



Шифр _____

Правила проведения практического тура

1. В аудиторию *запрещается* вносить электронные устройства, шпаргалки и другие вспомогательные материалы. Наличие любых электронных устройств (даже в выключенном состоянии), а также шпаргалок приравнивается к их использованию. Во время Олимпиады *запрещается* разговаривать и мешать окружающим. В случае нарушения этих правил участник удаляется из аудитории, его работа не проверяется.
2. Работа выполняется только на *бланках*, выданных организатором. В случае необходимости участник может получить дополнительные листы. Для этого участник должен поднять руку и ждать, когда подойдет ответственный по аудитории или волонтер.
3. Работа, включая чертежи, схемы, таблицы и рисунки, должна выполняться ручкой. При этом чистовиком являются страницы со сканируемым куар-кодом, а черновиком – обороты этих страниц. Черновик работы не проверяется. Посторонние пометки и рисунки в работе не допускаются!
4. Находясь в аудитории, участник должен выполнять все требования преподавателей, относящиеся к проведению Олимпиады. Если возникает вопрос, участник должен поднять руку и ждать, когда подойдет ответственный по аудитории.
5. Выход участника из аудитории во время написания работы допускается только один раз с разрешения ответственного по аудитории и в сопровождении дежурного.



Шифр _____

Перед началом работы

Убедитесь, что на вашем столе присутствуют все необходимые материалы и оборудование. Таблица (чек-лист) для проверки представлена ниже.

Реактивы и оборудование	Концентрация	Подпись на пробирке	Количество	Отметка о присутствии
Плазмида 1	20 нг/мкл	Пл 1	1 пробирка	
Плазмида 2	20 нг/мкл	Пл 2	1 пробирка	
Плазмида 3	20 нг/мкл	Пл 3	1 пробирка	
Буфер для ферментов рестрикции Rose	10X	R	1 пробирка	
Стерильная вода	-	mQ	1 пробирка	
Микропробирки 2 мл	-	-	3 пробирок	
Микропробирки 0,5 мл	-	-	? пробирок	
Перчатки	-	-	1 пара	
Пипетка-дозатор, 2-20 мкл	-	-	1 пипетка	
Коробка с наконечниками для пипетки-дозатора	-	-	1 на 2-х человек	
Буфер для нанесения проб в агарозный гель	4X	LD	1 пробирка	



Шифр _____

Помимо этого, в процессе работы вам понадобится оборудование, которое используется всеми участниками в аудитории, его местоположение вам покажет волонтер или преподаватель. Включение и выключение данного оборудования производится **ТОЛЬКО волонтерами или преподавателем**. Обратите внимание, что некоторые необходимые реактивы не могут храниться при комнатной температуре. Непосредственно перед их использованием обратитесь к преподавателю, и он выдаст эти реактивы. Список оборудования и реактивов, использовать которые можно только в присутствии волонтеров или преподавателя, представлен в таблице ниже.

Реактивы и оборудование	Концентрация	Подпись на пробирке
Термостат для пробирок	-	-
Камера для проведения горизонтального электрофореза	-	-
Лабораторный источник тока	-	-
Эндонуклеаза рестрикции BamHI	5000 ед/мл	BamHI
Эндонуклеаза рестрикции HindIII	5000 ед/мл	HindIII



Шифр _____

ВВЕДЕНИЕ

Для изучения свойств одного из флуоресцентных белков вам необходимо создать генетическую конструкцию, которая позволила бы экспрессировать этот белок в клетках прокариот.

Для этого вы планируете использовать некоторый вектор, содержащий ген устойчивости к антибиотику и все необходимые элементы для экспрессии вашего целевого белка, а также синтетически полученную последовательность изучаемого флуоресцентного белка.

Фрагмент ДНК, содержащий белок, на концах имеет сайты рестрикции BamHI и EcoRI. Такие же последовательности есть в сайте поликлонинга выбранного вектора, поэтому вы решаете встроить последовательность белка с использованием этих сайтов. На первом этапе вы обрабатываете вектор и вставку рестриктазами, затем выделяете порезанные фрагменты из рестрикционной смеси и лигируете с помощью T4 ДНК лигазы. После этого лигазной смесью вы трансформируете клетки *E. coli* и высаживаете полученную культуру на твердую среду, содержащую антибиотик.

