

Полимеразная цепная реакция – от теории к решению олимпиадных задач

Скриган Екатерина Анатольевна (учитель биологии, ГУО Лицей №1 г. Минска., Ph.D)
E-mail: skryhan.katsiaryna@gmail.com

Введение

Задания, требующие понимания механизма полимеразной цепной реакции (ПЦР), все чаще встречаются на биологических олимпиадах. Как у учащихся, так и у учителей данные задания вызывают затруднения по ряду вполне понятных причин. Во-первых, как многие другие разделы молекулярной биологии, тема ПЦР не представлена ни в школьных учебниках, ни в большинстве школьных пособий по биологии. Во-вторых, у многих учителей биологии нет опыта решения задач на ПЦР (например, учились в вузе тогда, когда эту тему еще не проходили). В-третьих, в данной теме встречается большое количество специфических понятий и терминов. Цель этой статьи – разъяснить процесс полимеразной цепной реакции и прокомментировать решение типичных задач.

Статья состоит из двух блоков – теоретического и практического. В теоретической части подробно изложены ответы на вопросы: что такое ПЦР, как она проводится, что именно происходит в пробирке и для чего применяют ПЦР. В практической части приведены олимпиадные задачи, с ответами и комментариями к решению. Автор предполагает, что после прочтения этой статьи читатель овладеет базовыми знаниями по теме ПЦР, достаточными для того, чтобы большинство олимпиадных заданий из сложных и непонятных превратились в доступные и даже увлекательные.

Зачем нужна ПЦР?

Представьте себе несколько ситуаций. Ситуация первая: человек заразился серьезной вирусной инфекцией, симптомы которой не выражены или похожи на симптомы других заболеваний. Еще тридцать лет назад приходилось бы ждать развития заболевания и появления ярко выраженных специфических симптомов. В настоящее время для многих вирусных заболеваний можно максимально быстро и точно определить возбудителя уже на первых этапах развития заболевания и назначить подходящее лечение.

Ситуация вторая: на месте преступления был найден только один волос преступника. Есть ряд подозреваемых, которые с одинаковой вероятностью могут быть причастны к злодеянию. Еще недавно подобная ситуация завела бы следствие в тупик, но сейчас, при обнаружении хотя бы малых количеств биологического материала преступника (волос, капля крови, частицы кожи), можно достоверно определить истинного виновника.

Ситуация третья: археологи нашли среди изучаемых окаменелостей около десяти копий молекулы ДНК неизвестного вымершего организма. Еще несколько десятилетий назад данная находка была бы бесполезна для ученых. В настоящее же время даже такого маленького количества ДНК достаточно, чтобы провести анализ, например, на предмет определения родства с ныне живущими организмами.

И во всех этих случаях на помощь приходит полимеразная цепная реакция. Каким образом? Давайте подумаем, что объединяет эти три ситуации? Верно, ничтожно малое количество генетического материала. ПЦР чудесным образом увеличивает количество генетического материала. Встречается даже такое образное описание ПЦР: *это метод, с помощью которого ученые могут находить иглу в стогу сена и затем строить стог из этих игл*. Если продолжать аналогию, то игла – это интересующий нас фрагмент генетического материала, а стог сена – вся ДНК человека или другого организма, в котором данный фрагмент нужно отыскать.

Что такое ПЦР

Давайте вначале попытаемся извлечь максимум информации из самого названия метода. Уже упоминалось, что аббревиатура ПЦР (произносим «пэ-цэ-эр») обозначает «**П**олимеразная **Ц**епная **Р**еакция». Разберем эти слова по порядку. Слово «полимеразная» говорит нам о полимеризации, то есть построении полимера из мономеров. Слово «цепная» означает зависимость следующих этапов реакции от продуктов предыдущих. Наконец, слово «реакция» предполагает превращение одних веществ в другие, отличающиеся от исходных по химическому составу и (или) строению. Теперь посмотрим, одно из определений термина. **Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный молекулярно-биологический метод, который основан на катализируемой ДНК-полимеразой реакции, и который позволяет амплифицировать (от английского amplify - многократно увеличивать, усиливать) малые концентрации определённых фрагментов ДНК в биологическом материале в миллионы раз в течение нескольких часов.**

Метод основан на реакции протекающей в каждой живой клетке – репликации ДНК. Разработан в 1983 году американским ученым Кэри Муллисом, за что спустя всего десять лет тот был удостоен Нобелевской премии по химии в 1993 (разделил ее с Майклом Смитом). В настоящее время метод ПЦР широко распространен в науке и медицине. Давайте теперь разберем методику проведения реакции.

Как проводится ПЦР

ПЦР можно условно разделить на два этапа – подготовительный и основной. Во время первого этапа идет подготовка реакционной смеси, иными словами, в одну пробирку скапываются все необходимые компоненты. Длится этот этап, в зависимости от количества пробирок и способа скапывания, обычно до часа. Во время второго этапа происходит собственно ПЦР, при этом пробирки с реакционной смесью помещают в специальный прибор и оставляют на несколько часов (обычно 3-5). Разберем подробно каждый из этих этапов.

