

# Опыт Мезельсона и Сталя

## Ход эксперимента

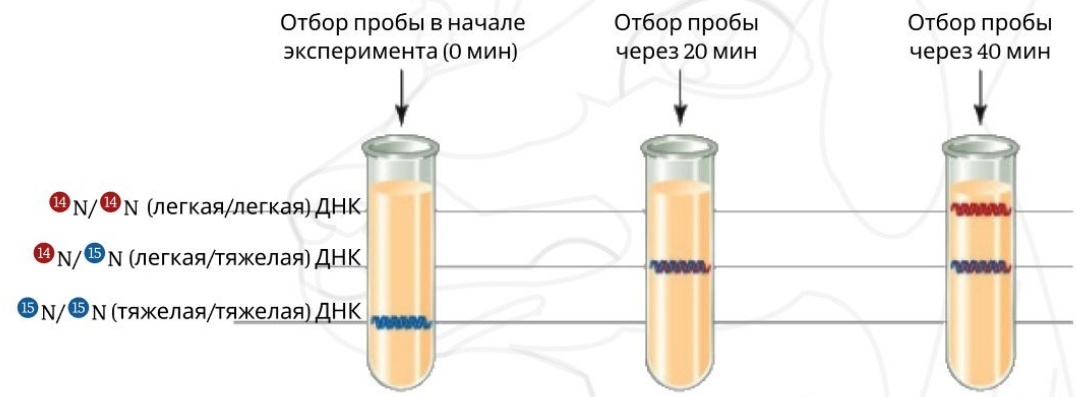
Сначала бактерий выращивали на питательной среде с тяжелым изотопом  $^{15}\text{N}$



Затем бактерий перенесли на питательную среду с легким изотопом азота  $^{14}\text{N}$  для двукратного деления

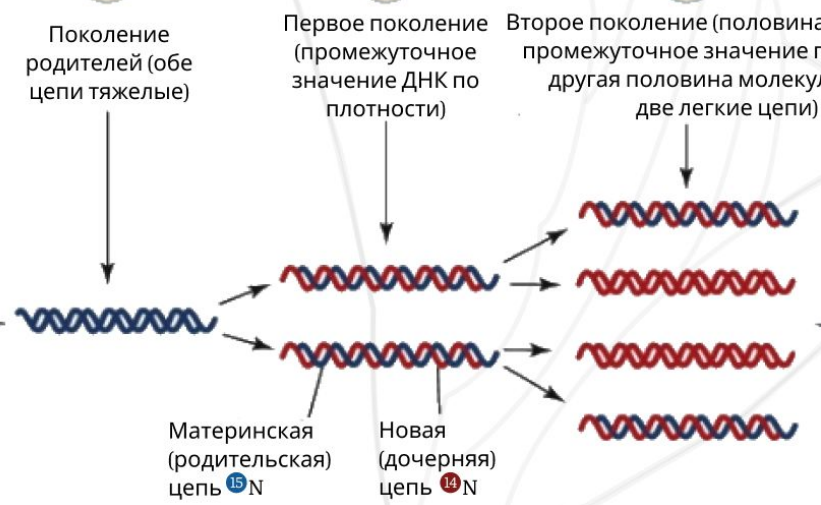
При благоприятных условиях бактерии делятся каждые 20 мин, таким образом, через 20 мин и 40 мин после начала эксперимента бактерии пройдут 1 и 2 цикла репликации соответственно.