В результате этих манипуляций вы получаете большое количество клонов бактерий, которые устойчивы к антибиотику, однако лишь малая часть этих клонов флуоресцирует под действием ультрафиолета. Чтобы изучить причины такой неэффективной трансформации, вы переносите несколько клонов в жидкую среду и наращиваете массу бактерий для выделения содержащихся плазмид.

Московская олимпиада школьников по генетике, 02.04.2023.
Заключительный этап. Практический тур.
10-11 классы



Шифр _____

На следующем этапе вы выделяете плазмиды из этих клонов:

Клон	Флуоресценция	Название плазмиды
Клон 1	Светится в ультрафиолетовом свете	Плазмида 1
Клон 2	Колония светилась на твердой среде, однако после наращивания культуры бактерии потеряли способность к флуоресценции	Плазмида 2
Клон 3	Не светится в ультрафиолетовом свете	Плазмида 3
Клон 4	Светится в ультрафиолетовом свете	Плазмида 4

После выделения плазмиды вы проводите электрофорез, чтобы оценить концентрацию выделенной ДНК. На электрофореграмме вы замечаете, что Плазмида 4 значительно длиннее ожидаемой целевой плазмиды, поэтому её изучение вы откладываете на следующий раз. Оставшиеся **Плазмиды 1, 2 и 3** вы решаете изучить с помощью аналитической рестрикции по сайтам BamHI и HindIII.



Шифр _____

Задание 1. Аналитическая рестрикция

Аналитическая рестрикция - это метод, основанный на обработке ДНК эндонуклеазами рестрикции второго типа, который приводит к возникновению двухцепочечных разрывов ДНК в определенных местах. Эти ферменты распознают определенные палиндромные последовательности нуклеотидов (сайты рестрикции) в ДНК и разрезают обе цепи, зачастую в пределах этих последовательностей. Поскольку эти ферменты распознают последовательности в 4 и более специфических нуклеотидов, встречаемость сайтов рестрикции в ДНК несколько ограничена теорией вероятности, поэтому можно считать, что каждый фермент рестрикции обладает своим уникальным способом разрезания конкретной молекулы ДНК. Это значит, что с помощью рестрикции определенными рестриктазами можно отличить одну ДНК от другой, обращая также внимание на длины и подвижность полученных фрагментов ДНК на электрофореграмме.

Задание 1.1.

1. Выберите из имеющегося у вас списка реагентов все необходимые компоненты для проведения реакции рестрикции и укажите все эти компоненты в листе ответов (**1.1**). Количество строк дано с избытком.
2. Для каждого из компонентов рассчитайте требуемые количества. **Обратите внимание:** итоговый объем каждой реакции рестрикции должен составлять 40 мкл; для наиболее оптимальной визуализации при электрофорезе следует взять 240 нг ДНК на каждую реакцию рестрикции; на одну реакцию требуется 10 е.а. каждой из рестриктаз.
3. После расчета количества всех необходимых компонентов обратитесь к преподавателю для получения реактивов, которые хранятся в холодильнике.
4. Смешайте рестрикционные смеси согласно вашему плану.
5. Обратитесь к преподавателю в аудитории, чтобы он помог вам поставить пробирки в термостат. Проследите, чтобы номер с вашим рабочим местом был наклеен на термостат рядом с вашими пробирками.
6. Оставьте рестрикционные смеси инкубироваться при 37°C на 15-20 минут.
7. По окончании времени обратитесь к преподавателю, чтобы он выдал вам ваши пробирки.



Шифр _____

Теоретические задания по аналитической рестрикции

Задание 1.2 Для Плазмиды 4 вы также провели ряд аналитических рестрикций с использованием эндонуклеаз рестрикции BamHI, HindIII и Van91I. Результаты представлены в таблице.