Подготовительный этап: какие компоненты нужны для ПЦР?

Реакционную смесь готовят в специально предназначенных для ПЦР тонкостенных пробирках типа Эппендорф объемом 200 микролитров (рис. 1). Для этого в пробирки последовательно добавляют все компоненты в рассчитанном объеме для получения необходимой финальной концентрации. Перечислим все необходимые компоненты и их роль в реакции.



Рисунок 1. Специальные тонкостенные пробирки типа Эппендорф для проведения ПЦР.

Поскольку, как уже упоминалось, ПЦР является модифицированной реакцией репликации, реакция невозможна без **ДНК-матрицы** – той ДНК, которая содержит необходимый для многократного копирования фрагмент. Матрицей может служить любая молекула ДНК любого живого организма, при этом концентрация может быть очень низкой – всего несколько копий ДНК.

Конечно же, для построения новой цепи ДНК необходим фермент ДНК-зависимая ДНК-полимераза. При проведении ПЦР используют особую термостойкую версию фермента – **Тaq-полимеразу** – произносится «так полимеразу». Фермент был получен из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*. Первая буква рода и две первые буквы вида бактерии на латинском языке определили название фермента - Taq. Почему так важна термостойкость фермента станет ясно чуть позже, когда будем говорить об основном этапе ПЦР.

Ферменту для построения новой цепи необходимы «кирпичики» - предшественники нуклеотидов. Действительно, в реакционную смесь обязательно добавляют **дезоксинуклеозиды трифосфаты**, которые являются не только источником новых нуклеотидных звеньев в строящейся ДНК, но и источником энергии за счет своих макроэргических связей между остатками фосфатов. За счет этого АТФ в реакционную смесь не добавляют.

В естественных условиях в клетке репликация начинается в особых местах – точках начала репликации. При проведении ПЦР начало репликации определяют **праймеры**. Праймер – относительно короткий (20-40 нуклеотидов) одноцепочечный фрагмент ДНК, комплементарный одной из цепей ДНК-матрицы. Праймер служит затравкой для ДНК-полимеразы подобно РНК-затравке в естественном процессе репликации. Для ПЦР нужно два праймера – прямой (на английском - forward) и обратный (на английском - reverse). Прямой праймер «садится» на транскрибируемую (матричную) цепь в начале фрагмента и обеспечивает синтез дочерней цепи от начала к концу. Обратный праймер соединяется с нетранскрибируемой цепью ДНК в конце фрагмента и обеспечивает синтез другой дочерней цепи в направлении от конца к началу (рис. 2).

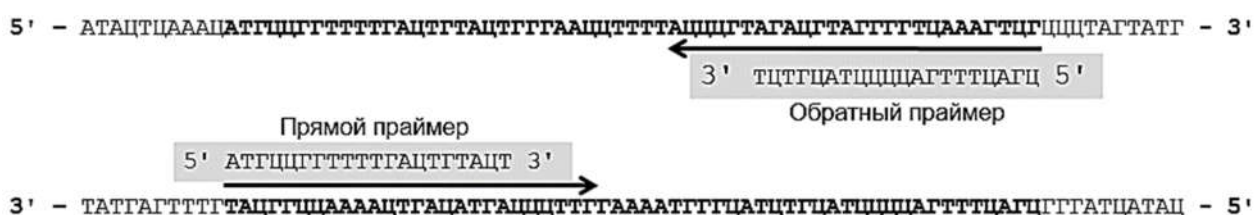


Рисунок 2. Схематическое изображение мест присоединения праймеров. Жирным шрифтом обозначен фрагмент, число копий которого необходимо многократно увеличить. Стрелками обозначены направления, в которых будет идти синтез новых цепей. 20-ти нуклеотидные праймеры приведены в серых прямоугольниках. Обратите внимание, что их последовательность строго комплементарна цепям ДНК-матрицы.

Фермент ДНК-полимераза для функциональной активности требует наличие в реакционной среде **ионов магния**. Поэтому ионы магния, обычно в составе $MgCl_2$, обязательно добавляют в пробирку.

ДНК-полимераза, подобно многим другим ферментам требует для оптимальной активности определенного уровня кислотности. Поэтому обязательным компонентом реакционной смеси является специальный **ПЦР-буфер**, который обеспечивает поддержание оптимального рН.

Наконец, последним необходимым компонентом реакции ПЦР является **вода**. С одной стороны, она является средой для протекания реакций, с другой стороны, меняя ее объем, добиваются одинакового объема реакционной смеси и нужной концентрации всех компонентов.

Все компоненты с кратким перечислением их функций приведены в таблице 1.

Таблица 1. Роль компонентов реакционной смеси ПЦР.