## Результаты центрифугирования бактериальной ДНК



## Выводы

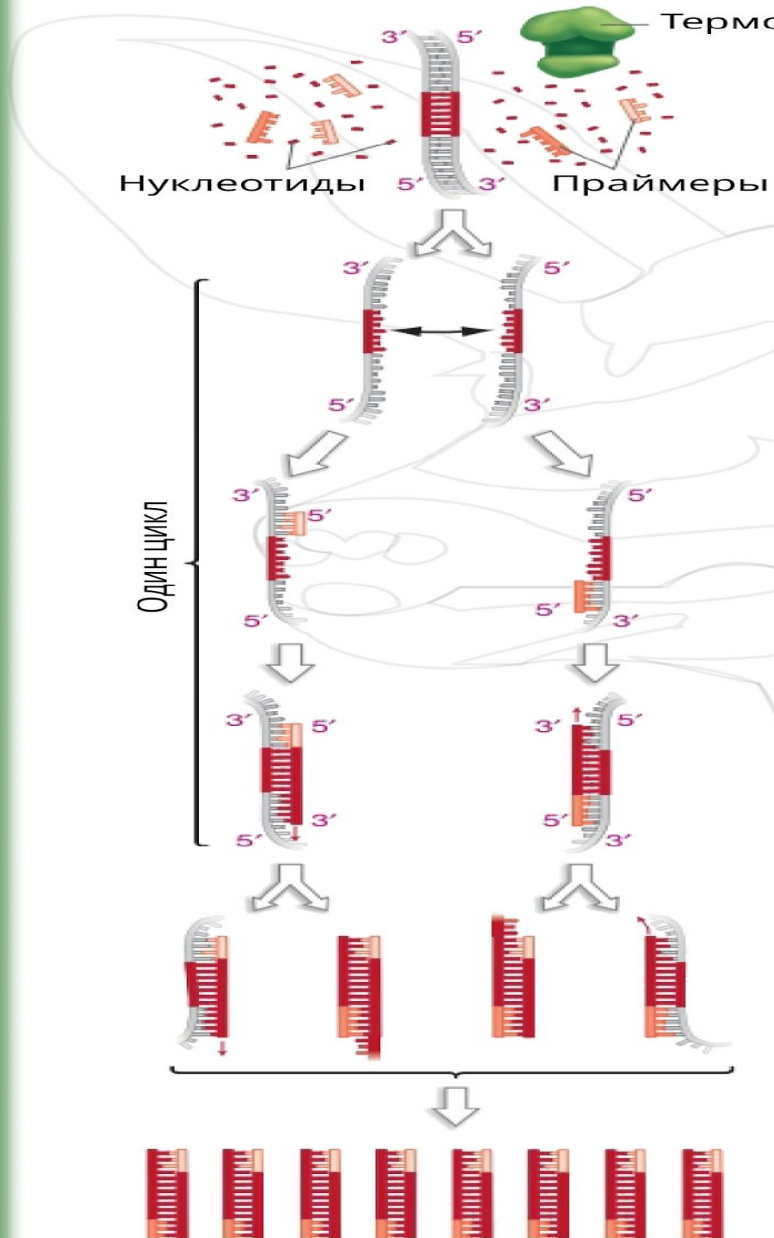
Т.к. бактерии росли на среде с тяжелым изотопом  $^{15}\text{N}$ , то именно его они использовали для построения двухцепочечной ДНК



После двух раундов репликации получится 4 новые молекулы ДНК, две из которых будут иметь промежуточное значение по массе (одна цепь легкая, другая тяжелая  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ), а две другие будут занимать более высокое положение при центрифугировании, т.к. имеют самую низкую плотность (обе цепи легкие  $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$ )

# ПЦР (полимеразная цепная реакция)

Метод основан на **многократной репликации** участка ДНК в пробирке с целью получения **большого количества копий** исследуемого образца



1. В исходном растворе находится ДНК-матрица (исследуемый образец), праймеры (короткие участки для начала репликации), ДНК-полимераза, весь набор нуклеотидов

2. **Денатурация.** При нагревании пробы водородные связи между нуклеотидами разрываются, что приводит к денатурации (расхождению) двух цепей ДНК.

3. **Отжиг праймеров.** При незначительном понижении температуры происходит присоединение праймеров к одноцепочечным фрагментам ДНК по принципу комплементарности.

