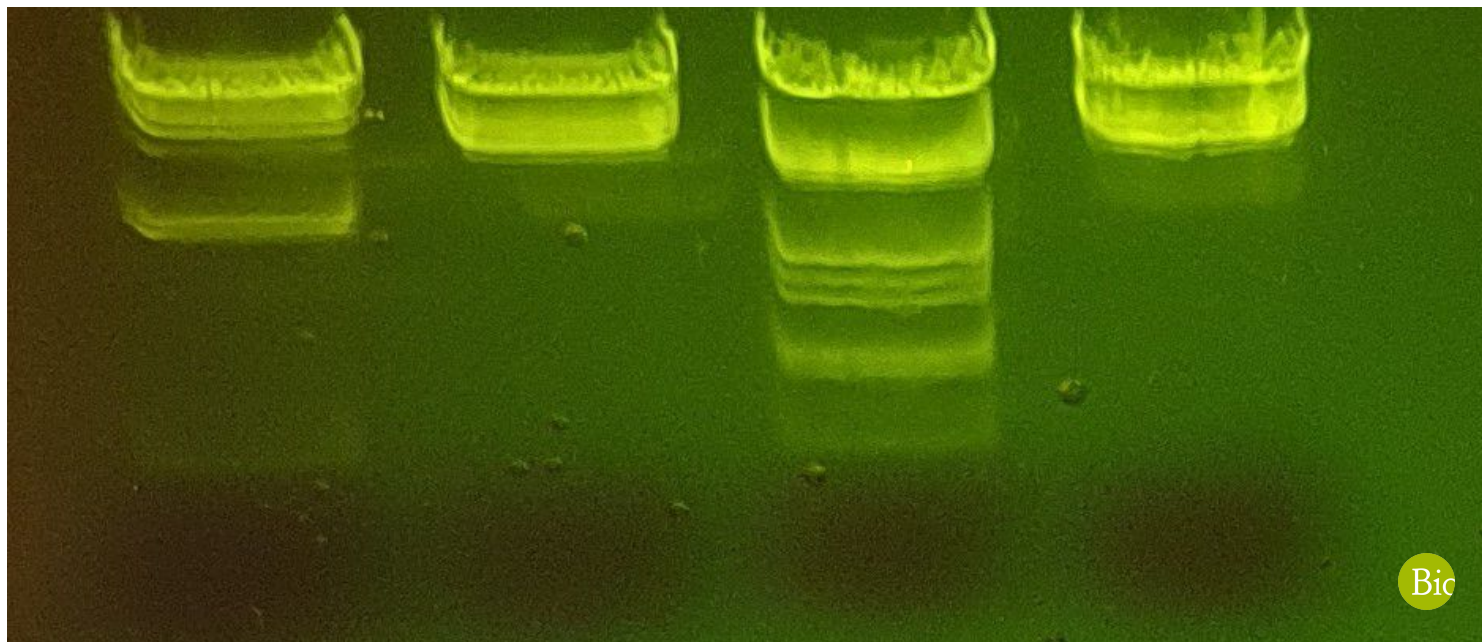


Генетическая дактилоскопия



Биология

Микробиология и генетика

Молекулярная генетика



Уровень сложности

средний



Размер группы

2



Время подготовки

10 Минут



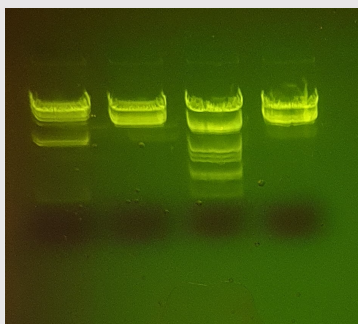
Время выполнения

30 Минут

PHYWE
excellence in science

Информация для учителей

Описание

PHYWE
excellence in science

Генетическое
дактилоскопирование

Благодаря очень популярного криминального сериала почти все знакомы с термином «генетический отпечаток пальца». серии преступлений, почти все знакомы с термином "генетический дактилоскопический отпечаток". Поэтому этот эксперимент особенно интересен, поскольку он знакомит учащихся с темой гель-электрофореза.