Компоненты реакционной смеси ПЦР	Роль в реакции
1. ДНК-матрица	Матрица для синтеза дочерних цепей
2. Таq-полимераза	Наиболее часто используемая термостабильная ДНК-полимераза
3. Дезоксинуклеозиды трифосфаты	Мономеры для наращивания цепи
4. Два праймера – прямой и обратный	Служат заправкой для ДНК-полимеразы
5. Ионы магния (Mg^{2+})	Являются кофакторами для ДНК-полимеразы
6. ПЦР-буфер	Создание оптимальных условий для максимальной активности и стабильности ДНК-полимеразы
7. Вода	Среда для протекания реакции, доведение объема реакционной смеси до необходимого

Основной этап: что происходит в пробирке?

После того как смесь готова, начинается основной этап ПЦР. Основной этап состоит из 20 – 40 циклов. Каждый цикл протекает по одной и той же схеме и состоит из трех стадий – денатурация, отжиг (или гибридизация) праймеров, элонгация. Каждая стадия протекает при строго определенной температуре (рис. 3). Для последовательного создания и поддержания необходимого температурного режима необходимо специальное оборудование – амплификатор (рис. 4). Разберемся подробнее с каждой из стадий.

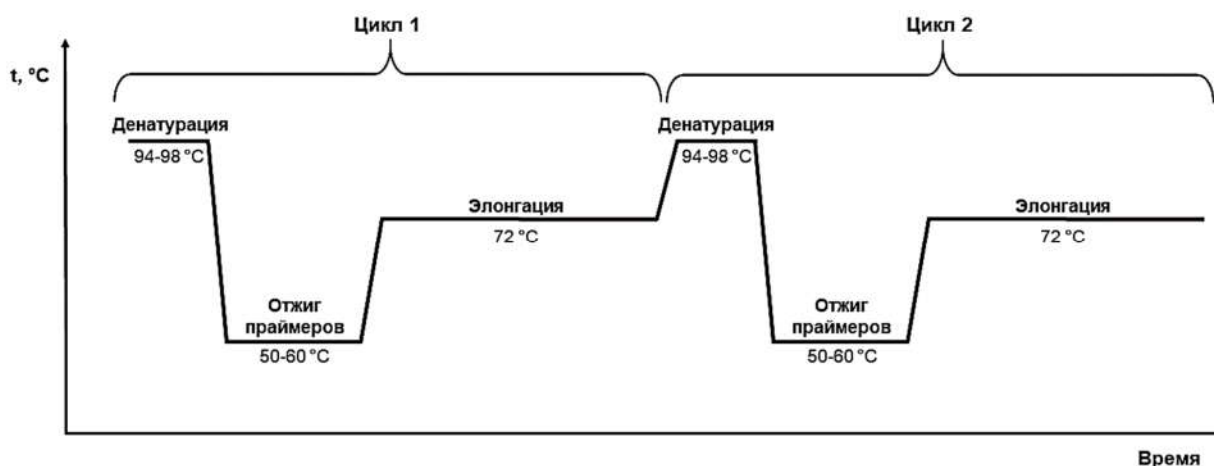


Рисунок 3. Схематическое изображение температурного режима в течение первых двух циклов ПЦР.



Рисунок 4. Амплификатор для проведения ПЦР.

Первая стадия называется **денатурация** или **плавление**. Во время этой стадии происходит разрушение водородных связей в ДНК-матрице за счет кратковременного нагревания пробирки со смесью до 94-98 °C (рис. 5А). При этом ДНК-матрица из двуцепочечной превращается в одноцепочечную, что делает возможным присоединение праймеров к комплементарным участкам. Именно во время стадии денатурации крайне важна термостабильность фермента Таq-полимеразы. Если бы использовалась обычная термочувствительная ДНК-полимераза, то она, будучи по химической природе белком, при столь высокой температуре подвергалась бы необратимой денатурации.

Для присоединения праймеров необходимо снизить температуру в среднем до 50-60 °C. Температура рассчитывается теоретически в зависимости от длины и нуклеотидного состава праймеров, а потом оптимизируется экспериментально. Процесс присоединения праймеров по краям нужного фрагмента называется **отжигом** или **гибридизацией праймеров** (рис. 5Б). Подбор оптимальной температуры для отжига праймеров очень важен. Если температура ниже оптимальной, то праймеры будут присоединяться в местах, которые не полностью им комплементарны, что приведет к амплификации неспецифических участков ДНК. В случае

более высокой температуры праймеры, наоборот, с трудом будут присоединяться к ДНК-матрице или не будут присоединяться вовсе.

После того, как праймеры присоединились к комплементарным участкам в начале и конце фрагмента, температуру поднимают до 72 °С, поскольку эта температура оптимальна для функционирования Таq-полимеразы. Фермент начинает удлинять праймеры в обоих направлениях. Этот этап называется **элонгацией** (рис. 5В). Длительность его определяется длиной фрагмента, который необходимо амплифицировать. На каждую тысячу пар нуклеотидов отводится в среднем 1 минута.