Рестриктазы	Получаемые фрагменты
BamHI	1402, 4103
HindIII	1402, 4103
Van91I	376, 1026, 1117, 2986
BamHI+HindIII	701, 3402
BamHI +Van91I	188, 1026, 1117, 2798
HindIII+Van91I	376, 513, 604, 2986,

В листе ответов (1.2) нарисуйте полную карту рестрикции данной плазмиды с указанием положения сайтов рестрикции всех трех рестриктаз и расстояния между ними.

Задание 1.3. Для рестрикции в ходе практической части мы взяли заведомо избыточное количество рестриктаз, чтобы ускорить реакцию. Однако необходимое оптимальное количество можно рассчитать и теоретически.

Предположите и запишите в листе ответов (1.3), как количество единиц активности будет зависеть (не зависит/прямая зависимость/обратная зависимость) от количества ДНК, которое наносится на рестрикцию; длины обрабатываемой ДНК; числа сайтов рестрикции в обрабатываемой ДНК.

Задание 1.4. По определению 1 единица активности рестриктазы - это такое количество фермента, которое необходимо для полного расщепления ДНК фага лямбда в течении 1 часа. Длина ДНК фага лямбда приблизительно 48 т.п.о., для EcoRI у ДНК фага лямбда 5 сайтов рестрикции. Рассчитайте сколько единиц активности нужно на реакцию, чтобы порезать 1 мкг ДНК длиной 4,1 т.п.о., если в ней 1 сайт рестрикции EcoRI. Ответ укажите в листе ответов (1.4)



Шифр _____

Задание 2. Биоинформатика

Для того, чтобы определить причину свечения колоний, были получены последовательности плазмид из культур бактерий, которые способны к свечению (файл plasmid1.fa) и потерявших способность к свечению (файл plasmid2.fa).

Первым делом необходимо понять, какие функциональные элементы располагаются в плазмидах. Для этого можно воспользоваться программами, которые способны к ab-initio аннотации геномных последовательностей. Такие программы используют паттерны, которые характерны для регуляторных участков генов и фрагментов начала и конца генов.

Одной из таких программ является NCBI ORFfinder:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>

Задание 2.1. Перейдите на сайт программы ORFfinder. Скопируйте вашу последовательность первой плазмиды в формате .fasta* в поле ввода программы. Измените минимальную длину открытой рамки считывания на 150 нуклеотидов. Нажмите кнопку 'Submit'. Дождитесь перехода в окно результатов. Ответьте на вопросы.

2.1.1. Какое количество открытых рамок считывания (Open Reading Frames) было обнаружено программой? Укажите в листе ответов (2 балла)

2.1.2. Заполните таблицу в листе ответов (Используйте столько строк, сколько необходимо) (10 баллов).

Задание 2.2. Для того, чтобы определить, какой ген ответственен за свечение у бактерий, можно воспользоваться поиском по гомологии для установления функций аннотированных последовательностей. Для этого можно использовать программу BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Так как мы будем использовать белковые последовательности, то воспользуемся программой blastp (выберите раздел protein blast в интерактивном меню).



Шифр _____

Скопируйте самую длинную белковую последовательность из вкладки ORFfinder. Для этого оцените, какая из последовательностей самая длинная (используя таблицу из задания 2.1.2), а затем кликните мышью на соответствующую рамку считывания.

Скопированная последовательность должна быть в .fasta* формате и иметь вид:

```
>lc1|ORF2
MRDITMPVAMATTLRKLTLGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPLLRSAIPAGWFIADKSGAGERGSRG
IIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQAAMDERNRQIAEIGASLIKHW
```

Перейдите во вкладку программы BLASTP. Вставьте в поле для поиска скопированную последовательность. В разделе Database выберите Non-redundant protein sequences (nr). В разделе Algorithm выберите Quick BLASTP (Accelerated protein-protein BLAST).

Если выбор сделан верно, то должна появиться следующая строчка:



Нажмите на кнопку BLAST и дождитесь результатов (время ожидания может достигать нескольких минут).

2.2.1. Перейдите во вкладку descriptions. Какой источник является наиболее вероятным по данным алгоритма blastp для данной последовательности? Укажите в листе ответов.

