

Опыт Мезельсона и Сталя

Ход эксперимента

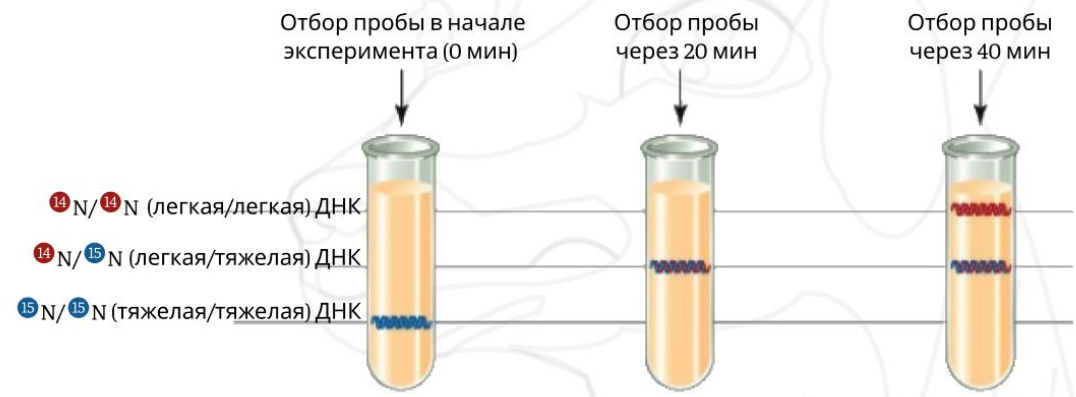
Сначала бактерий выращивали на питательной среде с тяжелым изотопом ^{15}N



Затем бактерий перенесли на питательную среду с легким изотопом азота ^{14}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



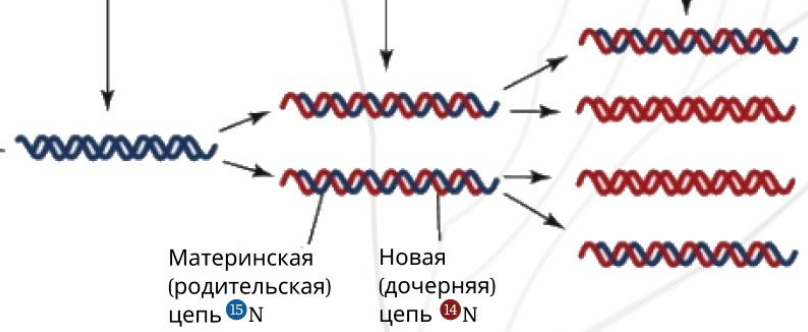
Поколение родителей (обе цепи тяжелые)

Первое поколение (промежуточное значение ДНК по плотности)

Второе поколение (половина ДНК имеет промежуточное значение плотности, другая половина молекул имеет две легкие цепи)

