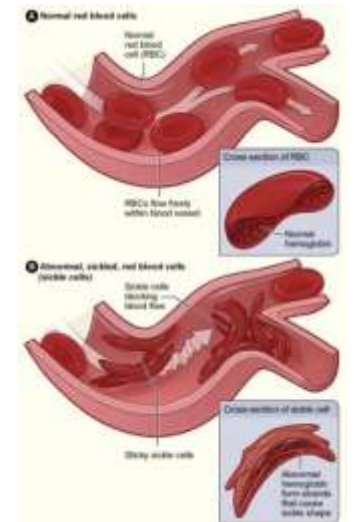
1985–1987 – определение ВИЧ в крови

1987 – выделение и амплификация ДНК из волоса человека

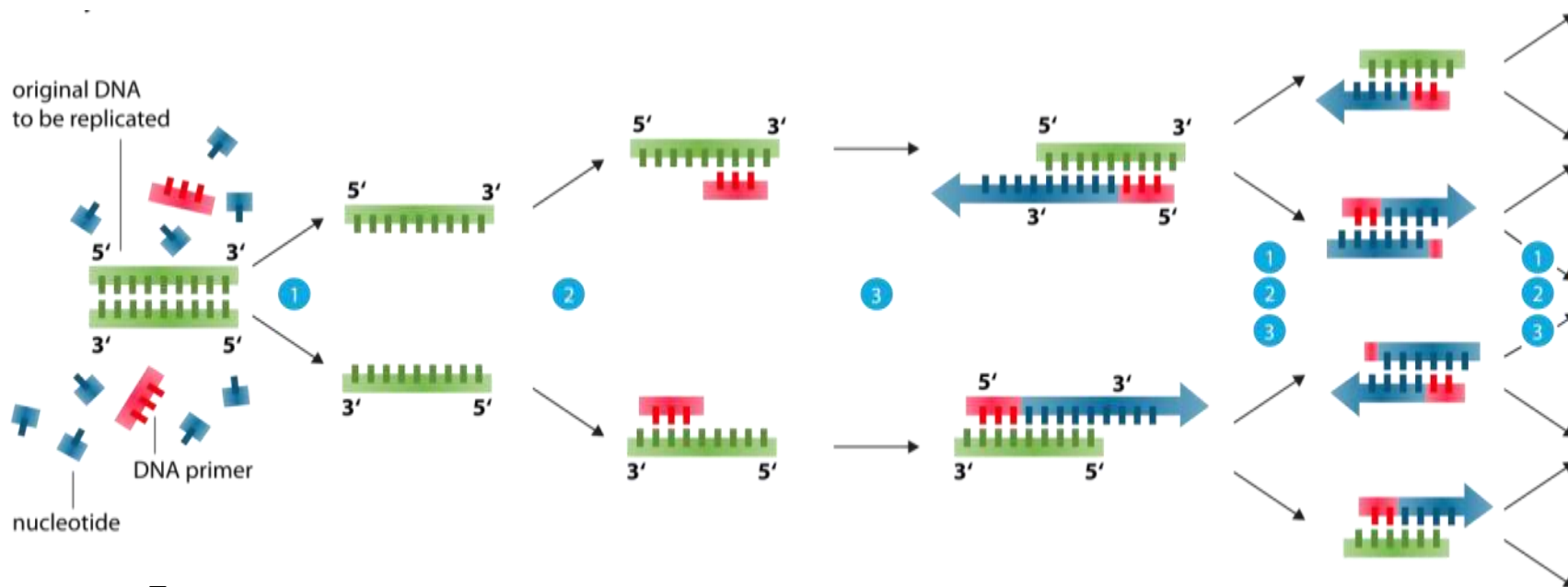
1989 – Таq-полимераза – молекула года по версии Science