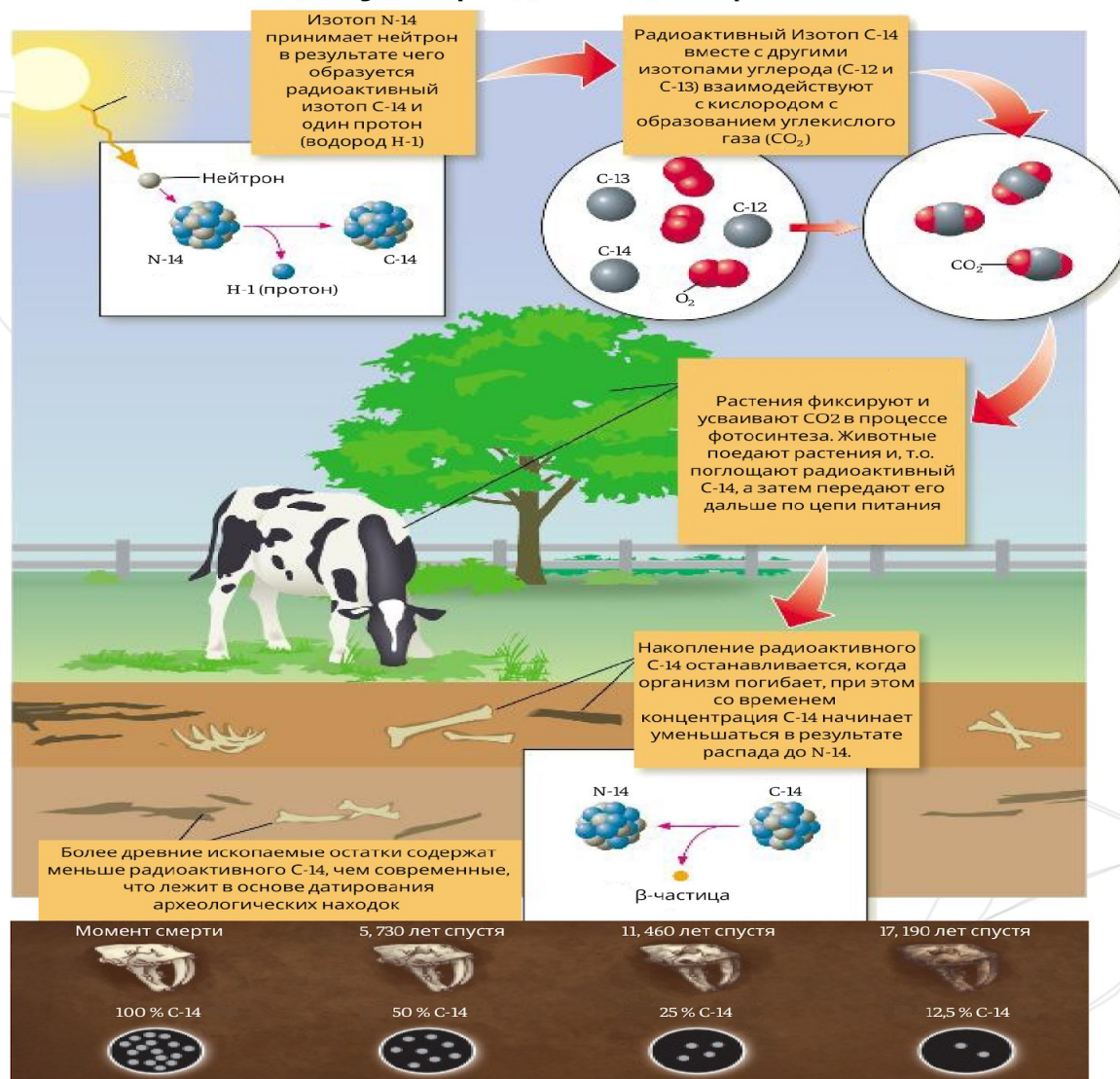
4. **Элонгация.** ДНК-полимераза с использованием нуклеотидов достраивает дочерние цепи ДНК по принципу комплементарности.

5. Повторение цикла (шаги 2-4) приводит увеличению количества копий в 2 раза

6. Многократное повторение цикла (20-30 раз) приводит к получению миллиона копий исходного фрагмента ДНК ( $2^n$ , где  $n$  – количество циклов).



# Радиоуглеродное датирование



В чем суть радиоуглеродного датирования в палеонтологии? Для чего используют этот метод? Почему используют именно углерод?