Чтобы иметь возможность анализировать фрагменты ДНК и РНК, их обычно разделяют по размеру и делают видимыми путем окрашивания. Для этого используется гель-электрофорез. В этом методе используется отрицательный заряд нуклеиновых кислот, которые перемещаются в электрическом поле в направлении положительного полюса (анода). Фрагменты становятся видимыми с помощью флуоресцентного красителя SYBR-Green и безвредного синего светодиодного света.

Дополнительная информация для учителей (1/4)

Предыдущие знания



Студенты уже должны знать, что такое интроны и экзоны, а также свойства ДНК. Кроме того, учащиеся уже должны быть знакомы с принципом полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также с поведением заряженных молекул в электрическом поле.

Принцип



Студенты получают четыре разных образца ДНК, имитирующих генетические отпечатки пальцев человека. Студенты готовят агарозный гель, наносят образцы на гель и оценивают результат. При использовании таблеток GelGreen® 3-в-1 агарозы флуоресцентный краситель SYBR-Green, содержащийся в таблетках, интеркалируется с ДНК. Краситель освещается специальным светом гелевой камеры BlueGel™ и, таким образом, заставляет ДНК светиться.

Набор содержит только образцы нечеловеческого происхождения и предназначен только для имитационного моделирования.

Дополнительная информация для учителей (2/4)

Цель



В ходе этого эксперимента студенты должны узнать и понять, как работает гель-электрофорез. С помощью этого метода ДНК разделяется по размеру и становится видимой.

Задачи



Студенты готовят агарозный гель заданной концентрации и применяют различные образцы ДНК. Разделение можно наблюдать в реальном времени, самостоятельно задокументировав его с помощью смартфона или планшета и передав эти данные на компьютер.

Дополнительная информация для учителей (3/4)

PHYWE
excellence in science



Введение в систему

Инструкции по подготовке и выполнению работы

- На видео слева показаны производство геля, сборка системы и пример разделения ДНК.
- При использовании таблеток GelGreen обратите внимание, что таблетка уже содержит TBE соль. Добавлять соль больше нельзя. В таблетку необходимо добавить только то количество деионизированной воды, которое указано на вкладыше упаковки.
- Рабочий буфер также должен быть буфером TBE и иметь концентрацию 1x. Преподаватель должен заранее разбавить буфер и распределить необходимую аликвоту каждой группе, так как количество, необходимое каждой группе (около 40 мл), относительно невелико.

Дополнительная информация для учителей (4/4)

PHYWE
excellence in science

Экспериментальные варианты и примечания



- Для кипячения геля рекомендуется использовать микроволновую печь (или электроплитку).
- Эксперимент также можно проводить на гелях, состоящих из отдельных компонентов (агароза, TBE или TAE), и полосах ДНК, окрашенных раствором метиленового синего. Однако здесь невозможно наблюдать разделение в реальном времени.
- Поскольку пипетирование - непростая задача, рекомендуется заранее отработать эту процедуру со студентами с помощью специальных карт, входящих в состав набора.
- Все компоненты могут храниться 2 месяца при комнатной температуре. Для более длительного хранения образцы ДНК из набора следует заморозить при -18°C .

Инструкции по технике безопасности

PHYWE
excellence in science

- К этому эксперименту применяются общие инструкции по безопасному проведению экспериментов при преподавании естественных наук.
- Правила работы с опасными веществами приведены в соответствующих паспортах безопасности.
- SYBR-Green, используемый в таблетках GelGreen, является безопасной альтернативой обычному бромистому этидию. Он не проникает через кожу, но может проникать в ткани через открытые раны. Поэтому рекомендуется использовать перчатки.
- Агарозный гель, изготовленный из GelGreen таблетки может быть утилизирован с обычным бытовым мусором.

PHYWE
excellence in science

Информация для студентов

Мотивация (1/4)

PHYWE
excellence in science



Кто же преступник?