Выводы

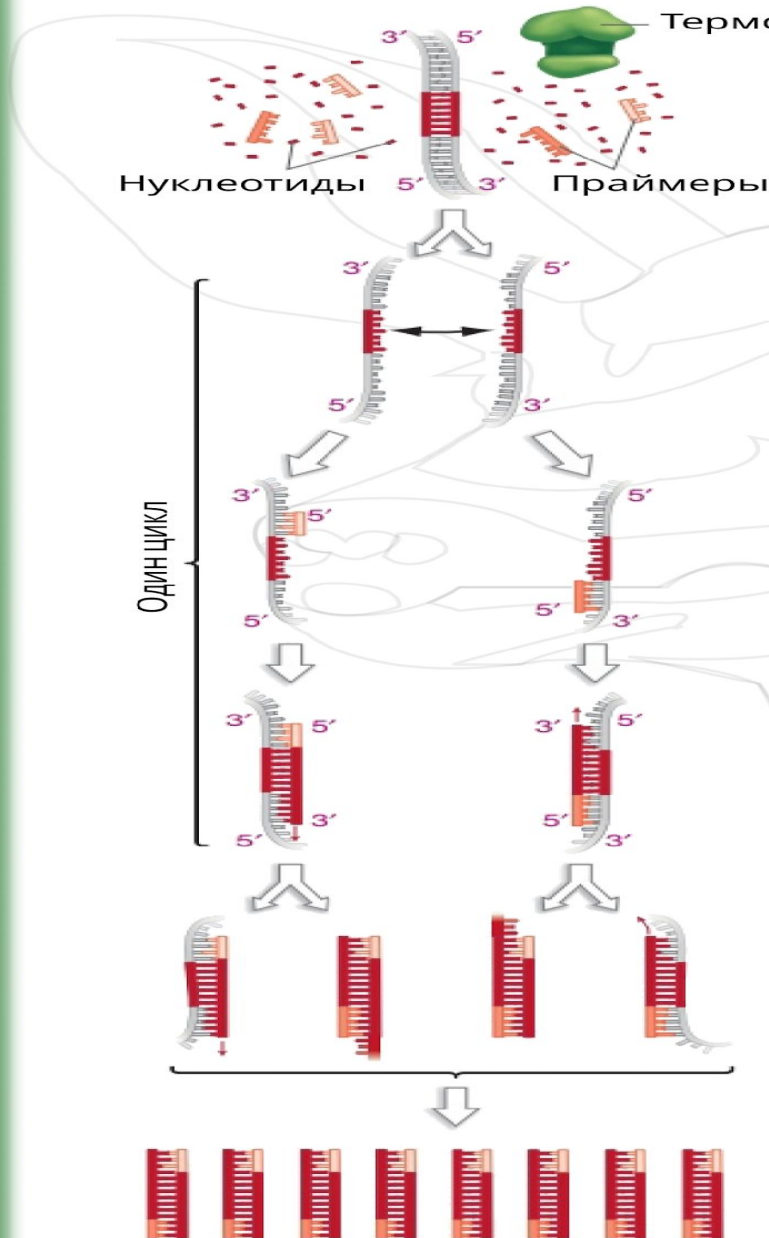
Т.к. бактерии росли на среде с тяжелым изотопом ^{15}N , то именно его они использовали для построения двухцепочечной ДНК



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.