1991 – патент на ПЦР продан Roche за 300 млн долларов

1993 – Нобелевская премия по химии присуждена Кэри Муллису



Стадии ПЦР



Денатурация

20 секунд 90 ° C

Элонгация

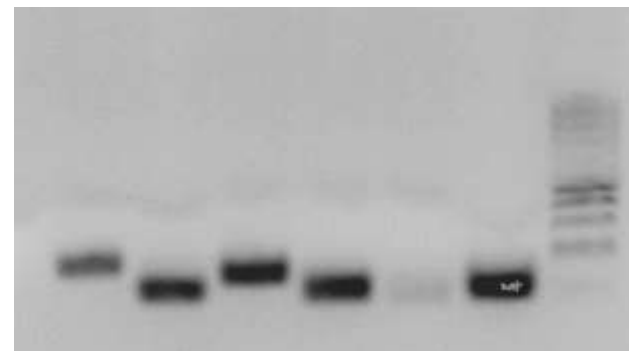
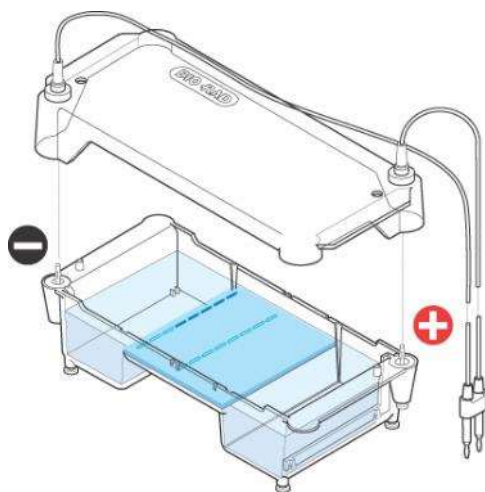
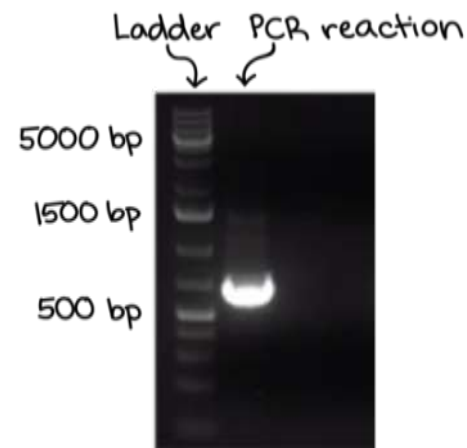
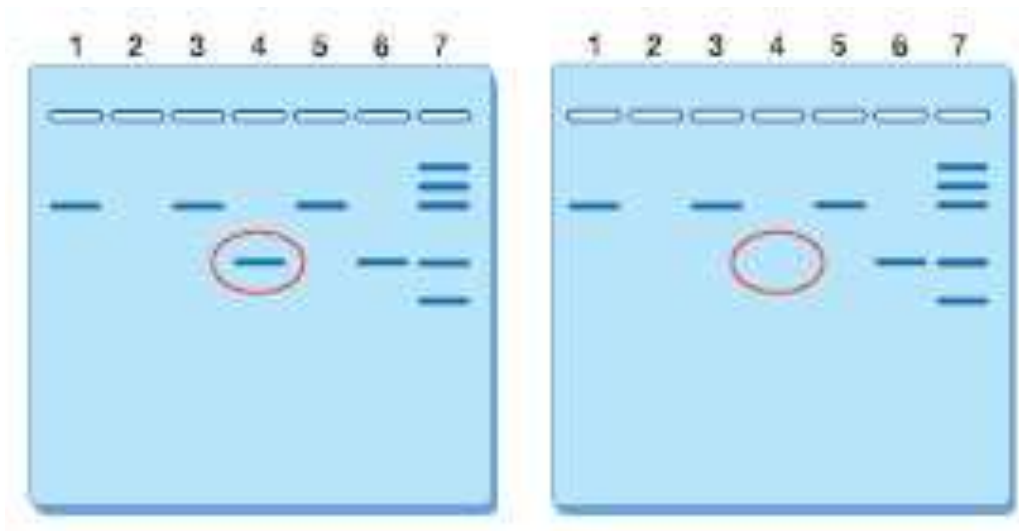
20–60 секунд ~ 72 ° C

Отжиг праймеров

20 секунд ~ 50–60 ° C

20–40 циклов

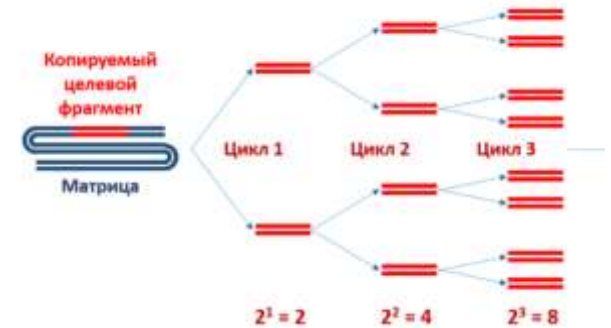
Детекция результатов: электрофорез в агарозном геле



Полимеразная цепная реакция

Количество молекул двуцепочечной ДНК, которые образуются в результате полимеразной цепной реакции (N), описывается формулой, в которой m — исходное число молекул матрицы ДНК, а n — количество циклов ПЦР.