2.2.2. Перейдите во вкладку alignments. Эта вкладка представляет собой подробную визуализацию выравниваний последовательностей, которые представлены на вкладке descriptions. Score – это счет, который получается при выравнивании вашей последовательности с определенной последовательностью из базы данных. В скобках указан ненормализованный счет (raw score). Снаружи от скобок указан нормализованный счет (bit score). Query – последовательность интереса (та, которую вы загрузили в программу). Sbjct – последовательность из базы данных, с которой производилось выравнивание.



Шифр _____

Score
588 bits(1515)

Query 1

Sbjct 1

Для первой последовательности во вкладке alignments запишите длину выравнивания, количество совпадений, количество несовпадений, количество пропусков и нормализованный счет выравнивания. Заполните таблицу в листе ответов.

2.2.3. Для оценки статистической значимости находки программа blastp использует параметр e-value. В упрощенном понимании, это ожидаемое число находок при определенной длине базы данных (n), длине последовательности (m) и счете, который выдает программа blast при сравнении последовательностей (S'). Параметр e-value рассчитывается следующим образом:

$$E = m \cdot n \cdot 2^{-S'}$$

Представим себе, что вы получили значение e-value 10^{-12} . Для первой последовательности оцените размер базы данных n, которую вы использовали для поиска. Запишите значение в лист ответов.

2.2.4. Для всех обнаруженных открытых рамок считывания заполните таблицу в листе ответов по результатам blast'a (необходимо запустить программу несколько раз). (Используйте столько строк, сколько необходимо) (10 баллов).

2.2.5. На основании заполненной таблицы в пункте 2.2.4 предположите, какой из белков, кодируемых плазмидой, ответственен за свечение бактериальной колонии. (3 балла).

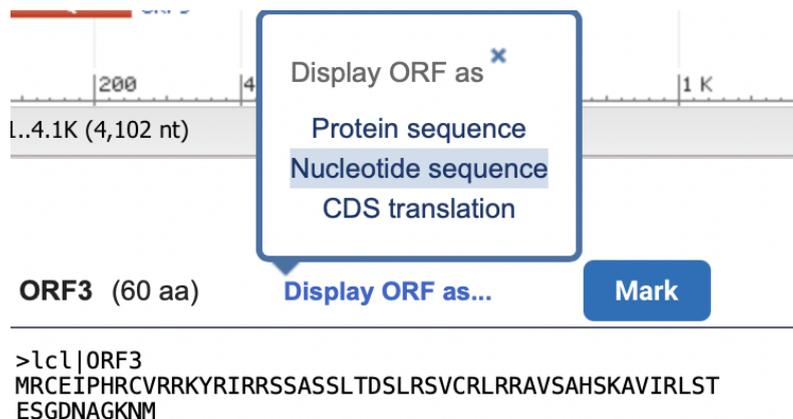


Шифр _____

Задание 2.3. Теперь предстоит понять, почему вторая колония бактерий потеряла способность к свечению. Для этого загрузите последовательность плазмиды, выделенной из колонии бактерий, которые потеряли способность к свечению (plasmid2.fa), в программу ORFfinder: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>.

Для этого скопируйте вашу последовательность второй плазмиды в формате .fasta* в поле ввода программы. Измените минимальную длину открытой рамки считывания на 300 нуклеотидов. Нажмите кнопку 'Submit'. Дождитесь перехода в окно результатов.

Скопируйте последовательность открытой рамки считывания (нуклеотиды) белка, который предположительно ответственен за свечение из плазмиды 1. Для этого зайдите во вкладку результатов первого запуска ORFfinder и для соответствующей рамки считывания выберите параметр 'Display ORF as nucleotide sequence' (см. изображение).



Должна быть скопирована последовательность следующего вида:

```
>lcl|ORF3 CDS
ATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAG
GCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTCGGC
TGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA
GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGA
```

Перейдите в программу для парного выравнивания, которая использует алгоритм Нидлмана-Вунша: https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/



Шифр _____

Выберите тип последовательностей DNA. В качестве первой последовательности вставьте таргетный ген (предположительно ответственный за свечение) из первой плазмиды.