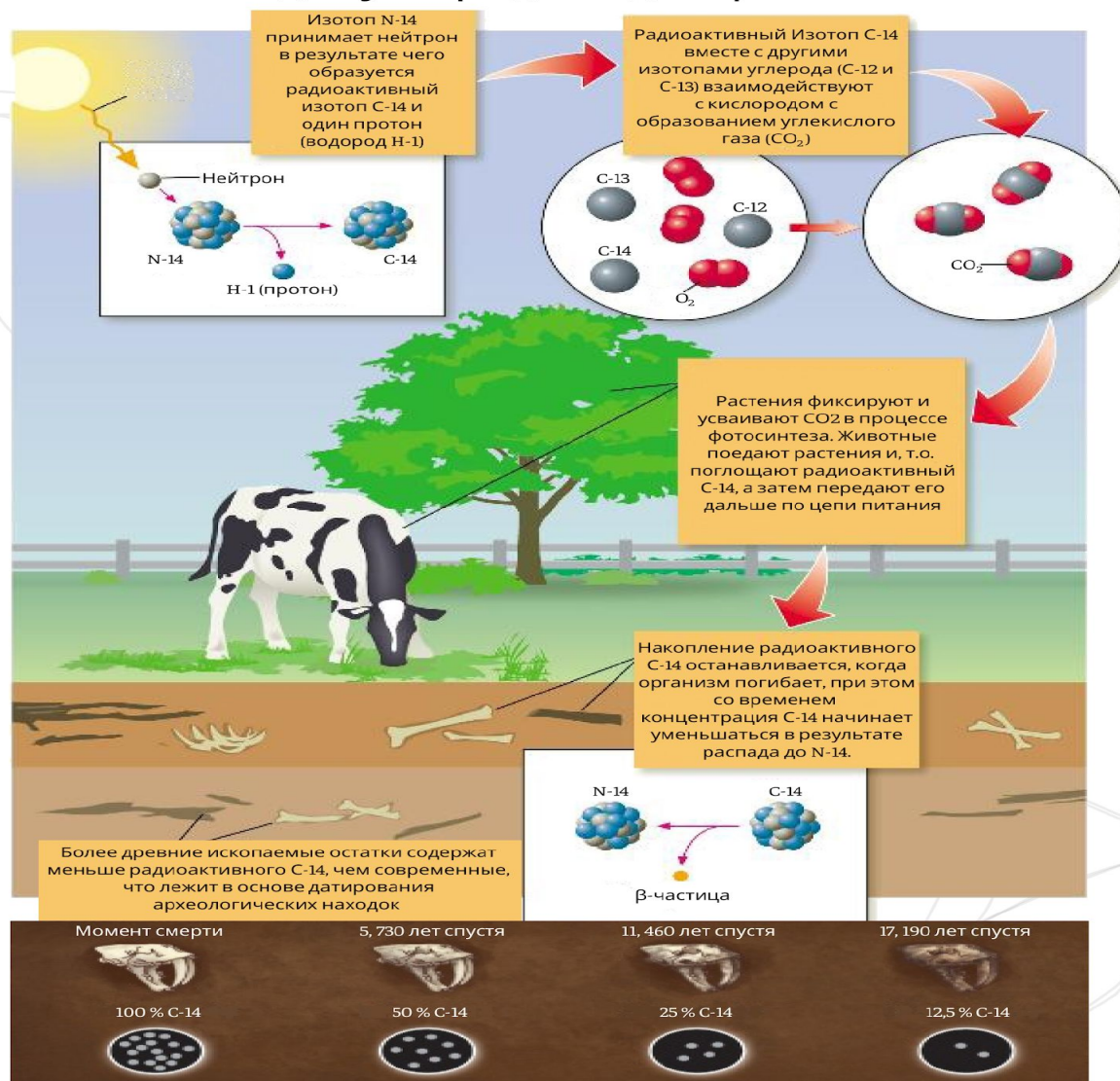
4. **Элонгация.** ДНК-полимераза с использованием нуклеотидов достраивает дочерние цепи ДНК по принципу комплементарности.

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



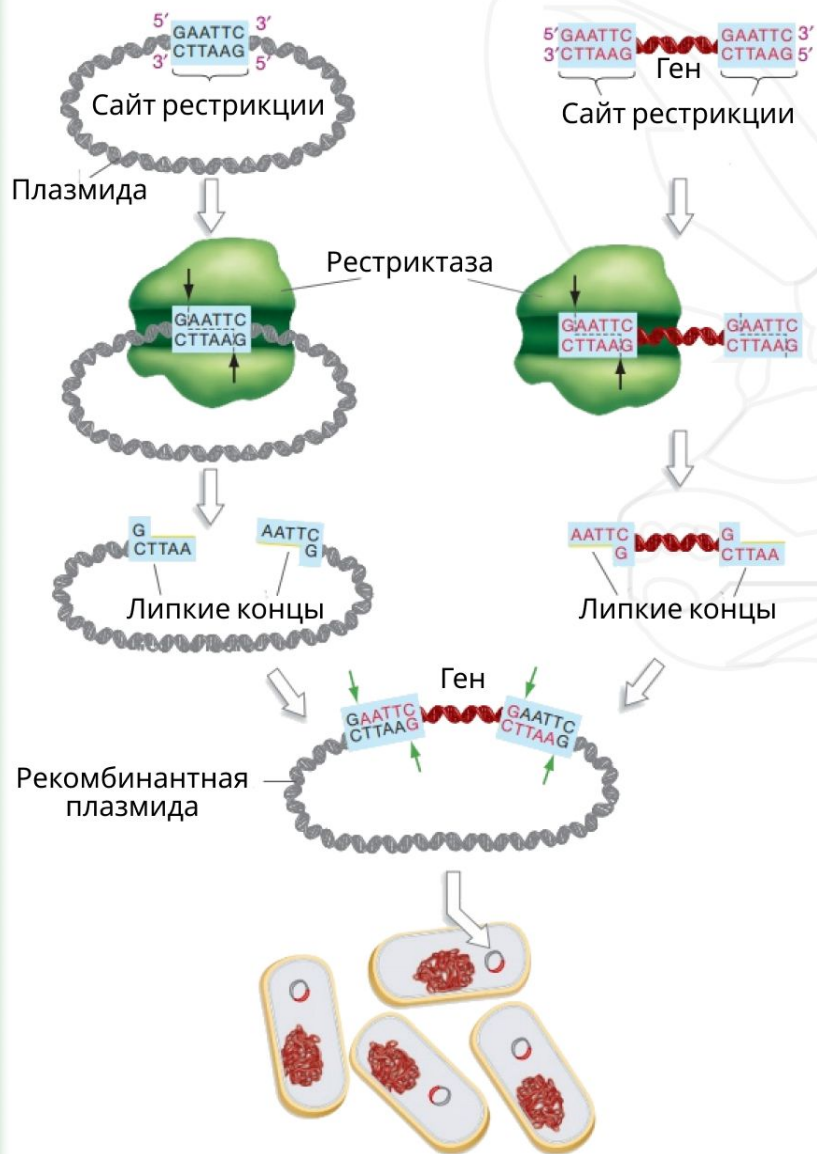
В чем суть радиоуглеродного датирования в палеонтологии? Для чего используют этот метод? Почему используют именно углерод?