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



Задача. Определите, сколько копий ДНК будет получено к концу 22го цикла ПЦР, если в качестве матрицы использовали 2022 молекулы ДНК.

На каком цикле образуется 1 млрд молекул?

$$N=2^n$$

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

$$m = 10 \text{ нг} = 1000 \text{ шт}$$

n	2 ⁿ
1	2
10	10 ³
20	1·10 ⁶
25	3·10 ⁷
30	1·10⁹
35	3·10 ¹⁰
40	1·10 ¹²

n	2 ⁿ
1	2·10 ³
10	1·10 ⁶
20	1·10⁹
25	3·10 ¹⁰
30	1·10 ¹²
35	3·10 ¹³
40	1·10 ¹⁵

Полимеразная цепная реакция

Задача. Определите, сколько копий ДНК будет получено к концу 20 цикла ПЦР, если в качестве матрицы использовали 2022 молекулы ДНК.

$$n = 30$$

$$m = 2022$$

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

$$N = 2022 \cdot 2^{30} \approx 2^{11} \cdot 2^{30} = 2^{41}$$

	2	2.022	2.02E+03
1	2	2.00E+00	4.044
2	4	4.00E+00	8.088
3	8	8.00E+00	16.176
4	16	1.60E+01	32.352
5	32	3.20E+01	64.704
6	64	6.40E+01	129.408
7	128	1.28E+02	258.816
8	256	2.56E+02	517.632
9	512	5.12E+02	1.035.264
10	1.024	1.02E+03	2.070.528
11	2.048	2.05E+03	4.141.056
12	4.096	4.10E+03	8.282.112
13	8.192	8.19E+03	16.564.224
14	16.384	1.64E+04	33.128.448
15	32.768	3.28E+04	66.256.896
16	65.536	6.55E+04	132.513.792
17	131.072	1.31E+05	265.027.584
18	262.144	2.62E+05	530.055.168
19	524.288	5.24E+05	1.060.110.336
20	1.048.576	1.05E+06	2.120.220.672
21	2.097.152	2.10E+06	4.240.441.344
22	4.194.304	4.19E+06	8.480.882.688
23	8.388.608	8.39E+06	16.961.765.376
24	16.777.216	1.68E+07	33.923.530.752
25	33.554.432	3.36E+07	67.847.061.504
26	67.108.864	6.71E+07	135.694.123.008
27	134.217.728	1.34E+08	271.388.246.016
28	268.435.456	2.68E+08	542.776.492.032
29	536.870.912	5.37E+08	1.085.552.984.064
30	1.073.741.824	1.07E+09	2.171.105.968.128
31	2.147.483.648	2.15E+09	4.342.211.936.256
32	4.294.967.296	4.29E+09	8.684.423.872.512
33	8.589.934.592	8.59E+09	17.368.847.745.024
34	17.179.869.184	1.72E+10	34.737.695.490.048
35	34.359.738.368	3.44E+10	69.475.390.980.096
36	68.719.476.736	6.87E+10	138.950.781.960.192
37	137.438.953.472	1.37E+11	277.901.563.920.384

Полимеразная цепная реакция

Задача. Определите массу продукта ПЦР, если известно, что его длина 300 пар оснований, а молекулярная масса одной пары нуклеотидов – 660 г/моль. Будет ли он виден на агарозном геле (предел чувствительности 50 нг)?