В качестве второй последовательности скопируйте гомологичную рамку считывания из плазмиды второй группы (ту рамку, которая, по-видимому, соответствует гену в плазмиде 1). Считайте, что ориентация нуклеотидной последовательности плазмид одинакова.

В параметрах выравнивания замените параметр Gap Open Penalty на 100.

Нажмите кнопку 'Submit'. Дождитесь появления результата (Процесс может занимать несколько минут).

2.3.1. Внимательно изучите полученное парное выравнивание. Определите длину последовательности из первой и второй плазмиды, а также длину и счет выравнивания.

2.3.2. На основании выравнивания предположите, почему вторая плазида не может обеспечить свечение бактериальных клеток. Для ответа можно использовать таблицу генетического кода.

Генетический код (иРНК)

Первое основание	Второе основание				Третье основание
	У	Ц	А	Г	
У	Фен	Сер	Тир	Цис	У
	Фен	Сер	Тир	Цис	Ц
	Лей	Сер	—	—	А
	Лей	Сер	—	Три	Г
Ц	Лей	Про	Гис	Арг	У
	Лей	Про	Гис	Арг	Ц
	Лей	Про	Глн	Арг	А
	Лей	Про	Глн	Арг	Г
А	Иле	Тре	Асн	Сер	У
	Иле	Тре	Асн	Сер	Ц
	Иле	Тре	Лиз	Арг	А
	Мет	Тре	Лиз	Арг	Г
Г	Вал	Ала	Асп	Гли	У
	Вал	Ала	Асп	Гли	Ц
	Вал	Ала	Глу	Гли	А
	Вал	Ала	Глу	Гли	Г



Шифр _____

Задание 3. Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез - это метод, основанный на разделении молекул в электрическом поле. Молекулы нуклеиновых кислот, благодаря остаткам фосфорной кислоты в их составе, обладают равномерно распределенным отрицательным зарядом. Это придает нуклеиновым кислотам подвижность в электрическом поле. В процессе электрофореза нуклеиновые кислоты погружаются в плотную среду с гомогенной трехмерной структурой - агарозный гель. Скорость движения нуклеиновых кислот в плотной среде пропорциональна их длине. Благодаря этому, электрофорез позволяет разделять фрагменты ДНК, отличающиеся по длине.

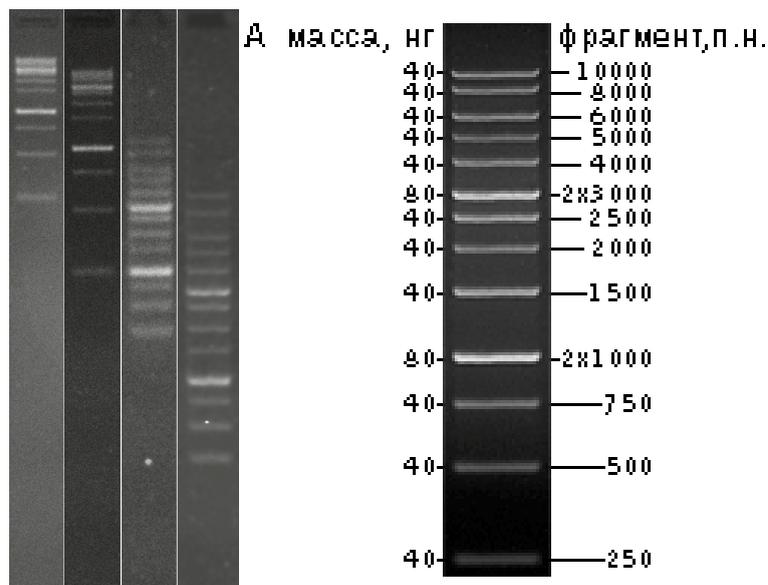
1. Смешайте четырехкратный (4x) буфер для нанесения с образцом в количестве, необходимом для достижения рабочей концентрации буфера (1x). Обратите внимание, что максимальный объем нанесения в лунку - 20 мкл. Для большей четкости электрофореграммы мы советуем наносить максимально возможное количество.
2. В качестве контроля правильного нанесения возьмите 6 мкл Плазмиды 1, смешайте с необходимым количеством буфера для нанесения.
Укажите в листе ответов **(3.1)**, сколько микролитров рестрикционной смеси и буфера для нанесения вы возьмете для каждого из образцов.
3. Обратитесь к преподавателю в аудитории и нанесите по 20 мкл каждого образца, смешанного с буфером для нанесения, в указанные преподавателем лунки геля.**(3.2)**
4. После окончания электрофореза вы получите распечатанную фотографию вашего геля для анализа.
5. Вклейте фотографию в бланк ответов **(3.3)**.
6. Используя электрофореграмму и схему маркеров длин, постройте калибровочную кривую, а затем по ней вычислите размер всех фрагментов для каждой лунки. Укажите экспериментально полученные размеры в листе ответов **(3.4)**, в отдельных ячейках по порядку (от самого большого к самому маленькому в столбце).
7. Калибровочную кривую приложите к бланку ответов.