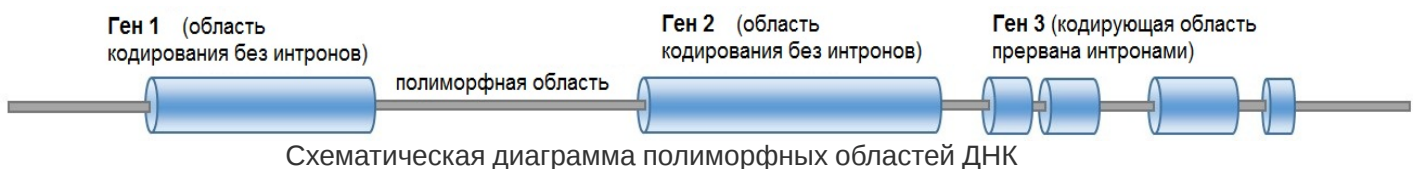
Образцы тканей, найденные на месте преступления. Как определить преступника?



Генетический материал всех людей на 99,9% идентичен. Геном человека состоит из кодирующих (экзонов) и некодирующих (интронов) областей. В частности, интроны сильно различаются у разных людей (за исключением однояйцевых близнецов). Чтобы иметь возможность идентифицировать людей на основе их генетической структуры, создаются генетические отпечатки пальцев. Здесь сравниваются участки ДНК, которые показывают особенно большие индивидуальные различия, то есть являются полиморфными.

Мотивация (2/4)

PHYWE
excellence in science



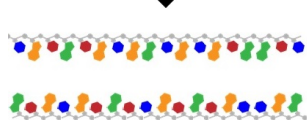
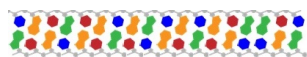
Создаются генетические отпечатки пальцев. Здесь сравниваются области ДНК, которые показывают особенно большие индивидуальные различия, то есть являются полиморфными. Эти области расположены в интронах и часто состоят из повторяющихся последовательностей из двух или более нуклеотидов. Количество этих так называемых повторов варьируется от человека к человеку. Если теперь посмотреть на несколько таких полиморфизмов человека, то выявляется паттерн, который уникален для этого человека и поэтому используется для идентификации людей. Эти переменные (полиморфные) области воспроизводятся и усиливаются с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), а затем визуализируются с помощью гель-электрофореза.

Мотивация (3/4)

С этой целью для ПЦР используются праймеры, которые связываются в законсервированных областях слева и справа от полиморфных областей. В результате получаются фрагменты ПЦР разной длины. Глядя на несколько таких областей, вы получаете узор, который практически уникален для каждого человека.

ПЦР состоит из трех этапов, которые повторяются циклами:

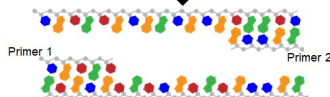
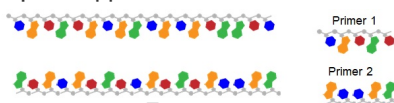
1. Денатурация



Двойные цепи ДНК разделяют нагреванием.



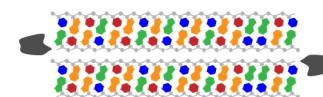
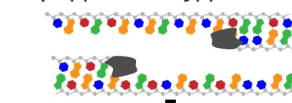
2. Присоединение / отжиг



Праймеры прикрепляются к одноцепочечной ДНК.



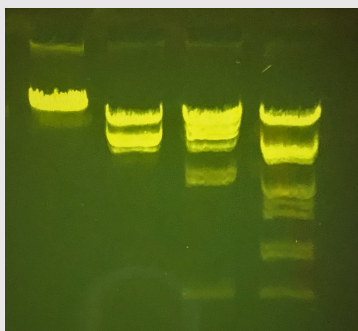
3. Продление/ удлинение



Полимераза генерирует комплементарную цепочку ДНК.