$$\nu = \frac{m}{M_2}$$

$$N = \nu \cdot N_A$$

$$m = \nu \cdot M_2$$

$$\nu = \frac{N}{N_A}$$

$$m = \frac{N}{N_A} \cdot M_2$$

$$M_2 = 660 \cdot 300 = 198 \cdot 10^3 \text{ г/моль}$$

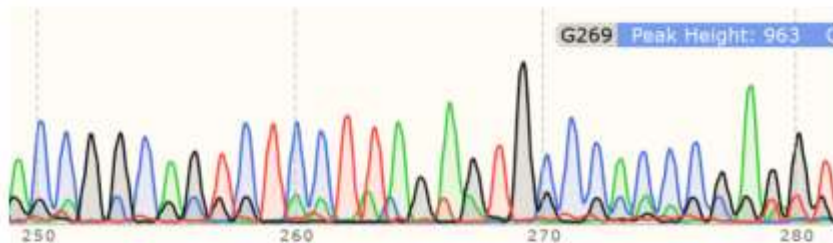
$$m = \frac{2,171 \cdot 10^{12} \text{ моль}}{6,02 \cdot 10^{23}} \cdot 198 \cdot 10^3 \text{ г/моль} = 714 \cdot 10^{-9} \text{ г} = 714 \text{ нг}$$

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 «секвениграмма», 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

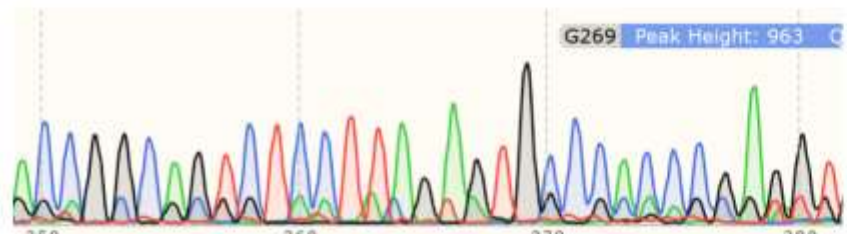
Задача. Определите последовательность и с помощью сервиса BLAST [3] установите, какому гену она принадлежит.

Метод Сэнгера

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:



ACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCAACCGAGGT

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 C

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

Сервис NCBI BLAST

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCAACCGAGGT

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. [Learn more](#)

Web BLAST

Nucleotide BLAST
nucleotide → nucleotide

blastx
translated nucleotide → protein

tblastn
protein → translated nucleotide

Protein BLAST
protein → protein

BLAST Genomes

Enter organism common name, scientific name, or tax id

Human Mouse Rat Monkeys

Search

A new feature was added to the NCBI IgBLAST webpage. The program is now able to determine Ig isotypes. Mon, 01 Nov 2021 12:00:00 EST [More BLAST news...](#)

blastn blastp blastx tblastn tblastn

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), g(x), or FASTA sequence(s) [Clear](#) [Query subpage](#)

ACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCAACCGAGGT

From: To:

Or, upload file [Build query from file](#) [Query via output](#)

Job Title:

Enter a descriptive title for your BLAST search

☐ Align two or more sequences

Choose Search Set

Database: ☒ Standard databases (nt, etc.) ☐ RNAiTS databases ☐ Genomic + transcript databases ☐ RefSeq databases

Nucleotide collection (nr) [?](#)

Organism: [Add organism](#)

Enter organism name or ID-comparator will be suggested

Exclude: ☐ Masks (MMXXP) ☐ Unpublished environmental sample sequences

Limit to: ☐ Sequences from type material

Enter Query: [Create custom database](#)

Enter an E-value query to limit search

Program Selection

Optimize for: ☒ Highly similar sequences (megablast) ☐ More dissimilar sequences (discontiguous megablast) ☐ Somewhat similar sequences (blastn) [Change BLAST algorithm](#)

BLAST Search database Nucleotide collection (nr) using Megablast (Optimize for highly similar sequences) [Show results in a new window](#)