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.

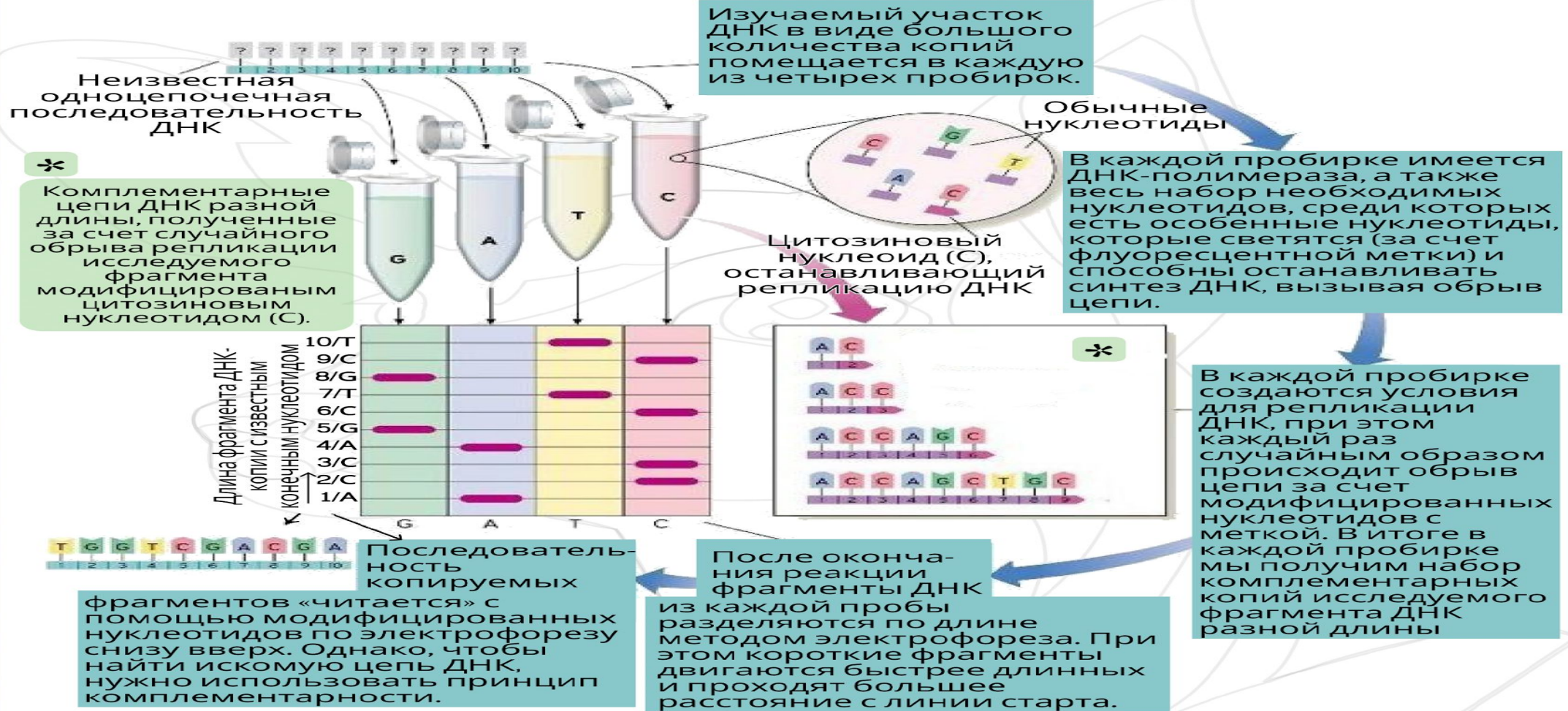
3. Образование «липких концов». Образование разрезов в ДНК приводит к образованию «липких концов», которые способны соединиться за счет восстановления водородных связей по принципу комплементарности.