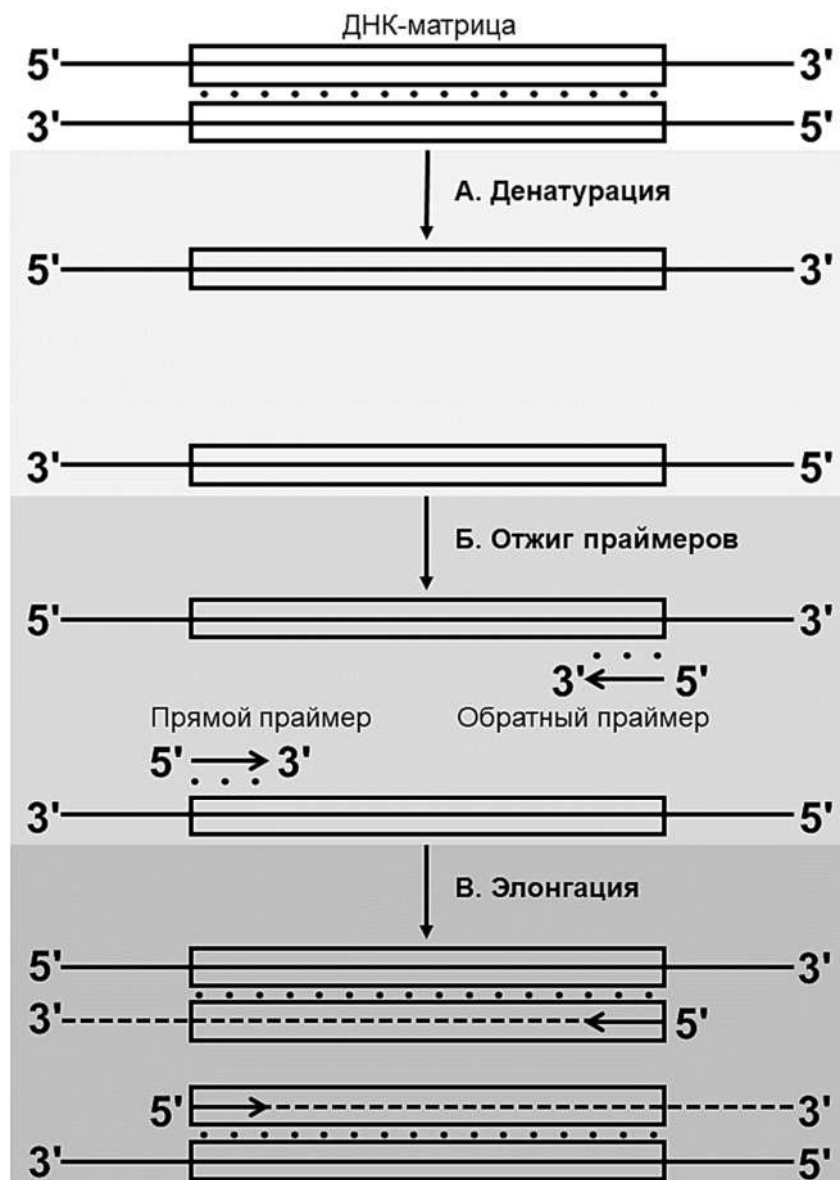


Рисунок 5. Схематическое изображение трех стадий одного цикла ПЦР. Прямоугольниками выделены фрагменты ДНК, которые необходимо амплифицировать. Точками обозначены водородные связи между комплементарными участками. Стрелками обозначены праймеры и направления синтеза новых цепей ДНК. Штриховой линией обозначены цепи, которые синтезированы на этапе элонгации.

Краткое описание всех этапов и условия их протекания приведены в таблице 2.

Таблица 2. Этапы ПЦР и их характеристика.

Что происходит	Температура	Длительность
Этап 1: Денатурация (плавление)		
Водородные связи разрываются, двуцепочечные молекулы ДНК распадаются на одноцепочечные	94-98 °С	15 секунд
Этап 2: Отжиг (гибридизация) праймеров		
Водородные связи образуются между комплементарными фрагментами ДНК. Одноцепочечные праймеры гибридизуются с участками ДНК в начале и конце нужного фрагмента	50-60 °С	30 секунд
Этап 3: Элонгация		
Тaq-полимераза удлиняет праймеры в направлении 5'-3', синтезируя дочерние цепи	72 °С	60 секунд на тысячу пар оснований

Теперь предлагаю разобраться, что происходит в течение первых трех циклов ПЦР (рис. 6). Для удобства возьмем изначально одну копию ДНК в качестве матрицы (А). К концу первого цикла нужный фрагмент будет удвоен (Б и В), при этом одна из цепей каждого продукта будет идентична исходной матрице (обозначена серым цветом), а другая будет вновь синтезированная (обозначена черным цветом). Важно отметить, что продукты первого цикла не полностью идентичны исходной матрице, поскольку удваивается не вся ДНК, а только необходимый фрагмент.