Мотивация (4/4)



ДНК-группы в агарозном геле

Гель-электрофорез позволяет разделить и визуализировать фрагменты ДНК. Здесь используется отрицательный заряд нуклеиновых кислот, которые мигрируют к положительному полюсу (аноду) в электрическом поле. Агарозный гель, служит в качестве стационарной (неподвижной) фазы: чем выше концентрация агарозы в геле, тем плотнее сетка. Маленьким фрагментам ДНК легче, чем большим, перемещаться через эту сеть к аноду и, следовательно, со временем мигрировать дальше в геле.

Сами по себе нуклеиновые кислоты в геле не видны. Их можно либо окрашивать раствором метиленового синего после окончания цикла, либо использовать вещества, которые интеркалируются между основаниями генетического материала (накапливаются там). В этом эксперименте используется флуоресцентный краситель, который интеркалирует с фрагментами лямбда ДНК. Синий свет камеры для электрофореза заставляет краситель светиться, и таким образом ДНК становится видимой (зелено-желтые полосы, как на фото слева).

Задачи

PHYWE
excellence in science



1. Приготовьте 1% агарозный гель: обратите внимание, что таблетка агарозы уже содержит агарозу, флуоресцентный краситель и соль TBE, поэтому нужно добавлять только деионизированную воду.
2. Загрузите образцы ДНК в ячейки и начните электрофорез.
3. Сравните образцы ДНК и попытайтесь вычислить преступника.

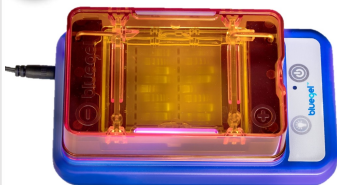
Материал

PHYWE
excellence in science

Позиция	Материал	Пункт No.	Количество
1	blueGel Камера для гель-электрофореза с источником питания	35016-99	1
2	Агарозные таблетки 3 в 1 для гель-электрофореза 15 таблеток	35018-61	1
3	Микролитровая пипетка 2-20 мкл, автоклавируемая	47141-10	1
4	Генетический отпечаток (ДНК-отпечаток)	KLA-530-120	1
5	Наконечники для микролитровых пипеток, 2-200 мкл, желт., 1000 шт.	47148-01	1
6	Шпатель, с никелевым покрытием, 180 мм	33392-00	1
7	Защитные очки, прозрачные	39316-00	1
8	Колба Эрленмейера, широкогорлая, 100 мл	46151-00	1
9	Мерный цилиндр, 100 мл	36629-00	1
10	Вода, дистиллирован., 5 л	31246-81	1
11	Резиновые перчатки, размер 8	39323-00	1

Подготовка (1/2)

PHYWE
excellence in science



Видео 1: Подготовка геля

- Разбавьте 10x концентрированный концентрат буфера TBE до 1x деионизированной водой (на один гель требуется около 30 мл буфера).
 - Приготовьте 1% агарозный гель (см. также видео 1). **Внимание: одной таблетки достаточно для приготовления двух 1% гелей!**
1. Выньте из упаковки таблетку с агарозой GelGreen и поместите ее в колбу Эрленмейера.
 2. Добавьте в таблетку 40 мл деионизированной воды и закипятите (в микроволновой печи или на электроплитке).
 3. Поместите стеклянную емкость для геля в платформу для разливки, а гребень - в емкость для геля (гребень находится под платформой для разливки). Используйте сторону гребня с большими зубцами.

Подготовка (2/2)

PHYWE
excellence in science



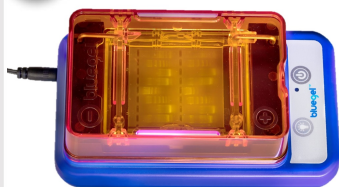
Готовый гель,
подготовленный к загрузке

Теперь налейте в чашу 20 мл жидкого геля и дайте ему застыть (около 10 минут).

- После остывания геля осторожно вытащите гребень из геля вертикально.
- Теперь поместите емкость с гелем в буферную камеру базового блока.
- Заполните буферную камеру 1x TBE, чтобы гель заполнил поверхность камеры.