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

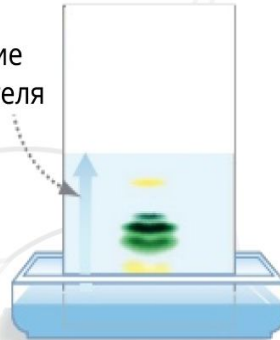


① Зеленые листья измельчаются в присутствии органического растворителя, таким образом пигменты листа переходят в раствор, т.е. экстрагируются.

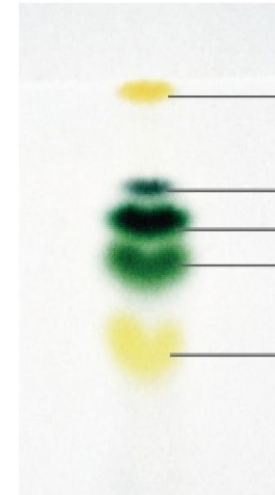


② Экстракт пигментов наносится на линию старта хроматографической бумаги.

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).



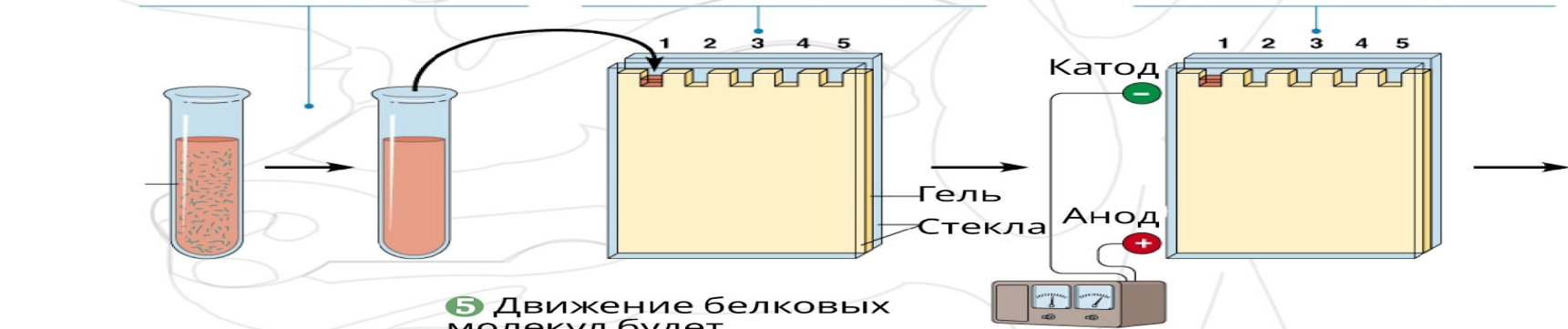
Метод электрофореза

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 (фибриллярную) 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