Далее продукты первого цикла – Б и В – становятся матрицами для второго цикла. Поскольку они при денатурации распадутся на четыре одноцепочечные молекулы ДНК, каждая из которых станет местом присоединения одного из праймеров, в конце второго цикла образуется четыре продукта – Г, Д, Е и Ж.

В третьем цикле матрицами будут служить продукты второго цикла, которые при денатурации распадутся на 8 одноцепочечных молекул. Это означает, что в конце третьего цикла в пробирке будет 8 двуцепочечных копий необходимого фрагмента. Обратите внимание, что доля исходных цепей (обозначена серым цветом) в конце первого цикла составляет 50%, в конце второго цикла – 25%, а в конце третьего только 12,5%. Также отметьте, что только в конце третьего цикла впервые появляются продукты без одноцепочечных «хвостов» - И и О. С каждым последующим циклом доля таких продуктов будет возрастать, а доля исходных цепей уменьшаться.

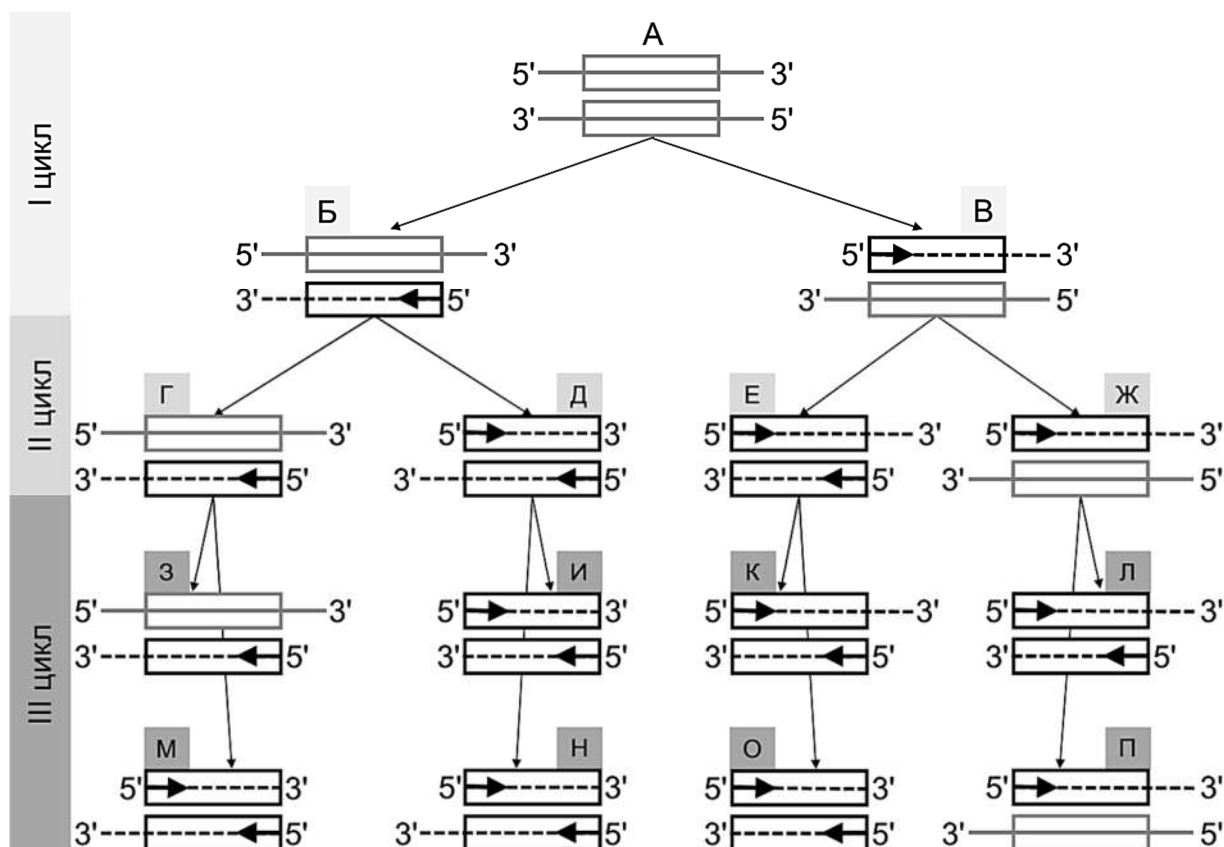


Рисунок 6. Схематическое изображение первых трех циклов ПЦР. Пояснения к рисунку в тексте.

А теперь посмотрим на протекание ПЦР с математической точки зрения. Возможно вы уже заметили, что увеличение числа копий ДНК происходит в геометрической прогрессии. При этом количество копий нужного фрагмента ДНК после проведения ПЦР в идеальных условиях можно описать следующей формулой:

$$N = A \times 2^b, \text{ где}$$

N – количество копий ДНК в конце реакции, A – исходное количество копий ДНК, b – количество циклов ПЦР. Если мы рассчитаем количество копий необходимого фрагмента в течение 40 циклов реакции, то получим результаты, представленные в таблице 3. На практике, количество продуктов будет несколько ниже идеально рассчитанного, однако эта разница будет незначительной и количество продуктов после 20 циклов действительно будет стремиться к миллиону!