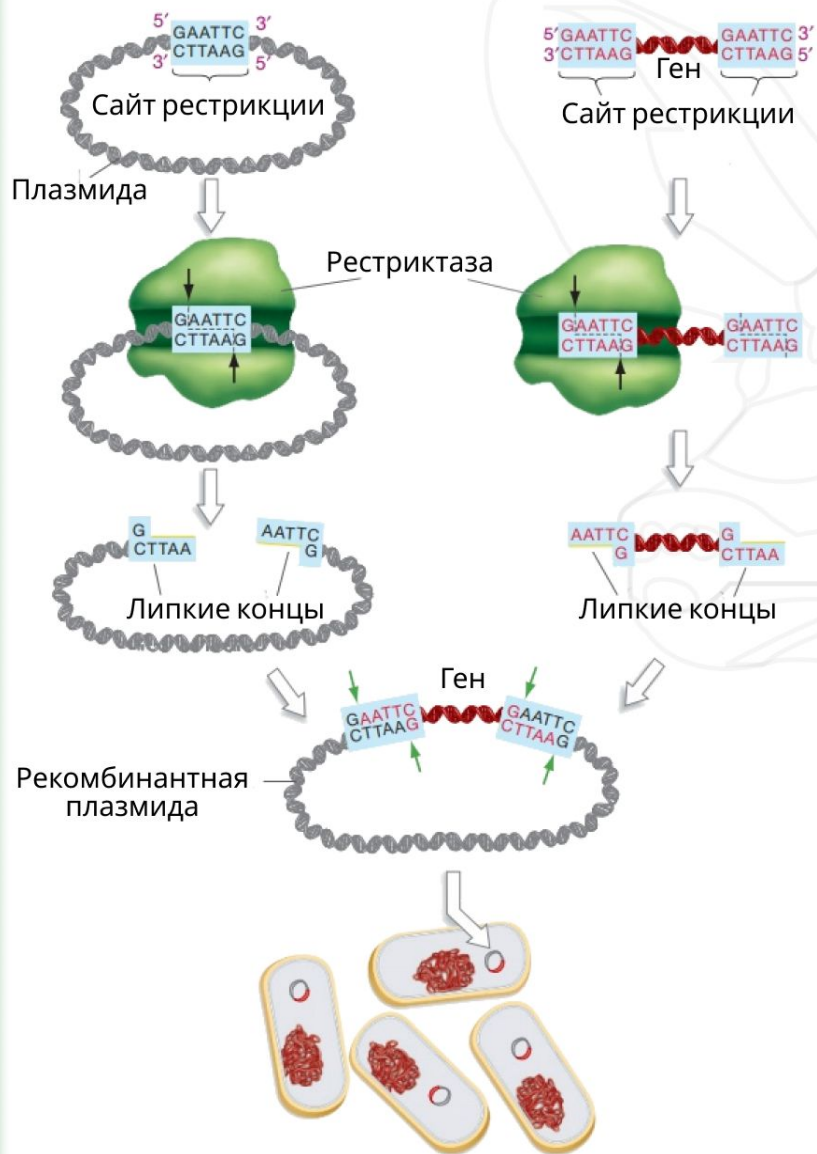
**Элементы ответа:**

- 1) метод используется для определения возраста ископаемых остатков;
- 2) метод основан на радиоактивных свойствах одного из изотопов углерода;
- 3) в течении жизни организмы потребляют обычный и радиоактивный углерод;
- 4) со временем радиоактивный углерод распадается, а нерадиоактивный — нет;
- 5) по соотношению радиоактивного углерода и стабильного изотопа углерода можно определить возраст ископаемых остатков.





# Рестрикция и клонирование



**1. Определение сайта рестрикции.** Плазмида (слева) содержит определенную последовательность нуклеотидов, которую распознает фермент рестриктаза. Эта последовательность называется сайтом рестрикции. Аналогичные сайты рестрикции имеются в гене (справа), который необходимо вставить в плазмиду.