Выполнение работы (1/2)

PHYWE
excellence in science



Загрузка и запуск геля

Загрузка и запуск геля (см. также видео 2):

- Возьмите пипетку объемом 2 мкл - 20 мкл на 7 мкл и наденьте на пипетку желтый наконечник.
- Загрузите четыре образца ДНК в гель в следующем порядке:
 1. ДНК с места преступления
 2. ДНК жертвы
 3. ДНК подозреваемого №1
 4. ДНК подозреваемого №2
- Теперь аспирируйте (наберите) 7 мкл в наконечник с помощью пипетки и осторожно переносите содержимое в ячейку.

Выполнение работы (2/2)

PHYWE
excellence in science



Гель-камера с "черной камерой" и смартфоном

- Повторите процесс и меняйте после каждого образца наконечник, чтобы не допустить загрязнения образцов друг другом.

Запуск геля

- Закройте базовый блок крышкой и включите нажав кнопку "Вкл / Выкл".
- Разверните "черную камеру" и аккуратно наденьте ее на крышку (см. также фото слева).
- Нажав кнопку "Свет", активируете синий свет и следите за разделением образцов. С помощью смартфона или планшета задокументируйте разделение на пленке или сделайте фотографии и видео.
- Разделение завершается примерно через 20 минут.

PHYWE
excellence in science



Протокол

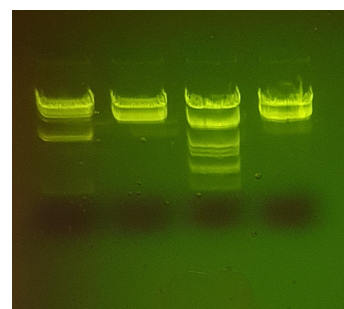
Задача 1

PHYWE
excellence in science

Сравните Ваши результаты с таблицей и изображенной фотографией

Размеры фрагментов с оптимальным окрашиванием и разделением (задаются в парах оснований, bp)

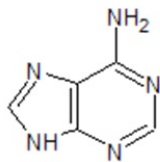
ДНК жертвы	ДНК на месте преступления	ДНК подозреваемого 1	ДНК подозреваемого 2
23.100	21.200	21.200	21.200
5.100	7.400	5.100	7.400
5.000	5.800	5.000	5.800
4.300	5.600	4.300	5.600
2.300	4.800	3.500	4.800
2.000	3.500	2.000	3.500

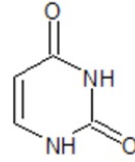


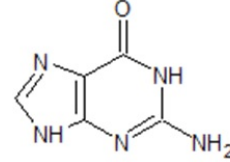
Разделение генетических отпечатков пальцев

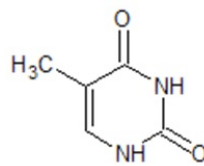
Задача 2

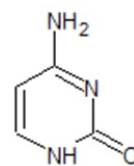
Запишите правильные названия оснований











Задача 3



Что относится к полимеразной цепной реакции (ПЦР)?

- Фрагменты ДНК становятся видимыми с помощью ПЦР.
- ДНК-полимераза фрагментов ДНК.
- ПЦР - это ферментативная реакция.
- Циклы ПЦР следующие: 1. Денатурация 2. Удлинение 3. Отжиг

Задача 4

Заполните пробелы в тексте

ДНК заряжена и движется в поле к . ДНК представляет собой двойную спираль. и тимин, а также цитозин и связаны водородными связями.

участки ДНК полезны для различения людей друг от друга. Эти переменные участки в основном расположены в , тогда как экзоны более консервативны.

Для создания полного генетического анализируются переменные области ДНК.

✓ Проверить

Слайд	Оценка/Всего
Слайд 21: Назначьте базам их имена	1/1
Слайд 22: Принцип ПЦР	0/1
Слайд 23: Свойства ДНК	0/9

Всего  1/11

👁 Решения

🔄 Повторить