Таблица 3. Образование продуктов ПЦР в геометрической прогрессии.

Количество циклов ПЦР	Количество копий ДНК
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128

8	256
9	512
10	1 024
20	1 048 576
30	1 073 741 824
40	1 099 511 627 776

Как «увидеть» продукты ПЦР?

Для того, чтобы проверить качество и количество продуктов ПЦР, как правило, используют метод агарозного гель-электрофореза. Для этого достаточно взять около 10 микролитров продуктов ПЦР, внести в лунку агарозного геля и посмотреть на результат разделения в ходе электрофореза.

Применение ПЦР

В завершение теоретической части статьи перечислим примеры применения ПЦР в науке, медицине и криминалистике (таблица 4). Следует также отметить, что существует достаточно большое количество модификаций ПЦР, но их обзор, равно как и подробное рассмотрение примеров применения ПЦР, выходит за рамки данной статьи.

Таблица 4. Примеры применения ПЦР в различных областях

Наука	Медицина	Криминалистика
<ul style="list-style-type: none"> • Увеличение числа копий нужного фрагмента ДНК • Поиск нужного фрагмента ДНК • Клонирование генов • Секвенирование ДНК (определение нуклеотидной последовательности) • Направленный мутагенез ДНК • Установление эволюционного родства исследуемых организмов 	<ul style="list-style-type: none"> • Диагностика инфекций • Диагностика генетических заболеваний, включая пренатальную диагностику • Персонализированная медицина • Установление отцовства 	<ul style="list-style-type: none"> • Установление личности

Задачи

Задача 1: (IV этап Республиканской олимпиады по биологии, 2003-2004 уч. г.)

Реакционная смесь для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) кроме исследуемой ДНК в буферном растворе должна содержать:

1-ДНК-полимеразу III; 2-dATP, dGTP, dCTP, dTTP; 3-два различных праймера в больших концентрациях; 4-Taq-полимеразу; 5-ионы Mg^{2+}

- A. 1, 2, 3, 4, 5
- B. 1, 2, 3, 5
- C. 2, 3, 4, 5
- D. 1, 2, 3, 4
- E. 2, 4

Задача 2: (IV этап Республиканской олимпиады по биологии, 2005-2006 уч. г.)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это один из важнейших молекулярно-биологических методов. Что из перечисленного не является правильным в отношении ПЦР?

1 - для ПЦР необходимы праймеры; 2 - необходима ДНК-полимераза, способная выдерживать высокую температуру; 3 – источником энергии для ПЦР является АТФ; 4- для ПЦР необходима матрица ДНК.

- A. 1, 2
- B. 2, 3
- C. 3
- D. 1, 3
- E. 2, 4

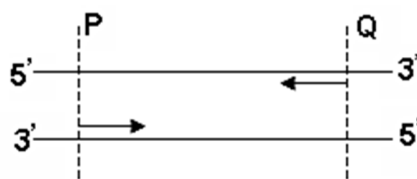
Задача 3: (IV этап Республиканской олимпиады по биологии, 2005-2006 уч. г.)

Перечислены процессы: 1) плавление; 2) рестрикция; 3) отжиг; 4) элонгация; 5) терминация; 6) инициация. Один цикл ПЦР последовательно включает:

- A. 3→1→4→2
- B. 1→3→4
- C. 1→3→2
- D. 3→1→2→5

Задача 4: (IV этап Республиканской олимпиады по биологии, 2008-2009 уч. г.; Международная олимпиада по биологии 2008 г.)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является методом быстрой амплификации участков ДНК. Если вы добавите к двуцепочечной ДНК необходимые прямой и обратный праймеры (как показано на рисунке ниже), то какое минимальное число циклов потребуется вам для получения одной копии желаемого фрагмента PQ в виде двуцепочечной ДНК без одноцепочечных концов:



- A. 1
- B. 3
- C. 4
- D. 40
- E. 2

**Задача 5: (IV этап Республиканской олимпиады по биологии, 2008-2009 уч. г.;
Международная олимпиада по биологии 2008 г.)**

Какая пара праймеров является подходящей для амплификации представленного участка ДНК с помощью ПЦР?

5' – GCGTTGACGGTATCAAAACGTTAT.....TTTACCTGGTGGGCTGTTCTAATC – 3'

- A. 5' – GCGTTGACGGTATCA-3' и 5'- TGGGCTGTTCTAATC – 3'
- B. 5' – CGCAACTGCCATAGT-3' и 5'- TGGGCTGTTCTAATC – 3'
- C. 5' – TGATACCGTCAACGC-3' и 5'- GATTAGAACAGCCCA – 3'
- D. 5' – GCGTTGACGGTATCA-3' и 5'- GATTAGAACAGCCCA – 3'

Задача 6: (IV этап Республиканской олимпиады по биологии, 2016-2017 уч. г.)