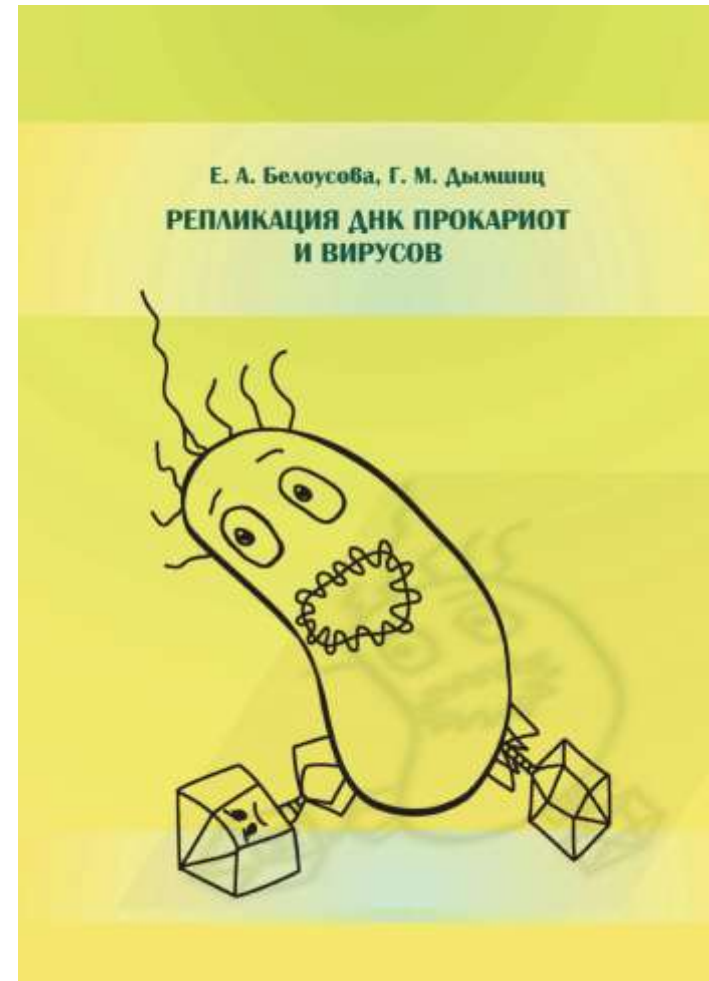
[+ Algorithm parameters](#)

☒ select all 100 sequences selected

[GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [New MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
☒	Pseudomonas sp. strain R21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas sp.	62.1	62.1	100%	4e-07	100.00%	1426	OL546772.1
☒	Pseudomonas sp. strain H6- 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas sp.	62.1	62.1	100%	4e-07	100.00%	1414	OL546651.1
☒	Pseudomonas aeruginosa SG17M chromosome, complete genome	Pseudomonas aeruginosa S...	62.1	186	100%	4e-07	100.00%	6879321	CP080369.1
☒	Pseudomonas sp. strain BTCKTSR_S10P1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas sp.	62.1	62.1	100%	4e-07	100.00%	703	OL477419.1
☒	Pseudomonas sp. strain CQ6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas sp.	62.1	62.1	100%	4e-07	100.00%	1407	OL477309.1
☒	Pseudomonas aeruginosa strain BGS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas aeruginosa	62.1	62.1	100%	4e-07	100.00%	1384	MW857131.2
☒	Pseudomonas aeruginosa strain BGS6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas aeruginosa	62.1	62.1	100%	4e-07	100.00%	1397	MW857138.2
☒	Pseudomonas lalkuanensis strain ACYW190 chromosome, complete genome	Pseudomonas lalkuanensis	62.1	310	100%	4e-07	100.00%	5837226	CP084625.1
☒	Pseudomonas aeruginosa strain Dokkai 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas aeruginosa	62.1	62.1	100%	4e-07	100.00%	1374	OK383444.1
☒	Pseudomonas aeruginosa strain CAB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudomonas aeruginosa	62.1	62.1	100%	4e-07	100.00%	1255	OK360621.1

Электронные учебные пособия по молекулярной биологии



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](#) ▾

shop.prosv.ru

Пособия и сборники задач для организации естественно-научного, технологического и медицинского профиля



shop.prosv.ru

Дополнительные сервисы для педагогов на сайте

Приобретение

Интернет-магазин



shop.prosv.ru



Гос. контракты

Начальник отдела
Трофимова Галина Владимировна
+7 (495) 789-30-40
(доб. 41-44)
GTrofimova@prosv.ru



Пакет документов



cloud.prosv.ru/s/jTekWj8XtN3TpCA

Приобрести учебники и учебные пособия можно в официальном интернет-магазине издательства

shop.prosv.ru

По вопросам оформления государственных контрактов обращайтесь к начальнику отдела по работе с клиентами Трофимовой Галине Владимировне, тел.: +7 (495) 789-30-40 (доб. 41-44); e-mail: GTrofimova@prosv.ru

В помощь образовательной организации пакет документов по: покупке, постановке на учёт дополнительных учебных пособий



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