**2. Добавление рестриктазы.** Рестриктаза узнает сайты рестрикции и делает разрезы в ДНК.

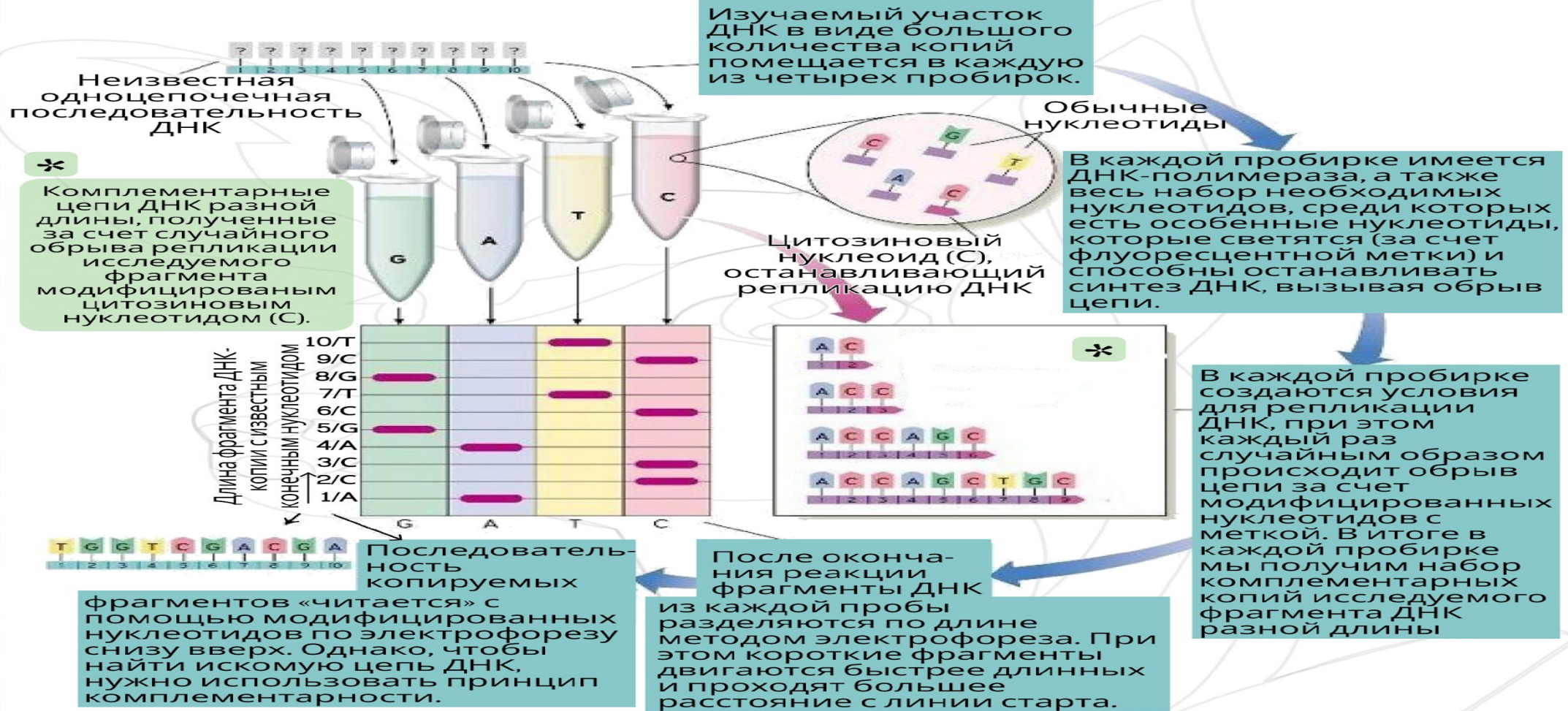
**3. Образование «липких концов».** Образование разрезов в ДНК приводит к образованию «липких концов», которые способны соединиться за счет восстановления водородных связей по принципу комплементарности.

**4. Внедрение гена в плазмиду.** Липкие концы плазмиды и гена совпадают по принципу комплементарности. Фермент ДНК-лигаза соединяет концы гена и плазмиды друг с другом за счет образования фосфодиэфирных связей по позициям, обозначенным на рисунке зелеными стрелками. Такая плазмида с новым геном называется рекомбинантной.

**5. Внедрение рекомбинантной плазмиды в бактерию (клонирование).** Через бактериальные клетки проводят электрический импульс, что ведет к возникновению повреждений в клеточной стенке и мембране, через которые рекомбинантная плазмида попадает в цитоплазму. Клетки бактерий, получившие плазмиду с геном, начинают размножаться на питательной среде, копировать ДНК и передавать рекомбинантную плазмиду своим потомкам.



# Секвенирование по Сэнгеру



Рассмотрите таблицу “Методы биологических исследований”. Запишите в ответ пропущенный термин, обозначенный в таблице вопросительным знаком.

Частнонаучный метод	Применение метода
близнецовый	Определение степени влияния среды на монозиготных близнецов
?	Определение последовательности нуклеотидов в ДНК с использованием флуоресцентных меток

Ответ: секвенирование





# Хроматография

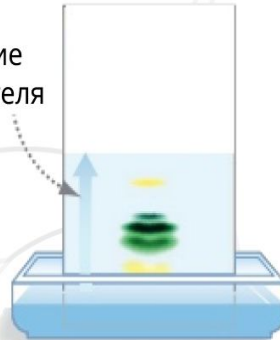


① Зеленые листья измельчаются в присутствии органического растворителя, таким образом пигменты листа переходят в раствор, т.е. экстрагируются.

