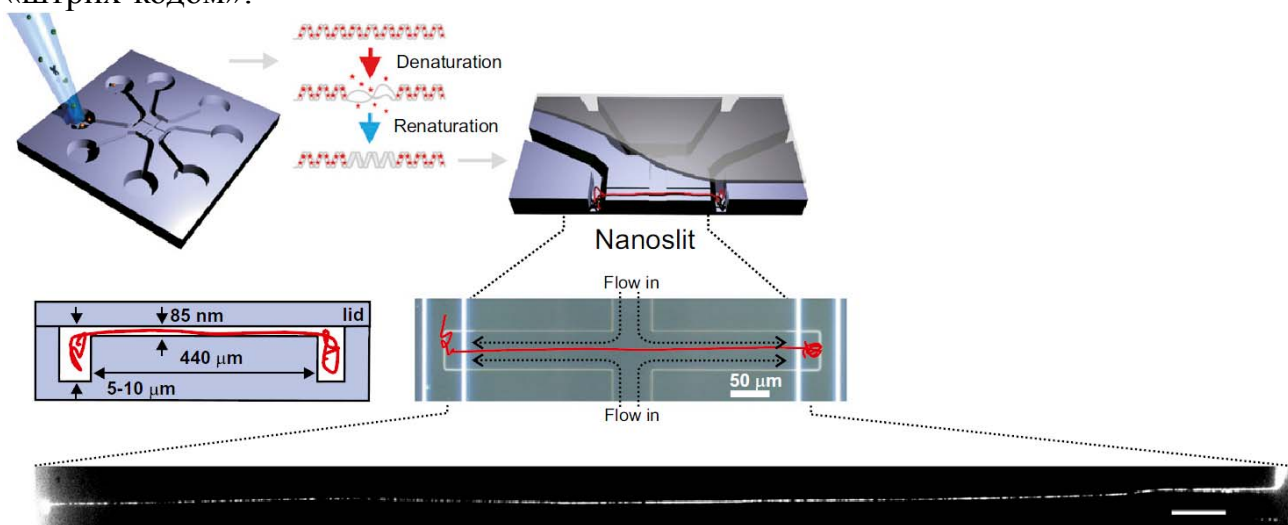


### Задача 8. ДНК: точки и тире. (10 баллов).

Множество ученых занимаются созданием новых способов определения последовательности ДНК. Геном человека давно расшифрован, но для медицинских (и других) целей важно быстро и дешево определять последовательность ДНК для очень малых количеств образца (например, расшифровать последовательность ДНК из одной клетки). Интересный способ определения последовательности ДНК, а также наличия мутаций в ней, придумали датские ученые и их коллеги из других стран. Хромосомы выделяют из клетки и помещают в специальную ячейку, представляющую собой систему микро- и наноразмерных каналов. Потоком жидкости молекулы ДНК направляются к системе нанощелей (nanoslits), в которых молекула ДНК вытягивается во всю длину, расправляется и так же потоком жидкости удерживается на месте. Концы такой вытянутой двойной спирали остаются в виде свернутых «клубочков» по краям щели. Перед внесением ДНК в ячейку ее окрашивают специальными интеркалирующими флуоресцентными красителями, которые удерживаются между нитями ДНК (между азотистыми основаниями) в двойной спирали. Далее ячейку нагревают, и отдельные участки ДНК «плавятся» (денатурируют), нити ДНК отделяются одна от другой и молекулы флуоресцентного красителя «вываливаются» из молекулы ДНК. Затем температуру снижают, и молекула ДНК ренатурирует, т.е. приобретает исходную двунитевую структуру, однако теперь в ней есть участки, которые не содержат флуоресцентного красителя. После этого снимают изображение такой полностью вытянутой в длину молекулы ДНК при помощи обычного флуоресцентного микроскопа и получают «пунктирную» линию, имеющую светлые участки (там, где молекулы флуоресцентного красителя встроены в двунитевую спираль и дают флуоресцентный сигнал) и темные (там, где ДНК «расплавилась» при нагревании и потеряла флуоресцентную краску). Назовем эту картинку картой денатурации ДНК, ее также можно образно назвать «штрих-кодом».



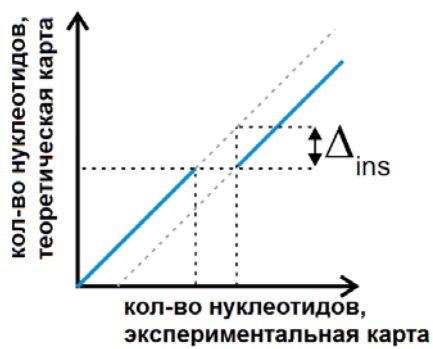
Для получения лучшего разрешения такую картинку снимают на видео и

усредняют во времени. При необходимости можно сместить участок ДНК, попадающий в нанощель – для этого надо потоком жидкости «развернуть» клубочек на одном из концов молекулы и протащить его дальше через щель. После того, как необходимые данные получены, молекулу ДНК можно «выдуть» потоком жидкости из ячейки и использовать для дальнейших исследований. При необходимости определить наличие мутаций в структуре ДНК полученную карту денатурации ДНК с гипотетическими мутациями сравнивают с теоретической, рассчитанной для уже известной последовательности той же ДНК без мутаций.

Вопросы:

1. Какие способы определения последовательности ДНК Вы знаете? Объясните вкратце, как они работают? **1 балл.**
  2. Как Вы думаете, какие предварительные процедуры обработки необходимы на этапе от экстракции хромосом из клетки до получения флуоресцентной карты денатурации ДНК? **1 балл.**
  3. Какими характеристиками (свойствами) должен обладать флуоресцентный краситель? **1 балл.**
  4. Как отличаются светлые и темные участки ДНК (окрашенные и неокрашенные) по составу? Какие участки будут оставаться окрашенными? Почему? **1 балл.**
- Какое разрешение (по количеству нуклеотидов) будет иметь этот метод: какой минимальный размер мутации может быть определен? Какую длину нуклеотидной последовательности можно проанализировать при помощи ячейки, приведенной на рисунке (длина нанощели 440 мкм)? **1 балл.**
5. Почему необходимо, чтобы ДНК ренатурировала (восстановила свою структуру после плавления) перед тем, как регистрировать карту денатурации? **1 балл.**

При определении наличия мутаций в фрагменте ДНК сравнивают теоретически построенную карту денатурации для фрагмента без мутаций и полученную в результате эксперимента для фрагмента с мутациями. Для этого определяют положение на той и другой карте, где “паттерн” свечения совпадает максимально (т.е. светлые точки на экспериментальной карте – светлые и на теоретической). Если в экспериментальном образце ДНК имеется мутация – вставка фрагмента ДНК (инсерция), то на графике положения максимального совпадения паттернов свечения можно видеть следующую картину:



6. Как будет выглядеть подобная зависимость для случая делеции? Для случая инверсии? **2 балла.**
7. Как можно использовать молекулы ДНК, которые в неизменном виде эвакуируются из ячейки после регистрации карты денатурации ДНК? **1 балл.**
8. Какие преимущества и недостатки Вы можете предположить у такого метода анализа последовательности ДНК? **1 балл.**