При ПЦР:

- A. Прямой и обратный праймер садятся на одну и ту же цепь молекулы ДНК
- B. Последовательность праймера комплементарна участку посадки на матричной цепи
- C. Температура этапа полимеризации определяет размер продукта амплификации: чем выше значение температуры, тем больше длина амплифицируемого фрагмента
- D. Для амплификации некоторых повторяющихся последовательностей можно использовать 1 праймер (последовательность прямого и обратного праймеров одинаковая)

Задача 7: (IV этап Республиканской олимпиады по биологии, 2016-2017 уч. г.)

Вы хотите получить продукт амплификации фрагмента ДНК, ограниченного участками, представленными ниже:

5' – ТАСТСАТАСАТGCCAA...____...ТССАТТGACАТТТССС – 3'
3' – АТGAGTATGTACGGT...____...AGGТААСТGТААAGGG – 5'

Для этого Вам необходимо придумать последовательности для прямого и обратного

праймеров. Проанализируйте предложенные варианты и для каждого из следующих утверждений отметьте, является оно верным или неверным.

А. Последовательность одного из праймеров, пригодных для амплификации указанного фрагмента ДНК может быть: 5' – ТАСТСАТАСАТГССАА – 3'

В. Последовательность одного из праймеров, пригодных для амплификации указанного фрагмента ДНК может быть: 3' – АГГТААСТГТАААГГГ – 5'

С. Для амплификации указанного фрагмента можно использовать праймеры, последовательность которых представлена ниже: прямой - 5' – ТАСТСАТАСАТГССАА – 3'; обратный – 5' – ТССАТТГАСАТТТССС – 3'

Д. В идеальных условиях за один цикл полимеразной цепной реакции происходит удвоение количества двунитовой ДНК.

Задача 8: (Гончаренко Г.Г. Основы генетической инженерии: учебное пособие / Г.Г. Гончаренко. - Минск: Вышэйшая школа, 2005 - 183 с.)

Для генетической идентификации членов семьи египетского фараона XIX династии Сети I, забальзамированных еще в середине II тысячелетия до н. э., молекулярные генетики из костных останков мумий получили около 10 копий небольших фрагментов ДНК, содержащий нужный ген. Каково будет количество копий ДНК нужного гена, если исследователям удастся провести 20 успешных циклов амплификации фрагментов ДНК из костных останков, используя метод ПЦР?

Задача 9: (Гончаренко Г.Г. Основы генетической инженерии: учебное пособие / Г.Г. Гончаренко. - Минск: Вышэйшая школа, 2005 - 183 с.)

У человека ген, кодирующий компонент зубной эмали, амелогенин, расположен в половых хромосомах X и Y. Причем длина этого гена в хромосоме X составляет 106 п. н., тогда как в хромосоме Y она на 6 пар длиннее. Как будут выглядеть электрофоретические спектры образцов ДНК, гена амелогенина, взятые из костных останков мужчины и женщины и амплифицированные методом ПЦР, после электрофореза в агарозном геле?

Ответы и пояснения

Задача 1

Ответ:

С

Пояснение:

Для решения задачи обратимся к таблице 1, в которой перечислены необходимые компоненты реакционной смеси ПЦР. Из вариантов, предложенных в задаче, не подходит только 1 – ДНК-полимераза III (поскольку она не термостабильна). dATP, dGTP, dCTP, dTTP обозначают смесь нуклеотидов на английском языке. Сокращения обозначают дезоксиаденозинтрифосфат, дезоксигуанозинтрифосфат, дезоксицитозинтрифосфат и дезокситимидинтрифосфат, соответственно. Таким образом, правильный ответ должен содержать компоненты под номерами 2, 3, 4 и 5. То есть, правильный ответ С.

Задача 2

Ответ:

С

Пояснение:

Сравним варианты ответов с компонентами реакционной смеси ПЦР, перечисленными в таблице 1. Из всего перечисленного, только вариант 3 является лишним, поскольку ДНК-полимераза не использует АТФ в качестве источника энергии. Вместо АТФ используется энергия макроэргических связей дезоксинуклеозидтрифосфатов.

Задача 3

Ответ:

В

Пояснение:

Последовательность этапов в каждом цикле ПЦР одинакова: 1. Денатурация (плавление); 2. Отжиг (гибридизация) праймеров; 3. Элонгация.

Задача 4

Ответ:

В

Пояснение:

Для решения данной задачи необходимо обратиться к рисунку 6 и проследить динамику образования продуктов ПЦР в первых трех циклах. Продукты первого и второго циклов содержат одноцепочечные концы. Только после третьего цикла образуются продукты без одноцепочечных концов – продукты «И» и «О». Таким образом, минимальное число циклов,

необходимое для образования двуцепочечных продуктов без одноцепочечных концов составляет три, то есть, правильный ответ В.