Шифр _____

Теоретические задание по электрофорезу

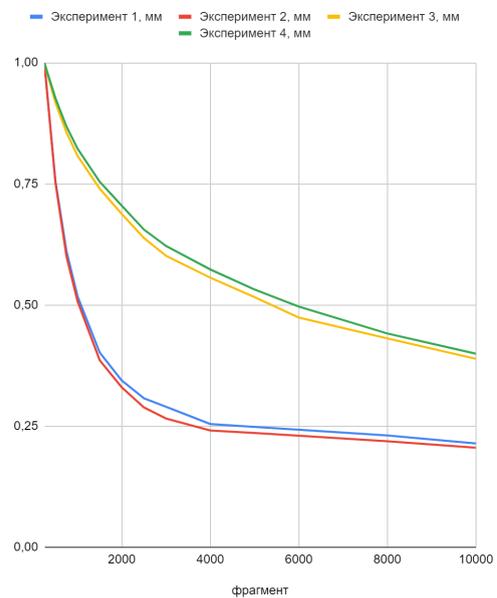
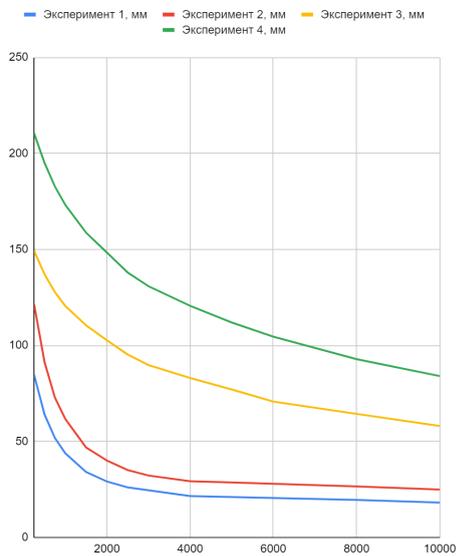
Задание 3.5 Перед вами электрофореграммы неких маркеров длин, а также расшифровка визуализации, представленная производителем этого маркера. Электрофорез маркеров длин проводился при разных условиях: длительность 15 или 30 минут, плотность геля 0,5 или 1,5% агарозы.



Помимо этого, перед вами графики калибровочных кривых, построенных в следующих координатах: зависимость абсолютной длины пробега ДНК от длины фрагмента ДНК в п.о. (слева); относительная длина пробега (абсолютная длина пробега в мм / абсолютную длину пробега наименьшего фрагмента) от длины фрагмента ДНК в п.о (справа).



Шифр _____



Ответьте на вопросы:

Какие координаты лучше использовать для построения калибровочной кривой и почему? (3.5.1)

Исходя из графиков, предположите какие параметры геля и времени были в эксперименте 4? (3.5.2)

Для каких фрагментов ДНК следует использовать 0,5% гели и почему? (3.5.3)

По своей калибровочной кривой предположите, какую процентность (0,5 или 1,5%) имел гель использованный в практической части? (3.4.4)