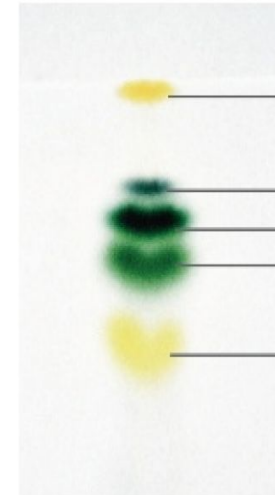


② Экстракт пигментов наносится на линию старта хроматографической бумаги.

Движение растворителя



③ Хроматографическая бумага помещается в ёмкость с органическим растворителем, в результате чего растворитель начинает подниматься вверх по хроматографической бумаге, увлекая за собой пигменты, которые будут двигаться с различной скоростью и, таким образом, разделяться. Скорость движения пигментов зависит от их массы, чем она меньше, тем выше скорость и тем дальше поднимется пигмент от линии старта.



Каротин

Феофитин

Хлорофилл а

Хлорофилл в

Ксантофилл

Учёный выделил пигменты фотосинтеза из листа растения. Каким методом он мог бы разделить их? На чём основан этот метод?

**Элементы ответа:**

1) метод хроматографии

2) метод основан на разделении пигментов из-за различий в скорости движения пигментов в растворителе (подвижной фазы по неподвижной фазе).



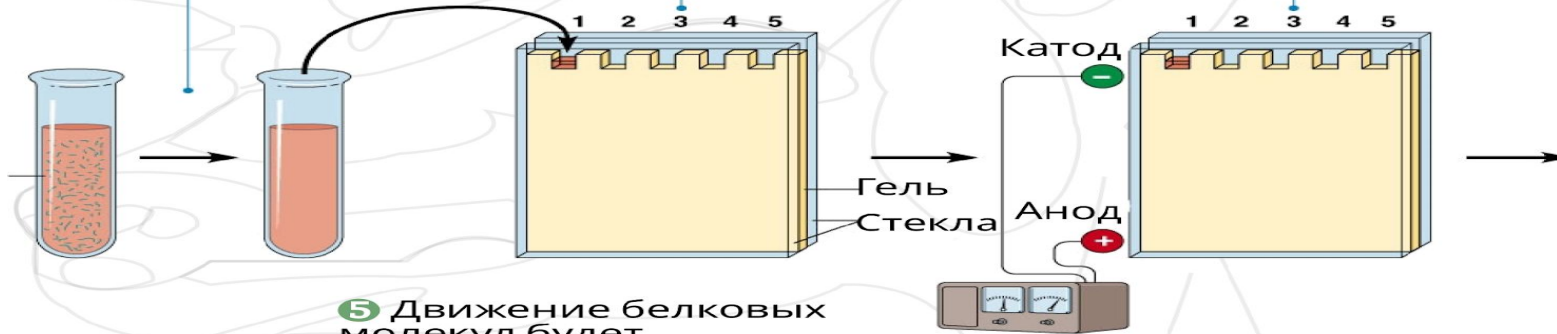
# Метод электрофореза

Метод основан на разделении белков и нуклеиновых кислот по массе под воздействием электрического тока

1 Белки отличаются по массе, форме и заряду. Чтобы разделение происходило только по массе, белки обрабатываются раствором SDS, молекулы которого несут отрицательный заряд. После обработки все белки несут отрицательный заряд и имеют нитевидную (фибрилярную) форму.

2 Пробы белка наносят на линию старта в лунки геля, зажатого между двух стекол.

3 Камеру для электрофореза подключают к источнику тока таким образом, чтобы катод (-) располагался у верхнего полюса геля, а анод (+) у нижнего



4 Это приводит к тому, что молекулы белка, заряженные отрицательно, начинают двигаться в электрическом поле от катода (-) к аноду (+), т.е. сверху вниз по гелю

5 Движение белковых молекул будет приводить к их разделению: молекулы с малой молекулярной массой будут двигаться быстрее, чем молекулы с большой массой, и пройдут большее расстояние от линии старта.

6 После окончания электрофореза гель фиксируется и окрашивается, чтобы позиции молекул были хорошо различимы