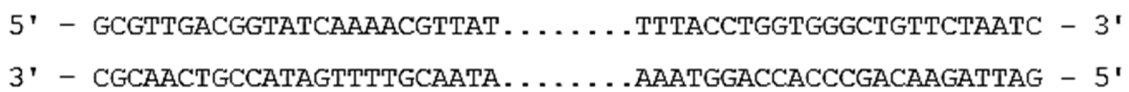
Задача 5

Ответ:

D

Пояснение:

В данной задаче используются англоязычные сокращения, принятые для нуклеотидов: А=А, С=Ц, G=Г, Т=Т. Сначала достраиваем вторую цепь ДНК.



Далее

определяем места присоединения и последовательность обоих праймеров. Прямой праймер должен присоединяться по принципу комплементарности к 3'-5'- цепи в начале гена. Иными словами, последовательность прямого праймера будет идентична последовательности 5'-3'-цепи и будет выглядеть следующим образом –



Обратный праймер должен присоединяться к концу фрагмента и быть комплементарным 5'-3'-цепи. Соответственно, его последовательность будет совпадать с концевой последовательностью 3'-5'-цепи. Обратите внимание, что в ответах нужно указывать последовательность обоих праймеров от 5' к 3' концу. Поэтому последовательность обратного праймера будет выглядеть таким образом –



Вариант D предлагает именно такую пару праймеров.

Задача 6

Ответ:

А неверно, В верно, С неверно, D верно

Пояснение:

Утверждение А неверно. Праймеры садятся на разные цепи ДНК.

Утверждение В верно. Присоединение праймера к ДНК основано на принципе комплементарности.

Утверждение С неверно. Во-первых, длина фрагментов определяется местом посадки праймеров, поскольку они ограничивают амплифицируемую последовательность по краям. Повышение температуры не может изменить места посадки праймеров и повлиять на длину образующихся продуктов. Во-вторых, этап элонгации всегда протекает с большим временным запасом, то есть даже при температуре немного ниже оптимальной полимеразы все равно успевает синтезировать нужный фрагмент целиком. Таким образом, повышение температуры не скажется на длине продуктов еще и по этой причине.

Утверждение D верно. Действительно, в случае с повторяющимися последовательностями, один и тот же праймер может найти комплементарный участок и на одной цепи, и на другой.

Задача 7

Ответ:

А верно, В верно, С неверно, D верно

Пояснение:

Утверждение А верно. Здесь приведена правильная последовательность прямого праймера.

Утверждение В верно. Здесь приведена правильная последовательность обратного праймера.

Утверждение С неверно. Последовательность прямого праймера верна. Последовательность обратного неверна. Смотрите пояснения к решению задачи №5.

Утверждение D верно. Смотрите таблицу 3 и комментарии к ней.

Задача 8

Ответ:

10 485 760 копий ДНК

Пояснение:

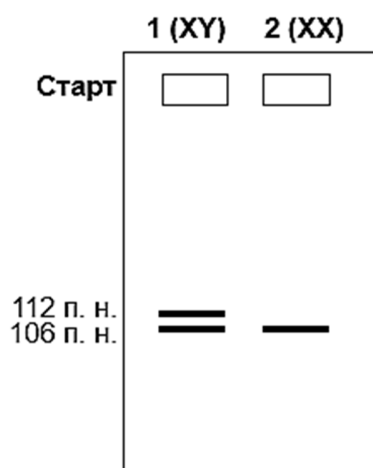
Используем формулу, согласно которой происходит увеличение числа копий ДНК в реакционной смеси:

$$N = A \times 2^b,$$

где N – количество копий ДНК в конце реакции; A – исходное количество копий ДНК; b – количество циклов. Подставив необходимые параметры в формулу, получим, что $10 \times 2^{20} = 10\,485\,760$.

Задача 9

Ответ:



Пояснение:

На левой дорожке – 1 (XY) – результат разделения мужской ДНК, содержащей ген амилогенина длиной 106 пар нуклеотидов (из X-хромосомы) и длиной 112 пар нуклеотидов (из Y-хромосомы). На правой дорожке – 2 (XX) – результат разделения женской ДНК, содержащий только вариант гена амилогенина длиной 106 п. н. (из X-хромосомы).

Объяснению метода агарозного гель-электрофореза ДНК посвящена статья «Изучение молекулярной биологии. Решение задач на построение карт рестрикции» в журнале «Біологія і хімія» № 7 (55), стр. 18 - 26, 2017.

Заключение

Безусловно, биологические олимпиады содержат больше разновидностей заданий, чем было разобрано в статье. Тем не менее, теоретический и практический материал статьи с большой долей вероятности поможет вам и вашим ученикам успешно справляться с заданиями по теме ПЦР. Ваши комментарии, вопросы и пожелания можете присылать на электронную почту: *skryhan.katsiaryna@gmail.com*

Список литературы

Gene cloning and DNA analysis: an introduction / T.A. Brown. — Wiley-Blackwell, 6th ed, 2010.

Principles and techniques of biochemistry and molecular biology / edited by Keith Wilson and John Walker. — 7th ed.

Иллюстрации к Рис. 1 и Рис. 4 взяты из Интернета.